

UNIVERSITÉ DE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département des Biotechnologies

MEMOIRE DE MAGISTER

en Sciences Agronomiques

Spécialité : Amélioration des productions végétales

PROPAGATION *IN VITRO* DE QUELQUES VARIETES AUTOCHTONES D'OLIVIER

Par

Kamel Zinelabidine MERBAH

Devant le jury composé de :

| | | | |
|---------------|-------------------------|-----------|-------------------|
| M. BENMOUSSA | Professeur | U Blida 1 | Président de jury |
| A. BOUTEKRABT | Professeur | U Blida 1 | Promoteur |
| K. KAMELI | Professeur | ENS Kouba | Examineur |
| A. AISSAT | Maitre de conférences A | U Blida 1 | Examineur |
| B. HADDAD | Maitre-assistant A | UDB KM | Invité |

Blida, juin 2015

RESUME

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation et la préservation des ressources génétiques locales de l'olivier (*Olea europaea* L.). Il consiste en l'étude de la micropropagation de quatre variétés autochtones à partir de leurs bourgeons axillaires.

Les explants ont été initiés *in vitro* à partir des pousses de l'année des variétés autochtones Chemlal, Limli, Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana sur milieu MS modifié (MSM) (LEVA et al, 1995) additionné ou non de deux concentrations de zéatine (1 et 2 mg/l). Le débourrement a été influencé par le génotype et les taux les plus élevés ont été obtenus avec les variétés Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana (respectivement 90,86 et 90,96%). Ces mêmes variétés ont enregistré les taux de pousses les plus importants avec 2mg/l de zéatine (41,00 et 27,49%).

Après deux mois de culture dans la phase d'élongation, les paramètres longueur des pousses, le nombre de feuilles ont réagi proportionnellement avec l'augmentation de la concentration de la zéatine et ce, pour les quatre génotypes étudiés. De même pour le nombre de pousses développées par explant à l'exception de la variété Chemlal. Le nombre de pousses supérieures ou égales à un centimètre a été influencé par la zéatine et le meilleur résultat est obtenu avec 2mg/l pour tous les génotypes à l'exception de la variété Ronde de Miliana où la concentration de 1mg/l de zéatine a donné le meilleur résultat. La variété Limli a donné une réponse défavorable dans cette phase.

La rhizogénèse a été étudiée en utilisant l'ANA comme auxine avec quatre concentrations différentes (0, 1, 2 et 4 mg/l) sur les trois variétés restantes. Les racines se sont développés sur les variétés Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana cultivées dans 1, 2 et 4 mg/l alors que la variété Chemlal a initié des racines uniquement avec 4mg/l d'ANA et ce, avec le même pourcentage d'enracinement qui était de 40%. L'ANA a permis d'augmenter significativement la longueur moyenne des racines. Les racines les plus longues sont obtenues avec 4mg/l. Une interaction significative a été observée entre le génotype et la concentration d'ANA pour le nombre moyen de racines développées.

Les taux de survie des pousses enracinées lors de la phase d'acclimatation ont été assez faibles (0-25%) durant le premier mois de leur transfert *ex vitro*. Les plants des variétés Blanquette de Guelma et Ronde de Milian issus des concentrations 2 et 4mg/l d'ANA ont continué normalement leur croissance dans la serre d'acclimatation donnant après six mois, des longueurs allant de 10 à 16 cm et 15 à 21 feuilles.

Mots clés : *Olea europaea* L., micropropagation, variété autochtone, zéatine, rhizogénèse.

ABSTRACT

This work is within the scope of the valorization and preservation of local genetic resources of the olive tree (*Olea europaea* L.). It consists in to the study of micropropagation of four autochthonous varieties from their axillary buds.

The explants were initiated in vitro from the shoots of the year of autochthonous varieties Chemlal, Limli, Blanquette of Guelma and Ronde of Miliana on modified MS medium (MSM) (LEVA et al, 1995), whether or not two concentrations of zeatin (1 and 2 mg/l). Bud was influenced by the genotype and the highest rates were obtained with Blanquette of Guelma and Ronde of Miliana varieties (90.86 and 90.96% respectively). Those varieties recorded the highest rates of shoot with 2mg/l of zeatin (41.00 and 27.49%).

After two months of culture in the elongation phase, the length settings of shoots, the number of leaves and the number of shoots greater than or equal to one centimeter shoots reacted proportionally with the increase of the concentration of zeatin and that, for the four genotypes studied. The same applies to the number of shoots developed per explant with the exception of the Chemlal variety. Variety Limli gave an unfavorable response in this phase.

Rhizogenesis was studied using NAA as auxin with four different concentrations (0, 1, 2 and 4 mg / l) on the remaining three varieties.

The roots have developed on the Blanquette of Guelma and Ronde of Miliana varieties grown in 1, 2 and 4 mg/l, while the variety Chemlal initiated its roots only with 4mg/l of NAA and this, with the same percentage rooting which was 40%. The NAA has significantly increased the average length of the roots. The longest roots are obtained with 4 mg/l. A significant interaction was observed between genotype and the concentration of NAA for the average developed root.

The monitoring of shoots rooted in the acclimatization phase showed relatively low survival rates (0-25%) in the first months of their ex vitro transfer. Plants of varieties of Blanquette of Guelma and Ronde of Miliana from 2 and 4 mg/l NAA concentrations continued to grow normally in the greenhouse

acclimatization giving after six months lengths ranging from 10 to 16 cm with 15-21 sheets.

Keywords: *Olea europaea* L., micropropagation, autochthonous variety, zeatin, rooting.

ملخص

بههدف تثمين و حماية المصادر الوراثية المحلية لشجر الزيتون (*Olea europaea L.*) قمنا باستخدام تقنية الزراعة العضوية (الزراعة المخبرية) لبراعم جانبية لأربع أصناف محلية للزيتون الجزائري.

تمت الزراعة المخبرية لبراعم جانبية منتقاة من الفروع السنوية للأصناف المحلية شمالاً، ليملي، بلونكات دو قالمة وروند دو مليانة في وسط زراعي MS معدل (MSM) (ليفا وآخرون، 1995) بدون أو مع إضافة الزياتين (1 و 2 ملغ/ لتر).

تأثر التبرعم بالنمط الجيني حيث تم تسجيل أعلى معدلات التبرعم مع الصنفين بلونكات دو قالمة وروند دو مليانة (90.86 و 90.96 % على التوالي). نفس هاته الأصناف سجلت أهم معدلات الانبات مع 2 ملغ/ لتر من الزياتين (41.00% و 27.49 %).

بعد شهرين من الزراعة في مرحلة الاستطالة، تأثر بالتناسب كل من طول الفروع، عدد الأوراق و عدد الفروع التي تساوي أو تفوق واحد سنتيمتر مع الرفع من تركيز الزياتين و ذلك بالنسبة للأصناف الأربعة المحلية المدروسة و ينطبق ذلك أيضاً على عدد الفروع النامية الموجودة في كل برعم باستثناء صنف شمالاً. نتائج الصنف ليملي كانت سيئة للغاية في هذه المرحلة

تمت دراسة تشكل الجذور باستخدام NAA كأوكسين بأربع تركيزات مختلفة (0، 1، 2 و 4 ملغ / لتر) مع الأصناف الثلاثة المتبقية .

نمت الجذور في كل من بلونكات دو قالمة وروند دو مليانة المزروعة في 1، 2 و 4 ملغ/ لتر في حين أن الصنف شمالاً أخرج جذورا فقط مع 4 ملغ/ لتر من NAA و ذلك مع نفس نسبة التأصيل (40 %). سمحت الاوكسين NAA بزيادة كبيرة في متوسط طول الجذور، حيث تم الحصول على أطول الجذور مع تركيز 4 ملغ/ لتر. و قد لوحظ أيضاً وجود تفاعل كبير بين النمط الجيني وتركيز NAA لمتوسط عدد الجذور النامية.

أظهرت متابعة النبيتات المتجذرة في مرحلة التأقلم معدلات منخفضة نسبياً (0-25%) في البقاء على قيد الحياة في الشهر الأول من نقلهم خارج الزجاج. نباتات الصنفان بلونكات دو قالمة وروند دو

مليانة المتحصل عليها من 2 و4 ملغ/ لتر من NAA استمرت في النمو في بيوت التأقلم و قد أعطت بعد ستة أشهر أطوال تتراوح من 10 إلى 16 سم مع 15 إلى 21 ورقة.

كلمات مفتاحية: *Olea europaea* L ، الإكثار الدقيق في المختبر، أصناف محلية، الزياتين، التأصيل.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie le Bon Dieu de m'avoir donné la volonté et l'énergie pour réaliser ce modeste travail.

En premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Pr BOUTEKRABT A. d'avoir accepté la direction de ce travail et le remercie infiniment pour ses encouragements et précieux conseils.

Ma gratitude va aussi à Mr HADDAD B. pour son assistance, son omniprésence et sa patience tout au long de ce travail.

Je dois exprimer, aussi, mes vifs remerciements à Monsieur BENMOUSSA M. de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Mes remerciements vont également au Pr KAMELI K. d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Mes remerciements vont aussi au Dr AISSAT A. d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens également à exprimer ma sincère gratitude à Mme HADDAD N. de m'avoir accueilli dans le laboratoire de la culture *in vitro* de l'ITAFV et la remercie pour ses encouragements et conseils qu'elle n'a cessé de me les prodiguer tout au long de mon expérimentation.

Je ne dois pas omettre de remercier toute l'équipe du laboratoire de la culture *in vitro* de l'ITAFV et particulièrement Mmes TAIBI A. et BOUKHALFA S. pour leur gentillesse et disponibilité.

Enfin, à toute ma chère famille que je prie de trouver ici mes sentiments les plus profonds.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----|
| RESUME | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| ملخص | 5 |
| REMERCIEMENTS | 7 |
| TABLE DES MATIERES | 8 |
| LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX | 11 |
| LISTE DES APPENDICES | 14 |
| INTRODUCTION | 15 |
| CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE | 17 |
| 1.1 Importance de l'oléiculture dans le monde et en Algérie | 17 |
| 1.1.1. Oléiculture et production mondiale | 17 |
| 1.1.2. Oléiculture et production en Algérie | 19 |
| 1.1.2.1 Production nationale | 19 |
| 1.1.2.2 Répartition géographique de l'oléiculture en Algérie | 21 |
| 1.1.2.3 Variétés cultivées | 23 |
| 1.2 Présentation générale de l'olivier | 26 |
| 1.2.1 Origine de l'olivier | 26 |
| 1.2.2 Caractéristiques botaniques | 26 |
| 1.2.3 Caractéristiques morphologiques | 27 |
| 1.2.3.1 Système racinaire | 28 |
| 1.2.3.2 Système aérien | 29 |
| 1.2.4 Caractéristiques physiologiques | 33 |
| 1.2.4.1 Cycle de développement | 33 |
| 1.2.4.1.1 Période de jeunesse | 34 |
| 1.2.4.1.2 Période d'entrée en production | 34 |
| 1.2.4.1.3 Période adulte | 34 |
| 1.2.4.1.4 Période de sénescence | 34 |
| 1.2.4.2 Cycle végétatif annuel | 34 |
| 1.2.5 Exigences écologiques | 38 |
| 1.2.5.1 Exigences climatiques | 38 |

| | |
|--|----|
| 1.2.5.2 Exigences édaphiques | 39 |
| 1.2.6 Multiplication de l'olivier | 40 |
| 1.2.6.1 Multiplication traditionnelle | 40 |
| 1.2.6.2 Multiplication moderne | 42 |
| 1.3 Généralités sur la propagation <i>in vitro</i> | 45 |
| 1.3.1 Principales techniques de la culture <i>in vitro</i> | 45 |
| 1.3.1.1 Microbouturage | 45 |
| 1.3.1.2 Culture de méristème | 46 |
| 1.3.1.3 Embryogenèse somatique | 47 |
| 1.3.1.4 Culture de protoplaste | 48 |
| 1.3.1.5 Culture de grain de pollen et d'ovules | 49 |
| 1.3.2 Exigences de la culture <i>in vitro</i> | 49 |
| 1.3.2.1 Milieux de culture | 49 |
| 1.3.2.2 Facteurs physiques de l'environnement des cultures | 54 |
| 1.3.3 Avantages et contraintes de la culture <i>in vitro</i> | 54 |
| 1.3.4 Phases du microbouturage | 55 |
| 1.3.4.1 Phase de conditionnement des plantes mères | 55 |
| 1.3.4.2 Phase d'établissement ou d'initiation | 56 |
| 1.3.4.3 Phase de multiplication | 56 |
| 1.3.4.4 Phase d'élongation | 57 |
| 1.3.4.5 Phase d'enracinement | 57 |
| 1.3.4.6 Phase d'acclimatation | 59 |
| CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES | 61 |
| 2.1 Objectif du travail | 61 |
| 2.2 Matériel végétal | 61 |
| 2.3 Méthodes et techniques expérimentales | 62 |
| 2.3.1 Milieux de culture | 62 |
| 2.3.2 Préparation et mise en culture du matériel végétal | 63 |
| 2.3.2.1 Phase d'initiation | 63 |
| 2.3.2.2 Phase d'élongation | 66 |
| 2.3.2.4 Phase d'enracinement | 67 |
| 2.3.2.5 Phase d'acclimatation | 69 |
| 2.3.2.6 Paramètres étudiés (variables étudiées) | 70 |

| | |
|---|-----|
| 2.4 Analyses statistiques | 71 |
| CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS | 72 |
| 3.1 Phase d'initiation | 72 |
| 3.1.1 Taux de débourrement total des explants (%) | 73 |
| 3.1.2 Taux de pousses (%) | 74 |
| 3.1.4 Taux de brunissement des explants (%) | 78 |
| 3.1.5 Etude de la vitesse de débourrement | 79 |
| 3.1.5.1 Séjour au premier débourrement | 80 |
| 3.1.6 Discussion | 82 |
| 3.2 Phase d'élongation (phase d'allongement) | 85 |
| 3.2.1 Longueur moyenne des pousses | 87 |
| 3.2.2 Nombre moyen de feuilles par explant | 90 |
| 3.2.3 Nombre moyen de pousses par explant | 93 |
| 3.2.4 Taux de survie après transplantation (%) | 95 |
| 3.2.5 Nombre de pousses ≥ 1 cm (%) | 97 |
| 3.2.6 Etude du rythme de croissances | 99 |
| 3.2.7 Discussion | 101 |
| 3.3 Phase d'enracinement | 105 |
| 3.3.1 Taux de callogénèse (%) | 106 |
| 3.3.2 Pourcentage d'enracinement des pousses | 109 |
| 3.3.3 Nombre moyen de racines par pousse | 112 |
| 3.3.4 Longueur moyenne des racines par pousse | 114 |
| 3.3.5 Discussion | 116 |
| 3.4. Phase d'acclimatation | 122 |
| 3.4.1 Taux de survie (%) | 122 |
| 3.4.2 Longueur de la tige et nombre de feuilles par plant | 124 |
| 3.4.3 Discussion | 125 |
| CONCLUSION | 129 |
| APPENDICES | 133 |
| REFERENCES | 143 |

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Figure 1.1 : Carte oléicole mondiale | 17 |
| Figure 1.2 : Evolutions des surfaces cultivées, production et rendements en olive en Algérie (2003-2012) | 19 |
| Figure 1.3 : Répartition des zones géographiques de l'oléiculture algérienne | 22 |
| Figure 1.4 : Aspect morphologique d'un arbre d'olivier | 28 |
| Figure 1.5 : Tronc d'olivier sinueux et crevassé | 29 |
| Figure 1.6 : Feuilles de l'olivier | 30 |
| Figure 1.7 : Rameau fructifère de l'olivier | 31 |
| Figure 1.8 : Grappes florales de l'olivier | 32 |
| Figure 1.9 : Fleurs de l'olivier | 32 |
| Figure 1.10 : Fruit de l'olivier | 33 |
| Figure 1.11 : Cycle végétatif et reproducteur de l'olivier | 36 |
| Figure 1.12 : Bouturage horizontale, verticale et en garrotte | 41 |
| Figure 2.1 : Serre de forçage des plants d'olivier | 62 |
| Figure 2.2 : Désinfection du matériel végétal | 64 |
| Figure 2.3 : Etablissement de la culture | 65 |
| Figure 2.4 : Elongation des pousses | 66 |
| Figure 2.5 : Enracinement des pousses | 68 |
| Figure 2.6 : Acclimatation des plantules | 70 |
| Figure 3.1 : Débourrement des bourgeons axillaires | 72 |
| Figure 3.2 : Effet du génotype sur le pourcentage de débourrement | 73 |
| Figure 3.3 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur le taux de pousses | 75 |
| Figure 3.4 : Débourrement des explants après quatre semaines de culture : variétés Chemla et Limli | 77 |
| Figure 3.5 : Débourrement des explants après quatre semaines de culture : variétés Ronde de Miliana et Blanquette de Guelma | 77 |
| Figure 3.6 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur le taux de brunissement | 78 |
| Figure 3.7 : Evolution quotidienne de débourrement des explants | 79 |

| | |
|--|-----|
| Figure 3.8 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur le séjour au premier débourrement | 81 |
| Figure 3.9 : Callogénèse à la base des explants | 86 |
| Figure 3.10 : Vitrification et callogénèse sur la base des explants | 86 |
| Figure 3.11 : Callogénèse sur l'apex et nécrose des explants | 87 |
| Figure 3.12 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur la longueur des pousses après 60 jours d'élongation | 88 |
| Figure 3.13 : Allongement des pousses après 60 jours de d'élongation | 90 |
| Figure 3.14 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur le nombre moyen de feuilles par explant | 91 |
| Figure 3.15 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur le nombre moyen de pousses par explant | 93 |
| Figure 3.16 : Nombre de pousses obtenues | 95 |
| Figure 3.17 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur le taux de survie | 96 |
| Figure 3.18 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur le nombre de pousses 1 cm | 98 |
| Figure 3.19 : Rythme de croissance des explants en fonction des jours | 100 |
| Figure 3.20 : Observation de l'initiation de la callogénèse après 7 jous d'obscurité | 106 |
| Figure 3.21 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur le développement de cal à la base des pousses | 107 |
| Figure 3.22 : Effet du génotype sur l'enracinement des pousses | 110 |
| Figure 3.23 : Effet de la concentration de l'auxine ANA sur l'enracinement des pousses | 111 |
| Figure 3.24 : Effet de la concentration de l'auxine ANA sur le nombre moyen de racines par pousse | 112 |
| Figure 3.25 : Aspect des cals et enracinement des pousses à la fin de la phase de l'enracinement | 114 |
| Figure 3.26 : Effet de la concentration de l'auxine ANA sur la longueur moyenne des racines par pousse | 115 |
| Figure 3.27 : Taux de survie des plantules après trente jours de préacclimatation | 123 |
| Figure 3.28 : Plantules après un mois de pré-acclimatation | 124 |

| | |
|--|-----|
| Figure 3.29 : Résultats obtenus à l'issue de six mois d'acclimatation | 124 |
| Figure 3.30 : Plants d'olivier obtenus après 6 mois d'acclimatation | 125 |
| Tableau 1.1 : Principaux pays producteurs d'olive | 18 |
| Tableau 1.2 : Evolution de la production oléicole en Algérie (2003-2012) | 21 |
| Tableau 1.3 : Quelques variétés autochtones d'olivier cultivées en Algérie | 25 |
| Tableau 1.4 : Classification de l'olivier | 27 |
| Tableau 2.1 : Traitements étudiés lors de la phase de mise en culture et d'élongation | 67 |
| Tableau 2.2 : Traitements étudiés dans la phase d'enracinement | 69 |
| Tableau 3.1 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour les taux de débourrement | 74 |
| Tableau 3.2 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour les taux de pousses | 76 |
| Tableau 3.3 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour la longueur moyenne des pousses | 89 |
| Tableau 3.4 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour nombre moyen de feuilles | 92 |
| Tableau 3.5 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour le nombre moyen de pousses par explants | 95 |
| Tableau 3.6 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour le taux de survie des explants | 97 |
| Tableau 3.7 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour le nombre moyen de pousses de taille supérieure ou égale à 1 cm | 99 |
| Tableau 3.8 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour le pourcentage de pousses avec cal | 109 |
| Tableau 3.9 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour le pourcentage d'enracinement | 112 |
| Tableau 3.10 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour le nombre moyen de racines par pousse | 114 |
| Tableau 3.11 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour la longueur moyenne des racines obtenues par pousse | 116 |

LISTE DES APPENDICES

| | |
|--|-----|
| APPENDICE A : COMPOSITION DE LA SOLUTION Knop | 133 |
| APPENDICE B : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE MS MODIFIE (LEVA et <i>al</i> , 1995) (MSM) | 134 |
| APPENDICE C : RYTHME DE DEBOURREMENT | 135 |
| APPENDICE D : RYTHME DE CROISSANCE | 137 |
| APPENDICE E : TABLEAUX DE L'ANOVA | 137 |
| APPENDICE F : LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS | 141 |

INTRODUCTION

L'olivier (*Olea europaea* L.) est l'une des plantes les plus anciennes et les plus cultivées dans le bassin méditerranéen [1]. En Algérie, l'oléiculture revêt une grande importance socio-économique. Elle est constituée de 42 557 070 arbres à travers le territoire national sur une superficie de 328 884 ha soit, 130 arbre/ha occupant ainsi 38,7 % de la superficie totale consacrée aux cultures pérennes [2].

Le secteur de l'olivier, malgré ses potentialités importantes, n'arrive toujours pas à répondre aux besoins croissants de la population algérienne notamment en huile alimentaire. Cette situation résulte du fait que l'oliveraie nationale souffre de différentes contraintes liées, d'une part, aux conditions pédoclimatiques pas toujours favorables et d'autre part, au manque de soins sanitaires, à la non maîtrise d'itinéraires techniques adéquats et à la non disponibilité de matériel végétal performant.

Cependant, on enregistre, ces dernières années un regain d'intérêt pour la culture de l'olivier en Algérie pour son aspect socio-économique et environnementale et aux qualités nutritionnelles de l'huile d'olive. Une prise de conscience s'est opérée récemment à ce sujet en matière d'amélioration de la conduite du verger et de son extension sur des terres où l'intensification de la production est possible [3].

En effet, l'oléiculture est considérée aujourd'hui comme étant une des filières stratégiques dans l'économie du pays. Pour ce faire, une nouvelle approche a été initiée par le MADR dans la cadre de son programme de renouveau de l'économie agricole et rurale qui vise, principalement, l'extension du verger oléicole et la valorisation des ressources génétiques locales de l'olivier.

Concernant la réhabilitation et le développement de l'oléiculture algérienne, un projet de développement et d'extension de la filière a été entamé, à cet effet, par l'ITAFV en l'an 2009 avec, pour objectif principal, la réalisation de 1 million d'hectares à l'horizon 2019.

Néanmoins, la réussite de tout programme de réhabilitation ou de plantation reste tributaire à la mise en place de techniques de production en masse de plants sains et de meilleure qualité.

La maîtrise et l'introduction des techniques modernes de multiplication sont exigées pour rendre performant le secteur. Parmi ces dernières, la multiplication *in vitro* de l'olivier offre plusieurs avantages par rapport à la multiplication classique, notamment en matière de propagation conforme et intense du matériel végétal et d'assainissement des arbres virosés dans un temps très réduit.

Près de 25 cultivars d'olivier étrangers ont été multipliés *in vitro* avec succès. Toutefois, les cultivars les mieux étudiés sont Oueslati, Zard, Rowghani, Moraiolo, Dolce agogia, Leccino, Coratina, Nocellara, et Pendolino [4].

Il serait donc intéressant de mener une étude sur l'aptitude de la régénération *in vitro* des variétés autochtones algériennes d'olivier dans le but de leur valorisation et leur préservation contre l'érosion génétique.

La présente étude entre dans ce contexte et vise à contribuer à l'élaboration d'un protocole permettant de micropropager efficacement l'olivier autochtone par la technique du microbouturage par l'étude de l'influence de deux principaux facteurs : le génotype et la composition hormonale du milieu de culture.

A cet effet, notre étude sera structurée en trois parties :

- Une partie bibliographique sur l'importance économique de l'olivier, ses caractéristiques, les techniques de sa multiplication et la propagation *in vitro* ;
- Une partie expérimentale portant sur le matériel et méthodes utilisés ;
- Une partie d'interprétation et de discussion des résultats obtenus avec une conclusion.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Importance de l'oléiculture dans le monde et en Algérie

1.1.1 Oléiculture et production mondiale

L'olivier connaît une extension progressive à travers le monde. Durant les dernières années, plusieurs pays non méditerranéens ont tendance à développer cette culture dans certaines régions spécifiques de leur territoire. Les pays méditerranéens, restent prédominants avec plus de 95% de la production d'huile d'olive et avec environ 90% de sa consommation [5].

Dans la figure 1.1, sont représentées les zones de production oléicole mondiale.



Figure 1.1 : Carte oléicole mondiale [6].

Dans le tableau 1.1 sont représentées les surfaces cultivées ainsi que les productions d'olive chez les 10 principaux pays producteurs d'olive dans le monde durant la campagne de 2012.

Tableau 1.1 : Principaux pays producteurs d'olive en 2012 [7].

| Pays | Production (tonnes) | Pourcentage (%) de la production mondiale | Surface cultivée (Ha) | Pourcentage (%) de la surface oléicole mondiale |
|-----------------|----------------------------|--|------------------------------|--|
| Espagne | 3626600 | 21,90 | 2427500 | 23,80 |
| Italie | 3017537 | 18,22 | 1125382 | 11,03 |
| Grèce | 2080800 | 12,56 | 934400 | 9,15 |
| Turquie | 1820000 | 10,99 | 805500 | 7,89 |
| Maroc | 1315794 | 7,94 | 968123 | 9,48 |
| Syrie | 1049761 | 6,39 | 695711 | 6,81 |
| Tunisie | 963000 | 5,81 | 1800000 | 17,64 |
| Égypte | 465000 | 2,80 | 55000 | 0,53 |
| Algérie | 393840 | 2,37 | 328884 | 3,22 |
| Portugal | 389900 | 2,35 | 345700 | 3,38 |
| / | / | / | / | / |
| Monde | 16558175 | 100 | 10201775 | 100 |

Le tableau 1.1 montre que l'Espagne occupe la première place en termes de surface cultivée avec une superficie de 2427500 ha secondée par la Tunisie avec 1800000 ha suivie en troisième position de l'Italie avec 1125382 ha puis le Maroc et la Grèce avec respectivement 968123 et 934400 ha. L'Espagne, l'Italie et la Grèce occupent presque 40% de la superficie oléicole mondiale et sont les trois meilleurs producteurs d'olive dans le monde. En effet, le tableau 1.1 montre que l'Espagne est le premier producteur d'olive dans le monde, grâce aux 3626600 tonnes d'olive produites, suivie de l'Italie et de la Grèce avec respectivement

3017537 et 2080800 tonnes. Ces trois pays produisent 52,68 % d'olive dans le monde. L'Algérie est placée en 9^{ème} position avec 393840 tonnes (2,37%) et une surface de 328884 ha (3,22%).

1.1.2. Oléiculture et production en Algérie

En Algérie, l'oléiculture compte 42 557 070 arbres à travers le territoire national dont 37 360 140 oliviers en masse (verger) et 5 196 930 d'oliviers en isolés [2]. Elle occupe une place de choix dans le processus de la relance économique dans notre pays. Elle occupe 38,7 % de la superficie totale consacrée aux cultures pérennes et donc la première place avant les agrumes et la vigne [2].

1.1.2.1. Production nationale

Au cours de la décennie 2003/2012 la production moyenne d'olive est de 3304258,6 qx alors qu'elle était de 2237023 qx dans la décennie 1993/2002 [7]. Soit une augmentation de 47,70%.

L'évolution des surfaces cultivées, des productions et des rendements sont représentés dans la figure 1.2 :

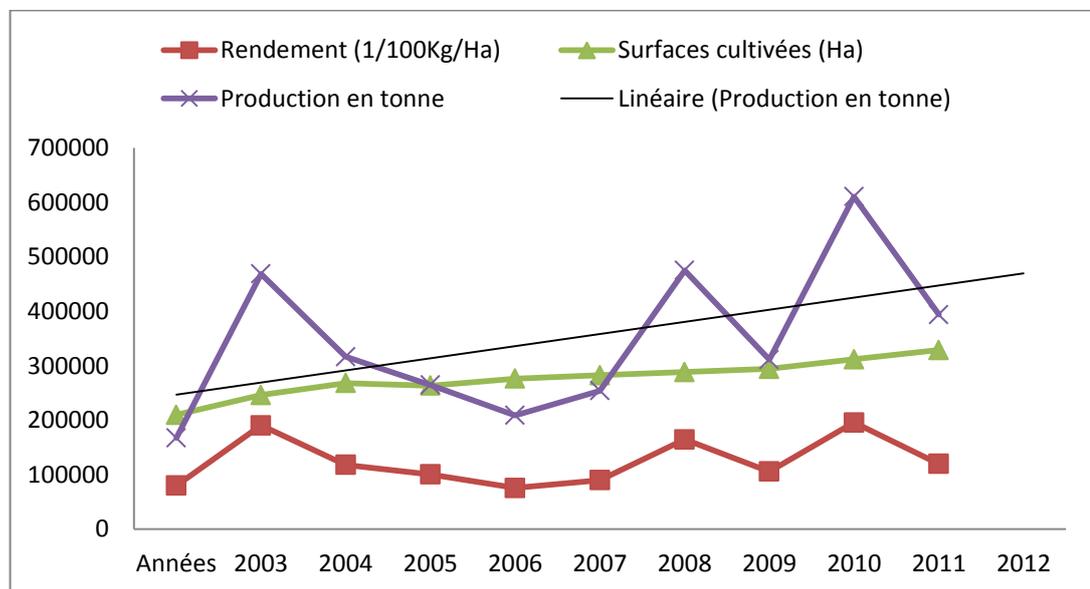


Figure 1.2 : Evolutions des surfaces cultivées, productions et rendements en olive en Algérie (2003-2012) [7].

D'après la figure 1.2, la production, les rendements à l'hectare et la superficie oléicoles en Algérie ont enregistré une évolution assez remarquable :

- On constate que le niveau de la production d'olive oscille d'une façon très marquée, d'une année à l'autre, en fonction de plusieurs facteurs. Il était de 167627 tonnes en 2003 alors qu'en 2011 on a enregistré le pic de production avec 610776 tonnes. La production a diminué par la suite jusqu'à 393840 tonnes en 2012. Notons que la tendance annuelle de la production oléicole est à la hausse depuis 2003.

- Le rendement moyen d'olive à l'hectare en Algérie connaît lui aussi de grandes variations et suit également la même tendance que la production oléicole. Il était de 799,3 kg/ha en 2003 et a atteint 1958,1 kg en 2011 pour ensuite diminuer à 1197,5 kg en 2012.

- Ces fluctuations sont dues aux conditions climatiques principalement d'ordre hydrique (climat méditerranéen caractérisé par de faibles pluies qui sont mal réparties au cours de l'année et souvent absentes durant les périodes critiques (juin-juillet)), au phénomène de l'alternance et aux techniques culturales, notamment au niveau de la récolte (rupture des rameaux par gaulage).

- La surface consacrée à l'oléiculture est en continuelle augmentation depuis 2003, elle était de 209730 ha en 2003 pour arriver à 328884 ha en 2012, soit une augmentation de 56,81 %. Cette augmentation serait le résultat de la relance du plan national de développement agricole (PNDA) en l'an 2000, et au financement de la filière par le fond national de relance et de développement agricole (FNRDA).

L'oléiculture algérienne présente une valeur économique très importante grâce aux produits que sa culture offre à savoir l'olive et son huile [8].

Le tableau 1.2 comporte les données statistiques de la production oléicole nationale de 2003 à 2010 [2] :

Tableau 1.2 : Evolution de la production oléicole en Algérie (2003-2012) [2].

| Année | Production d'olive | | | Rendement d'olive | Producti-on d'huile | Rendement d'huile |
|-------------|---------------------|-----------------|----------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| | Pour la conserve Qx | Pour l'huile Qx | Total prod. Olive Qx | Kg/arbre | HI | Litre/quintal |
| 2003 | 634 740 | 1 041 530 | 1 676 270 | 10,8 | 165 780 | 15,9 |
| 2004 | 587 980 | 4 100 020 | 4 688 000 | 29,4 | 757 070 | 18,5 |
| 2005 | 857 035 | 2 307 855 | 3 164 890 | 18,7 | 379 170 | 16,4 |
| 2006 | 684 750 | 1 962 580 | 2 647 330 | 15,1 | 349 920 | 17,8 |
| 2007 | 81 778 | 1 271 740 | 2 089 520 | 11,4 | 238 170 | 19 |
| 2008 | 910 990 | 1 629 680 | 2 540 670 | 13,1 | 261 260 | 16,0 |
| 2009 | 982 505 | 3 769 315 | 4 751 820 | 23,2 | 669 765 | 17,8 |
| 2010 | 1 359 368 | 1 753 152 | 3 112 520 | 13,8 | 288 860 | 16,5 |
| 2011 | 1 927 850 | 4 179 905 | 6 107 755 | 25,0 | 728 050 | 17,4 |
| 2012 | 1 458 260 | 2480 140 | 3 938 400 | 14,9 | 429 980 | 17,3 |

L'huile d'olive est consommée pratiquement dans sa totalité dans les zones de production. L'autoconsommation dans les zones traditionnelles est très forte, elle passe d'une moyenne de 0,85 kg par habitant dans les années 1990 à une moyenne de 1,43 kg en 2000, puis 1,60 en 2008, soit une augmentation de 86,5% [8].

1.1.2.2 Répartition géographique de l'oléiculture en Algérie

Etant la culture pérenne la plus dominante, l'olivier occupe en 2012 une superficie de 328884 ha qui se répartit sur tout le territoire national. Bejaia occupe 16% de la superficie oléicole avec 50 918 ha ; Tizi-Ouzou représente 11% de la

superficie avec 33 105 ha ; Bouira avec une superficie de 26 337 ha, soit 8 % ; Bordj Bou Arreridj avec une superficie de 21 544 ha, soit 7 % ; 5% à Sétif avec une superficie de 15 781 ha ; 4 % à Mascara et à Jijel avec respectivement 12 481 ha et 12 416 ha de superficies oléicoles ; Skikda avec 9 679 ha, soit 3 %. Ces wilayate, à elles seules, totalisent 58 % de l'oléiculture en Algérie en 2012 [2]. Les autres wilayate occupent chacune moins de 2,5% de la superficie oléicole nationale.

La figure 1.3 illustre la répartition des zones géographiques de l'oléiculture algérienne :

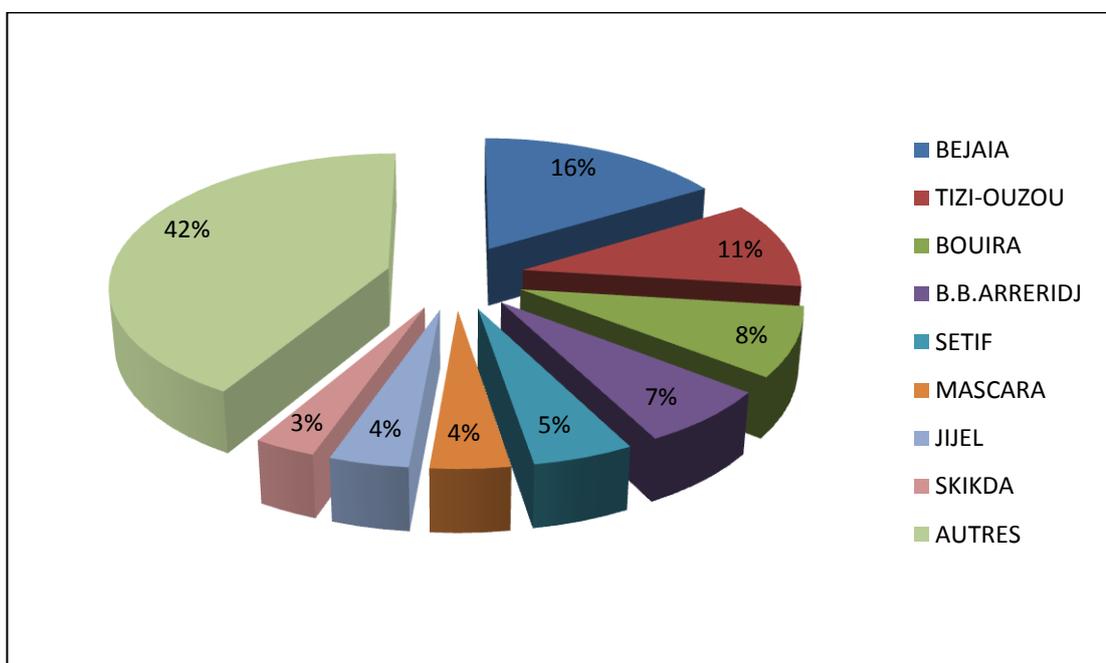


Figure 1.3 : Répartition des zones géographiques de l'oléiculture algérienne [2].

1.1.2.3 Variétés cultivées

On identifie deux types de système de production : moderne et traditionnel, avec une forte prédominance de ce dernier.

L'oléiculture traditionnelle (extensive) qui constitue près de 90% du verger national s'étend principalement sur les régions montagneuses défavorisées où les conditions de production sont assez rudes (la Kabylie, Sétif, Constantine, Guelma et Tlemcen) en raison de la géomorphologie de ces territoires connus par leur

relief montagnard avec forte déclivité, une pauvreté des sols et une faible accessibilité [9].

Le verger oléicole traditionnel occupe seulement 1,3% de la SAU de l'Algérie. La cueillette y est majoritairement destinée à la production de l'huile d'olive qui avoisine les 20 000 tonnes par an en moyenne [9].

La majeure partie des exploitations (70%) du secteur traditionnel sont petites (inférieures à 5 hectares) et de type familial. Le verger oléicole est vieillissant avec des rendements faibles. Il est peu entretenu et voué à l'abandon et à la détérioration dans plusieurs zones, du fait de l'exode rural et du désintérêt des jeunes. L'irrigation et la fertilisation (minérale) sont quasi absentes [9].

Selon les mêmes auteurs, cette oléiculture traditionnelle fournit un complément de revenu aux familles rurales et une large partie de la production est destinée à l'autoconsommation.

La structure variétale montre la prédominance de trois variétés produisant des huiles ayant des caractéristiques particulières:

- la variété CHEMLAL de Kabylie (30% des superficies totales et 44% des terres destinées à l'huile d'olive): cette variété locale, donc rustique, est la plus répandue en Kabylie, dans l'Atlas Blidéen, dans la Mitidja et dans la région des Bibans. Elle est très estimée pour la fabrication de l'huile de bonne qualité;
- les variétés AZERADJ et BOUCHOUK: elles accompagnent les peuplements de CHEMLAL et permettent la pollinisation;
- la variété ABERKANE: elle est répandue dans la région de Seddouk (Bejaia) et donne des résultats satisfaisants en huilerie [9].

L'oléiculture moderne, qui s'étend principalement le long des anciens domaines coloniaux (38% des olivettes de M'Chedallah, Mitidja et Chélif, 60 à 70% des olivettes du Constantinois, Guelma et Annaba, 90% à Mostaganem, 80% à Mascara et 98% à Sidi Bel-Abbès), représente une minorité (10%) du verger algérien [9].

Cette oléiculture s'est spécialisée dans la production et le conditionnement de l'olive de table. Elle est implantée essentiellement à l'Ouest du pays et notamment à Sig (Mascara). Deux types de variétés dominent cette filière:

- La SIGOISE, appréciée pour sa qualité d'olive de table. Elle est à l'origine de la majeure partie des olives de conserve destinées à la consommation locale et à l'exportation.
- La SEVILLANCE ou GORDAL, originaire d'Espagne, est aussi une olive de table qui donne de gros fruits [9].

La description des variétés d'olives cultivées en Algérie ayant déjà fait l'objet de nombreuses études est souvent restée au stade préliminaire. L'ITAFV [10] a caractérisé et répertorié 36 cultivars autochtones dont certains sont représentés dans le tableau 1.3.

Tableau 1.3 : Quelques variétés autochtones d'olivier cultivées en Algérie [10].

| Variété | Origine | Diffusion | Utilisation | Eenraci-nement | Rendement en huile | Autres caractéristiques |
|--------------------------------------|------------------------------------|--|-----------------|----------------|--------------------|--|
| Blanquett e de Guelma | Guelma | Nord-Est Constantinois (Skikda-Guelma) | Huile | 43,30 % | 18 – 22 % | -Tardive -Résistante au froid et moyennement à la sécheresse -Productivité moyenne et alternante |
| Chemlal | Kabylie | Occupe 40 % du verger oléicole algérien | Huile | Faible | 18 - 22 % | -Rustique et tardive -Autostérile -Productivité élevée et peu alternante |
| Limli | Sidi aich (Bejaia) | Occupe 8 % du verger oléicole algérien | Huile | Faible | 20 – 24 % | -Précoce -Peu tolérante au froid mais résistante à la sécheresse -Productivité moyennement alternante |
| Ronde de Miliana | Valée de Miliana (Ain Defla) | Restreinte | Double aptitude | / | 16 - 20 % | -Tardive -Sensible au froid et à la sécheresse -Productivité moyenne et alternante |
| Sigoise | Plaine de Sig (Mascara) | Occupe 25 % du verger oléicole algérien | Double aptitude | Moyen | 18 - 22 % | -De saison -Moyennement résistante au froid et à la sécheresse -Tolérante aux eaux salées -Productivité moyenne et alternante |
| Ferkani | Ferkane (Tebessa) | Région des Aurès | Huile | Elevé | 28 – 32 % | -Précoce -Résistante au froid et à la sécheresse -Productivité bonne et peu alternante. |

1.2 Présentation générale de l'olivier

1.2.1 Origine de l'olivier

Selon des études archéologiques, l'olivier cultivé dérive de l'oléastre qui est un olivier sauvage à fruit trop petits et qui donne une huile amère. D'après DECANDOLLE 1883 in [11], l'origine de l'olivier serait Irano-Syrienne. Sa domestication aurait lieu entre 3800 et 3200 AV. JC, et l'expansion de sa culture s'est faite de l'est vers l'ouest pour se répandre dans le bassin méditerranéen [12] grâce aux puissantes civilisations de la méditerranée orientale comme les phéniciens, les grecs et les romains [13].

Aujourd'hui l'olivier a franchi les frontières de la méditerranée pour se répandre sur tous les continents à l'exception de l'antarctique. En effet, on trouve des oliveraies en Afrique du sud, en Chine, au Vietnam, en Océanie méridionale, en Amérique du nord, en Amérique centrale et en Amérique du sud. La production mondiale d'huile d'olive ne cesse d'augmenter depuis 1990 [14].

1.2.2 Caractéristiques botaniques

L'olivier appartient à la famille des oléacées qui comprend 30 genres avec 600 espèces différentes (CRONQUIST, 1981) in [15].

Le genre *Olea* serait lui-même composé de 30 espèces différentes distribuées dans le monde entier et possèdent toutes le même nombre de chromosomes ($2n = 46$) [16]. Parmi ces espèces on trouve l'*Olea europaea* L.

Selon VILLEMURE et DOSBA [16], l'*Olea europaea* L se subdivise en quatre sous-espèces à savoir :

- ***Olea europaea lapealaperrini*** des montagnes sahariennes, de l'Atlas marocain et sud algérien (Hoggar et Tassili). Elle possède des drupes petites, peu huileuses et non utilisables pour l'alimentation humaine [17].
- ***Olea europaea cerasiformis*** des îles Canaries et Madères.
- ***Olea europaea cuspidata*** d'Asie du sud, d'Arabie, d'Abyssinie et du sud de l'Afrique. Elles possèdent des drupes petites, peu huileuses et sans utilisation pratique [17].

- ***Olea europaea euromediterranea*** localisée dans le bassin méditerranéen, elle est composée, selon CIFERRI et BREVIGLIERT 1942 in [9], de deux séries :
 1. **Série 1** : *Olea euromediterranea sativa* : c'est l'olivier cultivé, constitué par un grand nombre de variétés améliorées, multipliées par bouturage ou par greffage et non connues à l'état sauvage.
 2. **Série 2** : *Olea euromediterranea oleaster* ou *Olea euromediterranea sylvestris* (dénommé oléastre). Elle est utilisé comme porte-greffe.

Le tableau 1.4 comporte la classification de l'olivier :

Tableau 1.4 : Classification de l'olivier [18].

| Classification de l'olivier | ARGENSON [18] |
|------------------------------------|----------------------|
| Embranchement | Phanérogames |
| Sous-embranchement | Angiospermes |
| Classe | Dicotylédones |
| Série | Terebinthales |
| Ordre | Ligustrales |
| Famille | Oléacées |
| Genre | <i>Olea</i> |
| Espèce | <i>Olea europaea</i> |

1.2.3 Caractéristiques morphologiques

L'olivier se distingue des autres espèces fruitières par sa très grande longévité pouvant donner des arbres plusieurs fois centenaires. Si le tronc disparaît par vieillissement, les rejets se développant à sa base, assureront sa pérennité et redonneront un nouvel arbre [11].

La figure 1.4 représente l'aspect morphologique d'un arbre d'olivier.

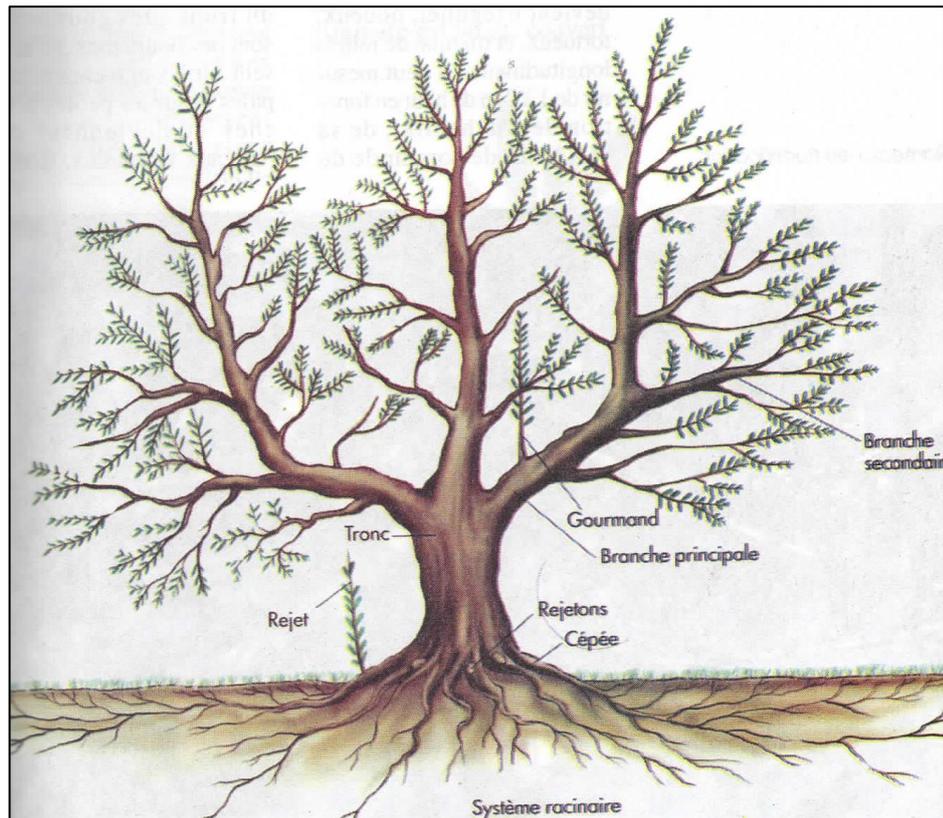


Figure 1.4 : Aspect morphologique d'un arbre d'olivier [14].

1.2.3.1 Système racinaire

La constitution du système racinaire chez l'olivier dépend du procédé de multiplication dont il a fait l'objet [19]. En effet, les jeunes plants issus de bouturage, présentent un système racinaire très développé avec trois ou quatre racines dominantes, pourvues d'un important chevelu. Par contre si l'olivier est greffé sur oléastre, le système racinaire est pivotant et peut atteindre des profondeurs assez importantes [18].

Le développement du système racinaire de l'arbre est surtout fonction des caractéristiques physico-chimiques du sol [18]. L'olivier adaptera son système racinaire à la profondeur du sol, suivant sa texture et sa structure. Il peut atteindre 6m de longueur dans les sols sablonneux avec un système pivotant. Dans les sols argileux, les racines ont un développement latéral fasciculé pouvant atteindre 60cm. Lorsque les terrains sont lourds, les racines sont proches de la surface, de 0.1 à 0.6m de profondeur.

Le développement, le taux de croissance des racines, leurs activités, le nombre de poils absorbants et la structure anatomique varient en fonction des variétés [20].

1.2.3.2 Système aérien

Selon LOUSSERT et BROUSSE [11], les parties aériennes de l'arbre comprennent :

- le tronc,
- les charpentières,
- la frondaison,
- les rameaux fructifères.

1.2.3.2.1 Tronc

D'abord lisse, gris verdâtre jusqu'à la dixième année environ. Il devient en vieillissant noueux, crevassé, fendu, élargi à la base et prend une teinte gris foncé presque noire [21]. Il peut mesurer de 1 à 2 m de haut en fonction de son habitat, de sa variété et de son mode de culture [14]. En effet, selon la zone de culture et le mode de conduite adoptée, le tronc est plus ou moins développé en hauteur. En Kabylie, la variété Chemlal était conduite sur un tronc élevé de 2 à 3 m. Mais dans les plantations nouvelles on tend à le réduire à 40 ou 60 cm de haut [11].

La figure 1.5 montre l'aspect d'un tronc d'olivier sinueux et crevassé :

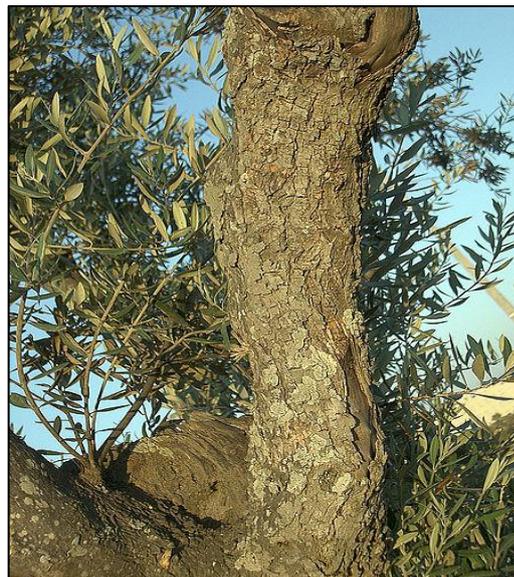


Figure 1.5 : Tronc d'olivier sinueux et crevassé.

1.2.3.2.2 Charpentières

Les charpentières maîtresses ou branches mères prennent naissance sur le tronc. C'est au moment des premières tailles de formation qu'elles commencent leur développement donnant la forme de l'arbre et le développement de la frondaison. Les sous charpentières, ou branches sous-mères, se développent sur les charpentières formant la couronne de l'arbre, celles-ci portent les rameaux [12].

Les rameaux sont multiples, opposés, tortueux, d'une teinte presque blanche, s'arrondissant avec l'âge, passant au gris puis au gris cendré dont l'ensemble forme une cime presque sphérique irrégulière [21].

1.2.3.2.3 Frondaison

C'est l'ensemble du feuillage. Les feuilles de l'olivier sont persistantes, elles ont une durée de vie de l'ordre de 3 ans. Elles sont opposées, simples, entières, sans stipules avec un pétiole court. Le limbe lancéolé se termine par un mucron [11].

Les feuilles se distinguent par une couleur verte foncée à la face supérieure et un aspect argenté à la face inférieure [22] dû à la présence de petits poils qui lui permettent de retenir la plus infime quantité d'humidité [23].

Leur forme est généralement fusiforme et allongée, variable selon les variétés et l'âge du plant, de même pour leur dimensions [22].

La figure 1.6 illustre les deux faces d'une feuille d'olivier :

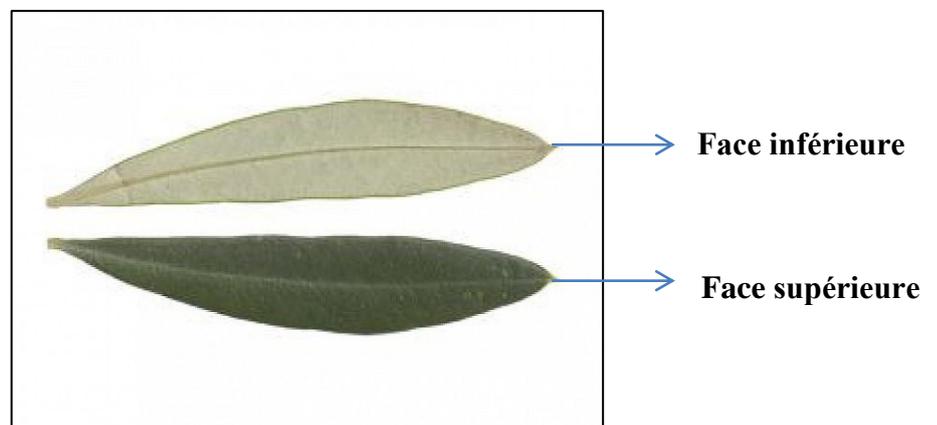


Figure 1.6 : Feuilles de l'olivier.

1.2.3.2.4 Rameaux fructifères

Ce sont les rameaux dont la croissance s'est poursuivie tout au long du printemps et l'automne de l'année précédente. Ils portent les fleurs puis les fruits. Ils sont de t'aille moyenne, faibles, courts et présentent un port semi-érigé, horizontal ou pendant [14]. Leur longueur est de l'ordre de quelques dizaines de centimètres suivant la vigueur et la variété de l'arbre [12].

Le rameau fructifère porte à son extrémité un bourgeon terminal qui possède 7 à 9 paires d'ébauches foliaires. Au niveau de chaque nœud, on trouve deux feuilles axillaires opposées avec un bourgeon à l'aisselle de chacune d'elles [17].

La figure 1.7 représente l'aspect d'un rameau fructifère d'olivier :



Figure 1.7 : Rameau fructifère de l'olivier.

1.2.3.2.4.1 Inflorescences et fleurs

Les fleurs de l'olivier sont constituées par des grappes longues et flexueuses pouvant comporter de 4 à 6 ramifications secondaires [11]. Les grappes peuvent comporter de 10 à 40 fleurs suivant la variété [18].

Par ailleurs, le nombre total d'inflorescence, leur répartition sur les rachis et la longueur de l'inflorescence sont génétiquement déterminés pour chaque cultivar, et varient également d'une année à l'autre selon l'état physiologique de l'arbre et les conditions climatiques [22].

La fleur de l'olivier est hermaphrodite et sa formule florale est la suivante : 4 Sépales + 4 Pétales + 2 Etamines + 2 Carpelles. Les sépales sont petits, soudés et persistants, les pétales de couleur jaunâtre sont aussi soudés mais plus grandes que les sépales. Les étamines sont saillantes insérées sur le tube de la corolle, l'ovaire simple, libre, ovoïde à 2 loges biovulées, surmonté d'un style simple très court, épais, allongé et bilobé [21].

Les figures 1.8 et 1.9 illustrent l'aspect des grappes florales et des fleurs d'olivier :



Figure 1.8 : Grappes florales de l'olivier.



Figure 1.9 : Fleurs de l'olivier.

1.2.3.2.4.2 Fruit

Le fruit est une drupe charnue à noyau de forme très variable suivant la variété. Il est généralement allongé et ovale d'un diamètre compris entre 1 et 3 cm [18]. De l'extérieur à l'intérieur on distingue :

- Le péricarpe : qui représente la peau de l'olive. Il passe de la couleur vert tendre à la couleur violette ou rouge puis à la couleur noirâtre à la maturation [11].
- Le mésocarpe (pulpe) : représente la partie charnue riche en lipide.
- L'endocarpe (noyau) : de forme sphérique, ovoïde, elliptique ou allongée.
- La forme du noyau est une caractéristique variétale [11].

En effet, la longueur du fruit et du noyau sont des caractères à forte héritabilité [15].

La figure 1.10 représente l'aspect d'un fruit d'olivier.

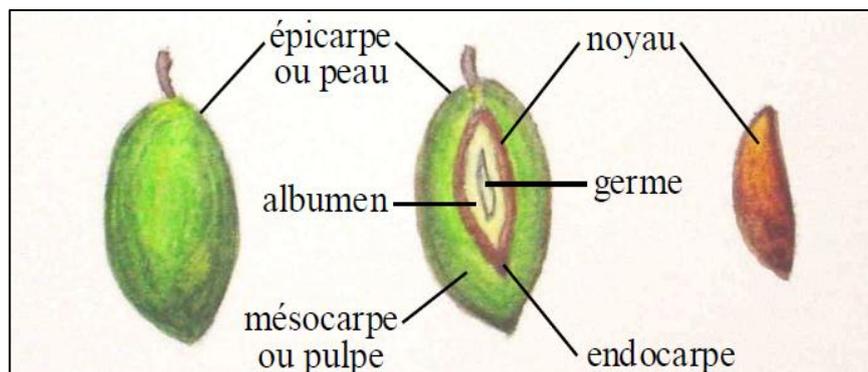


Figure 1.10 : Fruit de l'olivier.

1.2.4 Caractéristiques physiologiques

1.2.4.1 Cycle de développement

Au cours de la vie d'un arbre, on peut distinguer quatre grandes périodes [11]:

1.2.4.1.1 Période de jeunesse

C'est la période d'élevage et de croissance du jeune plant (de 1 à 7 ans). Elle commence en pépinière pour se terminer en verger dès que le plant est apte à fructifier.

1.2.4.1.2 Période d'entrée en production

C'est une phase intermédiaire, chevauchant la phase de jeunesse et la phase adulte (de 7 à 35 ans). Elle s'étale du moment où l'arbre est apte à produire, jusqu'à ce que sa production soit importante et régulière.

1.2.4.1.3 Période adulte

La période adulte correspond à la période où l'olivier fournit l'optimum de sa production (de 35 à 150 ans) ; il atteint sa taille normale de développement et son accroissement souterrain et aérien est terminé.

1.2.4.1.4 Période de sénescence

C'est la phase de vieillissement de l'olivier (au-delà de 150 ans). Elle se caractérise par une diminution progressive des récoltes avec une alternance marquée et une réduction progressive de la charpente.

La durée de chacune de ces périodes varie avec les conditions de culture des arbres, et selon les variétés (MORETTINI, 1950) in [11].

1.2.4.2 Cycle végétatif annuel

Le cycle végétatif annuel de l'olivier est en étroite relation avec les conditions climatiques de son aire d'adaptation, caractérisée essentiellement par le climat méditerranéen.

Selon BOULOUHA [24], le cycle biologique de l'olivier est caractérisé par le chevauchement de deux fonctions physiologiques différentes :

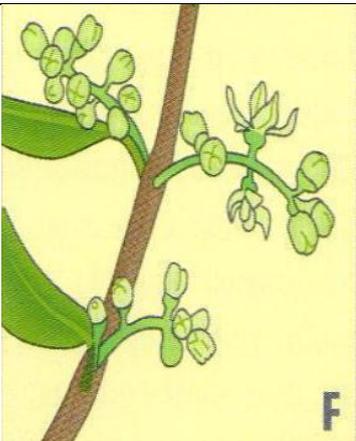
- La floraison et la fructification de l'année en cours ;
- La croissance végétative de nouvelles ramifications.

Après le repos hivernal de novembre à février, où l'arbre reconstitue ses réserves et accumule une certaine quantité de froid nécessaire à l'évolution des bourgeons [25], La végétation démarre à partir de mars-avril. En effet, les pousses terminales s'allongent, les bourgeons axillaires se développent après s'être différenciés en boutons floraux ou en yeux à bois. Les bourgeons végétatifs débourrent vers la fin du mois de mars, peu après les bourgeons floraux [18].

La pousse de printemps, la plus importante dans la croissance annuelle, dure jusqu'à mi-juillet environ. Une deuxième pousse peut avoir lieu entre septembre et mi-octobre si les conditions le permettent [18].

La floraison se déroule entre avril et mai sur la pousse de l'année précédente et sur la pousse de deux ans qui n'a pas fleuri l'année 1. La production interviendra donc sur du bois en deuxième année de croissance. L'endocarpe (noyau) se sclérifie en juillet-août. Les feuilles de troisième année jaunissent puis chutent à un âge compris entre 28 et 30 mois en moyenne. L'arbre rentre enfin en repos hivernal [18].

La figure 1.11 représente le cycle végétatif et reproducteur de l'olivier.

| | | |
|---|---|--|
|  |  |  |
| <p>A</p> <p>Stade hivernal</p> <p>Le bourgeon terminal et les yeux axillaires sont en ralenti végétatif.</p> | <p>B</p> <p>Réveil végétatif</p> <p>Le bourgeon terminal et les yeux axillaires amorcent un début d'allongement.</p> | <p>C</p> <p>Formation des grappes florales</p> <p>En s'allongeant, la grappe fait apparaître les différents étages de boutons.</p> |
|  |  |  |
| <p>D</p> <p>Gonflement des boutons floraux Les boutons s'agrandissent en gonflant. Ils sont portés par un pédicelle court. Les bractées alluées à leur base s'écartent de la hampe florale.</p> | <p>E</p> <p>Différenciation des corolles</p> <p>La séparation du calice et de la corolle est visible. Les pédicelles s'allongent, écartent les boutons floraux de l'axe de la grappe.</p> | <p>F</p> <p>Début de la floraison</p> <p>Les premières fleurs s'épanouissent après que leurs corolles soient passées du vert au blanc.</p> |

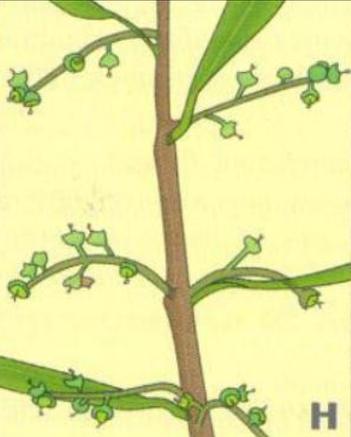
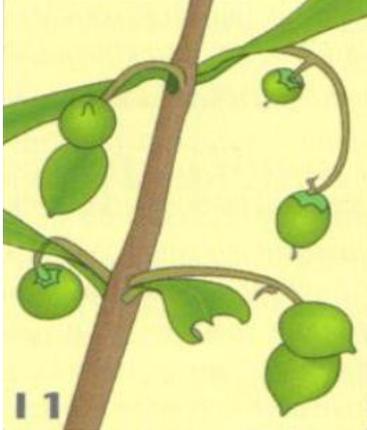
| | | |
|---|--|---|
|  |  |  |
| <p>Pleine floraison</p> <p>La majorité des fleurs sont épanouies.</p> | <p>Chute des pétales</p> <p>Les pétales brunissent et se séparent du calice. Ils peuvent subsister un certain temps au sein de la grappe florale.</p> | <p>Nouaison</p> <p>Les jeunes fruits apparaissent mais dépassent peu la cupule formée par le calice.</p> |
|  <p>Grossissement des fruits 1^{er} stade</p> <p>Les fruits subsistants grossissent pour atteindre la taille d'un grain de blé.</p> |  <p>Grossissement des fruits 2^e stade</p> <p>Les fruits les plus développés atteignent 8 à 10 mm de long et début de lignification des noyaux.</p> | |

Figure 1.11 : Cycle végétatif et reproducteur de l'olivier [18].

1.2.5 Exigences écologiques

La culture de l'olivier est circonscrite à 30-45° de latitude dans l'hémisphère Nord comme dans l'hémisphère Sud et jusqu'à 900 m d'altitude sur pentes exposées au sud (à plus de 1200 m en Argentine) [26].

1.2.5.1 Exigences climatiques

La température conditionne le déroulement des différents processus physiologiques de croissance et de développement chez l'olivier.

- Température

L'olivier résiste jusqu'à -8 °C en repos végétatif hivernal. Mais à 0 à -1°C, les dégâts peuvent être très importants sur la floraison. A 35-38°C, la croissance végétative s'arrête et à 40°C et plus, des brûlures endommagent l'appareil foliacé et peuvent faire chuter les fruits, surtout si l'irrigation est insuffisante [27].

Le zéro de végétation serait de 10°C à 12°C et les températures optimales du développement seraient comprises entre 12°C et 20°C [11]. La somme des températures positives cumulées nécessaires du départ de la végétation jusqu'à la formation des olives est de 5300°C [28].

- Pluviométrie

L'olivier peut être cultivé sous des régimes hydriques allant de 200 à 800 mm/an [29]. Toutefois, les besoins de l'olivier en eau varient suivant la nature du sol, par sa perméabilité et sa capacité de rétention d'eau, la température et la répartition des pluies dans le temps [30].

BALDY [31] précise que si les déficits hydriques sont importants en automne et en hiver, ils affecteront non seulement la récolte de l'année, mais aussi les récoltes ultérieures. En effet, Les pluies automnales favorisent le grossissement et la maturation du fruit [11] et ont un rôle appréciable sur la teneur en huile et la formation de rameaux fructifères [18]. Les pluies d'hiver-printemps assurent un pourcentage élevé de nouaison [11].

- Hygrométrie

L'humidité excessive et permanente favorise le développement de certains parasites (maladies cryptogamiques) [11]. En effet, la plupart des variétés paraissent plus sensibles aux attaques parasitaires lorsque de fortes hygrométries diurnes se manifestent durant d'assez longues périodes [21].

L'hygrométrie peut provoquer l'agglutination des grains de pollen au moment de la pollinisation ce qui nuit à la fécondation [28], diminue la quantité et la qualité de l'huile et cause la chute des fruits [21].

- Vent

Le vent joue un rôle dans la dissémination du pollen. Cependant, les vents forts affectent beaucoup l'olivier notamment au moment de la floraison [30], augmentent sensiblement les besoins en eau, stressent la végétation, peuvent éventuellement briser les branches ou faire chuter les fruits avant maturité [21]. Les vents chauds et secs (sirocco), peuvent causer des brûlures sur les arbres [11].

- Insolation

L'olivier est avide de lumière [21]. Une faible intensité lumineuse affecte le pourcentage de nouaison, la taille des fruits et leur teneur en huile [32]. En effet, il supporte mal les fortes densités de plantation et il ne donne de meilleures productions que sur les coteaux bien exposés au soleil [11].

1.2.5.2 Exigences édaphiques

L'olivier est peu exigeant en matière de sol, il pousse pratiquement tout autant sur des sols siliceux que calcaires [12]. Toutefois, les sols fortement argileux, compacts et humides ou ressuyant mal sont à écarter [33]. Les sols doivent être de texture légère (moins de 20% d'argile) et bien drainés [26].

La profondeur minimale du sol nécessaire à l'olivier est de 1 à 1,5m [11]. Le pH peut aller jusqu'à 8 à 8,5 avec, cependant, des risques d'induction de carence en fer et en magnésium (cas des sols calcaires) [27].

L'olivier est l'un des arbres fruitiers qui supporte le mieux la salure du sol et des eaux d'irrigation (2,7 g/l) [34].

1.2.6 Multiplication de l'olivier

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour multiplier l'olivier. Certaines sont très anciennes, d'autres, basées sur des principes traditionnels, ont été perfectionnées et continuent à jouer un rôle important dans la production industrielle des plants (greffage).

D'autres encore, comme le bouturage semi-ligneux associé à la technique de la nébulisation (ou brouillard artificiel) et, plus récemment, la micropropagation, sont en constante évolution et permettent d'offrir des réponses efficaces aux demandes de pépinières désireuses de soutenir le développement d'une oléiculture en expansion continue [35].

1.2.6.1 Multiplication traditionnelle

Les méthodes traditionnelles sont avant tout des propagations asexuées en opposition au mode de multiplication par semis (sexuée) utilisée surtout pour l'obtention de portes greffes. Ces techniques traditionnelles sont utilisées pour la mise en place de l'olivier en zones de culture arides où il est cultivé en extensif et là où l'eau d'irrigation fait défaut [11].

Ces méthodes présentaient l'inconvénient de faire appel à de nombreux sujets fournisseurs et par conséquent de donner naissance à des plants aussi différents entre eux que leurs parents, cela même au sein d'une variété identique [18].

La méthode traditionnelle de multiplication végétative peut être réalisée par différentes méthodes à savoir :

1.2.6.1.1 Bouturage ligneux

Ce mode de multiplication se pratique en pépinière, pour produire de jeunes plants à partir de pieds-mères sélectionnés pour leur qualité de production et leur état sanitaire [11]. Les boutures sont prélevées au moment de la taille pendant le repos végétatif puis mises en stratification dans du sable ensuite plantées

verticalement ou horizontalement de février à avril. L'utilisation des portions de rameaux âgés de 4 à 5 ans au maximum est conseillée [36].

1.2.6.1.2 Bouturage en garrote

Les garrottes sont des boutures ligneuses de 0,6 à 1 mètre de longueur et de 4 à 5 cm de diamètre. Elles sont mises en place assemblées par trois ou quatre dans le même trou de plantation, la partie supérieure s'incline vers l'extérieur.

La figure 1.12 illustre le bouturage ligneux et en garrote de l'olivier :

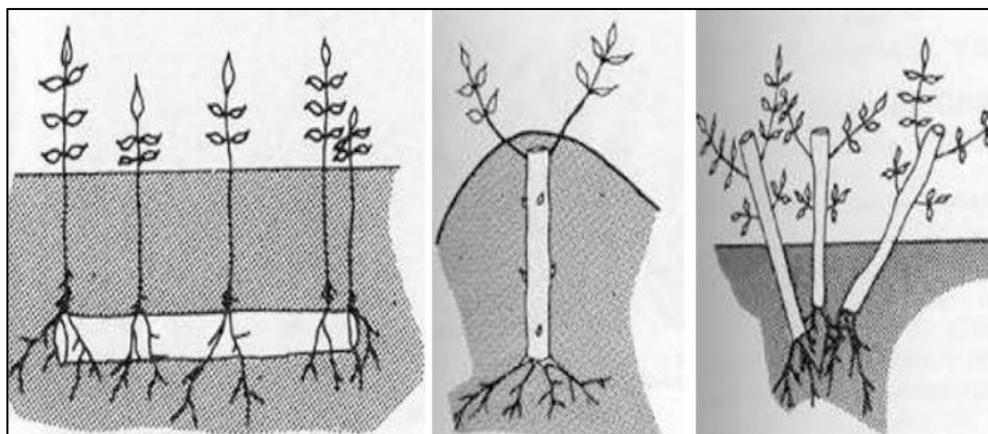


Figure 1.12 : Bouturage horizontale, verticale et en garrotte.

1.2.6.1.3 Bouturage par éclats de souches ou souquets

La bouture par éclats de souches ou souquets est réalisée à partir de protubérances ou de morceaux de souche prélevés nus ou de préférence avec un rejet de départ rabattu à 20-30 cm [18].

Le souquet est considéré comme une grosse bouture ligneuse obtenu lors du recépage d'un vieil arbre qui peut être utilisé pour la mise en place de nouvelles plantations.

Le vieil olivier sur lequel le prélèvement est effectué peut être soit entièrement déterrée, soit il reste en place si l'on utilise qu'une partie de ces protubérances. En général on peut prélever deux à cinq souquets par arbre-mère sans trop en compromettre sa vitalité [11].

Les souquets peuvent être plantés directement ou placés en jauge durant 2 ans [18]. Les mêmes auteurs précisent que la rapidité de l'enracinement du souquet dépend de sa grosseur (2 à 5 kg), de sa qualité et de son état sanitaire

Ce mode de multiplication convient aux plantations en terrains pauvres ou sous climat sec, il ne permet d'obtenir la variété désirée que si elle est franche de pied [18].

1.2.6.1.4 Greffage sur oléastre

Selon LOUSSERT et BROUSSE [11], cette méthode est à l'origine de l'olivette de Kabylie. Le système employé est la greffe en couronne sous écorce, exécutée en mars-avril, ou la greffe en placage d'écorce exécutée en mai-juin.

1.2.6.2 Multiplication moderne

Les modes de multiplication modernes réunissent les techniques permettant d'obtenir des plants de qualité en quantité suffisante pour satisfaire la demande massive qui ne cesse d'augmenter, tout en réduisant au maximum le cycle de production.

1.2.6.2.1 Semis-greffage

Cette technique consiste à réunir par le greffage d'un porte greffe issu de franc de semis et un greffon prélevé sur la variété faisant l'objet de la multiplication.

Selon OUKSILI [37], c'est une technique très utilisée en Algérie. Cependant elle nécessite trois années d'élevage et de nombreuses opérations qui limitent son taux de réussite. En effet cette pratique utilisée au niveau des pépinières nécessite plusieurs étapes :

1.2.6.2.1.1 Récolte et préparation des noyaux

Les olives sont récoltées avant maturité afin de pallier la germination difficile spécifique de cette méthode de reproduction [18]. Les noyaux sont nettoyés et laissés pendant une année à l'air libre afin d'achever leur post-maturation.

1.2.6.2.1.2 Semis

Il est recommandé de semer les noyaux en août-septembre, période où l'on obtient les meilleurs pourcentages de germination par rapport aux semis plus tardifs d'octobre- novembre [11]. Le semis se fait dans des blocs préalablement désinfectés.

1.2.6.2.1.3 Repiquage en carré d'élevage

Après une année du semis apparaît un système racinaire pivotant. On effectue alors un repiquage en carré d'élevage à densité réduite, de 40 à 50.000 plants/ha. Le système racinaire peut alors s'étoffer, il devient fasciculé [18]. Selon OUKSILI [37], le repiquage s'effectue au stade 6 à 8 feuilles après triage, habillage et pralinage.

1.2.6.2.1.4 Greffage des plants

C'est au printemps suivant le repiquage lorsque les plants sont en carré d'élevage depuis 12 à 18 mois que l'on procède au greffage [11].

Les greffons bien aoûtés d'un ou deux ans proviennent de rameaux préalablement récoltés sur des arbres étalons reconnus pour leur performance et leur bon état sanitaire. Le greffage à la couronne qui est le mode de greffage le plus recommandé pour l'olivier est utilisé du fait de son taux élevé de réussite allant jusqu'à 90% [11].

1.2.6.2.2 Bouturage herbacé

Ce mode de multiplication est aussi appelé bouturage semi-ligneux ou semi-herbacé. La méthode consiste à placer des boutures de 20cm de long au minimum, provenant de jeunes rameaux d'une année en cours de lignification, dans un milieu d'enracinement, avec une humidité relative de 90% à 100% [36].

La technique de bouturage herbacé par traitement hormoné sous nébulisation constitue la seule source de plants d'olivier pour les plantations importantes [20].

Selon LOUSSER et BROUSSE [11] ; FONTANAZA et BALDONI [16], le bouturage de l'olivier sous mist-système passe par trois phases, à savoir :

1.2.6.2.2.1 Phase d'enracinement

L'autoenracinement des boutures au niveau d'une serre de nébulisation nécessite de réunir les conditions suivantes :

- Température ambiante de 21 à 25°C,
- Température du substrat (perlite, vermiculite, laine de roche) de 20 à 28°C,
- Humidité de l'air de 100%,
- Durée d'enracinement de 60 à 90 jours.

1.2.6.2.2.2 Phase d'endurcissement

C'est une phase indispensable pour l'adaptation des boutures racinées à la vie autonome au niveau de la serre d'endurcissement dont la température de croissance est maintenue entre 15 à 25°C où des irrigations périodiques sont indispensables.

1.2.6.2.2.3 Phase d'élevage des plants

Les boutures racinées sont dépotées pour être mises en terre avec leur motte ce qui permet un taux de reprise de 90 à 100%.

Cette méthode offre la possibilité de prélèvement d'un très grand nombre de boutures sur un même sujet et accélère sensiblement la production de plants [18].

1.2.6.2.3 Culture *in vitro*

La technique de culture *in vitro*, est un mode de multiplication végétative artificielle des plantes. Il s'agit d'un ensemble de méthodes faisant intervenir d'une part l'asepsie et d'autre part des conditions de culture parfaitement contrôlées [38].

L'olivier a peu à peu intégré les techniques de culture *in vitro*. Ainsi plusieurs chercheurs ont réussi la micro propagation de l'olivier, en utilisant des bourgeons préformés, prélevés sur un matériel juvénile ou adulte [39 ; 40 ; 41] ou par induction de l'embryogenèse somatique et de l'organogenèse sur des cals induits sur des embryons, feuilles, pétioles [42] ou des cotylédons [43].

Toutefois, la propagation *in vitro* de l'olivier n'a pas encore dépassé le stade expérimental en raison de la grande variation des taux de réussite entre les cultivars [26].

1.3 Généralités sur la propagation *in vitro*

Les techniques de propagation *in vitro* trouvent leur fondement dans la totipotence cellulaire qui s'exprime par la dédifférenciation et la régénération cellulaire. C'est une propriété spécifique de la cellule et des tissus végétaux. En effet, toute cellule végétale vivante, quelle que soit sa spécialisation, du moment qu'elle est vivante et possède un noyau, est capable de reproduire la plante entière dont elle provient [44].

Cette totipotence a depuis toujours été exploitée par les techniques de bouturage. Mais la culture *in vitro* a poussé beaucoup plus loin cet énorme avantage du végétal [45].

Le principe de la micropropagation consiste à prélever sur la plante un organe ou un morceau d'organe qu'on appelle explant et de le cultiver en conditions aseptiques, sur des milieux de culture choisis selon le but désiré par le chercheur. Selon AUGÉ [38], les explants peuvent être des parties d'organes ou des organes entiers (tiges, feuille, racines, fleurs, ...), des tissus, des graines ou des embryons, des bourgeons ou des apex ou méristèmes, des cellules somatiques ou sexuelles ou des protoplastes.

Le choix de l'explant sera fonction de la technique utilisée, de l'objectif et de l'espèce choisie [46].

1.3.1 Principales techniques de la culture *in vitro*

La culture *in vitro* d'explants ou de fragments prélevés sur la plante permet différentes applications :

1.3.1.1 Microbouturage

Le microbouturage est la technique la plus répandue [47] pour produire en un minimum de temps un maximum de plantes. Elle est basée sur la stimulation des capacités naturelles de multiplication végétative de la plante [48].

Il consiste à prélever un fragment de tige comportant un bourgeon (son extrémité ou un nœud) et à le placer en culture en conditions aseptiques sur un milieu nutritif favorisant la production de nouvelles tiges. Ces tiges peuvent, à leur tour, être multipliées de la même façon. La dernière étape consiste à induire l'enracinement des multiples tiges obtenues qui donneront autant d'individus, qu'il sera possible d'acclimater en conditions horticoles [49].

Le but essentiel du microbouturage est de produire en grande quantité des jeunes plantes identiques au pied-mère [47]. D'après CORNU et BOULAY [50], cette voie de multiplication appelée multiplication conforme, réside dans le respect de la stricte conformité génétique du végétal à multiplier. La mise en culture des microboutures puis la stimulation des bourgeons axillaires et leur prolifération constituent la méthode la plus généralement appliquée en micropropagation des ligneux [51].

En effet, des résultats prometteurs ont été obtenus sur des espèces ligneuses forestières, feuillus [52 ; 53], sur l'olivier [53 ; 40 ; 55] ainsi que sur la sous espèce de l'olivier 'maderensis' [56].

Cependant, la réussite du microbouturage *via* la culture *in vitro*, est influencée par plusieurs facteurs dont la composition minérale [54 ; 57 ; 58] et hormonale [58 ; 59], les milieux de culture, le génotype [54 ; 58] et l'âge de l'explant [60].

1.3.1.2 Culture de méristème

Les méristèmes sont formés de cellules non différenciées à l'origine de tous les tissus de la plante. Leur mise en culture *in vitro* permet d'obtenir une plante identique à la plante initiale. Seuls les méristèmes caulinaires sont utilisés [47].

Le but principal de cette technique est la régénération d'espèces atteintes de virus. En effet, les méristèmes sont généralement indemnes de virus [47].

La raison qui fait que dans la grande majorité des cas, les méristèmes sont indemnes de virus est encore inexplicée [48]. On évoque pour cette particularité l'hypothèse suivante : la vitesse de multiplication des cellules méristématiques qui, en quelque sorte et en simplifiant, se multiplieraient plus vite que le virus, laissant

ainsi quelques cellules saines [47]. AUGE et BOCCON-GIBOD [48] supposent que les cellules en voie de division active possèderaient une certaine immunité, ou bien qu'une compétition s'établirait pour l'utilisation des métabolites entre cellules et virus, compétition qui tournerait à l'avantage des cellules méristématiques.

Cependant, les travaux ont montré que dans quelques cas les méristèmes pouvaient être infectés par certains virus [48]. Dans ce cas-là on peut associer cette culture *in vitro* à la thermothérapie, qui consiste à détruire le virus par chauffage des plantes à 35-39°C à la limite de leur survie [45].

De nombreuses espèces ont été débarrassées des virus qu'elles renferment : pommes de terre, fraisiers, chrysanthèmes, œillets, arbres fruitiers, agrumes [61] et vignes [62 ; 63].

1.3.1.3 Embryogenèse somatique

C'est l'obtention d'embryons à partir de cellules somatiques, c'est-à-dire non sexuelles. BOXUS [64] a défini l'embryogenèse somatique comme étant l'ensemble des événements provoqués artificiellement *in vitro* et conduisant à la formation d'un embryon à partir d'une cellule somatique ou germinale, mais sans passer par la fusion gamétique.

Les embryons somatiques connaissent les mêmes stades de développement morphologiques que traversent habituellement les embryons zygotiques à savoir : stade globulaire, cordiforme, torpille et cotylédonnaire [65].

Aujourd'hui, des embryons somatiques peuvent être obtenus pour de nombreuses plantes à partir d'une grande diversité de tissus tels que feuilles, racines, cotylédons, embryons zygotiques immatures et protoplastes [66].

Il faut que l'explant soit marqué par un programme génétique très jeunes, très proche de l'état embryonnaire : parois de l'ovaire, pièces inflorescentielles proches de l'embryon, embryon immature, zone hypocotyle de la plantule, base cotylédonnaires [67].

Il existe deux types d'embryogenèse somatique :

L'embryogenèse somatique indirecte qui, nécessite le passage par un stade

de cellules indifférenciées (cal) ;

- L'embryogenèse somatique directe, qui ne fait pas intervenir le cal (les embryons sont produits directement à partir d'un explant) [68].

L'embryogenèse somatique, avantageuse surtout sur le plan rapidité et coût de production, présente un intérêt certain pour les ligneux [69]. Les résultats obtenus chez l'olivier jusqu'à présent laissent présager un avenir prometteur pour certains cultivars [69], notamment ' Dolce agogia ', ' Leccino ', ' Frantoio ' et ' Moraiolo ' [70], ' Canino ' [71 ; 72], ' Picholine' [69], et chez l'olivier sauvage var. 'sylvestris' [73].

Cependant, il reste à développer certains aspects, en particulier les besoins nutritifs et hormonaux de l'embryon, de même que les conditions de survie et de développement des plantules issues de ces embryons [69].

1.3.1.4 Culture de protoplastes

Le terme de protoplaste désigne une cellule végétale débarrassée de sa paroi squelettique. Elle apparaît alors sous forme d'une cellule sphérique, limitée par sa membrane plasmique [48].

C'est vers les années 1960 que Cocking, montrait que, par des enzymes du type cellulase et pectinase, on pouvait attaquer les fibres pecto-cellulosiques et dissocier les tissus végétaux, mettant ainsi à nu la membrane plasmique de chaque cellule [67].

Une fois les protoplastes obtenus, il faut les mettre en culture et obtenir qu'ils se divisent puis forment une nouvelle plante [48].

Cette technique pourrait être un moyen de multiplication végétative à très haut potentiel, mais les autres méthodes de multiplication *in vitro* suffisent largement aux besoins. De plus, le risque d'obtention de mutants est relativement élevé, et la technique est délicate à mettre en œuvre [47].

L'intérêt des protoplastes réside dans le fait qu'ils permettent :

- Des recherches approfondies sur le fonctionnement de la cellule,
- Des traitements mutagènes sur cellules isolées,

- L'obtention de « résistances » naturelles contre les bactéries, les champignons, les herbicides et même contre certains ravageurs,
- L'étude du comportement des ADN,
- Des manipulations génétiques avec introduction ou substitution de gènes [47].
- D'obtenir des fusions entre protoplastes de même origine ou bien appartenant à des cultivars ou même des espèces différents [48 ; 67],
- Une application importante dans la multiplication des males-stériles [45].

1.3.1.5 Culture de grain de pollen et d'ovules

C'est l'obtention de plantes à partir des cellules reproductrices ou gamètes. Ces méthodes de culture *in vitro* de microspores incluses ou non dans des étamines immatures (androgenèse *in vitro*) ou d'ovaires non fécondés (gynogenèse *in vitro*) se sont développées depuis les années 1960. Ceci a permis d'étendre la production d'haploïdes doublés à un grand nombre d'espèces [49].

Cette technique consiste à provoquer le développement en embryons de cellules haploïdes (cellules à n chromosomes), qui n'existent que dans les anthères et les sacs embryonnaires des fleurs et provoquer, sur les jeunes plantes formées, le doublement artificiel du stock chromosomique pour obtenir des plantes à $2n$ chromosomes [45].

Selon BOUTHERIN et BRON [47], cette technique n'a pas pour but la multiplication ou la régénération sanitaire, mais elle est utilisée pour l'amélioration des plantes. La mise en pratique d'une méthode efficace d'haplodiploïdisation peut conduire à un gain de temps et de moyens pour la fixation des caractères au cours de la sélection [49]. En effet, elle permet un gain de trois à quatre ans [74].

1.3.2 Exigences de la culture *in vitro*

Quelle que soit la technique utilisée, la propagation *in vitro* requiert des conditions très précises de milieu de culture et d'environnement.

1.3.2.1 Milieu de culture

Un milieu de culture est une solution aqueuse comprenant des sels minéraux, des éléments organiques (sucres, vitamines, etc.) et éventuellement

des régulateurs de croissance. Cette solution aqueuse est la plupart du temps solidifiée par une substance extraite des algues que l'on appelle agar-agar ou gélose [75].

1.3.2.1.1 Constituants du milieu de culture

1.3.2.1.1.1 Eau

On utilise généralement de l'eau déminéralisée ou de l'eau permutée stérilisée [47].

1.3.2.1.1.2 Sels minéraux

Un milieu de culture s'élabore aux moyens d'éléments minéraux majeurs (macro- éléments) qui sont N, P, K, S, Mg, Ca et d'éléments mineurs (micro-éléments ou oligo-éléments) qui sont B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I, Fe.

Selon MARGARA [78], les exigences en sels minéraux varient avec l'espèce, la nature du tissu et son état physiologique mais aussi avec le mode de culture et le type d'organogenèse.

On utilise des milieux de composition connus déjà prouvés tels que MURASCHIGE et SKOOG, 1962 ; HELLER, 1953 ; NITSCH, 1956 [77], bien que ces milieux sont souvent modifiés notamment au niveau des macroéléments et particulièrement en NH_4NO_3 .

1.3.2.1.1.3 Sucres

Les tissus en culture *in vitro* sont largement hétérotrophes au carbone en raison de l'absence ou de l'insuffisance de l'assimilation chlorophyllienne. Il est donc généralement indispensable d'ajouter des glucides au milieu de culture. Les sucres les plus utilisés sont le saccharose et le glucose [76]. Toutefois, cette source de carbone dépend de l'espèce. D'après LEVA et al (1994) in [78], le mannitol a révélé de meilleurs résultats que le saccharose pour la culture de l'olivier.

1.3.2.1.1.4 Vitamines

Elles favorisent le développement des plants *in vitro*. On utilise généralement des vitamines du groupe B : thiamine, pyridoxine, biotine, méso-inositol, à des concentrations de l'ordre de 1 mg par litre [47].

1.3.2.1.1.5 Régulateurs de croissance

Il existe les régulateurs de croissance naturels rencontrés chez les végétaux et les régulateurs de croissance de synthèse dont les formules sont voisines ou différentes des substances naturelles et présentent une activité physiologique similaire.

Parmi les différents types de phytohormones, nous distinguons trois principales classes : les auxines, les cytokinines et les gibbérellines.

1.3.2.1.1.5.1 Auxines

L'auxine a été découverte à la suite d'expériences portant essentiellement sur des réactions de courbures de coléoptiles de graminées. Elle doit son nom à son action sur l'élongation cellulaire (auxèse) [74].

L'action de l'auxine dépend de sa concentration et de ses interactions avec les autres régulateurs. AUGÉ [38] signale qu'en étudiant les divers effets séparément, il est possible de noter, entre autres :

- Une action nette sur l'élongation cellulaire,
- Une stimulation de la division cellulaire d'origine cambiale (c'est cette action qui a permis les premières réussites des cultures *in vitro*). Cet effet est qualifié « d'histogène » car il conduit à de nombreuses cellules toutes semblables qui forment un « cal ».
- Une action dans les réactions de croissance (tropisme) et dans les corrélations entre organes, en particulier dans le phénomène de dominance apicale,
- Une action rhizogène nette qui a, depuis longtemps, débouché dans le domaine pratique où les 'hormones de bouturage' sont d'usage courant.

L'acide indole-acétique (AIA) est l'auxine naturelle la plus fréquente dans les plantes. Il existe d'autres auxines d'origine synthétique, les plus fréquemment utilisées sont l'acide indole-butryrique (AIB), l'acide α -naphtalène-acétique (ANA) et le 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4 D) qui est un herbicide de synthèse à effet auxinique très puissant.

L'ANA est probablement l'hormone de synthèse la plus utilisée en laboratoire. Comme la plupart des hormones de synthèse, l'ANA est stable, sensible ni à la lumière, ni aux auxines oxydases [74]. L'ANA est l'auxine la plus appropriée pour la rhizogénèse de l'olivier [39 ; 41].

1.3.2.1.1.5.2 Cytokinines

Selon SOLTNER [45], le lait de noix de coco, qui était très utilisé en culture *in vitro* pour ses propriétés stimulantes sur les divisions cellulaires, serait à l'origine de la découverte des cytokinines.

En 1954, SKOOG met en évidence la stimulation par le lait de coco des divisions cellulaires de la moelle de tabac en culture *in vitro*. Cependant, ne pouvant purifier la substance active à partir du lait de coco, les chercheurs isolent en 1956, à partir d'ADN du hareng, une substance présentant la même action sur la moelle de tabac : la kinétine (de kinase : division cellulaire) [74]. C'est vers 1963-1966, que l'existence des cytokinines a été mise en évidence dans la plupart des végétaux [75].

Selon HELLER et *al* [79], les cytokinines stimulent la division cellulaire, favorisent la néoformation des bourgeons ainsi que la ramification des pousses herbacées, retardent la senescence des feuilles et des fruits, favorisent la synthèse des protéines et lèvent la dormance de certaines graines.

Les cytokinines sont surtout des hormones nécessaires à la morphogénèse végétale et ceci grâce au rôle qu'elles jouent en association avec les autres hormones, principalement l'auxine [74]. En effet, d'après les mêmes auteurs, c'est le rapport cytokinine/auxine qui va jouer sur la réponse physiologique de l'explant. Ainsi, si :

- le rapport est supérieur à 1, on a une néoformation de bourgeons ou une levée de dominance apicale (caulogénèse).
- ce rapport est inférieur à 1, on a une formation de racines (rhizogénèse).
- Un rapport voisin de 1 serait callogène (callogénèse).

Ce schéma général est toujours valable bien qu'il convienne de le moduler en fonction des équilibres endogènes de l'explant, équilibres variés et variables [38].

Quatre cytokinines sont employées : l'isopentényladénine (2iP) et la zéatine, qui sont naturelles, la benzyladénine (BA ou BAP) et la kinitine, qui sont obtenues par synthèse. La kinétine est souvent moins efficace que les trois autres cytokinines [75]. Selon LAFON et al [74], l'action de la zéatine est de dix fois supérieure à la kinétine. Par ailleurs, RUGINI [60] ; ABOUSALIM et al [41] affirment que la cytokinine la plus appropriée pour la micropropagation de l'olivier est la zéatine.

1.3.2.1.1.5.3 Gibbérellines

De très nombreuses gibbérellines ont été isolées dans les tissus de plantes. Leur activité biologique peut varier fortement. Seul l'acide gibbérellique A3 (GA3) est couramment utilisé [75]. L'effet des gibbérellines est souvent semblable à celui des auxines [45]. Elle est utilisée principalement pour stimuler la croissance des méristèmes, pour induire l'allongement des tiges, ou encore pour activer la croissance des embryons somatiques [75].

D'autres régulateurs de croissance peuvent se montrer indispensables, mais la plupart du temps ils ne sont que stimulants ou favorisants et rarement essentiels [38].

1.3.2.1.1.6 Gélose ou AGAR-AGAR

Extraite d'algues, elle assure un support solide aux explants. Elle a l'avantage de retenir très peu d'ions, mais en contrepartie elle fournit un milieu de vie pauvre en oxygène lorsqu'elle est utilisée à une forte concentration [47].

1.3.2.1.1.6 pH du milieu de culture

Le pH du milieu de culture est aussi un facteur critique. La pratique habituelle fait que l'on ajuste le pH à 5,5-5,8 pendant la préparation du milieu [75] en ajoutant du (NaOH) ou du (HCl) dans le milieu [76].

1.3.2.2 Facteurs physiques de l'environnement des cultures

Les facteurs principaux de l'environnement des cultures sont la lumière et la température. L'humidité relative sera négligée puisqu'elle est souvent voisine de 100 % dans les récipients de culture [75].

1.3.2.2.1 Température

La température doit être impérativement contrôlée, d'où l'utilité d'une chambre de culture. En moyenne elle est entre 22 et 25 °C [76 ; 47]. Au-dessus de 30°C, la température est néfaste.

1.3.2.2.2 Besoins en lumière

Habituellement, dans les salles de culture de tissus, les intensités lumineuses varient de 1000 à 5000 lux, avec un photopériodisme de 16 à 18 heures/jours [75].

1.3.3 Avantages et contraintes de la culture *in vitro*

1.3.3.1 Avantages de la culture *in vitro*

Par rapport aux méthodes conventionnelles de multiplication, la technique de la culture *in vitro* présente les avantages suivants :

- Reproduction d'un cultivar plus rapidement par rapport aux moyens traditionnels [80],
- Multiplication des géotypes d'élite difficiles à multiplier par bouturage ou par greffage,
- Potentialité de multiplication très importante (approximativement 1000 fois plus élevée que la multiplication végétative traditionnelle) [47],
- Suppression des pieds-mères qui nécessitent de grandes surfaces (marcottières, carrés de pieds-mères) [80],

- Sauvetage d'espèces en voie de disparition ou d'extinction,
- Régénération sanitaire (culture de méristème),
- Conservation du matériel génétique au froid facilitant ainsi la création de banques de gènes [45].

1.3.3.2 Contraintes de la culture *in vitro*

Parmi les inconvénients de la culture *in vitro*, nous pouvons citer les points suivants :

- Possibilité d'apparition d'individus nettement différents que l'on désigne généralement sous le nom de «variants», qui peuvent provenir de perturbations dans le nombre chromosomique, modifications affectant les organites cellulaires ou le cytoplasme [76]. Ceci peut être utilisé comme une source de variation génétique.
- Difficulté de réussite pour certaines espèces, particulièrement chez les ligneuses (milieu de culture inadapté, substances toxiques sécrétées par les plantules [49] ou phase d'acclimatation non maîtrisée [80]).

1.3.4 Phases du microbouturage

1.3.4.1 Phase de conditionnement des plantes mères

Cette étape contribue de manière significative à la réussite des phases ultérieures. Elle se réfère à la préparation de la plante mère qui devrait être dépourvue de carences en minéraux, c'est à dire sans aucun stress hydrique [81].

Les plantes infestées, par les insectes ou les maladies fongiques, peuvent fournir d'importants défis dans une chambre de culture. Par exemple, les œufs de thrips qui se logent dans les interstices des bourgeons résistent à la désinfection de surface du matériel végétal [26].

En ce qui concerne les maladies fongiques et afin de réduire le risque de contamination, les plantes-mères peuvent être traitées avec un fongicide quelque semaines avant la mise en culture des explants *in vitro*. BRHADDA et al [40] ont utilisé un fongicide « cryptanol », 15 jours avant l'introduction des explants *in vitro* de la variété "Picholine marocaine".

Dans presque tous les cas, les explants ne devraient pas être cultivés au cours de la période de dormance [82]. Ainsi, pour un lancement réussi, il est nécessaire de bien préparer les plantes-mères.

1.3.4.2 Phase d'établissement ou d'initiation

La phase d'établissement de la culture est la phase la plus critique au cours de laquelle les cultures doivent surmonter deux problèmes : les contaminations fongiques et bactériennes [81], et la prolifération des bourgeons axillaires des explants introduits dans le milieu où l'équilibre auxine/cytokinine joue un rôle crucial [83].

Les bourgeons sont introduits et mis en culture dans un milieu contenant divers éléments pour assurer leur prolifération. Les milieux les plus utilisés chez l'olivier, sont basées sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) et le milieu d'olive (OM) de RUGGINI (1984) [40 ; 84]. Ces milieux sont souvent enrichis en vitamines et en régulateurs de croissance. L'explant introduit peut être un bourgeon axillaire ou apical [85].

La culture *in vitro* de l'olivier nécessite une photopériode de 16h/j avec une intensité lumineuse de 4000 lux [41]. La durée de cette phase dépend du génotype et la période d'échantillonnage du matériel végétal. Elle est généralement de 6 semaines.

1.3.4.3 Phase de multiplication

Cette étape consiste à transplanter les pousses obtenues à partir de la phase d'initiation dans un milieu adéquat contenant une cytokinine exogène. Ces pousses peuvent, à leur tour, être multipliées de la même façon [49]. Le but de cette phase est d'accroître le nombre de vitroplants. Le taux de multiplication est un critère économique important pour la propagation commerciale [85].

Le milieu utilisé est souvent identique à la première phase, bien que quelques différences mineures puissent avoir lieu dans l'équilibre hormonal [83]. Les cytokinines sont généralement utilisées, dans le milieu, en plus grande concentration que les auxines. Cela est dû à un point de vue physiologique par le

fait que les cytokinines s'opposent à la dominance apicale stimulant ainsi la croissance des nouvelles tiges [84].

Pendant cette phase, plusieurs milieux ont été testés avec succès sur l'olivier donnant des résultats significatifs. Les milieux Murashige et Skoog (MS) [87], le milieu d'olive (OM) [42], Lloyd et Mc Cown (WPM) [56], MS modifié (MSM) [88] et le milieu de multiplication (MM) [89], additionnés de BAP ou de Zéatin à différentes concentrations [54], ont donné les meilleurs résultats.

La cytokinine la plus appropriée pour la micropropagation de l'olivier est la Zéatine [54 ; 90]. Si l'espèce cultivée est à croissance lente, la lenteur du développement peut être observée dans les tubes.

1.3.4.4 Phase d'élongation

Après avoir obtenu le nombre de plants désirés, ceux-ci sont individualisés ou microbouturés une dernière fois [47]. Cette phase d'élongation qui correspond à l'allongement des jeunes pousses, peut-être dans certain cas facultative. Cela dépend de la plante qu'on cherche à multiplier. TSOGAS et BOURIQUET [91], sur l'épicéa et DUMANOIS et *al* [92], sur le chanvre notent que les jeunes pousses peuvent être directement installées sur un milieu d'enracinement, mais que la réussite de celui-ci dépend, pour une grande part, de la taille de l'explant mis en culture. MICHEL et *al* [93], sur l'hybride de bananier FHIA-01 (AAAB), démontre que la taille du vitroplant et l'induction racinaire sont positivement corrélées. Ainsi, si les pousses feuillées ne sont pas assez développées, l'enracinement est souvent médiocre.

1.3.4.5 Phase d'enracinement

Cette étape se caractérise par l'émergence de racines sur les pousses feuillées obtenues dans la phase précédente [81]. L'enracinement est souvent la phase la plus délicate et à l'origine des échecs dans la conduite de la culture *in vitro* (TOURTE, 1998) in [94].

Les milieux varient quelque peu de ceux utilisés dans les phases précédentes. Les vitamines et minéraux restent généralement identiques. La

différence majeure réside principalement sur l'équilibre hormonal en faveur des auxines.

La rhizogénèse est décomposée en phases d'induction, d'initiation et d'expression ou de développement racinaire [95 ; 96 ; 41]. Un apport d'auxine est nécessaire à l'induction racinaire, mais sa présence de façon continue dans le milieu de culture peut inhiber le développement ultérieur des racines [97].

Selon GHORBEL et *al* [98], la lumière n'est pas déterminante dans l'induction et l'initiation des racines. Au contraire, ils considèrent qu'un passage à l'obscurité pendant 5 jours permet l'induction et l'initiation rapide des racines chez l'hybride pêcher-amandier *GF-557*. ROUSSOS et PONTIKIS [1] affirment que deux courtes blessures longitudinales à la base de la pousse associées à un passage à l'obscurité des pousses pendant les premiers jours d'enracinement augmentent le pourcentage d'enracinement de l'olivier cv. 'Koroneiki'.

ABOUSALIM et *al* [41], en étudiant l'enracinement de l'olivier var. 'Picholine marocaine', ont réalisé l'étape d'induction des pousses à l'obscurité tandis que la prolifération et le développement racinaire ont été réalisés à la lumière, sous une photopériode de 16 h. Il apparaît donc que l'auxine peut être plus active sur l'induction des racines lorsque les plantules séjournent d'abord à l'obscurité. Leur passage par la suite sur un milieu dépourvu d'hormone évite la rétro-inhibition des racines par les auxines [98].

Plusieurs chercheurs rapportent que l'olivier différencie mieux les racines avec l'ANA qu'avec d'autres auxines [55 ; 37 ; 41]. Les travaux de YACOUBOUGDAL et *al* (2000) in [94] sur l'olivier montrent que la variété 'Chemla' différencie mieux les racines en présence d'ANA à 6 mg/l en comparaison avec la même concentration en AIA ou AIB. Alors que ABOUSALIM et *al* [41] sur la variété 'Picholine marocaine' ; RUGINI [54] sur les cultivars 'Frantoio', 'Moailo' et 'Doce Agogia', rapportent que c'est l'ANA à 1 mg/l qui permet d'avoir les meilleurs taux d'enracinement.

ABOUSALIM et *al* [41] ont signalé la difficulté d'enracinement *in vitro* du matériel adulte. Cette difficulté est commune à d'autres espèces ligneuses. Le

rajeunissement du matériel végétal par divers moyens a été suggéré par plusieurs auteurs en vue d'améliorer sa réactivité *in vitro* [99].

On profite parfois de la phase d'enracinement pour commencer à faire durcir les plants et les préparer ainsi au passage *in vivo* [47]. Selon les mêmes auteurs, la phase d'enracinement *in vitro* n'est pas une étape obligatoire pour certaines espèces. Dans ce cas, le passage en acclimatation se fait directement à la fin de la phase précédente.

1.3.4.6 Phase d'acclimatation

Il s'agit de la dernière phase de la propagation *in vitro*. Elle consiste à adapter progressivement les vitroplants aux conditions extérieures.

Les plants enracinés sont transférés dans des pots contenant un substrat horticole afin de former de nouvelles racines adaptées à la vie en terre. La porosité du substrat doit être moyenne mais une densité importante est favorable à un bon enracinement [100].

La température ambiante et celle du substrat doivent être contrôlées (aux environs de 20°C) et ne pas présenter d'écart trop important entre elles. La mycorhization du substrat, objet de quelques essais, pourrait dans l'avenir se révéler une technique intéressante [47].

Les stomates des vitro-plantules demeurent constamment ouverts et laissent donc échapper l'eau de transpiration de manière continue ce qui provoque le flétrissement de l'appareil végétatif [101]. Ainsi, l'humidité relative doit être de l'ordre de 100%. Ensuite, elle est réduite progressivement lors de la phase d'acclimatation des plantules [82]. L'humidité relative est assurée par le système classique de la mise à l'étouffée sous film polyane pour les espèces à acclimatation facile ou par l'utilisation du brouillard artificiel (*fog-system*), pour les espèces délicates [47].

Dans son état *in vitro*, la plante puise l'essentiel de son énergie dans le milieu de culture. Pour favoriser l'activité des systèmes photosynthétiques de la plante, une diminution de la teneur en sucre du dernier milieu permet de durcir les plants et donne parfois de bons résultats [47].

L'analyse moléculaire peut être réalisée dans cette phase en utilisant la technique de RAPD et ce, pour l'évaluation de l'olivier obtenu à cause des risques de variation somaclonale du matériel végétal pendant la micropropagation [102 ; 103].

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1 Objectif du travail

Notre travail consiste en l'étude des possibilités de régénération *in vitro*, à partir de bourgeons axillaires, de quatre variétés autochtones d'olivier (Chemlal, Limli, Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana) dans le but est de contribuer à l'élaboration de protocoles de multiplication *in vitro* de l'olivier autochtone.

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire central de l'institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne (ITAFV) à Tessala El Merdja (Alger), durant la période de septembre 2013 à octobre 2014.

L'étude a été menée en quatre étapes, à savoir :

- Initiation de la culture,
- Élongation des pousses,
- Enracinement des pousses,
- Acclimatation des plantules.

2.2 Matériel végétal

Dans notre expérimentation, nous avons utilisé un matériel végétal prélevé sur des plants d'olivier (*Olea europaea*. L) âgés de 04 à 05 ans. Quatre variétés autochtones ont été choisies pour notre étude à savoir : Chamlal, Limli, Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana. Ces plants proviennent de la station de Sidi Aich (Béjaia) rattachée à l'ITAFV et sont maintenus sous serre de forçage au sein du laboratoire central de Tessala El Merdja.

Le choix de ces variétés étudiées a été effectué sur la base des orientations du programme ministériel de préservation et de valorisation des ressources phytogénétiques de l'olivier. Dans ce cadre, un programme de micropropagation des variétés autochtones d'olivier a été entamé dans le laboratoire de culture *in vitro* de l'ITAFV.

Pour accélérer le débourrement de nouveaux bourgeons axillaires et la formation de nouvelles pousses herbacées sur notre matériel végétal de base, nous avons forcé les plants en les arrosant par une solution nutritive (Knop) (appendice A) tous les 7 jours pendant un mois (de 01 au 30 septembre).



Figure 2.1 : Serre de forçage des plants d'olivier

2.3 Méthodes et techniques expérimentales

2.3.1 Milieux de culture

Durant les deux premières phases du microbouturage (initiation et élongation) nous avons utilisé un seul milieu de culture, qui est le milieu MS modifié (MSM) (milieu MURASHIGE et SKOOG modifié par LEVA *et al* [88] (appendice B).

Concernant la phase d'enracinement, le milieu de culture de base utilisé est le MSM dilué de moitié pour les macroéléments et le mannitol ($\frac{1}{2}$ MSM). Ces compositions minérales ont donné de meilleurs résultats comparativement à d'autres formulations préalablement comparées au niveau du laboratoire.

Le choix de l'hormone en terme de présence ou d'absence d'auxines et/ou de cytokinines est fonction de la phase de la culture comme le montre le plan expérimental.

2.3.1.1 Composition des milieux de culture

2.3.1.1.1 Etablissement de culture et élongation

Le milieu de base utilisé est le MSM, additionné ou non de cytokinine. Un seul type de cytokinine a été testé ; la zéatine, avec trois niveaux de concentration (0, 1 et 2 mg/l).

Après ajustement du pH à 6,2, pour la phase d'établissement, les milieux sont stérilisés par autoclavage à une température de 120°C et une pression de 01 bar pendant 20 minutes, sont ensuite coulés sous une hotte à flux laminaire horizontale dans des boîtes de Pétri à raison de 20ml/boîte. Tandis que pour la phase d'élongation, les milieux sont coulés dans des flacons en verre de 250 ml à raison de 50 ml/flacon. Ils sont ensuite stérilisés par autoclavage à une température de 120°C et une pression d'un bar pendant 20 minutes.

2.3.1.1.2 Phase d'enracinement

Dans cette phase nous avons utilisé le milieu ½ MSM. Deux types de régulateurs de croissance sont ajoutés dans le milieu : la zéatine avec une seule concentration (0,5 mg/l) et l'auxine ANA avec 4 concentrations à savoir : 0, 1, 2 et 4 mg/l à l'effet de mettre en évidence leur influence sur l'enracinement des plantules obtenues à partir des phases précédentes.

Après ajustement du pH à 6,2, les milieux sont coulés dans des tubes de culture à raison de 15ml/tube, ensuite stérilisés par autoclavage à une température de 120°C et une pression d'un bar pendant 20 minutes.

2.3.2 Préparation et mise en culture du matériel végétal

2.3.2.1 Phase d'initiation

2.3.2.1.1 Prélèvement et désinfection du matériel végétal

Pour chaque variété, des boutures herbacées de 10 à 15 cm sont prélevées sur des plants-mères à l'aide d'un ciseau stérile que l'on désinfecte à l'eau de javel (13°chl) après chaque coupe, surtout en passant d'un plant à l'autre. Les boutures prélevées sont mises dans un sachet en plastique transparent.

Une fois au laboratoire, les feuilles sont coupées à environ 3 mm du pétiole, puis les tiges en deux boutures que l'on met dans un flacon que l'on remplit d'eau de robinet. On ajoute quelques gouttes de détergent (ISIS vaisselle) et d'eau de javel (13°chl). Ensuite, le flacon est agité pendant 5 min afin de dégager éventuellement les boutures des œufs et des larves d'insectes. Les boutures sont ensuite rincées abondamment avec l'eau courante. L'opération est répétée trois fois. Après lavage et rinçage des boutures, ces dernières sont immergées dans de l'eau distillée stérile pendant 30 minutes.

Sous la hotte stérile, les microboutures sont trempées pendant 3 minutes dans le bichlorure de mercure (HgCl_2) à 677 mg/l contenant 2 à 3 gouttes de Tween 20, avant d'être rincées abondamment à l'eau distillée stérile [41] (figure 2.2).



Figure 2.2 : Désinfection du matériel végétal : (a) prélèvement de boutures herbacées ; (b) feuille coupées à environ 3 mm du pétiole ; (c) mise en sachet des bouture échantillonnées ; (d) lavage des boutures ; (e) boutures immergées dans de l'eau distillée stérile ; (f) désinfection des boutures dans des conditions stériles.

2.3.2.1.2 Mises en culture du matériel végétal

La mise en culture se déroule dans des conditions d'asepsie totale sous hotte à flux laminaire. Tous les instruments utilisés (les pinces, scalpels,...etc.) sont stérilisés au préalable à l'étuve à 180° C pendant 2 heures.

Après désinfection de toute la surface de travail de la hotte avec l'alcool 70°, nous avons coupé les extrémités des pétioles puis les tiges en petits fragments de 1 à 1,5 cm contenant deux bourgeons axillaires chacun.

Les fragments obtenus (explants) sont cultivés dans une boîte de Pétri contenant 20 ml de milieu de culture MSM à raison de six explants par boîtes. Ce milieu est soit sans hormone de croissance soit additionné de 1 ou 2 mg/l de zéatine.

Les boîtes sont scellées avec du parafilm et déposées dans la chambre de culture conditionnée à une température de 24°C et une photopériode de 16 heures par jour (figure 2.3).

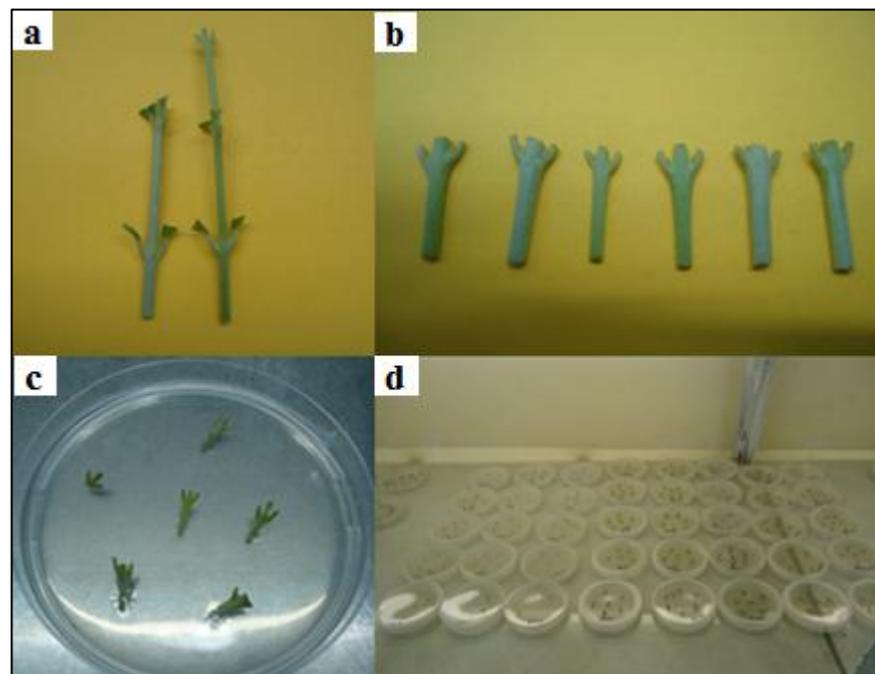


Figure 2.3 : Etablissement de la culture : (a) boutures désinfectées ; (b) explants contenant chacun deux bourgeons axillaires ; (c) mise en culture des explants dans le milieu de culture ; (d) dépôt des boîtes de Pétri dans la chambre de culture.

2.3.2.2 Phase d'élongation

Quatre semaines après l'établissement de la culture, dans des conditions d'asepsie totale, les microboutures ayant survécu à l'établissement ont été transférées dans des flacons en verre de 250ml contenant 50 ml de milieu de culture MSM à raison de 5 explants par flacon. Ce milieu est soit additionné de zéatine soit, sans hormone de croissance.

Les flacons sont déposés dans la chambre de culture dans les mêmes conditions que celles assurées dans l'étape précédente, à savoir : une température de 24°C, et une photopériode de 16 heures de lumière par jour (figure 2.4).

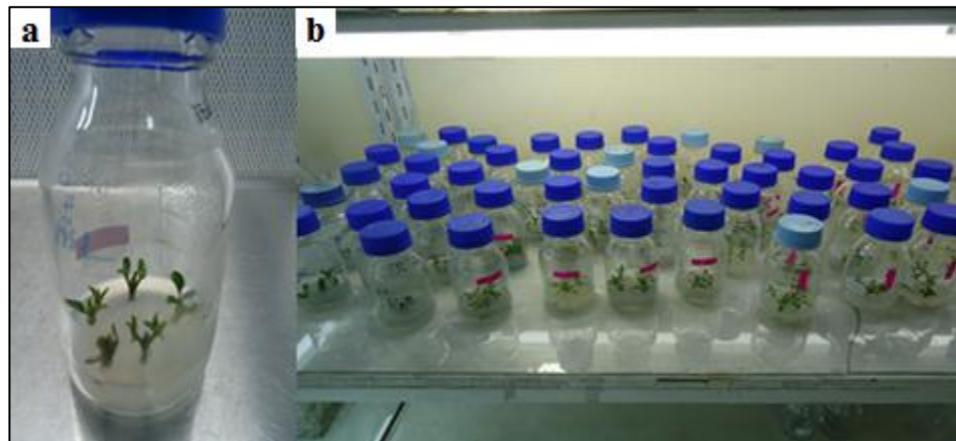


Figure 2.4 : Elongation des pousses : (a) : flacon contenant cinq explants débouffés ; (b) dépôt des flacons dans la chambre de culture.

2.3.2.3 Mise en place de dispositif expérimental des phases d'établissement et d'élongation

Etant donné que toutes les conditions de l'environnement sont contrôlées, nous avons opté pour notre expérimentation la randomisation totale à deux facteurs.

Le premier facteur représente le génotype avec quatre variantes : Chemlal (CH), Limli (LIM), Blanquette de Guelma (BG) et la Ronde de Miliana (RM). Le second facteur représente la concentration de la zéatine dans le milieu de culture avec trois niveaux : 0 mg/l (Z0), 1 mg/l (Z1) et 2 mg/L (Z2).

Le tableau 2.1 comporte les douze traitements étudiés dans la phase de mise en culture et d'élongation :

Tableau 2.1 : Traitements étudiés en phase de mise en culture et d'élongation

| Facteur 1 Facteur 2 | CH | LIM | BG | RM |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Z₀ | CH*Z ₀ | LIM*Z ₀ | BG*Z ₀ | RM*Z ₀ |
| Z₁ | CH*Z ₁ | LIM*Z ₁ | BG*Z ₁ | RM*Z ₁ |
| Z₂ | CH*Z ₂ | LIM*Z ₂ | BG*Z ₂ | RM*Z ₂ |

Dans la phase d'établissement, chaque traitement est répété cinq fois à raison de six explants par boîte tandis qu'il est répété quatre fois à raison de cinq explants par flacon dans la phase d'élongation.

2.3.2.4 Phase d'enracinement

A la fin de la période d'élongation, les explants, d'au moins 1 cm de longueur, sont transférés dans un milieu d'enracinement [1] dont le milieu de culture de base est le MSM dilué de moitié pour les macroéléments et le mannitol. Le milieu est additionné de 0,5 mg/l de zéatine soit sans auxine, soit avec l'auxine ANA à des concentrations variables (1, 2 et 4 mg/l).

La technique utilisée comprend deux stades :

- Stade I, les pousses, après exécution aseptique de deux blessures longitudinales courtes à leur base [1] et élimination des deux feuilles basales, ont été mises dans des tubes contenant 20 ml de milieu de base ½ MSM ensuite incubées à l'obscurité pendant une semaine. Le milieu a été additionné de 0,5 mg/l de zéatine complété ou non d'auxine ANA.
- Stade II, les pousses sont transférées dans un milieu frais dépourvu de régulateurs de croissance pour favoriser le développement racinaire [41], sous des conditions d'éclairage et de température identiques que

celles assurées dans les deux phases précédentes de culture (initiation et élongation) (figure 2.5).

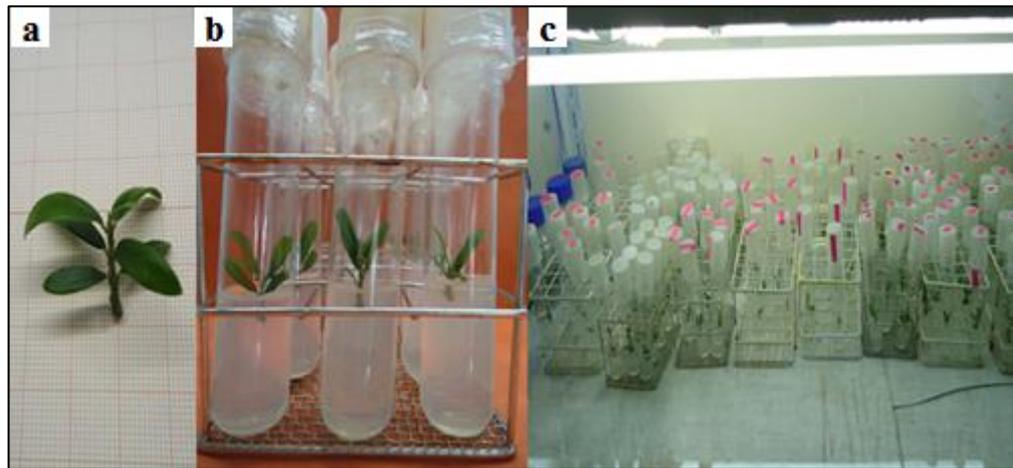


Figure 2.5 : Enracinement des pousses : (a) pousse avant la phase d'enracinement ; (b) mise en tube des pousses au stade I ; (c) dépôt des tubes au stade II dans la chambre de culture.

2.3.2.4.1 Mise en place de dispositif expérimental de la phase d'enracinement

Deux facteurs sont étudiés dans cette étape suivant un plan d'expérimentation en randomisation totale. Le premier facteur comprend les variétés ayant développé des pousses supérieures à 1 cm de longueur en nombre suffisant pour assurer le nombre de répétitions nécessaires à l'expérimentation. La tentative de multiplier la variété Limli a échoué lors de la phase précédente et, par conséquent, elle n'a pu être étudiée lors de la phase d'enracinement. De ce fait, nous avons étudié trois variétés seulement durant cette étape de culture, à savoir : Chemlal (CH), Blanquette de Guelma (BG) et la Ronde de Miliana (RM). Le second facteur représente la concentration de l'auxine ANA dans le milieu de culture avec quatre niveaux : 0 mg/l (A0), 1 mg/l (A1), 2 mg/l (A2) et 4 mg/l (A4).

Le tableau 2.2 comporte les douze traitements étudiés dans la phase d'enracinement :

Tableau 2.2 : Traitements étudiés dans la phase d'enracinement.

| Facteur 1 Facteur 2 | CH | BG | RM |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| A₀ | CH*A ₀ | BG*A ₀ | RM*A ₀ |
| A₁ | CH*A ₁ | BG*A ₁ | RM*A ₁ |
| A₂ | CH*A ₂ | BG*A ₂ | RM*A ₂ |
| A₃ | CH*A ₃ | BG*A ₃ | RM*A ₃ |

2.3.2.5 Phase d'acclimatation

Après sept semaines d'enracinement, les pousses enracinées sont retirées des tubes de culture et sont soigneusement lavées avec de l'eau courante afin de les débarrasser du milieu de culture restant, puis sont transférées dans des pots contenant un mélange de tourbe et de perlite afin de former de nouvelles racines adaptées à la vie en terre. Le substrat étant stérilisé à 180°C pendant deux heures à une pression de 01bar.

La partie aérienne est ensuite recouverte d'un sac en plastique transparent pour maintenir la plantule dans l'ordre de 90% d'humidité relative [82]. L'humidité est ensuite réduite en procédant d'une façon progressive à l'ouverture du sac pour permettre aux vitroplants de s'adapter aux conditions naturelles. La croissance de nouvelles feuilles fonctionnelles est nécessaire avant la suppression progressive du sac [82].

Les pots ont été mis sous une photopériode de 16 heures de lumière par jour et une température de 24°C. Les plantules sont arrosées par une solution nutritive (Knop) deux fois par semaine.

Après un mois de préacclimatation les plantules sont rempotées dans un substrat dans des sachets noirs de cinq kilos et transférés dans la serre d'acclimatation réglée à une température de 24°C afin de continuer leur croissance (figure 2.6).

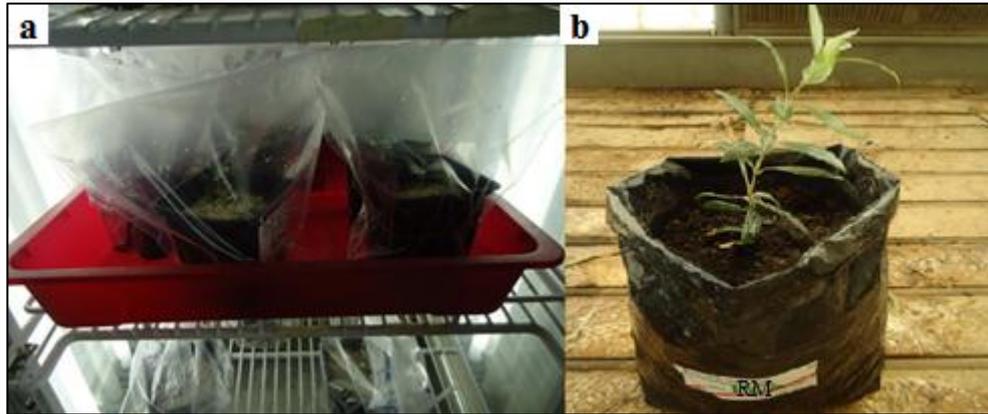


Figure 2.6 : Acclimation des plantules : (a) plants après 1 mois de préacclimation ; (b) plant dans la serre d'acclimation après 6 mois.

2.3.2.5.1 Mise en place de dispositif expérimental de la phase d'acclimation

Un seul facteur a été étudié dans cette étape suivant un plan d'expérience en randomisation totale. Il représente les traitements suivants : CH*A4, BG*A1, BG*A2, BG*A4, RM*A1, RM*A2 et RM*A4.

2.3.2.6 Paramètres étudiées

2.3.2.6.1 Phase d'établissement

Durant les quatre semaines de l'étape d'initiation, les observations réalisées ont porté sur les paramètres suivants :

- Taux de débourrement total des explants (%),
- Nombre de pousse (%),
- Taux de brunissement (%),
- Taux de débourrement journalier (%),
- Nombre de jours au premier débourrement.

2.3.2.6.2 Phase d'élongation

L'étape d'élongation a duré, en tout, soixante jours. Après chaque vingt jours de culture, les explants sont transférées dans un milieu frais additionné avec la même concentration de zéatine. Les observations réalisées ont porté sur les paramètres suivants :

- Longueur des pousses (mm),

- Nombre de feuilles,
- Nombre de pousses par explant,
- Taux de survie des explants (%),
- Nombre de pousse \geq à 1 cm de longueur (%).

2.3.2.6.3 Phase d'enracinement

Durant les sept semaines de l'étape d'enracinement, les observations réalisées ont porté sur les paramètres suivants :

- Taux de callogenèse (%),
- Taux d'enracinement (%),
- Nombre de racines par plantule,
- Longueur des racines par plantule (cm).

2.3.2.6.4 Phase d'acclimatation

Après un intervalle de un et six mois d'acclimatation, nous avons noté les observations suivantes :

- Taux de survie (%),
- Longueur de la tige (cm),
- Nombre de feuilles par plant.

2.4 Analyses statistiques

Les effets des différents traitements sont étudiés par l'analyse de la variance ($\alpha = 5\%$), suivie par un test de comparaison des moyennes (test de Newman-Keuls au seuil 5 %). Les analyses sont réalisées à l'aide du logiciel STATISTICA version 6.

La signification des différences entre les traitements est exprimée en fonction de la probabilité (P) de la façon suivante :

- $P \geq 0,05$: Différence non significative,
- $P \leq 0,05$: Différence significative,
- $P \leq 0,01$: Différence hautement significative,
- $P \leq 0,001$: Différence très hautement significative.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSIONS

L'objectif visé par notre étude est la contribution à la mise au point d'un protocole de multiplication conforme de quelques variétés autochtones d'olivier « Chemlal, Limli, Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana » par le biais du microbouturage *in vitro*.

3.1 Phase d'initiation

Cette phase est considérée comme étant l'étape de base de la micropropagation [47]. Elle consiste à établir la mise en culture *in vitro* des explants de la plante que l'on désire multiplier.

Un total de 360 microboutures ont été introduites sur milieu MS modifié (MSM) (LEVA et *al*, 1995). Ce milieu a été soit additionné de 1 ou 2 mg/l de zéatine ou laisser sans apport exogène de substance de croissance.

Après 4 à 5 jours de leur introduction, les bourgeons axillaires ont commencé à débourrer. Les contaminations, quelles soient d'origine bactérienne ou fongique n'ont pas été observées pendant cette phase. La figure 3.1 illustre l'initiation du débourrement des bourgeons axillaires :

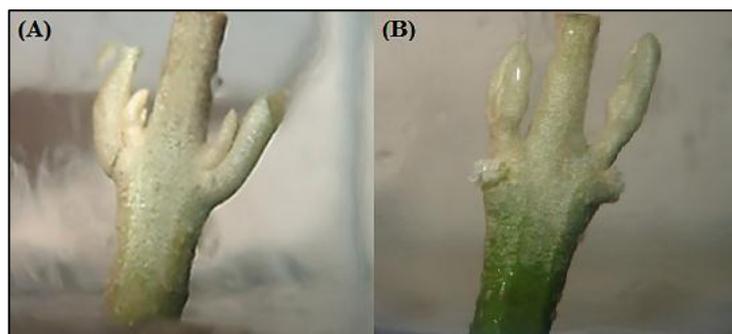


Figure 3.1 : Débourrement des bourgeons axillaires : (A) mise en culture, (B) débourrement des bourgeons axillaires et apparition des deux premières feuilles.

Après quatre semaines de l'introduction des explants *in vitro*, des observations ont porté sur le pourcentage de bourgeons ayant débourré, le pourcentage de bourgeons ayant développé des pousses, le pourcentage

d'explants perdus par brunissement ainsi que le séjour au premier débourrement et ce, pour chaque traitement étudié.

3.1.1 Taux de débourrement total des explants (%)

L'ensemble des explants ont montré un débourrement de leurs bourgeons axillaires (Figure 3.4 et 3.5). Cependant, l'intensité de celui-ci varie d'un traitement à l'autre. Les résultats obtenus montrent également que la zéatine a un effet positif sur le débourrement des explants des variétés CH, RM et BG et, un effet négatif sur la variété LIM.

Les pourcentages varient entre 61,60% et 98,80%. Le traitement BG*Z2 et RM*Z2 viennent en tête avec 98,80 % d'explants débourrés pour chacun suivi de BG*Z1 avec 96,00% puis de RM*Z1 avec 91,20%. LIM*Z2 et LIM*Z1 montrent les taux les plus faibles avec respectivement 62,60% et 61,60% de débourrement (Tableau 3.1).

L'analyse de la variance pour le débourrement total des explants n'a révélé aucun effet significatif de l'interaction génotype*zéatine. Néanmoins, l'ANOVA ayant porté sur les deux facteurs séparément révèle un effet très hautement significatif ($P=0,000014$) pour le facteur 1 (Génotype) (Figure 3.2) et aucun effet pour le facteur 2 (zéatine) ($p=0,069054$).

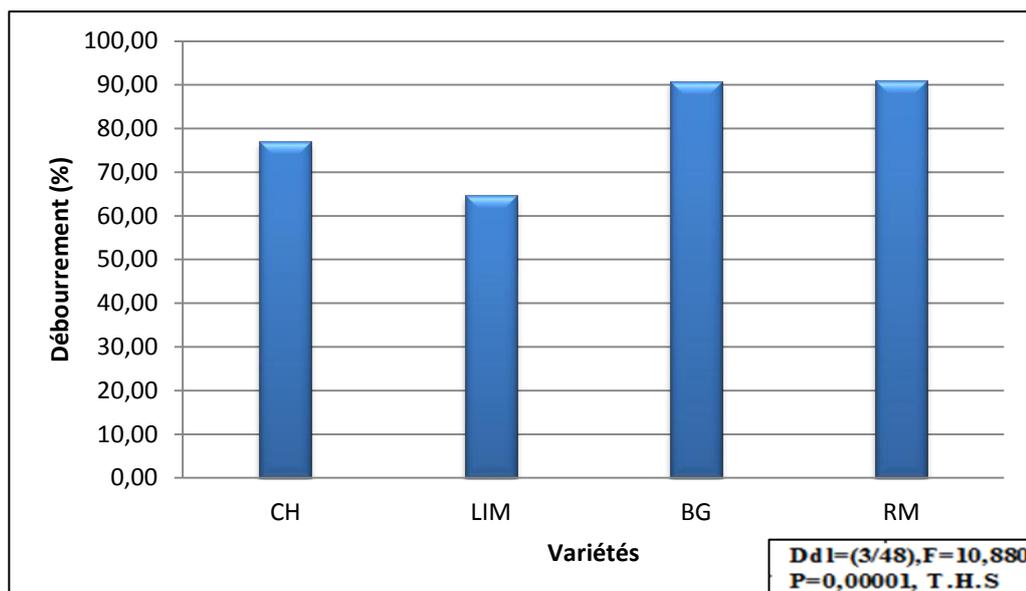


Figure 3.2 : Effet du génotype sur le pourcentage de débourrement.

Les taux de débourrement des géotypes varient entre 64,66-90,93%. La variété RM est classée la première avec 90,93% de débourrement, secondée de très près par la variété BG avec 90,86% puis les variétés CH et LIM, classées en dernier avec respectivement 76,97% et 64,66% d'explants débourrés.

Le test de Newman-Keuls classe les variétés en trois groupes distincts. Ainsi, le groupe (a) comporte les variétés RM et BG. Le groupe (b) comporte la variété CH et le groupe (c) la variété LIM (tableau 3.1).

Tableau 3.1 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour les taux de débourrement

| Facteur1 Facteur2 | | CH | LIM | RM | BG | Moyenne Zéatine |
|----------------------|-----------------|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| | | Z0 | 71,60a | 69,80a | 82,80a | 77,80a |
| Débourrement (%) | Z1 | 73,00a | 61,60a | 91,20a | 96,00a | 80,45 a |
| | Z2 | 86,33a | 62,60a | 98,80a | 98,80a | 86,63a |
| | Moyenne Géotype | 76,97b | 64,66a | 90,93c | 90,86c | |

**Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent au même groupe

3.1.2 Nombre de pousses (%)

Les résultats obtenus montrent que la zéatine a un effet positif sur le développement de nouvelles pousses et ce, pour tous les géotypes étudiés (Figure 3.3). Toutefois, les pourcentages obtenus diffèrent d'un traitement à un autre et varient de 0,00 à 41,00%. Notons que la longueur des pousses varie de 2 à 3 mm.

Le meilleur résultat a été enregistré chez le traitement BG*Z2 avec 41,00% contre 05,00% pour BG*Z1 et BG*Z0. Les traitements RM*Z2 et RM*Z1 ont donné respectivement 27,49% et 24,16% alors que RM*Z0 a enregistré un taux beaucoup plus faible, 05,00%. Le même constat a été observé pour la variété CH où les traitements CH*Z2 et CH*Z1 ont également donné des taux rapprochés

avec respectivement 24,16% et 20,83% tandis que CH*Z0 a donné seulement 02,50% de pousses. Le traitement LIM*Z2 a donné 05,00% de pousses contre 00,00% pour LIM*Z1 et LIM*Z0.

L'ANOVA montre un effet très hautement significatif de l'interaction génotype*zéatine sur ce paramètre ($p=0,000134$).

La figure 3.3 illustre les résultats obtenus pour les différents traitements étudiés.

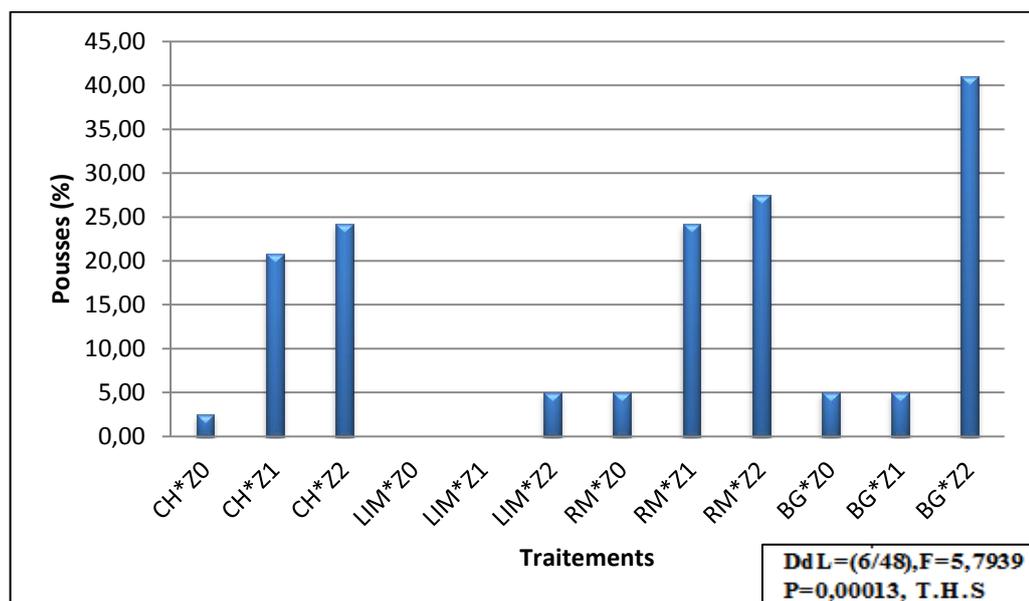


Figure 3.3 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur le nombre de pousses.

Le test de Newman-Keuls fait ressortir trois groupes homogènes (a, b et c) pour l'interaction des facteurs. Le traitement BG*Z2 s'individualise dans le groupe (a). Les traitements RM*Z2, RM*Z1, CH*Z2 et CH*Z1 forment le groupe (b). Le reste des traitements constitue le groupe (c) (Tableau 3.2 et figure 3.4 et 3.5).

En ce qui concerne le facteur génotype, les variétés ont réagi différemment. La valeur maximale est attribuée à la variété RM avec 18,88% et la valeur minimale à LIM avec 01,66%. Les variétés BG et CH ont donné respectivement 17,00% et 15,83%. Les différences sont très hautement significatives ($p=0,000005$).

La concentration de la zéatine dans le milieu de culture influe également sur le nombre de pousses obtenues et possède un effet très hautement significatif

($p=0,000000$). En effet, l'augmentation de la concentration du milieu en zéatine permet d'obtenir de meilleurs résultats. La concentration Z2 a donné le meilleur résultat avec 24,41% suivi de Z1 avec 12,49%, puis de Z0 qui a donné le résultat le plus faible avec un taux de 03,12% (Tableau 3.2).

Le tableau 3.2 comporte la comparaison des moyennes obtenues par le test de Newman-Keuls pour les taux de pousses obtenues.

Tableau 3.2 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour les taux de pousses

| Facteur1 Facteur2 | | CH | LIM | RM | BG | Moyenne Zéatine |
|----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Pousses (%) | Z0 | 02,50 c | 00,00 c | 05,00 c | 05,00 c | 03,12 <u>c</u> |
| | Z1 | 20,83 b | 00,00 c | 24,16 b | 05,00 c | 12,49 <u>b</u> |
| | Z2 | 24,16 b | 05,00 c | 27,49 b | 41,00 a | 24,41 <u>a</u> |
| | Moyenne Génotype | 15,83 <u>a</u> | 01,66 <u>b</u> | 18,88 <u>a</u> | 17,00 <u>a</u> | |

**Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent au même groupe.



Figure 3.4: Débourement des explants après quatre semaines de culture : variétés Chemlal (à gauche) et Limli (à droite).

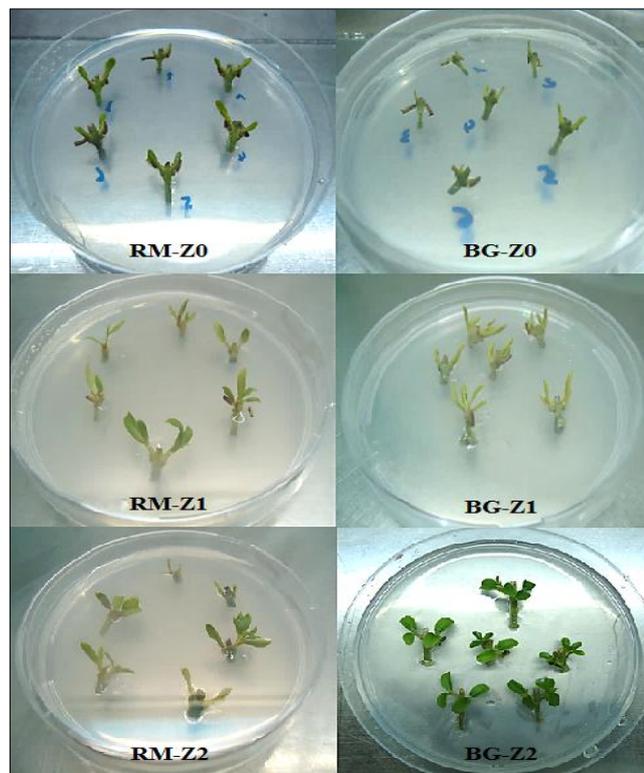


Figure 3.5: Débourement des explants après quatre semaines de culture : variétés Ronde de Miliana (à gauche) et Blanquette de Guelma (à droite).

3.1.4 Taux de brunissement des explants (%)

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage de brunissement diffère d'un traitement à un autre et les valeurs varient de 0% à 09,60%. En effet, le traitement CH*Z0 a révélé un taux de 09,60% suivi de LIM*Z1 et LIM*Z2 avec 09,20% chacun, ensuite celui de LIM*Z0 avec 08,80% suivi de BG*Z1 et RM*Z1 avec 06,40% chacun. Les traitements RM*Z2, RM*Z0 et BG*Z2 ont enregistré un taux de 03,20% et les trois derniers traitements (BG*Z0 et CH*Z0 et CH*Z1) révèlent, quant à eux, un taux de brunissement nul.

L'analyse de la variance révèle un effet non significatif de l'interaction génotype*zéatine sur le pourcentage de brunissement des explants. L'ANOVA des deux facteurs séparément ne montre aucun effet significatif pour les deux facteurs en question (F1 : $p=0,145719$), (F2 : $p=0,774794$).

La figure 3.6 fait ressortir les résultats enregistrés de l'effet de l'interaction génotype* zéatine sur le pourcentage de brunissement des explants.

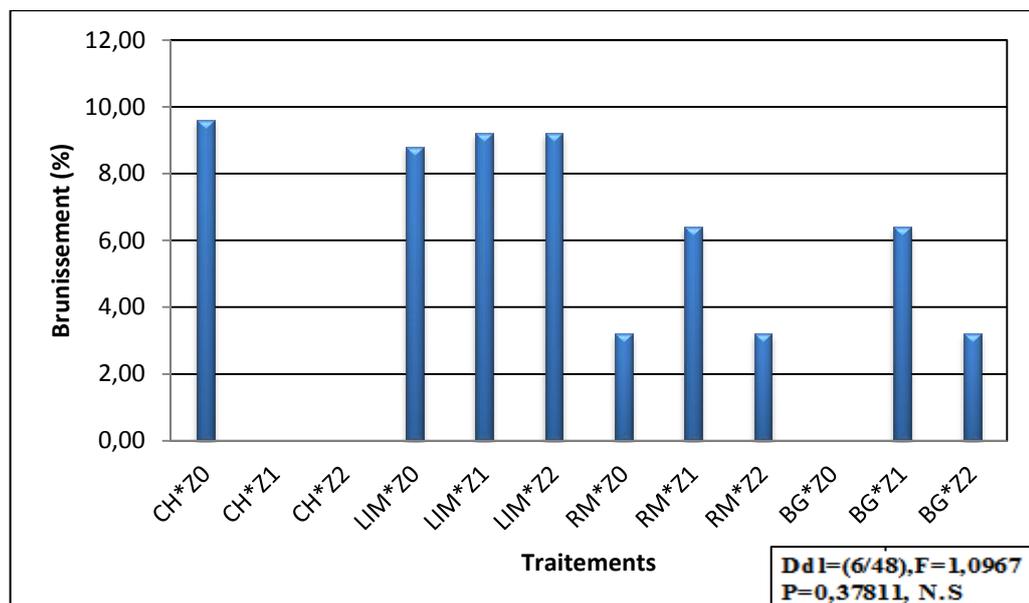


Figure 3.6 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur le taux de brunissement.

3.1.5 Etude de la vitesse de débourrement

Le suivi journalier de l'évolution de chaque explant pendant quatre semaines depuis le début de leur mise en culture nous a permis de calculer le taux de

débourrement pour chaque journée à partir du premier gonflement des bourgeons observé dans chaque traitement, ensuite de tracer une courbe de vitesse (figure 3.7). Les tableaux B.1 et B.2 (appendice B) récapitulent toutes les données enregistrées. La figure 3.7 illustre l'évolution quotidienne de débourrement pour l'ensemble des traitements étudiés.

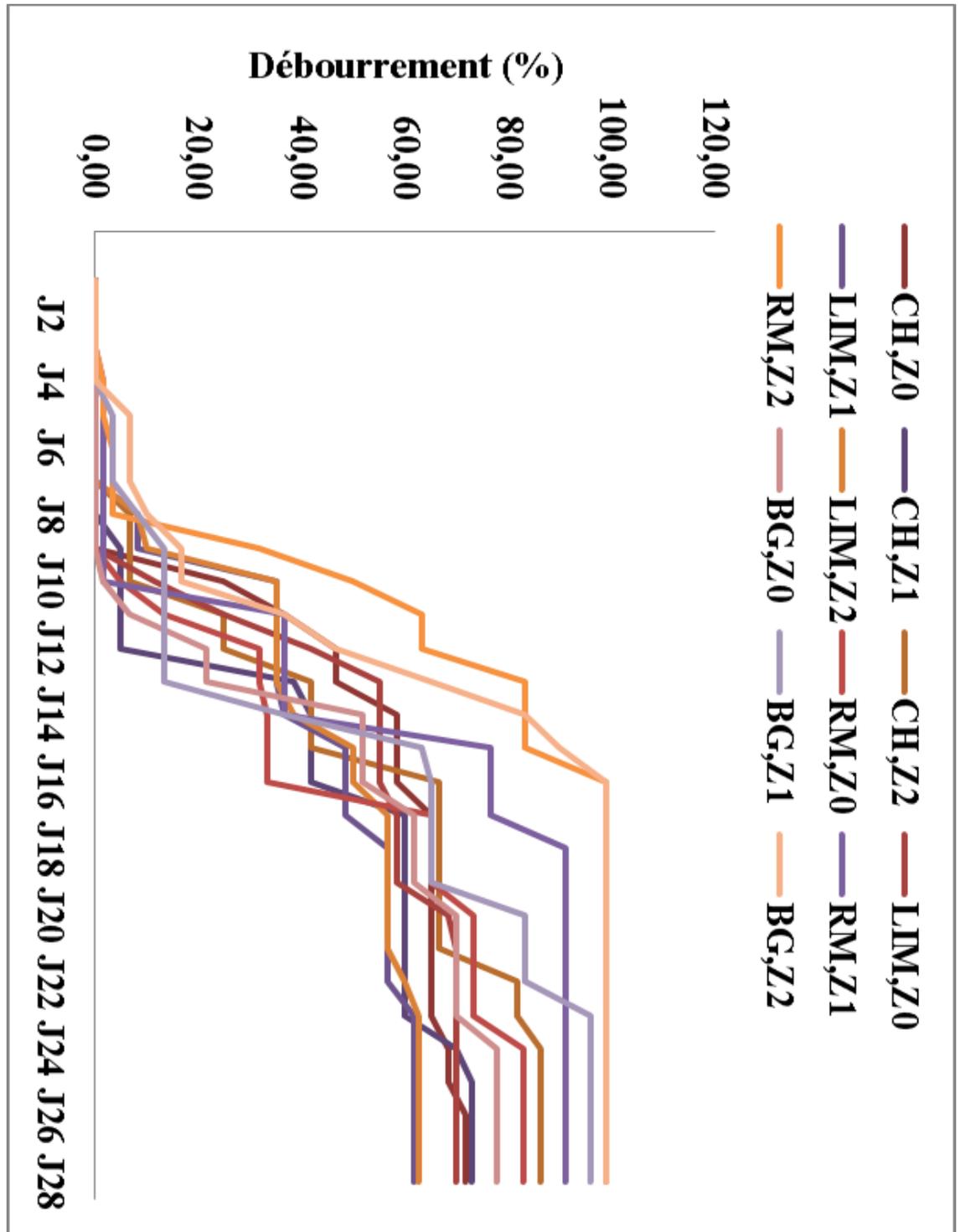


Figure 3.7 : Evolution quotidienne de débourrement des explants.

L'analyse de la figure 3.7 permet de relever les observations suivantes :

Les traitements RM*Z2 et RM*Z1 sont les plus rapides et ont enregistré une durée de débourement de 4 jours (1,65%) tandis que le RM*Z0 n'a débouillé qu'à partir du 10^{ème} jour (5,00%). Les traitements BG*Z2 et BG*Z1 ont donné une durée de 5 jours (respectivement 6,66% et 3,33%) alors que le BG*Z0 ne commence à débouiller qu'à partir du 10^{ème} jour (1,67%). Les traitements LIM*Z2 et LIM*Z1 ont débouillé après 8 jours (8,33%) et LIM*Z0 après 10 jours de mise en culture (11,67%). Le traitement CH*Z2 a enregistré une durée de 8 jours (6,67) alors que CH*Z1 a enregistré une durée de 9 jours (5,00%) tandis que le traitement CH*Z1, a débouillé au 10^{ème} jour avec un taux plus élevé (25,00%).

Après 14 jours de culture, les taux de débourement ont tous augmenté mais de manière différente. Le pourcentage le plus élevé est observé chez les traitements RM*Z2 et BG*Z2 (83,33%) tandis que RM*Z0 a montré le pourcentage le plus bas (33,33%). Notons que les explants des variétés CH et LIM mis dans le milieu sans hormone (Z0) ont enregistré des taux plus élevés que ceux mis dans les milieux avec zéatine (Z1 et Z2). La variété BG a montré des taux plus élevés avec la concentration Z2 suivie de Z0 puis de Z1. Quant à la variété RM, c'est la concentration Z2 qui a donné le meilleur résultat suivie de Z1 puis de Z2. En effet, on a observé 83,33% pour RM*Z2, 36,67% pour RM*Z1 et 33,33% pour RM*Z0. Le traitement BG*Z2 a également enregistré 83,33%. Les traitements BG*Z1 et BG*Z0 ont donné 36,6 et 51,67% respectivement. Quant à la variété CH, le traitement CH*Z0 a donné le taux le plus élevé avec 58,33% comparé aux traitements CH*Z1 et CH*Z2 avec 41,67% pour chacun. Même constat pour la variété LIM. Le traitement LIM*Z0 a donné 55,00% contre 38,33% pour LIM*Z2 et 36,67% pour LIM*Z1.

Les valeurs maximales sont atteintes après 16 jours pour RM*Z2 (98,80%), 18 jours pour RM*Z1 (91,20%) et 24 jours pour RM*Z0 (82,80%) ; 16 jours pour BG*Z2 (98,80%), 23 jours pour BG*Z1 (97,00%) et 24 jours pour BG*Z0 (77,80%) ; 23 jours pour LIM*Z2 et LIM*Z1 (respectivement 62,60% et 61,60%) et 21 jours pour LIM*Z0 (69,80%) ; 24 jours pour CH*Z2 (86,33%), 25 jours pour CH*Z1 (73,00%) et 26 jours pour CH*Z0 (71,60%).

3.1.5.1 Séjour au premier débourrement

On entend par séjour le temps écoulé entre le jour de la mise en culture des explants et le jour du premier débourrement.

Pour ce paramètre, les valeurs moyennes obtenues varient de 8,6 à 12,8 jours. Le traitement qui a enregistré le séjour moyen le plus court est LIM*Z2 (8,6 jours) alors que le séjour moyen le plus long est enregistré chez CH*Z1 (12,8 jours) (Figure 3.8).

Nous avons également observé que le milieu sans hormone (Z0) présente des séjours un peu plus longs que ceux enregistrés dans les milieu contenant de la zéatine (Z1 et Z2) et ce, pour toutes les variétés étudiées à l'exception de CH qui a enregistré un séjour plus long dans le milieu contenant de la zéatine. En effet, le traitement LIM*Z2 a enregistré un séjour d'une durée de 8,6j contre 8,8j pour LIM*Z1 et 11,2j pour LIM*Z0. Le traitement BG*Z2 a enregistré une durée de 9,2j contre 9,6j pour BG*Z1 et 11,8j pour BG*Z0. Le même constat pour le traitement RM*Z2 avec 10j contre 10,4j pour RM*Z1 et 10,8j pour RM*Z0. Par contre CH*Z2 et CH*Z1 présentent des durées un peu plus longues (respectivement 12,8 et 12,20j) comparées au CH*Z0 (10,8j).

Toutefois, l'analyse de la variance ne révèle aucune différence significative pour les valeurs obtenues ($p=0,490072$) ce qui démontre que l'interaction génotype*zéatine ne possède aucun effet significatif sur le nombre de jours au premier débourrement. L'ANOVA des facteurs séparément ne révèle également aucun effet significatif pour les deux facteurs ($F1 : p=0,102598$; $F2 : p=0,389240$). Ainsi le séjour au premier débourrement des explants n'est influencé ni par le génotype, ni la concentration de la zéatine, ni l'interaction de ces deux facteurs.

La figure 3.8 illustre les différentes durées enregistrées pour l'ensemble des traitements étudiés.

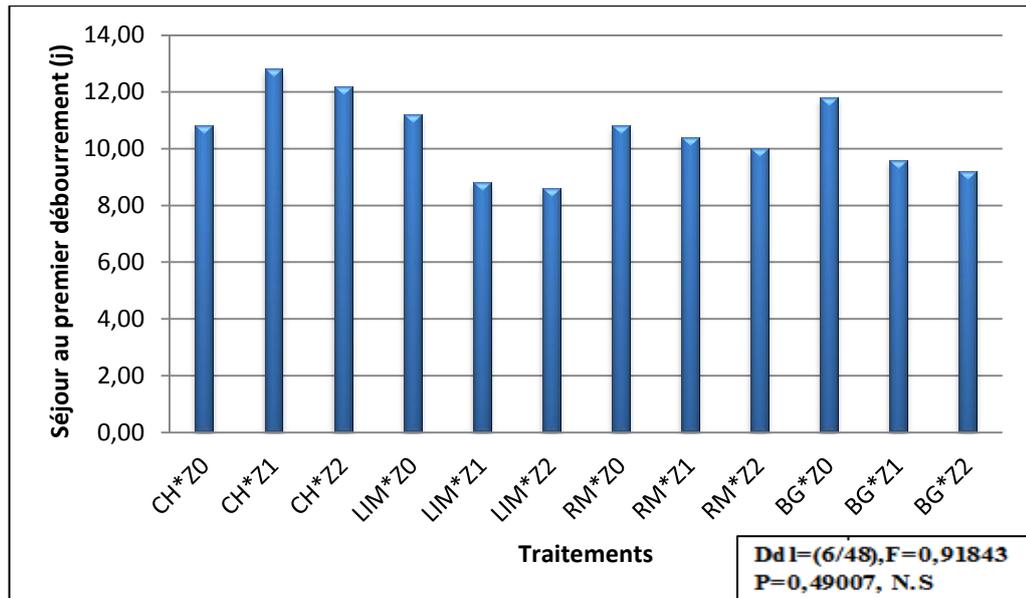


Figure 3.8 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur le séjour au premier débourrement.

3.1.6 Discussion

Des nœuds de boutures herbacées contenant deux bourgeons axillaires chacun de quatre variétés autochtones d'olivier (Chemlal, Limli, Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana) sont mis en culture dans le milieu MSM. Le milieu est soit additionné de 1 ou 2 mg/l de zéatine ou laissé sans apport exogène de cytokinine.

A travers les résultats obtenus, on considère que la reprise des bourgeons axillaires est satisfaisante. Tous les explants ont marqué un débourrement important surtout entre 9 et 15 jours. Les meilleurs taux sont enregistrés entre 16 et 25 jours de culture et sont de l'ordre de 61,60% à 98,80%.

Concernant la variété Chemlal, des résultats supérieurs aux nôtres sont rapportés par YAKOUB-BOUGDAL et *al* [87]. Ces derniers ont obtenu 90,00 et 75,00% de débourrement avec, respectivement, 2 mg/l de kintine et de BAP dans le milieu de culture MS. Des résultats de l'ordre de 63,63 et 73,64% sont rapportés par TABTI [104], respectivement, avec 1 et 2 mg/l de BAP. Les résultats rapportés par HIMOUR [105] sur la variété Sigoise cultivée dans les milieux KNOP et WHITE additionnés de 2 mg/l de kinétine sont comparativement inférieurs aux nôtres. Ce dernier a obtenu 20,00 et 40,00% respectivement.

Notons que l'augmentation de la concentration de la zéatine dans le milieu de culture de 0 à 2 mg/l n'a pas montré de différences significatives sur le taux de débourrement pour les quatre génotypes. Le même résultat est obtenu par BEDDEK [106] sur la variété Chemlal cultivée avec des concentrations de BAP allant de 0 à 2 mg/l.

A l'issue de la phase d'établissement, nous pouvons dire que la présence de zéatine dans le milieu de culture n'est pas indispensable pour avoir des taux de débournements importants puisque les pourcentages obtenus sans l'apport de la zéatine sont supérieurs à 69%. Un résultat similaire a été rapporté par YAKOUB-BOUGDAL et al [87] alors que les résultats obtenus par d'ABOUSALIM et al [41] sur le cultivar 'Picholine Marocaine' ne corroborent pas avec les nôtres. Ces derniers ont signalé un débourrement très faible en l'absence de cytokinines ce qui n'est pas en accord avec nos observations. Par ailleurs, GARCIA-FERRIZ et al [102] ont signalé que l'ajout de 1mg/l de BAP dans OM/2 était suffisant pour avoir des taux élevés de débourrement chez les variétés Arbequina et Picual.

Le génotype joue un rôle important dans la réactivité des bourgeons. Les résultats ont montré que le débourrement est significativement influencé par le génotype. Les taux le plus élevés sont obtenus avec les variétés Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana (respectivement 90,86 et 90,96%). Les variétés Chemlal et Limli ont donné des résultats moins importants (76,97 et 64,66% respectivement). Ces résultats montrent que le facteur génétique est déterminant dans le choix du milieu de culture à utiliser d'où la nécessité d'adapter la composition minérale et hormonal du milieu de culture au cultivar à multiplier [40].

Concernant le taux de pousses développées, nos résultats montrent une interaction très hautement significative entre le génotype et sa réactivité à la concentration en zéatine utilisée dans le milieu de culture. L'ajout de la zéatine a permis d'augmenter significativement le nombre de pousses développées pour tous les génotypes étudiés à l'exception de la variété Limli. Les concentrations 1 et 2 mg/l de zéatine n'ont pas montré de différences significatives pour les variétés Ronde de Miliana et Chemlal alors que pour la variété Blanquette de Guelma le meilleur résultat est obtenu avec 2 mg/l de zéatine.

Dans leur étude sur le cultivar Picholine Marocaine, ABOUSALIM et al [41] signalent que les meilleurs résultats ont été obtenus avec 5 mg/l de zéatine (100 %). Ils rapportent également des taux très faibles en l'absence de cytokinine ce qui est en accord avec nos résultats et qui montre que la croissance des pousses est favorisée par l'apport exogène en cytokinine.

Néanmoins, les taux obtenus sont faibles par rapport à ceux cités par certains auteurs : 71.42% de nouvelles pousses de la variété Chemlal cultivée dans le milieu MS additionné de 1 mg/l de BAP sont rapportés par TABTI [104]. Le même auteur a obtenu des taux inférieurs (42,00-44,00%) avec 2 mg/l de BAP. Sur le cultivar Picholine Marocaine, BRHADDA et al [40], ont obtenu 65,00% de nouvelles pousses dans le milieu OM enrichi de 5 mg/l de zéatine.

La faiblesse de nos résultats peut être expliquée par la nature génotypique des variétés autochtones étudiées ainsi que la composition minérale et hormonale du milieu de culture utilisé.

Les taux de brunissement obtenus sont également faibles (de 0 à 09,60%) et ne montrent pas de différences significatives. Des pourcentages de brunissement élevés et différents d'une saison à l'autre sont rapportés par YAKOUB-BOUGDAL et al [87]. D'après les résultats de ces derniers, le taux de nécrose et le brunissement atteint son maximum au cours du mois d'août. Notons que le prélèvement et la mise en culture de nos explants se sont déroulés pendant la phase de reprise d'activité (automne) ce qui a sûrement permis d'avoir des taux de brunissement assez faibles. Par ailleurs, BOUSTANY [82] a observé que c'est la saison estivale qui a permis d'avoir le taux le plus faible alors que SGHIR et al [107] ont rapporté que les meilleurs résultats dans la micropropagation sont obtenus durant la période de printemps-été. Les mêmes auteurs signalent que la période d'établissement optimale dépend également du cultivar et de l'environnement dans lequel se trouve le plant-mère.

Les taux faibles de brunissement obtenus peuvent également être imputés, d'une part, à l'efficacité du produit de désinfection utilisé et, d'autre part, à la dose adéquate appliquée ($HgCl_2$: 677mg/l). En effet, les travaux expérimentaux consacrés à l'étude des comportements des explants de la variété Chemlal vis-à-vis du bichlorure de mercure ($HgCl_2$), ont montré que l'augmentation de nécrose

est directement liée à l'augmentation des concentrations de (Hgcl_2) et à la durée du trempage des microboutures dans ce dernier [108]. De même, AHANHANZO et al [109], en étudiant l'influence du chlorure mercurique sur la survie *in vitro* d'explants de teck, ont montré que le pourcentage d'explants nécrosés augmente au fur et à mesure que la concentration de chlorure mercurique augmente. Nos résultats corroborent avec ceux d'AKSIL et BOUABID [110] qui ont obtenu des taux faibles de nécroses en utilisant la même dose du (Hgcl_2).

Signalons que pour les contaminations, nos résultats ne sont pas similaires avec ceux de YEKKOUR [108] ; BEDDEK [106]. Ces derniers, en utilisant le même désinfectant et la même concentration, ont obtenu respectivement 25,38 et 25% de contamination. Cette différence semble être imputée à l'entretien du matériel végétal au niveau de la serre de forçage de l'ITAFV où les traitements phytosanitaires sont appliqués sur tous les plants d'olivier diminuant ainsi les risques d'apparition des contaminations lors de la culture *in vitro*.

A ce stade, nous pouvons dire que la désinfection des explants est réussie puisque les taux de brunissement sont assez faibles et que ceux de contamination sont nuls. En effet, la méthode de désinfection devrait permettre un compromis entre les exigences d'une bonne stérilisation et la préservation de l'intégrité du tissu végétal [85].

Concernant la vitesse de débourrement, nos résultats montrent que ni le génotype, ni la concentration du milieu en zéatine, ni l'interaction de ces deux facteurs ne semblent l'influencer. On constate également que le nombre de bourgeons débourrés a été important qu'après une à deux semaines de culture. Nos résultats sont similaires avec ceux de BRHADDA et al [40] sur le cv. Picholine Marocaine (sur milieu OM et $\frac{1}{2}$ MS) et BEDDEK [106] sur le cv. Chemlal (sur milieu OM). Pour ce même cultivar AKSIL et BOUABID [110], sur milieu OM, ont rapporté des vitesses plus rapides que les nôtres (4 jours) tandis que BRHADDA et al [40] ont signalé des vitesses moins rapides pour la Picholine Marocaine sur les milieux WPM, Knop Heller et $\frac{1}{2}$ Miller où l'activité des bourgeons n'a été appréciable qu'à partir de la quatrième semaine. Nous pouvons supposer que le milieu de culture a une influence probable sur la vitesse de débourrement.

3.2 Phase d'élongation (phase d'allongement)

A l'issue de la phase d'établissement de la culture, nous avons obtenu des explants débourrés sans développement de véritables pousses feuillées, en raison de quoi, nous avons transplanté ces explants sur le même milieu de culture (MSM) additionné de zéatine (0, 1 et 2 mg/l) et ce, pour connaître l'effet de la concentration du milieu en zéatine sur la croissance *in vitro* des variétés étudiées.

Les explants débourrés sont répartis sur les différents milieux de culture à raison de cinq par flacon et quatre flacons par traitement. La phase d'élongation a duré 60 jours. Après chaque vingt jours de culture, les vitroplants sont transplantés dans des milieux frais additionnés avec les mêmes concentrations de zéatine.

Durant cette phase de culture, nous avons noté la présence de quelques explants vitrifiés notamment chez les variétés Chemlal et Limli (figure 3.10). Il a été observé également le développement d'un cal à la base de quelques explants des quatre variétés étudiées provoquant ainsi un léger jaunissement des feuilles suite à une mauvaise nutrition des explants (figure 3.9). À noter que ces explants ont été cultivés dans les milieux contenant la zéatine.

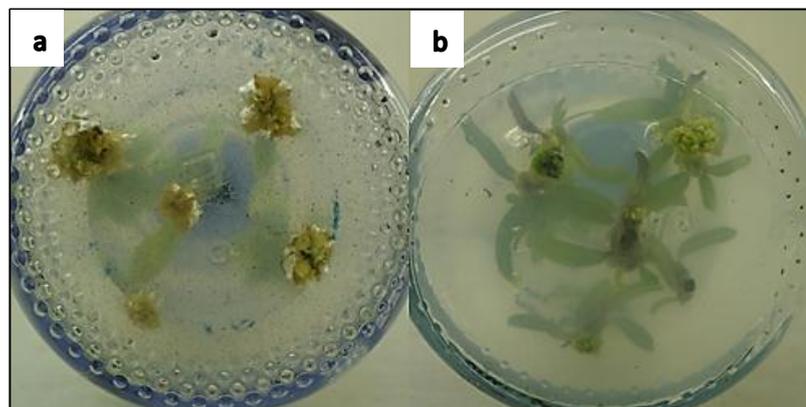


Figure 3.9 : Callogenèse à la base des explants. (a) BG*2Z, (b) RM*2Z

Le développement de cals était récurrent durant chaque transplantation. Notons que l'aspect et la couleur des cals des variétés CH et LIM diffèrent avec ceux des deux autres variétés (BG et RM). Concernant RM et BG, sont apparus, de gros cals compacts de couleur tendant, pour la majorité des cas, vers le vert

glauque tandis que les variétés CH et LIM ont développé des cals relativement petits et de couleur tendant vers le blanchâtre (figure 3.10 et 3.11).

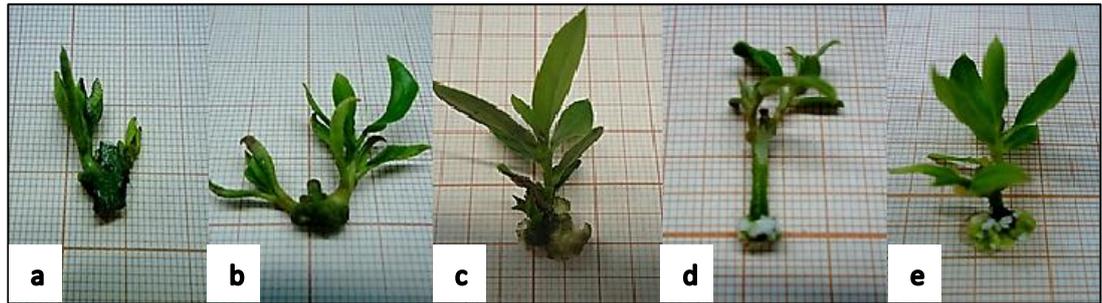


Figure 3.10 : Vitrification et callogénèse sur la base des explants. Vitrification (a et b) : (a) Lim*Z2, (b) CH*Z1. Callogénèse (c, d et e) : (c) CH*Z1, (d) LIMLI*2Z, (e) RM*2Z.

Nous avons également observé que, chez la variété CH, les pousses obtenues ont présenté un aspect morphologique moins vigoureux que celui des variétés BG et RM. Pour la variété Lim, les pousses obtenues étaient chétives.

Dans les milieux contenant de la zéatine, nous avons remarqué le développement de cals sur certains bourgeons apicaux et certains bourgeons axillaires chez les variétés RM, LIM et BG provoquant ainsi la chute des pousses initiées et la mort de l'explant par la suite.

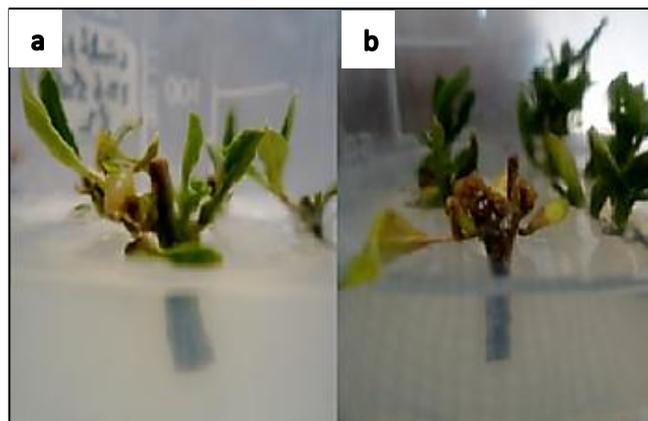


Figure 3.11 : Callogénèse sur l'apex et nécrose des explants. (a) BG*Z2, (b) RM*Z2.

Les paramètres étudiés à l'issue de la phase d'élongation sont : longueur des pousses, nombre de feuilles par explant, nombre de pousses par explant, taux (%) de survie et taux (%) de pousse de longueur \geq à 01 cm.

3.2.1 Longueur moyenne des pousses

La longueur et le nombre moyen des feuilles des pousses sont des paramètres très intéressants dans la mesure où ils permettent de bien apprécier l'effet des facteurs étudiés durant cette phase d'élongation.

Plus la concentration du milieu en zéatine s'élève plus nous obtenons un allongement élevé pour tous les génotypes étudiés (Figure 3.12). Les résultats montrent que les moyennes obtenues varient de 00,00 à 17,52 mm. Le traitement RM*Z2 a enregistré la valeur la plus élevée (17,52 mm) tandis que LIM*Z0 et BG*Z0 ont enregistré des valeurs nulles (00,00 mm chacun).

Nous avons enregistré une longueur de 17,52 mm pour le traitement RM*Z2 contre 14,30 et 05,02 mm respectivement pour RM*Z1 et RM*Z0. Le traitement BG*Z2 a donné une moyenne de 11,55 mm tandis que BG*Z1 et BG*Z0 ont donné respectivement 09,50 et 00,00 mm. Quant aux traitements CH*Z2, CH*Z1 et CH*Z0, les longueurs obtenues sont de 08,05 mm, 07,85 mm et 03,20 mm respectivement. Le reste des traitements (LIM*Z2, LIM*Z1 et LIM*Z0) ont montré des valeurs moins élevées, comparées aux autres traitements. Ainsi, LIM*Z2 a donné 04,65 mm de longueur alors que LIM*Z1 et LIM*Z0 ont donné respectivement 00,45 et 00,00 mm. L'ANOVA montre un effet très hautement significatif de l'interaction génotype*zéatine sur ce paramètre ($p=0,00057$).

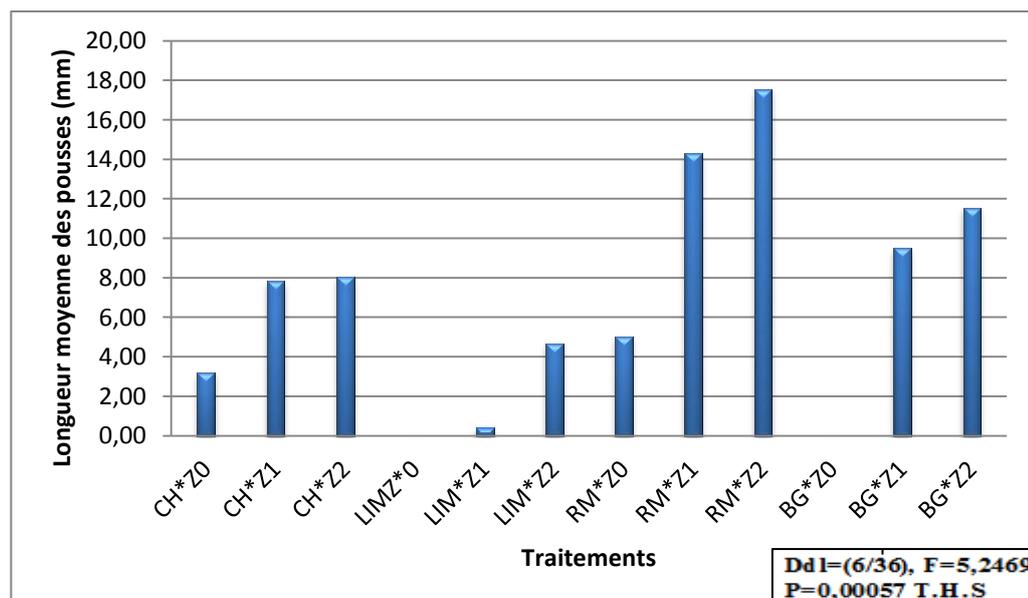


Figure 3.12 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur la longueur des pousses.

Le test de Newman-Keuls fait ressortir 6 groupes homogènes dont certains sont proches entre eux. Le groupe (a) est constitué des traitements BG*Z0, LIM*Z0, LIM*Z1 et CH*Z0. Le groupe (b) est constitué des traitements LIM*Z2, RM*Z0, CH*Z1 et CH*Z2. Le groupe (c) comporte les traitements BG*Z1, BG*Z2, CH*Z1 et CH*Z2. Le groupe (d) s'associe avec le groupe (a) sur le traitement CH*Z0 et avec le groupe (b) sur les traitements LIM*Z2 et RM*Z0. Le groupe (e) est constitué des traitements RM*Z1 et BG*Z2. Le groupe (f) s'individualise avec un seul traitement qui est le RM*Z2 (Tableau 3.3).

Concernant le génotype, le meilleur allongement enregistré est sur les explants de la variété RM avec 12,28 mm et le plus faible est enregistré sur la variété LIM avec une moyenne de 01,70 mm. Les variétés BG et CH enregistrent respectivement 07,01 et 06,36 mm. Les différences sont très hautement significatives ($p=0,00000$).

La concentration de la zéatine dans le milieu de culture influe également sur l'allongement des pousses ($p=0,00000$). Le meilleur allongement est obtenu par la concentration Z2 avec une moyenne de 10,44 mm et la concentration Z0 a donné une moyenne de 02,05 mm. Entre ces deux, la concentration Z1 enregistre une valeur de 08,02 mm.

Tableau 3.3 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour la longueur moyenne des pousses

| Facteur1 Facteur2 | | CH | LIM | RM | BG | Moyenne Zéatine |
|----------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | Longueur moyenne des pousses (mm) | Z0 | 03,20 ^{ad} | 00,00 ^a | 05,02 ^{bd} |
| Z1 | 07,85 ^{bc} | | 00,45 ^a | 14,30 ^e | 09,50 ^c | 08,02 ^a |
| Z2 | 08,05 ^{bc} | | 04,65 ^{bd} | 17,52 ^f | 11,55 ^{ce} | 10,44 ^c |
| Moyenne Génotype | 06,36 ^b | | 01,70 ^a | 12,28 ^c | 07,01 ^b | |

**Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent au même groupe.

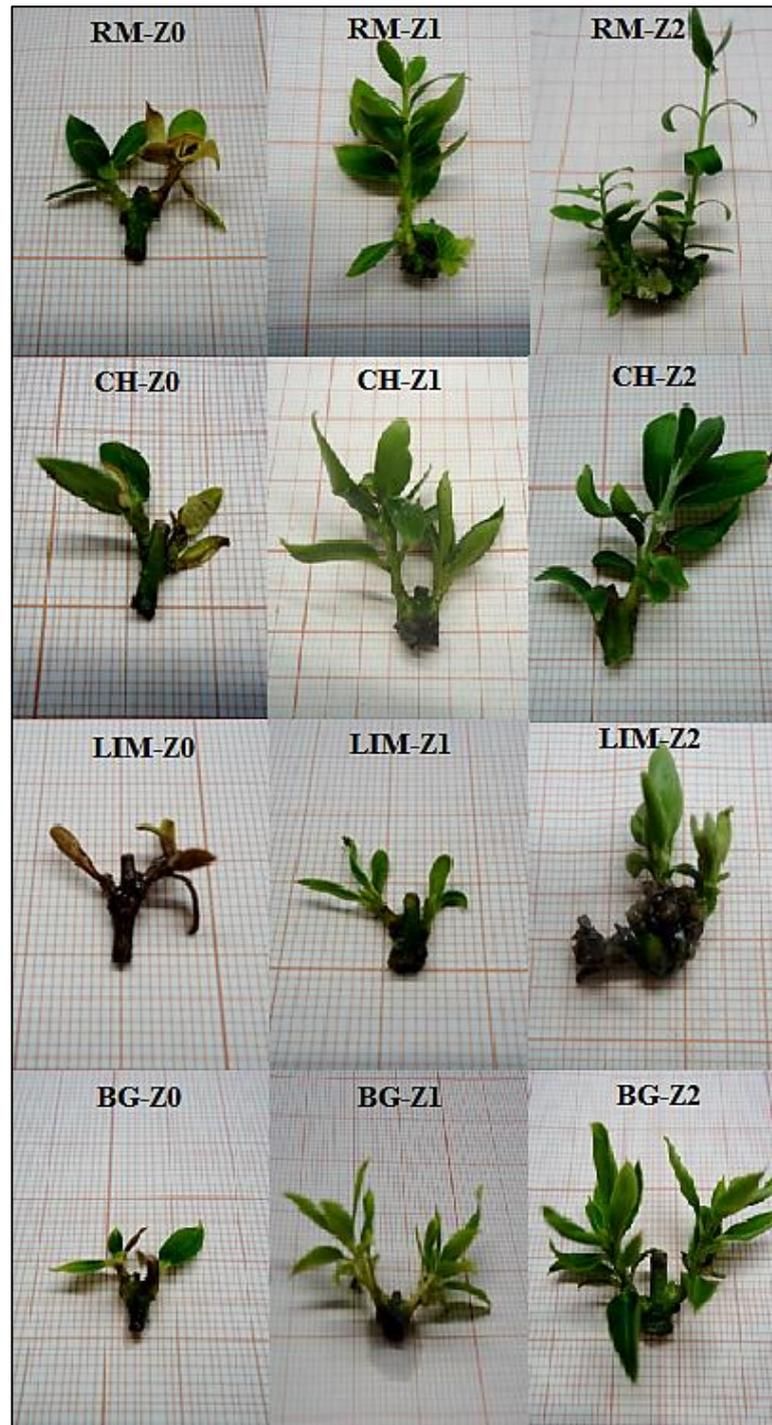


Figure 3.13 : Allongement des pousses après 60 jours d'élongation.

3.2.2 Nombre moyen de feuilles par explant

L'un des paramètres de mesure de la croissance est le feuillage de la plantule. Durant notre étude, nous avons observé une variation du nombre de feuilles selon le traitement étudié.

Les résultats montrent clairement que la richesse du milieu de culture en zéatine possède un effet positif sur ce paramètre pour tous les géotypes étudiés. Cependant, le nombre de feuilles diffère d'un traitement à un autre. Les valeurs varient de 00,00 à 10,85.

Les traitements RM*Z2 et RM*Z1 ont donné des valeurs proches l'une de l'autre avec respectivement 10,85 et 09,30 tandis que RM*Z0 a donné une valeur beaucoup plus faible (03,80). Le même constat pour les traitements BG*Z2 et BG*Z1 qui ont enregistré respectivement 10,15 et 09,25 alors que BG*Z0 a enregistré une valeur nulle (00,00) suite à la mort des tous les explants. Les traitements CH*Z2 et CH*Z1 ont donné également des valeurs très rapprochées avec respectivement 05,40 et 05,47 contre 02,25 pour CH*Z0. Le traitement LIM*Z2 a enregistré une valeur de 04,52 contre 00,40 pour LIM*Z1 et 00,00 pour LIM*Z0. L'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif ($p= 0,0000$).

La figure 3.14 illustre les résultats obtenus pour tous les traitements étudiés.

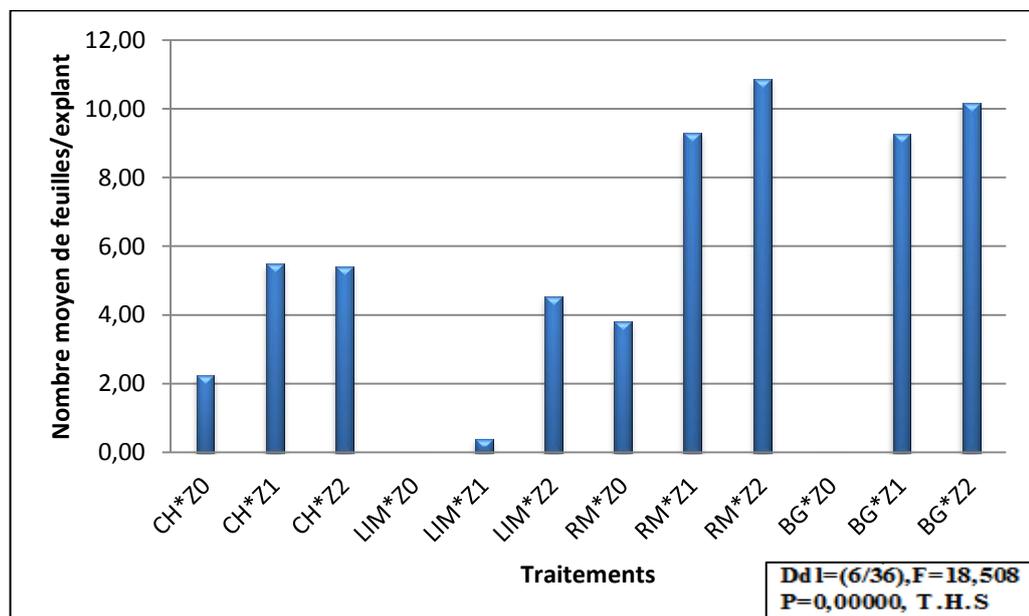


Figure 3.14 : Effet de l'interaction géotype*zéatine sur le nombre moyen des feuilles.

Le test de Newman-Keuls (tableau 3.4) classe les traitements en quatre groupes distincts. Le groupe (a) est constitué des traitements BG*Z0, LIM*Z0 et LIM*Z1. Le groupe (b) comporte uniquement le traitement CH*Z0. Le groupe (c)

est constitué des traitements RM*Z0, LIM*Z2, CH*Z1 et CH*Z2. Le groupe (d) est constitué des traitements BG*Z1, BG*Z2, RM*Z1 et RM*Z2.

Pour l'effet du génotype, les résultats montrent que la variété RM semble la plus favorable à la formation des feuilles tandis que la variété LIM semble la moins favorable. En effet, la variété RM a enregistré la valeur maximale avec une moyenne de 07,98 secondée par la variété BG avec 06,46, suivie de CH et de LIM avec respectivement 04,37 et 01,64 de feuilles par explant. Les différences sont très hautement significatives ($p=0,00000$).

Concernant la concentration de la zéatine, les résultats montrent que plus la concentration du milieu de culture en zéatine augmente, plus le nombre moyen de feuilles augmente. Les valeurs diffèrent de 01,51 à 07,73. La concentration Z2 a présenté la valeur la plus élevée (07,73) et la concentration Z0 la valeur la plus faible (01,51). La concentration Z1 a enregistré une valeur proche de celle enregistrée avec la concentration Z2 (06,10). L'influence de la concentration de la zéatine est également très hautement significative ($p=0,00000$).

Le tableau 3.4 comporte la classification des traitements pour le paramètre nombre de feuilles par le test de Neman-Keuls.

Tableau 3.4 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour le nombre moyen de feuilles par explant :

| Facteur1 Facteur2 | | CH | LIM | RM | BG | Moyenne Zéatine |
|----------------------|----------------|---|----------------|----------------|----------------|--------------------|
| | | Nombre moyen de feuilles par explant | Z0 | 02,25 b | 00,00 a | 03,80 c |
| Z1 | 05,47 c | | 00,40 a | 09,30 d | 09,25 d | 06,10 b |
| Z2 | 05,40 c | | 04,52 c | 10,85 d | 10,15 d | 07,73 c |
| Moyenne Génotype | 04,37 b | | 01,64 a | 07,98 d | 06,46 c | |

**Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent au même groupe.

3.2.3 Nombre moyen de pousses par explant

Concernant l'effet de l'interaction génotype*zéatine, les résultats varient d'un traitement à un autre et montrent également que la zéatine a un effet positif sur le nombre moyen de pousses des explants des variétés étudiées à l'exception de la variété Chemlal. (Figure 3.15).

Les valeurs obtenues diffèrent de 00,00 à 02,50 pousses par explant. Le traitement RM*Z2 vient en tête avec 02,50 pousses par explant. Les traitements RM*Z1 et RM*Z0 ont enregistré des valeurs plus faibles avec respectivement 01,95 et 01,65. Les traitements BG*Z2 et BG*Z1 ont présenté 01,95 chacun tandis que BG*Z0 a donné une valeur nulle (00,00) suite à la mort des explants de ce traitement lors de sa culture. On observe également que CH*Z1 a donné 01,75, une valeur plus élevée que celles enregistrées dans CH*Z2 et CH*Z0. Ces derniers ont présenté respectivement 01,50 et 01,40 pousses par explant. Le reste des traitements ; LIM*Z2, LIM*Z1 et LIM*Z0, ont donné respectivement 01,30, 00,15 et 00,00.

La figure 3.15 comporte les résultats obtenus pour ce paramètre.

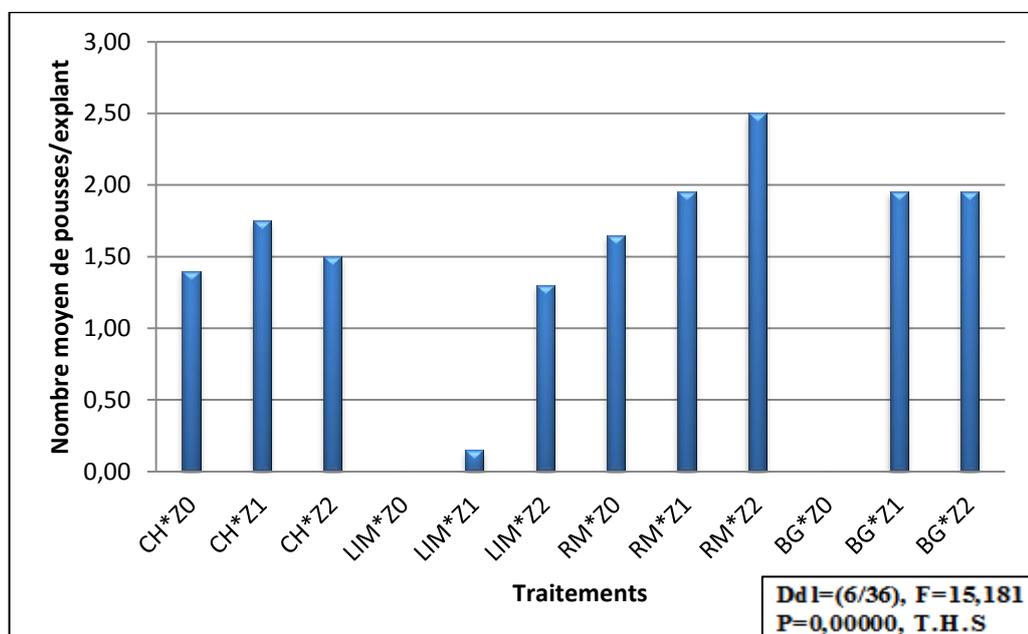


Figure 3.15: Effet de l'interaction génotype*zéatine sur le nombre moyen de pousses par explant.

L'analyse de la variance confirme l'effet très hautement significatif de l'interaction génotype*zéatine sur le nombre moyen de pousses par explant ($p=0,0000$).

Le test de Newman-Keuls (Tableau 3.5) fait ressortir quatre groupes homogènes (a, b, c et d) dont deux sont chevauchants (a et b). Ainsi, les traitements BG*Z0, LIM*Z0 et LIM*Z1 sont classés dans le groupe (a). Le groupe (b) comporte les traitements LIM*Z2, CH*Z0, CH*Z1, CH*Z2 et RM*Z0. Le groupe (c) s'équilibre avec le groupe (b) pour les traitements RM*Z0, CH*Z0, CH*Z1 et CH*Z2 et comporte, en outre RM*Z1, BG*Z1 et BG*Z2. Le dernier groupe (d) comporte uniquement RM*Z2.

Le facteur génotype possède une influence très hautement significative ($p=0,00000$) sur le nombre de pousses par explant. Les différentes variétés réagissent différemment. La valeur maximale est attribuée à la variété RM avec 02,03 et la valeur minimale à LIM avec 00,48. Les variétés BG et CH donnent respectivement 01,30 et 01,55.

La concentration de la zéatine dans le milieu de culture influe également sur les résultats ($p=0,00000$). En effet, comme pour les paramètres précédents, l'augmentation de la concentration du milieu en zéatine a permis d'obtenir de meilleurs résultats. La concentration Z2 donne le meilleur résultat avec 01,81 pousses par explant, secondée par Z1 avec 01,45 ; suivie de Z0 qui a donné le résultat le plus faible avec un nombre de pousses de 00,76 (Figure 3.16).

Le tableau 3.5 comporte la comparaison des moyennes obtenues pour l'interaction des deux facteurs sur le nombre moyen de pousses par explants.

Tableau 3.5 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour le nombre moyen de pousses par explants

| Facteur1 Facteur2 | | CH | LIM | RM | BG | Moyenne Zéatine |
|---|-----------------|-----------|---------|--------|---------|-----------------|
| | | Z0 | 01,40bc | 00,00a | 01,65bc | 00,00a |
| Nombre moyen de pousses/ explant | Z1 | 01,75bc | 00,15a | 01,95c | 01,95c | 01,45b |
| | Z2 | 01,50bc | 01,30b | 02,50d | 01,95c | 01,81c |
| | Moyenne Géotype | 01,55c | 00,48a | 02,03d | 01,30b | |

**Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent au même groupe.

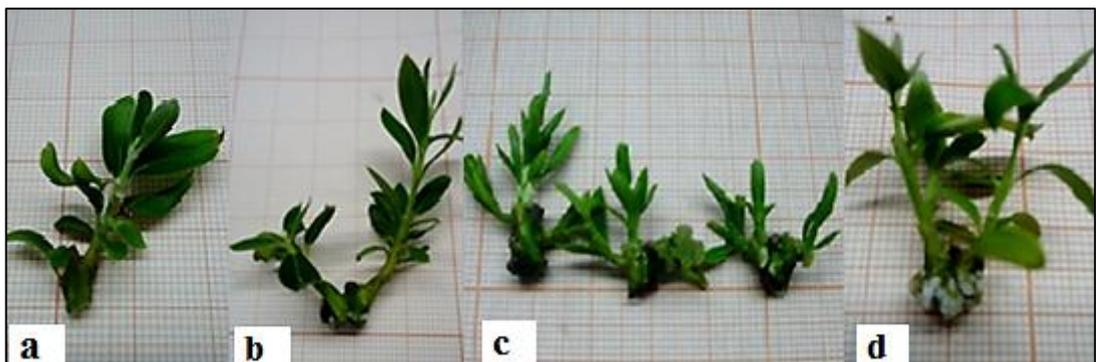


Figure 3.16 : Nombre de pousses obtenues : (a) CH*Z2, (b) RM*Z1, (c) LIM*Z2, (d) RM*Z2.

3.2.4 Taux de survie des explants (%)

Ce paramètre est très important puisqu'il nous permet de connaître l'aptitude des explants à la survie dans nos conditions expérimentales. Nos résultats montrent que les traitements influents sur ce paramètre de manière variée. En effet, nous avons observé des différences dans les réponses des variétés vis-à-vis à l'augmentation de la zéatine.

Le taux de survie le plus élevé est observé sur les traitements RM*Z1, BG*Z1 et BG*Z2 avec 97,5% chacun et le taux le plus faible sur BG*Z0 et LIM*Z0 avec des taux nuls pour chacun (00,00%).

Nous observons que pour les variétés RM et CH, c'est la concentration Z1 qui donne les meilleurs résultats. En effet, le traitement RM*Z1 enregistre un taux de 97,50% contre 85,00% pour RM*Z2 et 82,50% pour RM*Z0. Le traitement CH*Z1 présente un taux de 87,50% tandis que les traitements CH*Z2 et CH*Z0 enregistrent respectivement 75,00% et 70,00%. Concernant la variété BG, nous observons que les traitements BG*Z1 et BG*Z2 donnent le même taux de survie à savoir 97,50% alors que BG*Z0 enregistre un taux nul (00,00%). Pour la variété LIM, le taux de survie pour LIM*Z2 est de 52,50%, il chute à 07,50% pour LIM*Z1 et 00,00% pour LIM*Z0. L'analyse de la variance révèle une différence très hautement significative entre les traitements concernant ce paramètre ($p=0,0000$).

La figure 3.17 représente les pourcentages de survie obtenus dans la phase d'élongation pour les différents traitements étudiés.

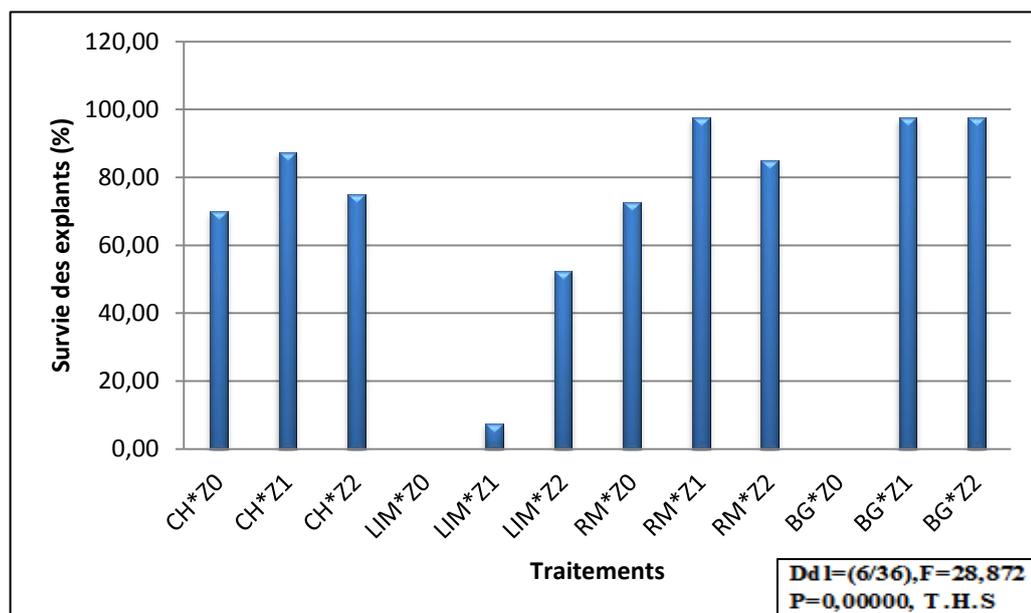


Figure 3.17 : Effet de l'interaction géotype*zéatine sur le taux de survie des explants.

Le test de Newman-Keuls fait ressortir quatre groupes homogènes. Le groupe (a) comporte les traitements BG*Z0, LIM*Z0 et LIM*Z1. Le groupe (b) comporte uniquement le traitement LIM*Z2. Le groupe (c) est constitué des traitements CH*Z0, CH*Z2 et RM*Z0 ainsi que, RM*Z2 et CH*Z1. Ces deux derniers appartiennent également au groupe (d) qui comporte, en outre, BG*Z1, BG*Z2 et RM*Z1.

Nos résultats montrent également que le génotype influe significativement sur ce paramètre ($p=0,00000$). Le meilleur taux de survie est attribué à la variété RM (85,00%), secondée par la variété CH (77,50%), suivie par la variété BG (65,00%). La variété LIM a enregistré le taux le plus bas (20,00%).

Concernant la concentration de la zéatine, nous avons observé que le taux de survie varie d'une concentration à une autre. La concentration Z2 enregistre le taux le plus élevé avec 77,50%, suivie de Z1 avec 72,50% et la concentration Z0 enregistre le taux le plus faible avec 35,62%. La différence est très hautement significative ($p=0,00000$).

Le tableau 3.6 comporte les groupes homogènes issus du test de Newman-Keuls pour les différents traitements.

Tableau 3.6 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour le taux de survie des explants

| Facteur1 Facteur2 | | CH | LIM | RM | BG | Moyenne Zéatine |
|----------------------|---------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|--------------------|
| | | Z0 | 70,00 c | 00,00 a | 72,50 c | 0,00 a |
| Survie (%) | Z1 | 87,50 cd | 7,50 a | 97,50 d | 97,50 d | 72,50 b |
| | Z2 | 75,00 c | 52,50 b | 85,00 cd | 97,50 d | 77,50 b |
| | Moyenne Génotype | 77,50 c | 20,00 a | 85,00 c | 65,00 b | |

**Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent au même groupe.

3.2.5 Nombre de pousses > 1 cm (%)

Ce paramètre permet d'avoir les estimations des pousses aptes à la phase de la rhizogénèse.

Concernant l'interaction génotype*zéatine, nous avons observé que l'augmentation de la quantité de la zéatine a favorisé le développement de pousses de longueur supérieure ou égale à 01 cm pour l'ensemble des variétés

étudiées à l'exception de la variété RM qui a enregistré un taux plus élevé avec la concentration Z1 qu'avec la concentration Z2 (figure 3.18).

Les résultats varient de 00,00 à 85,00%. Le traitement RM*Z1 a donné le meilleur résultat avec 85,00%. Ce dernier descend à 65,00% dans le traitement RM*Z2 pour chuter ensuite à 07,50% dans RM*Z0. Le traitement BG*Z2 a enregistré un taux de 82,50% alors que BG*Z1 et BG*Z0 ont enregistré respectivement 50,00% et 00,00%. Les traitements CH*Z2 et CH*Z1 ont donné des taux pas trop éloignés l'un de l'autre avec respectivement 40,00 et 37,50% tandis que CH*Z0 a donné un taux nul (00,00%). Le traitement LIM*Z2 a enregistré 11,50% alors que LIM*Z1 et LIM*Z0 ont enregistré tous les deux des taux nuls (00,00%). L'ANOVA fait ressortir un effet très hautement significatif de l'interaction génotype*zéatine sur ce paramètre ($p=0,00000$).

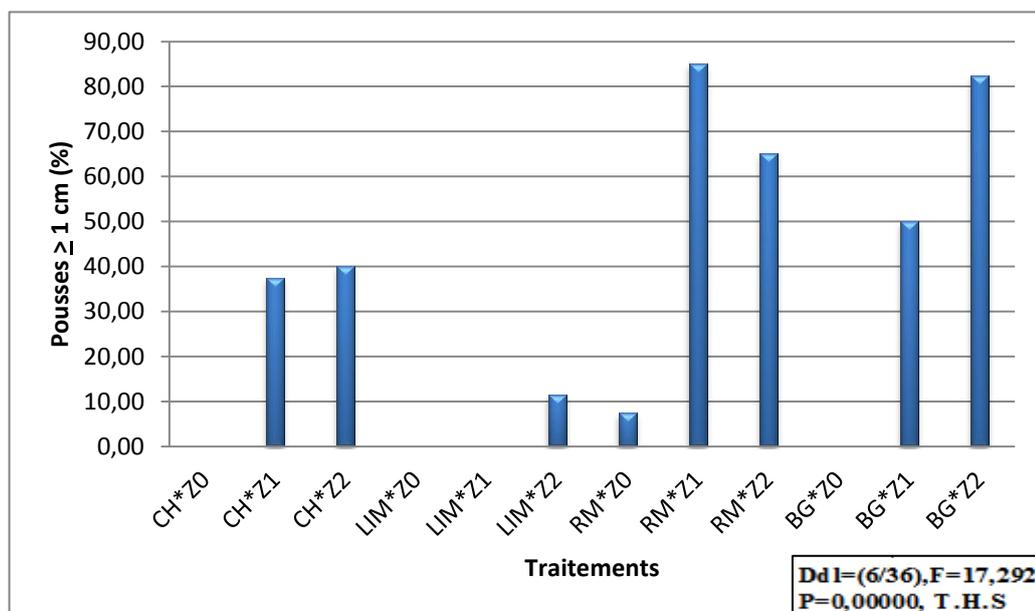


Figure 3.18 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur le nombre de pousses ≥ 1 cm.

La comparaison des moyennes par le biais du test de Newman-Keuls fait ressortir quatre groupes distincts. Le groupe (a) comporte les traitements LIM*Z0, LIM*Z1, LIM*Z2, BG*Z0, CH*Z0 et RM*Z0. Le groupe (b) comporte CH*Z1, CH*Z2 et BG*Z1. Le (c) comporte uniquement le traitement RM*Z2. Le dernier groupe (d) regroupe BG*Z2 et RM*Z1.

Le tableau 3.7 récapitule ces quatre groupes homogènes issus du test de Newman-Keuls.

Tableau 3.7 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour le nombre moyen de pousses de taille supérieure ou égale à 1cm

| Facteur1 | | CH | LIM | RM | BG | Moyenne Zéatine |
|----------------------------|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Facteur2 | | | | | | |
| Pousses \geq 1 cm (%) | Z0 | 00,00a | 00,00a | 07,50a | 00,00a | 01,87 $\underline{\underline{a}}$ |
| | Z1 | 37,50b | 00,00a | 85,00d | 50,00b | 43,12 $\underline{\underline{b}}$ |
| | Z2 | 40,00b | 11,05c | 65,00c | 82,50d | 49,75 $\underline{\underline{c}}$ |
| | Moyenne Génotype | 25,83 $\underline{\underline{b}}$ | 03,83 $\underline{\underline{a}}$ | 52,50 $\underline{\underline{d}}$ | 44,16 $\underline{\underline{c}}$ | |

**Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent au même groupe.

Les résultats montrent également que les réactions des variétés sont, vis-à-vis de ce paramètre, significativement différente ($p=0,0000$). La variété RM a donné le taux le plus élevé avec 52,50% tandis que la variété LIM a enregistré le taux le plus faible avec 03,83%. Les variétés BG et CH ont donné respectivement 44,16% et 25,83%.

Pour la concentration de la zéatine dans le milieu, les taux de pousses ayant au moins un centimètre de longueur varient de 01,87 à 49,75%. La concentration Z2 a présenté 49,75%, secondée de la concentration Z1 avec 43,12%, suivie de Z0 avec un taux beaucoup plus faible, 01,87%. La différence est très hautement significative ($p=0,0000$).

3.2.6 Etude du rythme de croissances

Les observations prises pendant chaque transplantation ont permis de tracer une courbe de croissance reflétant l'évolution de l'allongement de chaque explant pendant la phase d'élongation pour chaque traitement étudié.

La figure 3.19 illustre la cinétique de croissance pour tous les traitements étudiés en fonction des jours.

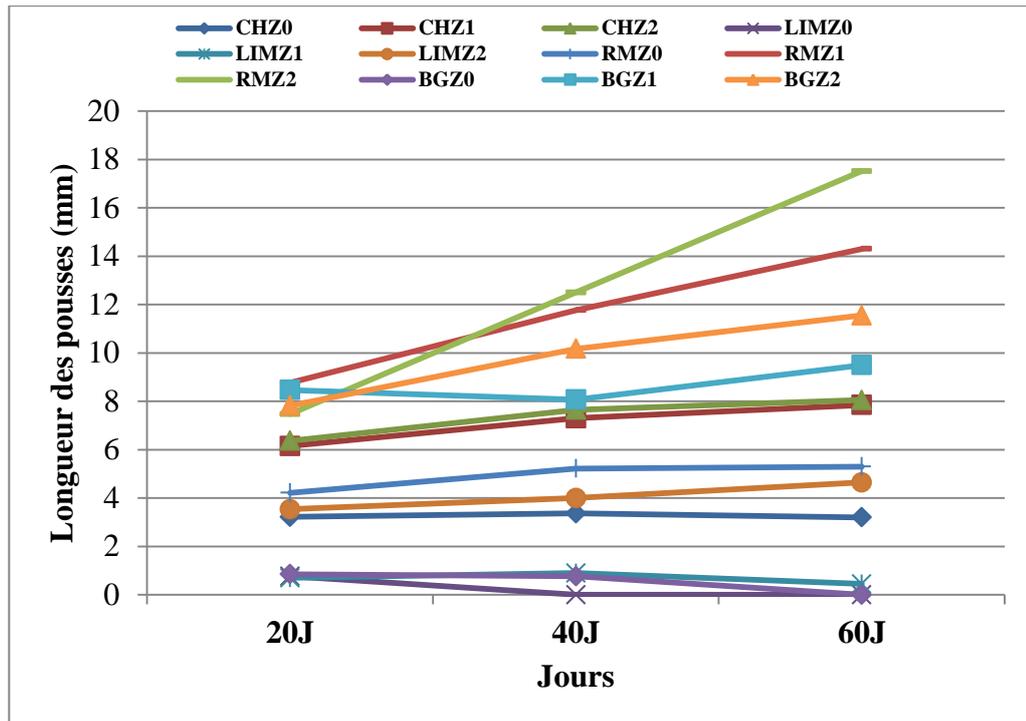


Figure 3.19 : Rythme de croissance des explants en fonction des jours.

La figure 3.19 montre des rythmes croissants pour la majorité des traitements sauf pour CH*Z0, LIM*Z1, LIM*Z0 et BG*Z0. Ces deux derniers ont déperissé au bout de 55 à 60 jours.

En général, la vitesse de croissance des explants cultivés dans les milieux contenant de la zéatine est meilleure que celle des plantules cultivées dans le milieu sans hormone. Le classement des traitements durant les vingt premiers jours est comme suit : en premier lieu, le traitement RM*Z1, secondé par le traitement BG*Z1, puis les traitements BG*Z2, RM*Z2, CH*Z2, CH*Z1, RM*Z0, LIM*Z2, CH*Z0, BG*Z0, LIM*Z1, en dernier lieu, se classe le traitement LIM*Z0.

Au bout de quarante jours, ce classement se présente comme suit : le traitement RM*Z2 devient premier, RM*Z1 le deuxième, puis viennent les traitements BG*Z2, BG*Z1, CH*Z2, CH*Z1, RM*Z1. Le reste des traitements gardent le même classement que celui des vingt jours précédents. Ce classement reste constant jusqu'au bout des soixante jours de culture.

3.2.7 Discussion

Après la phase d'établissement, les explants ayant survécu sont transplantés dans le même milieu de culture contenant les mêmes concentrations de zéatine où ils ont continué leur croissance pendant les 60 jours de la phase d'élongation. Les transplantations effectuées lors de cette phase ont été réalisées, tous les 20 jours, dans un milieu frais.

Pour l'allongement des pousses, les résultats montrent que plus la concentration du milieu en zéatine s'élève, plus nous obtenons un allongement élevé pour tous les génotypes étudiés ; la différence étant hautement significative. Les longueurs les plus élevées ont été obtenues avec 2 mg/l de zéatine.

Nos résultats sont dans la même ligne que ceux de LEVA et *al* [88]. Ces derniers rapportent que le milieu MSM additionné de 2mg/l de zéatine a été plus efficace pour la multiplication d'un grand nombre de cultivars (Maurino, Leccino, Pendolino, Frangivento, Frantoio, Moraiolo, Taggiasca, Nocellara etnea, Nocellara del Belice, Biancolilla, Cerasuola et la Picholine). Ces résultats corroborent avec ceux de CHAARI-RKHIS et *al* [111], qui ont obtenu les meilleurs allongements avec 2 mg/l de zéatine.

Toutefois, l'augmentation au-delà de 2 mg/l de zéatine peut donner des hauteurs plus faibles. Plusieurs travaux ont rapporté qu'une forte dose de zéatine influe négativement sur le développement et l'élongation des pousses [41 ; 111 ; 84 ; 1]. L'hypothèse de cet aspect négatif serait qu'une concentration supra-optimale de cytokinines provoquerait une faible interaction avec les sels minéraux dans le milieu de culture affectant ainsi l'absorption et l'utilisation des nutriments minéraux par les explants. Cela se traduit par voie de conséquence par un abaissement de la longueur des pousses [111].

Avec la concentration de 2 mg/l de zéatine, la variété Ronde de Miliana a enregistré la valeur la plus élevée (17,52mm) secondée par la variété Blanquette de Guelma (11,55mm) suivie des variétés Chemlal et Limli qui ont donné les résultats les plus faibles (08,05 et 04,65mm respectivement).

Notons que selon le génotype, les valeurs obtenues sont plus ou moins faibles comparées à celles rapportées dans la littérature. Des résultats allant de

08,70 à 20,40 mm ont été rapportées par ALI et *a/* [84] pour le cultivar Moraiolo en utilisant des concentrations allant de 1 à 4 mg/l de zéatine. ROUSSOS et PONTIKIS [1] ont obtenu des longueurs supérieures à 50 mm en étudiant la réponse du cultivar Koroneiki à des concentrations de zéatine allant de 0,5 à 4 mg/l. BENDERRADJI et *a/* [3] ont obtenu 16,40, 14,80, et 17,77mm pour les cultivars Chemlal, Gosse de Hama et Sigoise respectivement.

A travers les résultats obtenus dans cette phase, nous pouvons dire que la variété qui a eu la réponse la plus favorable est la Ronde de Miliana et celle qui a donné les résultats les plus faibles c'est la variété Limli, ce qui démontre l'effet du génotype sur l'aptitude à la culture *in vitro* de l'olivier.

Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs [58 ; 109 ; 112] qui signalent que le génotype joue un rôle très important dans l'organogenèse des plantes. Cette différence serait liée à des exigences nutritionnelles variables selon le génotype [40]. Pour BENDERRADJI et *a/* [3], après avoir étudié la réponse de trois variétés d'olivier (Chemlal, Sigoise et Gosse de Hama), ils ont signalé que ces variétés ne montraient aucune différence significative pour les variables feuillage et hauteur des explants.

Concernant l'interaction génotype*zéatine, celle-ci a également montré une influence significative sur le nombre de feuilles formées par explant. Le développement de nouvelles feuilles a généralement suivi une tendance similaire à celle de l'allongement. En effet, les résultats ont montré que l'ajout de la zéatine dans le milieu de culture possède un effet positif sur ce paramètre pour tous les génotypes étudiés. Les résultats obtenus chez les variétés Ronde de Miliana et Blanquette de Guelma avec les concentrations 1 et 2 mg/l de zéatine (de 09,25 à 10,85) sont meilleurs que ceux obtenus avec les autres traitements, ce qui nous laisse supposer qu'il existe un rapport entre le nombre de feuilles et le faible allongement des explants. En effet, l'augmentation du nombre de feuilles est expliquée par la bonne élongation des tiges (GEORGE, 1993) in [113]. Ce qui veut dire que plus en diminue la concentration de la zéatine dans le milieu de culture, plus l'allongement ralentit et par conséquent le nombre de feuille diminue également.

Comme pour le paramètre de la longueur, le génotype joue un rôle significatif dans la formation des feuilles, ce qui confirme les résultats obtenus par plusieurs chercheurs [58 ; 109 ; 112]. Par contre, BENDERRADJI et al [3] signalent une différence non significative entre les variétés Chemlal, Sigoise et Gosse de Hama.

Des résultats inférieurs sont rapportés par ABDELLI et MEKHELIFI [114]. Ces derniers, en étudiant la micropropagation de la variété autochtone Chemlal, ont obtenu un nombre de feuilles assez faible (02,01) et ce, dans le milieu MSM avec 0,4 mg/l de zéatine combiné avec 1 mg/l de BAP alors qu'ils ont obtenu 01,22 feuilles avec 1 mg/l de zéatine seule. Sur le même cultivar et avec le milieu OM, BEDDEK [106] a rapporté 01,94 et 01,30 feuilles par explant avec respectivement 1 mg/l de BAP et 1 mg/l de zéatine. SONTOS et al [56] ont obtenu des résultats plus élevés sur *Olea europaea* ssp. *Maderensis* soit 18,50 et 12,40 sur milieu OM additionné respectivement de 18,2 µM de zéatine seule et 2,2 µM de BA combiné avec 0,4 µM d'AIB.

Pour l'effet de l'interaction génotype*zéatine sur le nombre moyen de pousses des explants des quatre variétés étudiées, les résultats obtenus montrent que la zéatine a un effet positif. Toutefois, l'augmentation de la concentration de la zéatine dans le milieu de culture à 2mg/l a donné de meilleurs résultats pour les variétés Ronde de Miliana et Limli tandis que la variété Blanquette de Guelma n'a montré aucune différence significative entre 1 et 2 mg/l de zéatine. Quant à la variété Chemlal, la zéatine n'a pas influencé le nombre de pousses développées par explant. Les résultats ont varié de 00,15 à 02,50 (uniquement pour les traitements ayant survécu).

Nos résultats sur les variétés Ronde de Miliana, Limli et Blanquette de Guelma corroborent avec ceux rapportés par ALI et al [84]. Ces auteurs ont obtenu des nombres de pousses croissants en utilisant des doses croissantes de zéatine (de 0 à 4 mg/l) sur le cultivar 'Moraiolo'.

Concernant la variété Chemlal, AKSIL et BOUABID [110] ont rapporté des résultats proches des nôtres avec la concentration de 1 mg/l de zéatine qui a donné un résultat supérieur (01,81) aux 2 et 4 mg/l (01,5 et 01,13 respectivement) avec le milieu de culture OM.

Avec ce même milieu, SONTOS et al [56], en étudiant la micropropagation de l'*Olea europaea* ssp. *Maderensis*, ont obtenu 01,20 et 02,80 pousses par explant en utilisant respectivement les combinaisons 2,2 µM de BA/0,4 AIB et 8,8 µM de BA/0,4 AIB.

Ainsi le nombre de pousses développées par explant est influencé par le génotype, la concentration de la cytokinine et par l'interaction de ces deux facteurs.

Un nombre important de pousses par explant (02,50) s'est développé sur la variété Ronde de Miliana cultivée dans 2 mg/l de zéatine. En effet, de nouvelles ramifications ont pris naissance à la base des explants au bout de 40 jours de culture. Cette croissance de ramification s'est associée dans certain cas à une diminution de l'allongement final des pousses sans pour autant l'influencer de manière importante.

Ces résultats sont similaires à ceux rapporté par DIMASSI-THERIOU (1994) in [82], où l'auteur a signalé que l'ajout d'une concentration de 5 à 7,5 mg/l de BAP a permis de donné 01,20 à 01,80 de pousses par explant et que cette augmentation n'a pas d'influence sur la hauteur des pousses obtenues sur le cultivar Kalamon.

Concernant le taux moyen de survie des explants, nous avons remarqué que celui-ci est favorisé par la présence de la zéatine dans le milieu de culture pour tous les génotypes étudiés. Cependant les réponses de ces derniers à l'ajout de cette hormone sont significativement différentes. La survie des explants des variétés Blanquette de Guelma et Limli a atteint respectivement 97,50% et 52,50% avec 2 mg/l de zéatine alors que tous les explants de ces deux variétés ont dépérit dans le milieu sans hormones. Quant aux variétés Ronde de Miliana et Chemlal, la concentration 1 mg/l donne le meilleur résultat.

Sur l'*Olea europaea* ssp. *Maderensis*, SANTOS et al [56] ont obtenu des différences non significatives entre les milieux OM et DKW additionnés de BAP combiné avec l'AIB ou avec seulement de la zéatine. Les taux de survie rapportés varient de 74,7 à 91,7%

Nous avons également remarqué que la présence de la zéatine dans le milieu de culture permet d'augmenter significativement les pourcentages de

pousses de longueur supérieure ou égale à un centimètre pour les variétés Blanquette de Guelma, Ronde de Miliana et Chemlal. L'ajout de 2 mg/l donne les meilleurs résultats pour la variété Blanquette de Guelma alors que pour la variété Ronde de Miliana, c'est la concentration 1 mg/l qui a donné le pourcentage le plus élevé. Ceci peut être expliqué par le taux relativement élevé de mortalité remarqué avec la concentration de 2 mg/l par rapport à celui obtenu avec 1 mg/l. La variété Chemlal n'a pas montré de différences significatives entre l'apport de 1 et 2 mg/l de zéatine. L'apport de la zéatine au milieu de culture n'a pas influencé le nombre de pousses de longueur supérieure ou égale à un centimètre chez la variété Limli.

Il est donc indispensable d'ajouter des cytokinines dans le milieu de culture à des doses variées selon le génotype que l'on désire multiplier. Ces résultats corroborent avec ceux de BRHADDA et al [40], qui ont signalé l'importance d'adapter la composition minérale et hormonale du milieu de culture selon le génotype que l'on multiplie.

Le génotype influence également le nombre de pousses ≥ 1 cm et comme pour les paramètres précédents, c'est la variété Ronde de Miliana qui semble répondre le plus favorablement à la phase d'élongation avec 52,50% de pousses de taille ≥ 1 alors que la variété Limli a montré la réponse la moins bonne. Cette dernière, a donné des pousses chétives et un taux de pousses ≥ 01 cm de seulement 03,83%.

Concernant le rythme de croissance, nos résultats montrent que la présence de la zéatine dans le milieu de culture est nécessaire pour avoir une vitesse de croissance relativement rapide.

Ainsi à ce stade, nous pouvons dire que lors de la phase d'élongation, les variétés Ronde de Miliana et Blanquette de Guelma ont donné les réponses les plus favorables suivies de la variété Chemlal avec une réponse relativement moyenne. La variété Limli a donné la réponse la moins bonne.

3.3 Phase d'enracinement

Les pousses obtenues lors de la phase d'élongation ayant au moins un centimètre de longueur ont été transférées dans un milieu d'enracinement. Le milieu de culture de base est le ½ MSM (MSM dilué de moitié pour les macroéléments et le mannitol).

Le milieu est additionné de 0,5 mg/l de zéatine soit sans auxine, soit avec l'auxine ANA à des concentrations variables (1, 2 et 4 mg/l).

Les pousses ont été incubées à l'obscurité pendant une semaine puis transférées dans un milieu frais dépourvu de régulateurs de croissance pour favoriser le développement racinaire [41].

Vu le résultat non satisfaisant de la variété Limli lors de la phase d'élongation, ce génotype n'a pas fait l'objet d'étude lors de cette phase.

Les observations réalisées lors de cette phase ont porté sur les paramètres suivants : taux de callogenèse (%), taux d'enracinement (%), nombre de racines et longueur moyenne des racines par pousse.

5.3.1 Taux de callogenèse (%)

Toutes les pousses ont montré une callogénèse à leur base à l'exception de celles de la variété CH cultivées dans 0 et 1 mg/l d'ANA. Ainsi, la callogénèse sur les traitements concernés s'est initié au bout de 7 jours après leur mise en culture dans l'obscurité (figure 3.20).

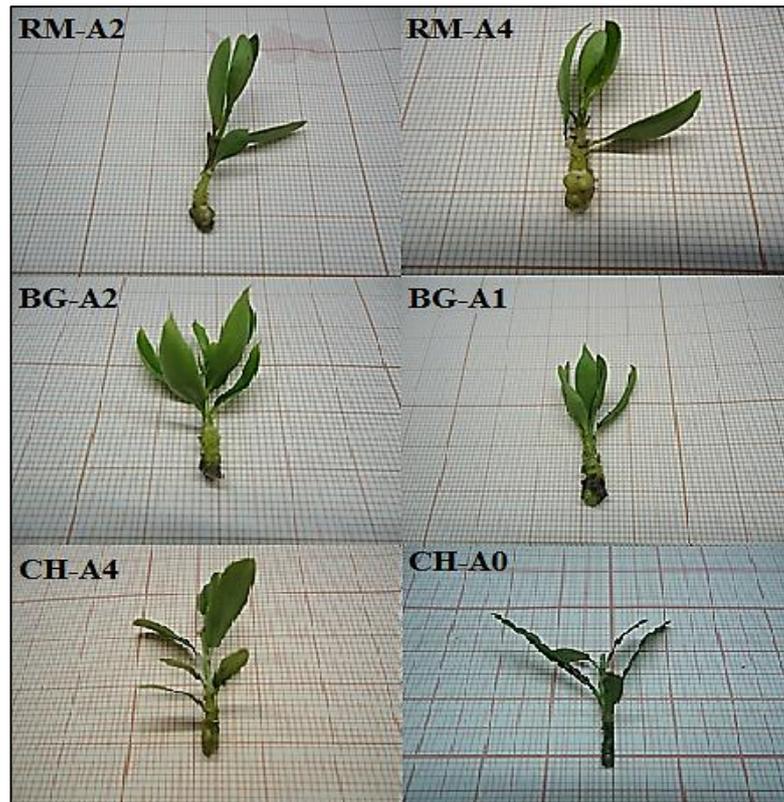


Figure 3.20 : Observation de l'initiation de la callogénèse après 7jous d'obscurité (pas de développement de cal sur CH*A0).

A la fin du test, nous avons observé que tous les traitements étudiés ont enregistré un développement de cal à l'exception de CH*A0 et CH*A1. On a observé également que les taux varient de 00,00 à 100%. En effet, pour la variété BG, toutes les concentrations d'ANA (A0, A1, A2 et A4) ont donné le même résultat à savoir, 100% de callogénèse. Concernant la variété RM, les traitements RM*A4, RM*A2 et RM*A1 ont donné également 100% chacun tandis que RM*A0 a donné 80,00%. Pour la variété CH, le traitement CH*A4 a enregistré 80,00%. Ce taux descend ensuite à 20,00% dans CH*Z2 pour arriver à des taux nuls pour les deux traitements CH*A0 et CH*A1.

L'analyse de la variance démontre un effet très hautement significatif de l'effet de l'interaction génotype*zéatine sur le pourcentage de pousses avec cal ($p=0,0000$).

La figure 3.21 représente le taux de pousses avec cal obtenu dans la phase d'enracinement pour les différents traitements étudiés.

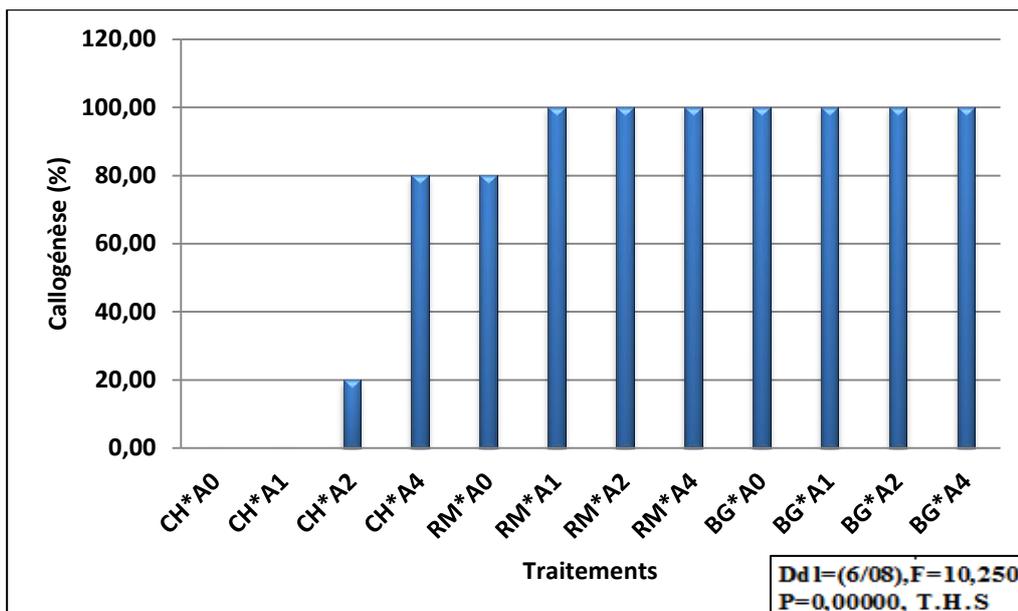


Figure 3.21 : Effet de l'interaction génotype*zéatine sur le développement de cal à la base des pousses.

Le test de Newman-Keuls classe les traitements en deux groupes homogènes. Le groupe (a) comporte la variété CH avec les concentrations A0, A1 et A2. Le groupe (b) comporte le reste des traitements à savoir les variétés BG et RM avec les différentes concentrations d'ANA utilisées (A0, A1, A2 et A4) et également le traitement CH*A4 (tableau 3.8).

Concernant l'effet génotypique sur la callogénèse, nous avons enregistré une différence très hautement significative ($p=0,00000$). Les taux obtenus diffèrent de 25,00 à 100%. C'est la variété BG qui a donné le taux le plus élevé (100%), secondée de RM (95,00%) suivie ensuite de CH (25,00%).

Nous avons également observé que le volume et la couleur des cals obtenus diffèrent entre les génotypes. En effet, pour la variété BG, on a remarqué le développement de gros cals compacts de couleur tendant vers le vert glauque recouverts par une couche de cals blanchâtre d'aspect laiteux (mousseux). Concernant la variété RM, de gros cals compacts se sont développés de couleur tendant, pour la majorité des cas, vers le vert glauque tandis que la variété CH a développé de petits cals de couleur tendant vers le blanchâtre.

Indépendamment du génotype, l'augmentation de la concentration du milieu en ANA a favorisé le développement de cals. Les taux ont varié de 60,00% à

93,33%. La concentration A4 enregistre le taux le plus élevé avec 93,33% et le taux le plus faible est enregistré avec la concentration A0 avec 60,00%. Les concentrations A1 et A2 ont donné respectivement 66,66 et 73,33%. Les différences sont très hautement significatives ($p=0,00000$).

Le type de cal (volume et couleur) ne semble pas être influencé par la concentration d'ANA et les différences enregistrées sont uniquement de nature génotypique.

Le tableau 3.8 comporte la comparaison des moyennes pour le pourcentage de pousses avec cal.

Tableau 3.8 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour le pourcentage de pousses avec cal :

| Facteur1 | | CH | RM | BG | Moyenne ANA |
|-----------------|------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Facteur2 | | | | | |
| Callogenèse (%) | A0 | 00,00 \underline{a} | 80,00 \underline{b} | 100,00 \underline{b} | 60,00 \underline{a} |
| | A1 | 00,00 \underline{a} | 100,00 \underline{b} | 100,00 \underline{b} | 60,66 \underline{ab} |
| | A2 | 20,00 \underline{a} | 100,00 \underline{b} | 100,00 \underline{b} | 73,33 \underline{b} |
| | A4 | 80,00 \underline{b} | 100,00 \underline{b} | 100,00 \underline{b} | 93,33 \underline{c} |
| | Moyenne Génotype | 25,00 \underline{a} | 95,00 \underline{b} | 100,00 \underline{b} | |

**Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent au même groupe.

3.3.2 Pourcentage d'enracinement des pousses

Les résultats montrent que les pousses mises dans le milieu sans hormones (témoins) n'ont présenté aucun enracinement pour tous les génotypes. Cependant, les doses croissantes d'ANA ont agi différemment sur les variétés.

Les résultats obtenus sont de l'ordre de 00,00 et 40,00%. Le pourcentage le plus élevé (40,00%) est enregistré dans les traitements RM*A1, RM*A2, RM*A4, BG*A1, BG*A2, BG*A4 et CH*A4. Le reste des traitements (CH*A0, CH*A1,

CH*A2, BG*A0 et RM*A0) n'ont pas montré de racines et donc ont enregistré des taux nuls (00,00%).

Nous avons également noté que les racines se sont initiées qu'après une durée allant de 19 à 37,5 jours de culture. En effet, pour la variété RM, la concentration A4 a enregistré la durée la plus courte avec la valeur de 22j contre 33,5 et 37,5j respectivement pour les concentrations A2 et A1. Le traitement CH*A4 a initié la première racine au bout de 32j. Pour la variété BG, c'est la concentration A2 qui a enregistré la durée la plus rapide avec une valeur de 19j contre 25 et 26j pour A4 et A1 respectivement.

L'analyse de la variance ne révèle aucun effet significatif de l'interaction génotype*zéatine sur le pourcentage d'enracinement des pousses ($p=0,342643$). Néanmoins, l'ANOVA ayant porté sur les deux facteurs séparément, révèle des effets significatifs pour les deux ($F_1 : p=0,036004$; $F_2 : p=0,001624$).

Concernant le génotype, les taux obtenus sont de l'ordre de 10,00 et 30,00%. Les variétés RM et BG ont donné le résultat le plus élevé (30,00%) tandis que la variété CH a montré le résultat le plus faible (10,00%) (Figure 3.22).

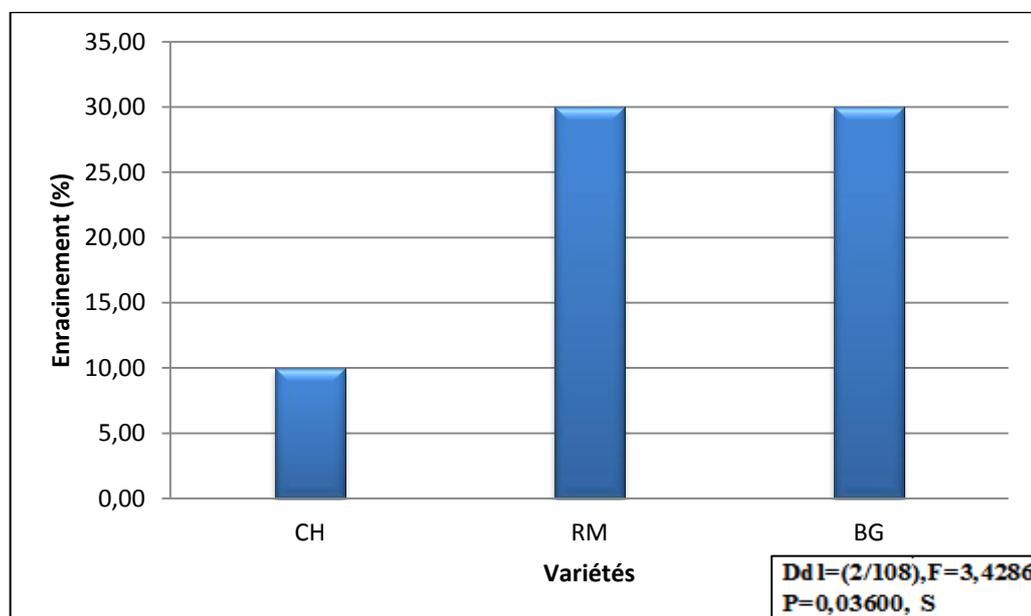


Figure 3.22 : Effet du génotype sur l'enracinement des pousses.

Le test de Newman-Keuls révèle deux groupes homogènes. Ainsi, la variété CH constitue le groupe (a) et les variétés RM et BG sont représentées dans le groupe (b) (tableau 3.9).

Concernant l'influence de la concentration de l'ANA dans le milieu de culture, les résultats obtenus varient de 00,00 à 40,00%. Le meilleur résultat est obtenu avec la concentration A4 qui a donné un taux de 40,00% suivie des concentrations A2 et A1 avec 26,66% pour chacune. Le résultat le plus faible est enregistré dans le milieu contenant la concentration A0 avec un taux nul (00,00%), (figure 3.23).

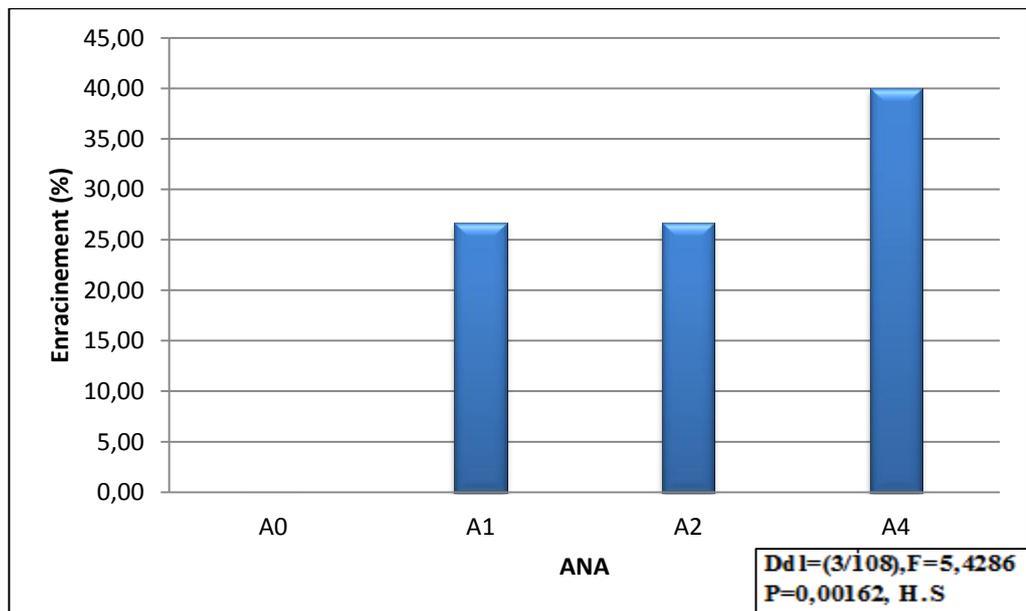


Figure 3.23 : Effet de l'ANA sur l'enracinement des pousses.

Pour ce même paramètre, deux groupes homogènes sont révélés par le test de Newman-Keuls. Le groupe (a) est constitué de la concentration A0. Le groupe (b) comporte les concentrations A1, A2, et A4 (tableau 3.9).

Tableau 3.9 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour le pourcentage d'enracinement :

| Facteur1 Facteur2 | | CH | RM | BG | Moyenne ANA |
|-------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | A0 | 00,00 \underline{a} | 00,00 \underline{a} | 00,00 \underline{a} |
| Enracinement (%) | A1 | 00,00 \underline{a} | 40,00 \underline{a} | 40,00 \underline{a} | 26,66 \underline{b} |
| | A2 | 00,00 \underline{a} | 40,00 \underline{a} | 40,00 \underline{a} | 26,66 \underline{b} |
| | A4 | 40,00 \underline{a} | 40,00 \underline{a} | 40,00 \underline{a} | 40,00 \underline{b} |
| | Moyenne Géotype | 10,00 \underline{a} | 30,00 \underline{b} | 30,00 \underline{b} | |

**Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent au même groupe.

3.3.3 Nombre moyen de racines par pousse

Concernant l'interaction géotype*zéatine, les résultats obtenus varient de 00,00 à 04,40 racines par pousse. Pour la variété BG, le traitement BG*A2 a donné le meilleur résultat et a enregistré 04,40 racines contre 02,60 pour BG*A4. Les traitements BG*A1 et BG*A0 ont enregistré respectivement 00,80 et 00,00 racine par pousse. Pour la variété RM, c'est le traitement RM*A4 qui a donné le meilleur résultat et a enregistré un nombre de 03,20 tandis que les traitements RM*A2, RM*A1 et RM*A0 ont donné respectivement 00,60, 00,40 et 00,00. La variété CH a enregistré 01,80 racines par pousse pour le traitement CH*A4 tandis que le reste des traitements (CH*A0, CH*A1 et CH*A2) ont donné des résultats nuls (00,00).

L'ANOVA révèle un effet significatif de l'interaction géotype*zéatine sur le nombre moyen de racines par pousse ($p=0,036767$).

La figure 3.24 illustre les nombres moyens de racines obtenues par pousse pour chaque variété en fonction de la concentration de l'auxine ANA.

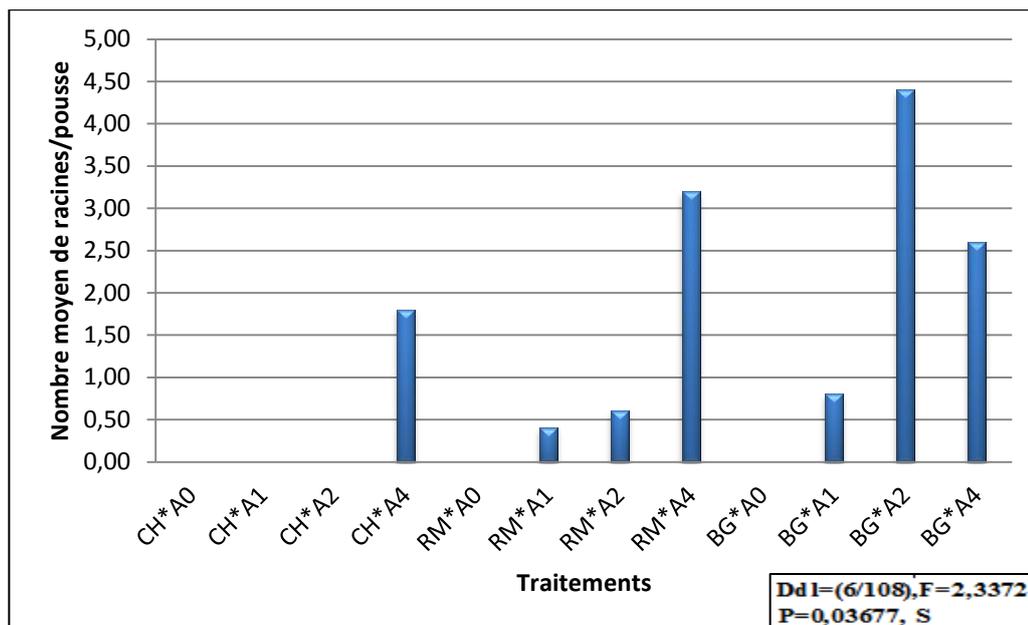


Figure 3.24 : Effet de l'interaction géotype*zéatine sur le nombre moyen de racines par pousse.

Le test de Newman-Keuls révèle deux groupes homogènes. Le groupe (a) comporte tous les traitements étudiés à l'exception de BG*A2. Ce dernier est représenté dans le groupe (b) qui chevauche avec le groupe (a) sur les traitements CH*A4, RM*A4 et BG*A4 (tableau 3.10).

Une influence significative du géotype a été remarquée sur le nombre moyen de racines par pousse ($p=0,022493$). Le meilleur résultat est obtenu par la variété BG avec une valeur de 01,95 suivie de la variété RM avec 01,05 et de la variété CH avec 00,45 racine par pousse.

Nous avons également observé que l'augmentation de la concentration d'ANA dans le milieu de culture a fait augmenter le nombre moyen de racines par pousse. Les résultats obtenus varient de 00,00 à 02,53. La concentration A4 a donné le nombre le plus élevé (02,53), secondée de la concentration A2 (01,66), suivie des concentrations A1 et A0 (00,40 et 00,00 respectivement). Les différences sont très hautement significatives ($p=0,000237$).

Le tableau 3.10 comporte la comparaison des moyennes pour le nombre moyen de racines par pousse.

Tableau 3.10 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour le nombre moyen de racines par pousse :

| Facteur1 | | CH | RM | BG | Moyenne ANA |
|------------------------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| Facteur2 | | | | | |
| Nombre moyen de racines par pousse | A0 | 00,00a | 00,00a | 00,00a | 00,00 <u>a</u> |
| | A1 | 00,00a | 00,40a | 00,80a | 00,40 <u>a</u> |
| | A2 | 00,00a | 00,60a | 04,40 b | 01,66 <u>b</u> |
| | A4 | 01,80ab | 03,20ab | 02,60ab | 02,53 <u>b</u> |
| | Moyenne Génotype | 00,45 <u>a</u> | 01,05 <u>ab</u> | 01,95 <u>b</u> | |

**Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent au même groupe.

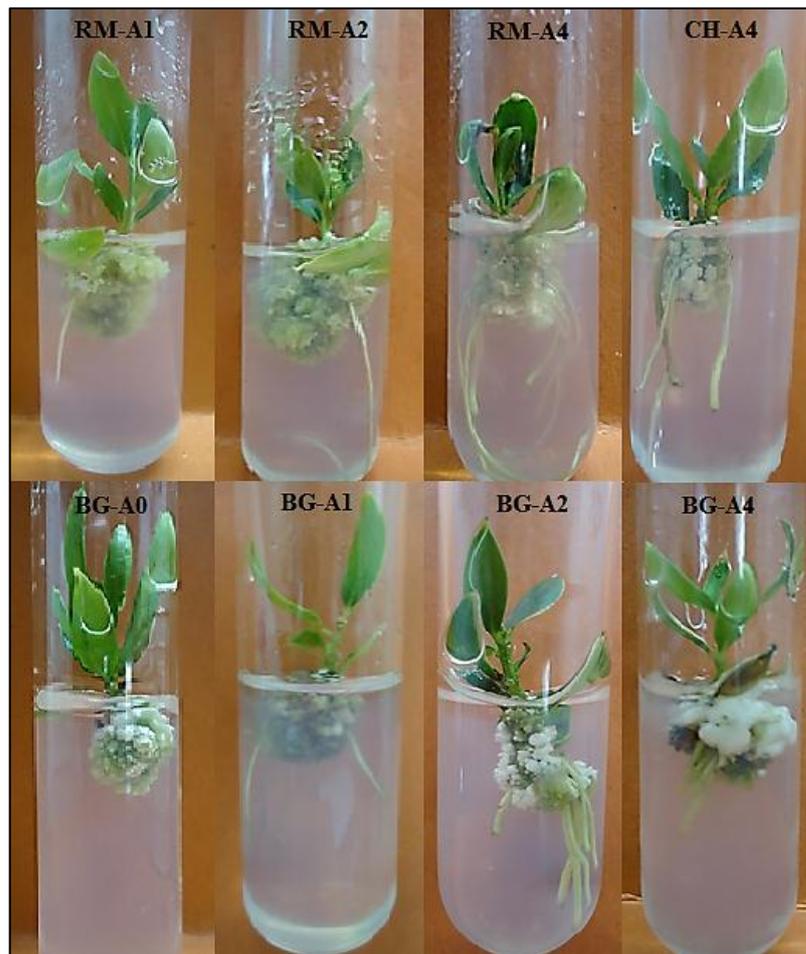


Figure 3.25 : Aspect des cals et enracinement des pousses à la fin de la phase de l'enracinement.

3.3.4 Longueur moyenne des racines par pousse

Pour ce paramètre, les résultats obtenus varient de 00,00 à 10,40 mm. Pour les variétés RM et BG, la concentration A2 a donné les meilleurs résultats (10,40 mm et 6,06 mm respectivement). Concernant la variété CH, la concentration A4 a donné des racines d'une longueur moyenne de 10,16 mm. Les autres concentrations n'ont présenté aucun enracinement sur cette variété.

L'ANOVA a révélé que l'interaction génotype*zéatine n'a eu aucun effet significatif sur la longueur moyenne de racines par pousse ($p=0,107827$). Par contre, l'ANOVA ayant porté sur les deux facteurs séparément, a révélé un effet non significatif du génotype ($P=0,163341$) et un effet hautement significatif de l'ANA ($p=0,002366$).

Nous avons observé que l'augmentation de la concentration d'ANA dans le milieu de culture a fait accroître la longueur moyenne des racines par pousse. Les résultats obtenus ont varié de 00,00 à 07,44 mm. La concentration A4 a donné la longueur la plus élevée (7,44mm), secondée de la concentration A2 (05,48 mm), suivie des concentrations A1 et A0 (02,48 et 00,00 mm respectivement).

La figure 3.26 illustre la longueur moyenne des racines en fonction de la concentration de l'auxine ANA.

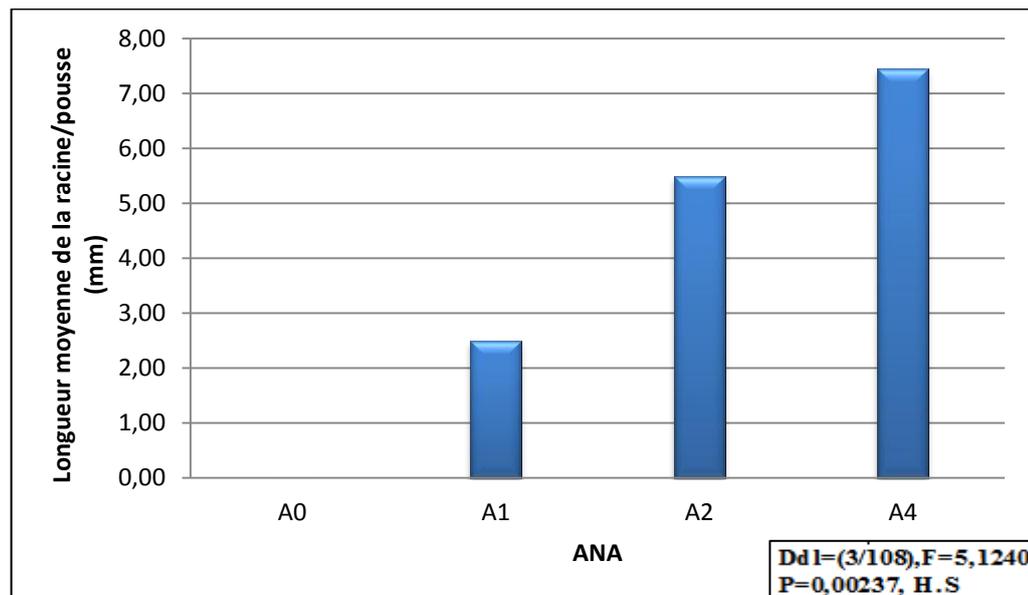


Figure 3.26 : Effet de la concentration de l'auxine ANA sur la longueur moyenne des racines.

Le test de Newman-Keuls fait ressortir trois groupes homogènes (tableau 3.11). Le groupe (a) comporte les concentrations A0 et A1. Cette dernière est représentée dans le groupe (b) avec la concentration A2 et cette dernière, à son tour, est représentée dans le groupe (c) avec la concentration A4.

Le tableau 3.10 comporte la comparaison des moyennes pour pour la longueur moyenne des racines obtenues par pousse.

Tableau 3.11 : Comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls pour la longueur moyenne des racines obtenues par pousse :

| Facteur1 | | CH | RM | BG | Moyenne ANA |
|--|------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| Facteur2 | | | | | |
| Longueur moyenne des racines par pousse (mm) | A0 | 0,00a | 0,00a | 0,00a | 00,00 <u>a</u> |
| | A1 | 0,00a | 03,80a | 03,66a | 02,48 <u>ab</u> |
| | A2 | 0,00a | 10,40a | 06,06a | 05,48 <u>bc</u> |
| | A4 | 10,16a | 08,92a | 03,26a | 07,44 <u>c</u> |
| | Moyenne Génotype | 02,54 <u>a</u> | 03,24 <u>a</u> | 05,78 <u>a</u> | |

**Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent au même groupe.

3.3.5 Discussion

La rhizogénèse a été étudié sur les trois variétés autochtones (Chemlal, Ronde de Miliana et Blanquette de Guelma) en utilisant l'auxine ANA avec quatre concentrations différentes (0, 1, 2, et 4 mg/l).

Une interaction très hautement significative a été notée entre le génotype et sa réactivité à la concentration d'auxine ANA dans le milieu d'induction racinaire. Les variétés Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana ont mieux réagi que la variété Chemlal vis-à-vis de la callogénèse. Chez cette variété, on a constaté le développement de cals seulement dans les milieux contenant 2 et 4 mg/l d'ANA alors que chez les deux autres variétés (Ronde de Miliana et Blanquette de Guelma) des cals se sont développés avec ou sans addition d'ANA dans le milieu de culture.

Ceci montre que l'initiation de cals à la base des pousses n'a aucun lien avec la concentration de l'ANA dans le milieu pour les variétés Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana. Concernant la variété Chemlal, l'augmentation de la concentration de l'ANA au-delà de 1 mg/l provoque le développement de cal. La différence de réactivité est en premier lieu de nature génotypique. Ce résultat est en accord avec celui de RASHID et QUARASHI [115] qui rapportent que, sur le blé tendre (*Triticum aestivum* L.), l'induction des cals serait dépendante du génotype et qu'elle serait favorisée par l'addition du 2.4-D au milieu de culture.

ABOUSALIM et al [41] ont observé une formation de cals à des degrés différents selon le type et la concentration de l'auxine. Avec l'ANA à 1 mg/l, ils ont obtenu moins de 25,00% de callogénèse alors que le taux a dépassé les 75,00% en utilisant les concentrations 2 et 4 mg/l. L'absence d'auxine n'a montré, cependant, aucun développement de cals. Ces résultats sont en accord avec le nôtre sur la variété CH. BEDDEK [106], sur la même variété, a rapporté un résultat proche au nôtre. Il a obtenu 16,66% en additionnant 2 mg/l d'ANA au milieu ½ OM. Par ailleurs, ABDELLI et MEKHELFI [114] ont obtenu 58,33 et 75,00% de callogénèse en utilisant le milieu ½ MSM additionné respectivement de 2 et 4mg/l d'ANA.

De gros cals ont été observés (macro-cals) sur les bases des pousses des génotypes Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana. GHORBEL et al [98], en étudiant la propagation *in vitro* du pêcher-amandier GF-557, ont signalé que des concentrations d'ANA supérieures à 0,5 mg/l donnent naissance à de gros cals à la base des pousses. Ces observations sont en accord avec celles de YAKOUB-BOUGDAL (2005) in [104] qui signale que l'accroissement des cals est en étroite relation avec la concentration de la BAP : plus celle-ci augmente, plus les cals sont volumineux. Ces résultats ne corroborent pas avec les nôtres car le volume des cals n'a pas été influencé par la concentration d'ANA. Nous pouvons alors admettre que la richesse du milieu de culture en éléments minéraux est responsable du développement des macro-cals. Une dilution plus importante du milieu de culture permettrait probablement la diminution du volume des cals.

La formation des cals est un préalable à l'induction de la rhizogénèse [3]. Cependant, malgré son importance, elle reste insuffisante pour obtenir une

bouture enracinée [11]. En effet, BEDDEK [106] a signalé la présence de cal à la base des pousses sans qu'il y eu formation de racines. Ces observations sont en accord avec les nôtres où il a été observé l'existence de cals sur les milieux témoins (sans auxine) chez les variétés Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana sans pour autant en avoir des racines. Toutefois pour la variété Chemlal, l'enracinement s'est initié uniquement avec 4 mg/l d'ANA où le taux de callogénèse a été le plus important (80,00%) par rapport à la concentration de 2mg/l (20,00%). Nous pouvons donc penser que l'enracinement nécessiterait à la fois la formation de cals et une concentration d'auxine exogène adéquate additionnée à un milieu de culture favorable et ce, en fonction du génotype à multiplier.

Cette suggestion vient dans la même ligne de pensée de KEVERS et al [116] qui ont rapporté que le succès dans la micropropagation dépend de la production de racines adventives de bonne qualité et que l'auxine est considérée comme étant le facteur déterminant dans le processus d'enracinement.

Nos résultats sont également en accord avec ceux d'ALI et al [117] puisque notre étude a montré que l'auxine est essentielle pour induire l'enracinement des microboutures d'olivier du fait qu'aucun enracinement n'a été observé en l'absence d'auxine.

Par ailleurs, le type d'auxine, le moment de son application et la durée d'exposition des pousses à l'auxine sont des facteurs clés de succès de l'enracinement des plantes [118]. Diverses auxines ont été utilisées pour l'enracinement *in vitro* de micro-boutures d'olivier, principalement l'acide indolebutyrique (AIB), l'acide naphtalène-acétique (ANA) et l'acide indole-acétique (AIA) [119]. Toutefois, le type et la concentration exigés de ces auxines varient considérablement en fonction des cultivars d'olivier [120 ; 107]. En effet, Selon ABOUSALIM et al [41], l'ANA s'est nettement distinguée des autres auxines testées sur le cultivar Picholine Marocaine alors que pour le cultivar Moraiolo, c'est l'AIB qui a montré sa supériorité dans l'initiation racinaire [117].

Ces observations concordent avec celles dégagées par notre étude où l'auxine ANA a été utilisée avec quatre concentrations différentes (0, 1, 2 et 4 mg/l). Les racines se sont développées sur les génotypes Blanquette de Guelma

et Ronde de Miliana cultivés dans 1, 2 et 4 mg/l d'ANA alors que le génotype Chemlal a initié des racines uniquement avec 4 mg/l d'ANA avec un même pourcentage d'enracinement de 40%. Nous pouvons donc déduire que l'enracinement est influencé par le génotype et la présence d'auxine dans le milieu de culture. La concentration nécessaire à l'enracinement varie selon le cultivar que l'on désire multiplier puisque la réactivité du génotype Chemlal est significativement différente de celles de Blanquette de Guelma et de Ronde de Miliana ces derniers ayant réagis de la même manière.

Le taux d'enracinement obtenu est similaire à celui rapporté par HADDAD et HADDAD [121] sur la variété Chemlal (40%) cultivée dans le milieu $\frac{1}{2}$ MSM additionné avec 1 mg/l d'ANA. Ce taux a doublé en combinant les auxines ANA et AIB.

Des résultats inférieurs aux nôtres sont rapportés sur la même variété par YAKOUB-BOUGDAL et al [87], où ils ont obtenu 10,41% et 27,08% en utilisant le milieu $\frac{1}{2}$ MS additionné respectivement avec 4 et 6 mg/l d'ANA. BEBBEK [106] a obtenu 00,00% d'enracinement sur milieu OM additionné de 2 mg/l d'auxine ANA. BOUSTANY [82] a obtenu 22,22% et 14,30% d'enracinement sur milieu MS et OM respectivement additionnés de 2 mg/l d'ANA.

La supériorité de nos résultats serait probablement liée au milieu de culture utilisé et à l'effet de l'obscurité sur la rhizogénèse. En effet, selon ROUSSOS et PONTIKIS [1], l'utilisation d'un milieu de culture de faible concentration ionique avec l'induction de l'enracinement dans l'obscurité s'avèrent extrêmement efficaces sur le cultivar Koroneiki. Il en est de même, pour les cultivars Frantoio, Doce agogia et Moraiolo où l'effet de l'obscurité a permis l'amélioration significativement de l'enracinement *in vitro* [122].

L'exécution simultanée de deux blessures à la base des explants contribuant à une meilleure absorption de l'eau, des éléments de croissance et de l'auxine conduit à des pourcentages d'enracinement relativement élevés [123].

Selon BENDERRADJI et al [3], une faible prolifération racinaire peut avoir comme origine la production par l'explant ou la présence dans le milieu de culture des substances chimiques inhibitrices de la morphogénèse. Ce phénomène est

réduit par ajout du charbon actif à 1mg/l qui exerce son effet par l'absorption des substances toxiques produites et rejetées par l'explant dans le milieu. Un second effet est que le charbon absorbe les substances nocives associées aux minéraux entrant dans la composition du milieu.

Les effets stimulateurs du charbon actif en culture *in vitro* ont été rapportés par HMOUNI *et al* [124] sur le mandarinier, par RUGINI *et al* [125] et YAKOUB-BOUGDAL *et al* [87] sur l'olivier. Ces derniers ont observé une augmentation du taux d'enracinement de l'olivier cv. Chemlal de 10,41 et 27,08% à 79,16 et 91,66% respectivement avec 4 et 6 mg/l d'ANA après avoir transféré des pousses du milieu d'induction racinaire (contenant l'auxine ANA) vers un milieu sans auxine mais contenant 7 mg/l de charbon actif.

L'effet du charbon est similaire à celui de l'obscurité car ce dernier noircit le milieu [3]. Toutefois, les travaux d'ALLAM (1985) in [106] sur le cv. Tanche, ont démontré que l'induction racinaire n'est pas liée à l'effet de l'obscurité mais plutôt à l'effet du charbon actif.

Pour ce qui est du nombre moyen de racines obtenues par pousse, il varie de 01,80 à 04,40 et est similaire à ceux rapportés par plusieurs auteurs [126 ; 117 ; 1].

Les résultats ont également montré que la présence d'ANA dans le milieu d'induction racinaire influence significativement le nombre moyen de racines par pousse. Des résultats similaires ont été rapportés par ROUSSOS *et* PONTIKIS [1]. Toutefois des différences significatives ont été observées entre les génotypes étudiés. En effet, pour le génotype Ronde de Miliana, le nombre moyen de racines obtenu par pousse a augmenté au fur et à mesure que la concentration d'ANA s'élevait tandis que 2 mg/l ont donné le nombre le plus élevé pour le génotype Blaquette de Guelma. La formation d'une ou de plusieurs racines est différente selon les cultivars de l'olivier [127].

La vitesse d'enracinement a suivi la même tendance que celle du nombre moyen de racines par pousse. L'augmentation de la concentration de l'ANA dans le milieu d'enracinement a entraîné une augmentation de la vitesse d'initiation racinaire pour la variété Ronde de Miliana. Toutefois, pour la variété Blanquette de

Guelma, la vitesse a diminué au-delà de 2 mg/l. La variété Chemlal n'a initié des racines que dans 4 mg/l d'ANA. Nous pouvons donc déduire que plus l'initiation racinaire est rapide, plus le nombre de racines augmente.

ALI et al [117] ont rapporté qu'au-delà d'une concentration d'auxine optimale, le nombre de racines par explant diminuerait. Dans notre étude, la concentration optimale d'ANA pour la variété Blanquette de Guelma est de 2mg/l. Pour les deux variétés restantes, la concentration optimale ne peut être déduite puisque la concentration 4 mg/l qui est le niveau le plus élevé d'ANA a donné les meilleurs résultats. YAKOUB-BOUGDAL et al [87] n'ont pas observé de différence entre le nombre de racines obtenues avec les concentrations 4 et 6 mg/l d'ANA.

BAKER et WETZSTEIN [128] rapportent que les fortes concentrations d'auxine induisent des niveaux élevés de métabolites de dégradation dans les tissus, bloquant ainsi, le processus de régénération. Le transfert des pousses dans un milieu frais dépourvu d'auxine permet le développement racinaire [41].

Indépendamment du génotype, la concentration de l'auxine dans le milieu de culture influence significativement le nombre de racines par pousse. Dans notre étude nous avons utilisé quatre concentrations différentes (0, 1, 2 et 4 mg/l) et les nombres de racines obtenus sont proportionnels aux concentrations utilisées.

De même, il a été constaté que l'augmentation de la concentration de l'ANA de 1 à 4 mg/l dans le milieu d'enracinement entraîne une augmentation significative de la longueur moyenne des racines par pousse.

Nos résultats ne corroborent pas avec ceux rapportés par ROUSSOS et PONTIKIS [1] qui ont signalé que l'augmentation de la concentration d'ANA au-delà de 1 mg/l avait conduit à la diminution de la longueur moyenne des racines alors qu'un constat inverse était observé avec l'AIB, ce qui est en accord avec notre résultat.

Par ailleurs, ALI et al [117], en comparant les auxines ANA et AIB, ont rapporté que la longueur moyenne des racines diminuerait au de-là d'une concentration optimale. Pour le cultivar Moraiolo, cette concentration est de 1mg/l et de 1,5 mg/l respectivement avec les auxines ANA et AIB.

Les racines peuvent se développer avec une concentration faible d'auxine mais leur croissance est fortement inhibée par une concentration plus élevée [129] car, à ce niveau, l'auxine induit la production d'éthylène, inhibiteur de la croissance des racines [130].

3.4. Phase d'acclimatation

Les vitroplants enracinés ont été rincés avec de l'eau de robinet afin d'éliminer le milieu adhérent et sont transférés individuellement dans des pots en plastique (7 cm de diamètre et 8 cm de hauteur) contenant un substrat composé de la tourbe et de perlite selon un rapport 2:1 (v/v), désinfecté à 180°C pendant 2 heures. Le mélange a été ensuite mouillé avec une solution nutritive (Knop).

Les plantules ont été ensuite recouvertes d'un sac plastique pour maintenir l'humidité relative aux alentours de 90% [82], puis placées au niveau de la chambre de pré-acclimatation dont la température est maintenue entre 23 et 25°C lors du premier mois d'acclimatation (présacclimatation). Après ouverture des sachets, les plantules ayant survécu sont repotées dans des sachets noirs de cinq kilos et transférées en serre d'acclimatation réglée à une température de 24°C.

Les paramètres suivis lors de cette phase sont : taux (%) de survie, longueur des tiges et nombre de feuilles par plant.

3.4.1 Taux de survie (%)

Lors de la près-acclimatation, nous avons observé au bout de huit jours un flétrissement et une chute de feuilles de certaines plantules suivis du dessèchement et de la mort des pousses.

Après trente jours, le pourcentage de survie dans cette étape a été de 25,00% pour les plantules des variétés RM et BG issues des concentrations A2 et A4 dans la phase de l'enracinement. Le reste des plantules (RM*A1, BG*A1 et CH*A4) ont dépéri (0% de survie) (figure 3.27).

Ainsi, l'ANOVA ne montre aucune différence significative ($p=0,80122$). Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.27.

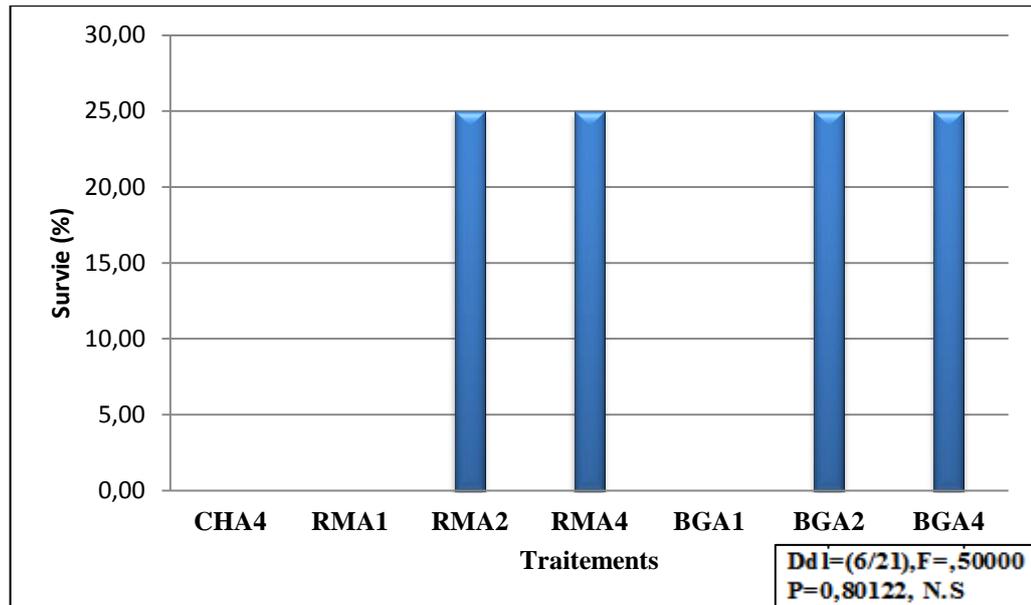


Figure 3.27 : Taux de survie des plantules après 30 jours de pré-acclimatation.

Notons que le nombre de plantules ayant repris dans chaque traitement était seulement d'une plantule ce qui nous donne un nombre total de quatre plantules pré-acclimatées avec succès. Ceci dit, le manque de répétitions dans chaque traitement ne permettait pas de réaliser des analyses statistiques pour confirmer les résultats obtenus vis-à-vis de la longueur et du nombre de feuilles obtenus pour chaque traitement.

3.4.2 Longueur de la tige et nombre de feuilles par plant

Les résultats ont montré qu'après le premier mois d'acclimatation, les plantules ont montré une faible croissance. Toutefois, leur croissance a commencé à s'accélérer après une période d'adaptation aux conditions d'acclimatation d'une durée d'un mois à l'issue de laquelle les plantules sont devenues plus grandes avec apparition de nouvelles feuilles.



Figure 3.28 : Plantules après 1 mois de pré-acclimation : (a) plantule morte ; (b) plantule avec deux nouvelles feuilles.

A l'issue de 6 mois d'acclimation, la longueur des plantules a varié entre 10,00 et 16,00 cm et le nombre de feuilles entre 15,00 et 21,00 (figure 3.29).

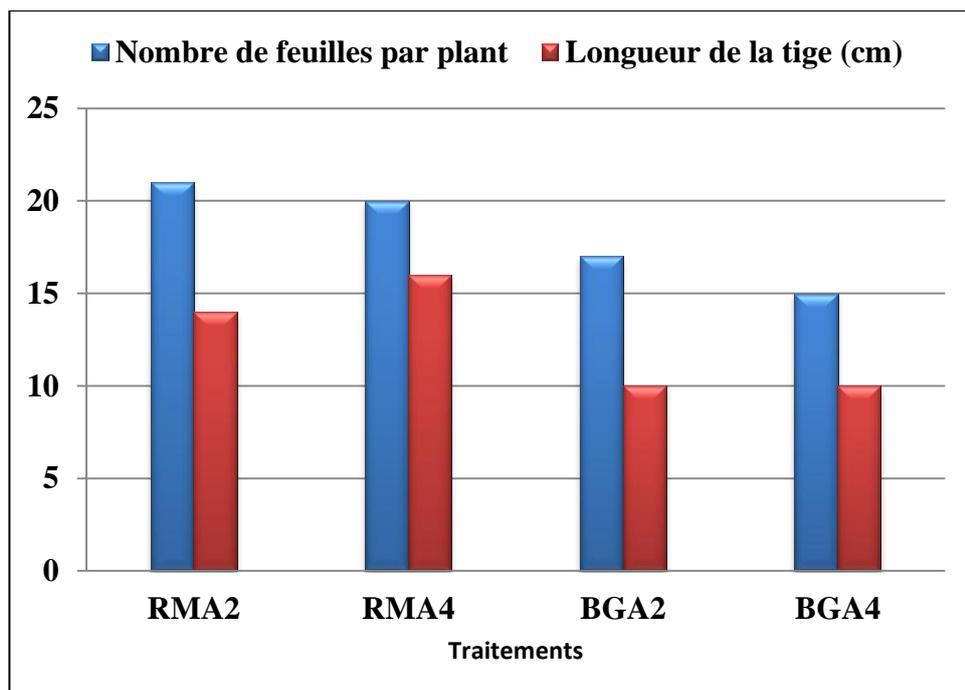


Figure 3.29 : Résultats obtenus à l'issue de six mois d'acclimation des plantules.

La variété RM a enregistré les valeurs les plus élevées avec les deux concentrations d'ANA (A2 et A4). Les traitements RM*A2 et RM*A4 ont donné respectivement 14,00 et 16,00 cm de longueur avec des nombres de feuilles très rapprochés, respectivement de 21,00 et 20,00. Pour la variété BG, une longueur

de 10,00 cm a été enregistrée pour les deux plants issus des deux concentrations d'ANA (A2 et A4) avec des nombres de feuilles également rapprochés, respectivement de 17,00 et 15,00. Les plants obtenus sont représentés dans la figure 3.30.



Figure 3.30 : Plants d'olivier obtenus après 6 mois d'acclimatation.

3.4.3 Discussion

L'acclimatation constitue une étape très importante dans le processus de régénération par culture *in vitro*. En effet, lors du transfert sur le substrat, les vitroplants peuvent dépérir pour diverses raisons : contamination, faible humidité, déshydratation, etc... [124].

Le suivi des pousses enracinées dans la phase d'acclimatation a montré des taux de survie assez faibles dans le premier mois de leur transfert *ex vitro*.

Des résultats supérieurs sont rapportés par ROUSSOS *et* PONTIKIS [1] et CHAARI-RKHIS *et al* [89]. Ces auteurs ont obtenu respectivement 75,00 et 88,00% de survie. LAHCENE [131] a obtenu un taux de survie de 00,00% pour le Thuya de Berberie.

Le pourcentage élevé de mortalité des plantules pourrait être attribué au substrat utilisé et aux conditions extérieures. Selon LAHCENE [131], cette phase nécessite de tester des substrats pour arriver à une meilleure réussite. AUGÉ [38] signale que les facteurs de réussite de l'acclimatation sont basés surtout sur les conditions extérieures.

Par ailleurs, le flux d'eau libre entre les racines et les pousses contribue à l'augmentation de taux de survie par la diminution du stress hydrique au niveau des feuilles [1]. Dans notre étude, les racines se sont développées à la base des pousses après formation de cal. Ces derniers, peuvent empêcher la connexion vasculaire entre la racine et la tige [132] diminuant ainsi le taux de survie. Ceci a également été signalé par GASPAR *et al* [133] où ils rapportent que les vitroplants possédant un cal au contact du milieu de culture présentent des vaisseaux du système racinaire mal raccordés à ceux de la tige ce qui peut expliquer les pertes lors du transfert en pot.

En plus, nous avons remarqué que les plantules desséchées (RM*A1, BG*A1 CH*A4), à l'exception de CH*A4, avaient un nombre de racines inférieur par rapport à celles qui avaient survécu (RM*A2, RM*A4, BG*A2 et BG*A4) dû aux concentrations d'ANA relativement élevées qu'ont subi ces dernières.

Nous pouvons supposer que les concentrations élevées d'auxine ANA, en plus de leur effet sur l'augmentation du nombre de racines par pousse lors de la phase d'enracinement, elle permet aussi le développement de nouvelles racines fonctionnelles pendant le premier mois d'acclimatation. La présence de nouvelles racines fonctionnelles adaptées à la vie en terre est nécessaire pour la réussite de l'acclimatation des plantules issues de la culture *in vitro*. En effet, le plus souvent, les jeunes racines formées en *in vitro* ont un rhizoderme non subérifié, elles se dessèchent et meurent quand elles sont placées au contact du substrat de culture. Il faut attendre la formation de nouvelles racines pour que la plantule s'alimente normalement [134].

Concernant la croissance des plantules transférées à la serre d'acclimatation, nous avons obtenu des plants présentant des longueurs allant de 10,00 à 16,00 cm. Le résultat obtenu par CHAARI-RKHIS et al [89] sur l'olivier cultivar Oueslati est inférieur au notre, il est de 08,90 cm.

Nous avons également noté un faible rythme de croissance lors du mois suivant le transfert *ex vitro* des plantules. Les plantules ont repris normalement leur croissance à partir du deuxième mois. Des observations similaires ont été rapportées par CHAARI-RKHIS et al [111]; CHAARI-RKHIS et al [89]. Ces auteurs ont expliqué que le ralentissement de la croissance est dû au stress de la plante après sa transplantation provoquant ainsi une déformation temporairement du système photosynthétique. BOUJNAH [135] a signalé que la vigueur et l'activité de la photosynthèse ont été restaurées à des valeurs similaires à celles enregistrées par les oliviers sur champ après quelques jours de leur transfert *ex vitro*.

En parallèle de la réduction du taux de la photosynthèse, CHAARI-RKHIS et al [89] ont observé une augmentation significative du taux de transpiration dans les premiers jours du transfert *ex vitro* et une diminution apparente de ce taux vers le troisième mois accompagnée d'une forte augmentation du taux de la photosynthèse.

L'augmentation des taux de transpiration des plantes micropropagées après le transfert *ex vitro* pourrait être attribuée au développement moindre de la cuticule [136]. La transpiration baisse par la suite pour atteindre des valeurs faibles au

bout de 6 mois [111 ; 89]. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par POSPISILOVA et al [136] sur des vitroplants de tabac.

Les plants acclimatés avec succès continuent leur croissance normalement dans la serre d'acclimatation au niveau de l'ITAFV.

CONCLUSION

L'objectif visé par notre étude est celui de contribuer à l'élaboration d'un protocole de multiplication conforme de quelques variétés autochtones d'olivier dans la perspective de valoriser et de préserver les ressources génétiques locales d'olivier (*Olea europaea* L.).

Notre travail a consisté donc en une mise au point d'une culture *in vitro* à partir de bourgeons axillaires de quatre variétés autochtones. Il s'agit des variétés Chemlal, Limli, Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana. Le milieu de culture utilisé est le MS modifié par LEVA et al (1995) (MSM).

L'étude menée a porté sur quatre phases : initiation de la culture, élongation des pousses, enracinement des pousses et acclimatation des plantules.

Lors des phases d'initiation de la culture et d'élongation, le milieu de culture a été additionné avec 1 ou 2 mg/l de zéatine ou laissé sans apport exogène de substances de croissance.

Concernant la phase d'initiation de la culture, le débourrement a montré qu'il a été significativement influencé par le génotype donnant ainsi des taux élevés chez les variétés Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana qui ont enregistré respectivement 90,86 et 90,96%.

Pour ce qui est de l'interaction des facteurs génotype*zéatine, celle-ci a significativement influencé le taux de pousses. Les meilleurs résultats sont obtenus avec 2 mg/l de zéatine chez les variétés Blanquette de Guelma, Ronde de Miliana et Chemlal qui ont enregistré respectivement 41,00, 97,49 et 24,16% tandis que la variété Limli a donné le résultat le plus faible, 05,00%.

Pour ce qui est du taux de brunissement des explants, celui-ci a varié de 00,00 à 09,60%. Ce faible taux est peut être imputé à la période de prélèvement des explants réalisé pendant le stade de reprise d'activité (automne) et/ou à l'efficacité du produit de désinfection utilisé (Hgcl₂ à 677 mg/l). Ce dernier nous a également permis d'obtenir des taux de contamination nuls.

Quant à la vitesse de brunissement, les résultats montrent que ni le génotype, ni la concentration du milieu en zéatine, ni l'interaction génotype*zéatine ne semblent l'influencer. On a également constaté que le nombre de bourgeons débouffés n'a été important que, seulement, après une ou deux semaines de culture.

Concernant la phase d'élongation, le constat pour tous les génotypes étudiés, est que plus la concentration du milieu en zéatine s'élève, plus l'allongement est élevé. La différence est significative et les longueurs les plus élevées ont été obtenues avec 2 mg/l de zéatine. En utilisant cette concentration, la variété Ronde de Miliana a enregistré la valeur la plus élevée (17,52 mm), viennent ensuite la variété Blanquette de Guelma avec 11,55 mm, la variété Chemlal avec 08,05 et Limli avec 04,65 mm.

Pour ce qui est du nombre de feuilles formées par pousse, l'interaction génotype*zéatine l'a également influencé d'une manière significative. Le meilleur résultat est obtenu avec la concentration 2 mg/l de zéatine chez les variétés Ronde de Milana et Blanquette de Guelma avec, respectivement, 10,85 et 10,15. Le faible développement des feuilles observé avec les autres traitements semble être en rapport avec le faible allongement obtenu avec ces derniers.

Pour ce qui est de l'effet de l'interaction génotype*zéatine sur le nombre moyen de pousses par explant, les résultats obtenus montrent que la zéatine a eu un effet positif sur les variétés étudiées à l'exception de la variété Chemlal. Toutefois, l'augmentation de la concentration de la zéatine dans le milieu de culture à 2 mg/l a permis d'obtenir les meilleurs résultats chez les variétés Ronde de Miliana et Limli tandis que chez la variété Blanquette de Guelma, on n'a enregistré aucune différence significative avec 1 ou 2 mg/l de zéatine. La variété Chemlal n'a pas été influencée par l'apport exogène de la zéatine.

Pour ce qui est de la survie des explants, on a également constaté que, l'ajout de la zéatine dans le milieu de culture l'a fait significativement augmenter. Il en résulte donc qu'il est indispensable d'ajouter de la zéatine dans le milieu de culture à doses adaptées à chaque génotype que l'on veut multiplier.

Pour ce qui est des pousses de longueur supérieure ou égale à 01 cm, les taux les plus élevés sont obtenus avec la concentration 2 mg/l de zéatine chez les variétés Blanquette de Guelma, Chemlal et Limli et 1 mg/l de zéatine chez la variété Ronde de Miliana.

Quant au rythme de croissance des pousses, nous avons constaté que la présence de la zéatine dans le milieu de culture a fait accélérer d'une manière relativement rapide la vitesse de croissance chez les quatre variétés étudiées.

Concernant la phase d'enracinement, nous avons utilisé pour notre étude l'auxine ANA avec quatre concentrations (0, 1, 2 et 4 mg/l) sur les variétés Blanquette de Guelma, Ronde de Miliana et Chemlal. La variété limli, n'ayant pas répondu favorablement lors de la phase d'élongation, ne pouvait plus faire objet d'étude lors de cette phase.

Le milieu de culture de base utilisé est le MSM dilué de moitié pour les macroéléments et le mannitol.

Nous avons observé la présence de macro-cals qui se sont développés sur la base des pousses chez les variétés Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana avec les quatre concentrations d'ANA utilisées. Concernant la variété Chemlal, des cals se sont développés avec les concentrations de 2 et 4 mg/l d'ANA.

Les racines se sont développées avec les concentrations 1, 2 et 4 mg/l d'ANA chez les variétés Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana tandis que la variété Chemlal a différencié des racines uniquement avec 4 mg/l d'ANA. Le taux est de 40,00% pour les trois variétés étudiées. Il apparaît que l'ANA est indispensable à l'enracinement et que sa concentration nécessaire à l'enracinement varie selon le cultivar.

Selon le génotype, les résultats ont également montré que la présence d'ANA dans le milieu d'induction racinaire influence significativement le nombre moyen de racines par pousse. En effet, pour la variété Ronde de Miliana, le nombre moyen de racines obtenues a augmenté avec l'augmentation de la concentration d'ANA tandis que pour la variété Blanquette de Guelma, le nombre le plus élevé a été obtenu avec la concentration de 2 mg/l d'ANA.

L'augmentation de la concentration d'ANA de 1 à 4 mg/l dans le milieu d'enracinement a entraîné une augmentation significative de la longueur moyenne des racines par pousse et la longueur la plus élevée a été obtenue avec la concentration de 4 mg/l d'ANA.

Concernant l'acclimatation, nous avons constaté une faible survie des pousses lors du premier mois de leur transfert *ex vitro*. Ce faible taux est probablement lié au mauvais raccordement des vaisseaux du système racinaire à ceux de la tige à cause de la formation de cals, au substrat utilisé et aux conditions extérieures.

Les plantules des variétés Blanquette de Guelma et Ronde de Miliana, issues de la concentration 2 et 4 mg/l d'ANA, ont continué leur croissance dans la serre d'acclimatation donnant, après 6 mois, des plants atteignant des longueurs allant de 10 à 16 cm et 15 à 21 feuilles.

En conclusion, nous pouvons croire, à la lumière des résultats enregistrés, que le microbouturage semble constituer une technique intéressante de propagation *in vitro* pour l'olivier en Algérie. Toutefois, un certain nombre d'aspects reste à étudier. Il s'agit :

- D'étudier l'effet du milieu de culture et des cytokinines, seules ou combinées, sur l'allongement des pousses chez les différentes variétés autochtones.
- D'étudier l'effet de la dilution du milieu de culture sur l'enracinement dans le but d'améliorer la rhizogénèse et l'acclimatation.
- D'entreprendre des études supplémentaires sur la phase d'acclimatation afin d'en bien définir ses facteurs de réussite.
- D'effectuer des études sur les techniques d'analyse moléculaire devant permettre la détection des variations somaclonales potentielles sur les plants issus du microbouturage.

APPENDICES**APPENDICE A****COMPOSITION DE LA SOLUTION NUTRITIVE (Knop)**

| Sels minéraux | Concentration (mg/l) |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Ca(NO ₃) ₂ | 1000 |
| KNO ₃ | 25000 |
| MgSO ₄ | 25000 |
| KH ₂ PO ₄ | 25000 |
| FeCl ₃ | 1 |
| H ₂ O | 1000 |

APPENDICE B

COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE MSM (Muraschige-Skoog Modifié -
LEVA et *al.*, 1995)

| Eléments | Concentrations |
|---|----------------|
| Macro-éléments (mg/l) | |
| NH ₄ NO ₃ | 825 |
| KNO ₃ | 950 |
| CaCl ₂ , 2H ₂ O | 477 |
| KH ₂ PO ₄ | 85 |
| MgSo ₄ 7H ₂ O | 185 |
| Micro-éléments (mg/l) | |
| MnSo ₄ , H ₂ O | 22,30 |
| H ₃ Bo ₃ | 16.70 |
| ZnSo ₄ , 7H ₂ O | 13 |
| KI | 0.83 |
| Na ₂ MoO ₄ ,2H ₂ O | 0.25 |
| CuSo ₄ , 5H ₂ O | 0.1 |
| CoCl ₂ , 6H ₂ O | 0.025 |
| Chélates de fer (mg/l) | |
| Na ₂ , EDTA | 37.2 mg/l |
| FeSo ₄ ,7H ₂ O | 27.80 mg/l |
| Vitamines et acides aminés (mg/l) | |
| Myo-Inositol | 100 |
| Acide nicotinique | 1 |
| Acide ascorbique | 10 |
| Pyridoxine-Hcl | 1 |
| Thiamine-Hcl | 10 |
| Composés organiques et agar (g/l) | |
| Mannitol | 18,2 |
| Agar agar | 7 |

APPENDICE C

RYTHME DE DEBOURREMENT

APPENDICE C.1 Pour les variétés CH et LIM

| Traitements Jours | CH*Z0 | CH*Z1 | CH*Z2 | LIM*Z0 | LIM*Z1 | LIM*Z2 |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Débourr (%) | Débourr (%) | Débourr (%) | Débourr (%) | Débourr (%) | Débourr (%) |
| J1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| J2 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| J3 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| J4 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| J5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| J6 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| J7 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| J8 | 0,00 | 0,00 | 6,67 | 0,00 | 8,33 | 8,33 |
| J9 | 0,00 | 5,00 | 6,67 | 0,00 | 8,33 | 10,00 |
| J10 | 25,00 | 5,00 | 6,67 | 11,67 | 35,00 | 35,00 |
| J11 | 36,67 | 5,00 | 25,00 | 25,00 | 35,00 | 35,00 |
| J12 | 46,67 | 5,00 | 25,00 | 41,67 | 35,00 | 35,00 |
| J13 | 46,67 | 38,33 | 41,67 | 55,00 | 35,00 | 35,00 |
| J14 | 58,33 | 41,67 | 41,67 | 55,00 | 36,67 | 38,33 |
| J15 | 58,33 | 41,67 | 41,67 | 55,00 | 48,33 | 50,00 |
| J16 | 58,33 | 41,67 | 66,67 | 55,00 | 48,33 | 50,00 |
| J17 | 65,00 | 60,00 | 66,67 | 58,33 | 48,33 | 56,67 |
| J18 | 65,00 | 60,00 | 66,67 | 58,33 | 56,67 | 56,67 |
| J19 | 65,00 | 60,00 | 66,67 | 58,33 | 56,67 | 56,67 |
| J20 | 65,00 | 60,00 | 66,67 | 68,33 | 56,67 | 56,67 |
| J21 | 65,00 | 60,00 | 66,67 | 69,80 | 56,67 | 56,67 |
| J22 | 65,00 | 60,00 | 81,67 | 69,80 | 56,67 | 60,00 |
| J23 | 65,00 | 60,00 | 81,67 | 69,80 | 61,60 | 62,60 |
| J24 | 68,33 | 70,00 | 86,33 | 69,80 | 61,60 | 62,60 |
| J25 | 68,33 | 73,00 | 86,33 | 69,80 | 61,60 | 62,60 |
| J26 | 71,60 | 73,00 | 86,33 | 69,80 | 61,60 | 62,60 |
| J27 | 71,60 | 73,00 | 86,33 | 69,80 | 61,60 | 62,60 |
| J28 | 71,60 | 73,00 | 86,33 | 69,80 | 61,60 | 62,60 |

APPENDICE C.2 Pour les variétés RM et BG

| Traitements Jours | RM*Z0 | RM*Z1 | RM*Z2 | BG*Z0 | BG*Z1 | BG*Z2 |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Débourr (%) | Débourr (%) | Débourr (%) | Débourr (%) | Débourr (%) | Débourr (%) |
| J1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 |
| J2 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 |
| J3 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 |
| J4 | 0,00 | 1,67 | 1,67 | 0,00 | 0,00 | 0 |
| J5 | 0,00 | 1,67 | 1,67 | 0,00 | 3,33 | 6,66 |
| J6 | 0,00 | 1,67 | 3,33 | 0,00 | 3,33 | 6,66 |
| J7 | 0,00 | 1,67 | 3,33 | 0,00 | 3,33 | 6,66 |
| J8 | 0,00 | 1,67 | 3,33 | 0,00 | 8,33 | 10 |
| J9 | 0,00 | 1,67 | 31,67 | 0,00 | 13,33 | 16,66 |
| J10 | 5,00 | 1,67 | 50,00 | 1,67 | 13,33 | 16,66 |
| J11 | 13,33 | 36,67 | 63,33 | 6,67 | 13,33 | 36,66 |
| J12 | 31,67 | 36,67 | 63,33 | 21,67 | 13,33 | 46,66 |
| J13 | 31,67 | 36,67 | 83,33 | 21,67 | 13,33 | 65 |
| J14 | 33,33 | 36,67 | 83,33 | 51,67 | 36,67 | 83,33 |
| J15 | 33,33 | 76,67 | 83,33 | 51,67 | 63,33 | 90 |
| J16 | 33,33 | 76,67 | 98,80 | 51,67 | 65,00 | 98,8 |
| J17 | 65,00 | 76,67 | 98,80 | 61,67 | 65,00 | 98,8 |
| J18 | 65,00 | 91,20 | 98,80 | 61,67 | 65,00 | 98,8 |
| J19 | 65,00 | 91,20 | 98,80 | 61,67 | 65,00 | 98,8 |
| J20 | 73,33 | 91,20 | 98,80 | 70,00 | 83,33 | 98,8 |
| J21 | 73,33 | 91,20 | 98,80 | 70,00 | 83,33 | 98,8 |
| J22 | 73,33 | 91,20 | 98,80 | 70,00 | 83,33 | 98,8 |
| J23 | 73,33 | 91,20 | 98,80 | 70,00 | 96,00 | 98,8 |
| J24 | 82,80 | 91,20 | 98,80 | 77,80 | 96,00 | 98,8 |
| J25 | 82,80 | 91,20 | 98,80 | 77,80 | 96,00 | 98,8 |
| J26 | 82,80 | 91,20 | 98,80 | 77,80 | 96,00 | 98,8 |
| J27 | 82,80 | 91,20 | 98,80 | 77,80 | 96,00 | 98,8 |
| J28 | 82,80 | 91,20 | 98,80 | 77,80 | 96,00 | 98,8 |

APPENDICE D

RYTHME DE CROISSANCE

| Traitements | 20 Jours | | 40 Jours | | 60 Jours | |
|-------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| | Longueur pousses (mm) | Nombre de feuilles | Longueur pousses (mm) | Nombre de feuilles | Longueur pousses (mm) | Nombre de feuilles |
| CHZ0 | 3,22 | 3,4 | 3,37 | 3 | 3,2 | 2,25 |
| CHZ1 | 6,15 | 4,62 | 7,3 | 5,62 | 7,85 | 5,47 |
| CHZ2 | 6,37 | 4,75 | 7,65 | 5,65 | 8,05 | 5,4 |
| LIMZ0 | 0,77 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LIMZ1 | 0,7 | 1,7 | 0,9 | 1,03 | 0,45 | 0,4 |
| LIMZ2 | 3,54 | 3,3 | 4 | 4,48 | 4,65 | 4,52 |
| RMZ0 | 4,22 | 4,22 | 5,22 | 4,82 | 5,3 | 3,8 |
| RMZ1 | 8,77 | 5,75 | 11,77 | 7,65 | 14,3 | 9,3 |
| RMZ2 | 7,47 | 5,4 | 12,5 | 7,32 | 17,52 | 10,85 |
| BGZ0 | 0,85 | 1,25 | 0,77 | 0,65 | 0 | 0 |
| BGZ1 | 8,47 | 7,17 | 8,07 | 8,12 | 9,5 | 9,25 |
| BGZ2 | 7,82 | 7,37 | 10,17 | 8,75 | 11,55 | 10,15 |

APPENDICE E

TABLEAUX DE L'ANOVA

APPENDICE E.1 : Phase d'initiation

a) Taux de débourrement total des explants (%)

| | SC | Degr. de | MC | F | p |
|------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| ord. origine | 392310,1 | 1 | 392310,1 | 1782,572 | 0,000000 |
| Variétés | 7183,6 | 3 | 2394,5 | 10,880 | 0,000014* |
| Zéatine | 1244,5 | 2 | 622,3 | 2,827 | 0,069054 |
| Variétés*Zéatine | 1557,5 | 6 | 259,6 | 1,180 | 0,333060 |
| Erreur | 10563,9 | 48 | 220,1 | | |

b) Taux de pousses (%)

| | SC | Degr. de | MC | F | p |
|------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| ord. origine | 10686,41 | 1 | 10686,41 | 138,4167 | 0,000000 |
| Variétés | 2799,24 | 3 | 933,08 | 12,0858 | 0,000005* |
| Zéatine | 4553,77 | 2 | 2276,89 | 29,4916 | 0,000000* |
| Variétés*Zéatine | 2683,89 | 6 | 447,32 | 5,7939 | 0,000134* |
| Erreur | 3705,82 | 48 | 77,20 | | |

c) Taux de brunissement des explants (%)

| | SC | Degr. de | MC | F | p |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| ord. origine | 1460,267 | 1 | 1460,267 | 23,31453 | 0,000014 |
| Variétés | 353,067 | 3 | 117,689 | 1,87901 | 0,145719 |
| Zéatine | 32,133 | 2 | 16,067 | 0,25652 | 0,774794 |
| Variétés*Zéatine | 412,133 | 6 | 68,689 | 1,09668 | 0,378108 |
| Erreur | 3006,400 | 48 | 62,633 | | |

d) Séjour au premier débourrement

| | SC | Degr. de | MC | F | p |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| ord. origine | 6636,017 | 1 | 6636,017 | 936,8494 | 0,000000 |
| Variétés | 46,317 | 3 | 15,439 | 2,1796 | 0,102598 |
| Zéatine | 13,633 | 2 | 6,817 | 0,9624 | 0,389240 |
| Variétés*Zéatine | 39,033 | 6 | 6,506 | 0,9184 | 0,490072 |
| Erreur | 340,000 | 48 | 7,083 | | |

APPENDICE E.2: Phase d'élongation (phase d'allongement).

a) Longueur moyenne des pousses

| | SC | Degr. de | MC | F | p |
|--------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| ord. origine | 2246,803 | 1 | 2246,803 | 450,0482 | 0,000000 |
| Variétés | 675,657 | 3 | 225,219 | 45,1127 | 0,000000* |
| Zéa | 596,408 | 2 | 298,204 | 59,7320 | 0,000000* |
| Variétés*Zéa | 157,167 | 6 | 26,195 | 5,2469 | 0,000571* |
| Erreur | 179,725 | 36 | 4,992 | | |

b) Nombre moyen de feuilles par explant

| | SC | Degr. de | MC | F | P |
|--------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| ord. origine | 1256,551 | 1 | 1256,551 | 1307,183 | 0,000000 |
| Variétés | 272,061 | 3 | 90,687 | 94,341 | 0,000000* |
| Zéa | 332,833 | 2 | 166,417 | 173,122 | 0,000000* |
| Variétés*Zéa | 106,749 | 6 | 17,792 | 18,508 | 0,000000* |
| Erreur | 34,606 | 36 | 0,961 | | |

c) Nombre moyen de pousses par explant

| | SC | Degr. de | MC | F | P |
|--------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| ord. origine | 86,40333 | 1 | 86,40333 | 1152,044 | 0,000000 |
| Variétés | 15,12333 | 3 | 5,04111 | 67,215 | 0,000000* |
| Zéa | 9,10167 | 2 | 4,55083 | 60,678 | 0,000000* |
| Variétés*Zéa | 6,83167 | 6 | 1,13861 | 15,181 | 0,000000* |
| Erreur | 2,70000 | 36 | 0,07500 | | |

d) Taux de survie après transplantation (%)

| | SC | Degr. de | MC | F | P |
|--------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| ord. origine | 183768,8 | 1 | 183768,8 | 1876,787 | 0,000000 |
| Variétés | 30506,3 | 3 | 10168,8 | 103,851 | 0,000000* |
| Zéa | 16737,5 | 2 | 8368,7 | 85,468 | 0,000000* |
| Variétés*Zéa | 16962,5 | 6 | 2827,1 | 28,872 | 0,000000* |
| Erreur | 3525,0 | 36 | 97,9 | | |

e) Nombre de pousses ≥ 1 cm (%)

| | SC | Degr. de | MC | F | P |
|--------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| ord. origine | 47880,33 | 1 | 47880,33 | 517,3145 | 0,000000 |
| Variétés | 16787,67 | 3 | 5595,89 | 60,4598 | 0,000000* |
| Zéa | 21533,17 | 2 | 10766,58 | 116,3256 | 0,000000* |
| Variétés*Zéa | 9602,83 | 6 | 1600,47 | 17,2920 | 0,000000* |
| Erreur | 3332,00 | 36 | 92,56 | | |

APPENDICE E.3: Phase d'enracinement**a) Taux de callogenèse (%)**

| | SS | Degr. of | MS | F | P |
|--------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Intercept | 645333,3 | 1 | 645333,3 | 1452,000 | 0,000000 |
| Variétés | 140666,7 | 2 | 70333,3 | 158,250 | 0,000000* |
| ANA | 18666,7 | 3 | 6222,2 | 14,000 | 0,000000* |
| Variétés*ANA | 27333,3 | 6 | 4555,6 | 10,250 | 0,000000* |
| Error | 48000,0 | 108 | 444,4 | | |

b) Pourcentage d'enracinement des pousses

| | SC | Degr. de | MC | F | P |
|--------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| ord. origine | 65333,3 | 1 | 65333,33 | 42,00000 | 0,000000 |
| Var | 10666,7 | 2 | 5333,33 | 3,42857 | 0,036004* |
| ANA | 25333,3 | 3 | 8444,44 | 5,42857 | 0,001624* |
| Var*ANA | 10666,7 | 6 | 1777,78 | 1,14286 | 0,342643 |
| Erreur | 168000,0 | 108 | 1555,56 | | |

c) Nombre moyen de racines par pousse

| | SC | Degr. de | MC | F | P |
|--------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| ord. origine | 158,7000 | 1 | 158,7000 | 27,36207 | 0,000001 |
| Var | 45,6000 | 2 | 22,8000 | 3,93103 | 0,022493* |
| ANA | 121,9667 | 3 | 40,6556 | 7,00958 | 0,000237* |
| Var*ANA | 81,3333 | 6 | 13,5556 | 2,33716 | 0,036767* |
| Erreur | 626,4000 | 108 | 5,8000 | | |

d) Longueur moyenne des racines par pousse

| | SC | Degr. de | MC | F | P |
|--------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| ord. origine | 1783,323 | 1 | 1783,323 | 28,29411 | 0,000001 |
| Variétés | 232,278 | 2 | 116,139 | 1,84266 | 0,163341 |
| ANA | 968,873 | 3 | 322,958 | 5,12403 | 0,002366* |
| Variétés*ANA | 676,914 | 6 | 112,819 | 1,78998 | 0,107829 |
| Erreur | 6807,032 | 108 | 63,028 | | |

APPENDICE E.4 : Phase d'acclimatation**a) Taux de survie (%)**

| | SC | Degr. de | MC | F | P |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| ord. origine | 5714,29 | 1 | 5714,286 | 4,000000 | 0,058600 |
| Traitements | 4285,71 | 6 | 714,286 | 0,500000 | 0,801217 |
| Erreur | 30000,00 | 21 | 1428,571 | | |

b) Longueur de la tige et nombre de feuilles pas plant

| Traitements | 1 mois | | 3 mois | | 6 mois | |
|-------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | Nombre feuilles/ plant | Longueur de la tige (cm) | Nombre feuilles/ plant | Longueur de la tige (cm) | Nombre feuilles/ plant | Longueur de la tige (cm) |
| RMA2 | 5 | 1,7 | 11 | 7 | 21 | 15 |
| RMA4 | 5 | 1,8 | 12 | 9 | 20 | 17 |
| BGA2 | 5 | 1,8 | 10 | 6 | 17 | 11 |
| BGA4 | 4 | 1,8 | 9 | 5 | 15 | 11 |

APPENDICE E**LISTES DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS**

- ANA : acide naphtalène acétique
- A0 : concentration nulle d'auxine ANA
- A1 : concentration d'ANA de 1 mg/l
- A2 : concentration d'ANA de 2 mg/l
- A4 : concentration d'ANA de 4 mg/l
- BAP : 6-benzyl-aminopurine
- BG : variété Blanquette de Guelma
- CH : variété Chemlal
- cm : centimètre
- COI : conseil oléicole international
- FAO : organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
- F1 : facteur 1
- F2 : facteur 2
- Hcl : acide chlorhydrique
- ITAFV : institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne
- l : litre
- LIM : variété Limli
- NaOH : hydroxyde de sodium
- MADR : ministère de l'agriculture et du développement rural
- mg : milligramme
- mm : millimètre

| | |
|-------|--|
| MS | : Murashige et Skoog. |
| ½ MS | : MS dilué de moitié |
| MSM | : MS modifié |
| pH | : potentiel hydrogène |
| RAPD | : amplification aléatoire d'ADN polymorphe |
| µm | : micromètre |
| Z0 | : concentration nulle de zéatine |
| Z1 | : concentration de zéatine de 1 mg/l |
| Z2 | : concentration de zéatine de 2 mg/l |
| % | : pourcent |
| °C | : degré Celsius |
| 2-4 D | : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique |

REFERENCES

1. Roussos PA. & Pontikis CA., 2002 - *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. *Plant Gro Regul*, 37: 295–304.
2. MADR., 2012 - Statistiques agricoles, superficies et production - Série B. fév. 2012. MADR., Alger, 60 p.
3. Benderradji L., Bouzerzour H., Ykhlef N., Djekoun A., Kellou K., 2007 – Réponse à la culture *in vitro* de trois variétés de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Sciences & Technologie*, 26: 27-32.
4. Niaz N., Ullah S., Ullah M., Jabeen N., 2014 - Effect of growth regulators on micropropagation of different olive cultivars (*Olea europaea* L.). *SCIENCE LETTERS*, 2 (2): 48-52.
5. FAO., 2003., (Page consultée le 2 aout 2014) "*Assistance au Recensement Agricole*" *L'OLIVIER : CONTRAINTES ET POTENTIALITES*. Rapport de la FAO., République libanaise, 44 p. [En ligne]. Adresse URL : [http://www.agriculture.gov.lb/SiteCollection Documents/MOA/PDF/Publications/Studies/AgriProductionChains/Olivier.pdf](http://www.agriculture.gov.lb/SiteCollection/Documents/MOA/PDF/Publications/Studies/AgriProductionChains/Olivier.pdf)
6. Anonyme., 2014 (Page consultée le 10 aout 2014) - *Les zones de production oléicole mondiale*. Adresse URL : www.Internationalolioil.org.
7. FAOSTAT., 2014 (Page consultée le 10 aout 2014) – *Production*. Adresse URL : <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
8. COI., 2008 - *Rapport récapitulatif sur le marché des produits oléicoles n°29*, Conseil Oléicole International, pp 1-2.
9. Hadjou L., Lamani O., Cheriet F., 2013 - Labellisation des huiles d'olive algériennes : contraintes et opportunités du processus?. *NEW MEDIT N*, 2/2013 : 35 - 46.
10. ITAFV., 2006 - *Catalogue des variétés algériennes de l'olivier*. Ed. ITAFV, Algérie, 98 p.
11. Loussert R. et Brousse G., 1978 - *L'olivier, Techniques et production méditerranéenne*. Ed. G.P Maisonneuve et Larose, Paris, 448 p.
12. Civentos L., 1998 - *L'olivier, l'huile d'olive et l'olive*. Ed. C.O.I, 130 p.
13. Brun JP., 2003 - *Le vin et l'huile dans la Méditerranée antique - Viticulture, oléiculture et procédés de transformation*. Ed. Errance, Paris, 240 p.
14. Villa P., 2003 - *La culture de l'OLIVIER*. Ed. DeVecchi S.A, Paris, 143 p.
15. Fantanaza G. et Baldoni L., 1990 - Proposition pour un programme d'amélioration génétique de l'olivier. *Oliveae*, 34 : 32-39.

16. Villemur P., Dosba F., 1997. Oléiculture: évolution variétale et acquisition de la maîtrise des pratiques culturales. *OCL Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 4 (5) : 298-302.
17. C.O.I., 1999. *L'olivier, l'olive, l'huile*. Conseil Oléicole International : 1-18.
18. Argenson C., Regis S., Jourdain J.M. et Vaysse, P., 1999 – *L'olivier*. Ed. Ctifl, Paris, 204 p.
19. Tournieroux J.A., 1929 - *Oléiculture en Tunisie*. Ed. Imprimerie centrale, Tunisie, 373 p.
20. Nurhayat C., 1989 - Les facteurs ayant une incidence sur la formation des bourgeons à fleurs chez l'olivier. *Olivae*, 27 : 25-27.
21. Pagnol J., 1985 - *L'olivier*. Ed. Aubanel, France, 3^{ème} édition, 180 p.
22. Lavee N., 1997 - *Biologie et physiologie de l'olivier*. In Encyclopédie mondiale de l'olivier. Ed. C.O.I, Madrid, Espagne : 61-110.
23. Brosse J., 2005 - *Larousse des arbres et des arbustes*. Ed. Larousse, 576 p.
24. Boulouha B., 1995 - Contribution à l'amélioration de la production et la régularité de production chez l'olivier (*Olea europaea* L.) « Picholine Marocaine ». *Olivae*, 58 : 54-57.
25. Daoudi L., 1994 - *Etude des caractères végétatifs et fructifères de quelques variétés d'olivier locales et étrangères cultivées à la station expérimentale d'arboriculture fruitière (ITAF) de Sidi-Aich*.
26. Van der vossen H.A.M., Mashungwa G.N. et Mmolotsi R.M., 2007 (page consultée le 13/07/2014) - *Olea europaea* L. [en ligne]. Adresse URL : <http://database.prota.org/recherche.htm>.
27. Wallali L.D., Skiredj A. et Elattir H., 2003 - Fiches techniques : L'amandier, l'olivier, le figuier, le grenadier. *Transfert de technologie en agriculture*, 105 : 1-4.
28. Maillard R., 1975 - *L'olivier*. Ed. Infulvec, 147p.
29. Dandani O., 1983 - *Les exigences pédoclimatiques de l'olivier*. 3^{ème} cours international d'oléiculture, Tizi-Ouzou, ITAF : 36-42.
30. Ouaouich A et Chimi H., 2007 - *Guide du producteur de l'huile d'olive*. Ed. ONUDI, Vienne, 34 p.
31. Baldy, C., 1990 - Le climat de l'olivier (*Olea europea* L.) - Volume jubilaire du professeur Quezel. *Ecole méditerranéenne* XVI : 113-121.
32. Poli M., 1979 - Etude bibliographique de la physiologie de l'alternance de production chez l'olivier (*Olea europaea* L.). *Fruits*, 34 : 687-695.
33. Amirouche M., 1977 - *Contribution à la caractérisation des principales variétés d'olivier cultivées en Kabylie, par l'analyse des données biométriques et morphologiques*. Thèse Magister, Int. Nati. Agro., EL-HARRACHE, Algérie, 47 p.

34. Claude D., 2006 - *Les arbres fruitiers*. Ed. Rustica, France, 127 p.
35. C.O.I., 2008 (Page consultée le 2 janvier 2015) – Technique de production des plants d'olivier en pépinière, [En ligne]. Adresse URL: <http://www.internationaloliveoil.org/projects/paginas/index01.htm>
36. Jacoboni N., 1987 - L'olivier remis en question, abandon, reconstitution ou réimplantation ?. *Olivae*, 14 :18-32.
37. Oukssil I.A., 1983 - *L'olivier : connaissance de la plante*. 3^{ème} cours international d'oléiculture, Tizi-Ouzou, 28Nov-14Dec 1983.
38. Auge R., 1989 – *Les phénomènes physiologiques liés à la réalisation des cultures in vitro*. pp. 7-29 cité par Auge R., Beauschene G., Baccon Gibon J., Decopurtye L., Digat B., Jalouzot R., Minier R., Morand J.CL., Reynoird J.P., Strullu D.G. & Vidalie H., 1989 – *La culture in vitro et ses applications horticoles*. Ed. Tec & Doc-Lavoisier., Paris, 225 p.
39. Rugini E., 1984 - In vitro propagation of some olive (*Olea europaea* L.) cultivars with different root ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae*, 24: 123-134.
40. Brahadda N., Abousalim A., Walali L.D.E., Benali D., 2003 - Effet du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine Marocaine. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 7 (3/4) : 177-182.
41. Abousalim A., Brahadda N., Walali L.D.E., 2005 - Essais de prolifération et d'enracinement de matériel issu de rajeunissement par bouturage d'oliviers adultes (*Olea europaea* L.) et de germination in vitro : effets de cytokinine et d'auxines. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 9 : 237-240.
42. Mazri M.A., Belkoura I., Pliego-Alfaro F., Belkoura M., 2013 - Somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of the Moroccan olive cultivar Dahbia. *Scientia Horticulturae*, 159: 88-95.
43. Brhadda N., Walali L.D.M., Abousalim A., 2007 – histological study of the somatic embryogenesis of Moroccan Picholine olive tree *Olea europea* L. *Fruits*, 62 (2) : 115-124.
44. Beauchesne G., 1989 – L'histoire et les fondements de la culture *in vitro*. pp. 1-5 cité par Auge R., Beauschene G., Baccon Gibon J., Decopurtye L., Digat B., Jalouzot R., Minier R., Morand J.CL., Reynoird J.P., Strullu D.G. & Vidalie H., 1989 – *La culture in vitro et ses applications horticoles*. Ed. Tec& Doc-Lavoisier., Paris, 225 p.
45. Soltner D., 2007 – *Les bases de la production végétale – la plante : Biologie végétale et amélioration des plantes*. Sciences et techniques agricoles, France, T.3, 302 p.
46. Decourtye L., 1989 – *L'aspect génétique : conformité ou non-conformité du matériel végétal reproduit in vitro*. pp. 133-144 cité par Auge R., Beauschene G., Baccon Gibon J., Decopurtye L., Digat B., Jalouzot R., Minier R., Morand J.CL.,

- Reynoird J.P., Strullu D.G. & Vidalie H., 1989 – *La culture in vitro et ses applications horticoles*. Ed. Tec & Doc-Lavoisier., Paris, 225 p.
47. Bouterin D. & Bron G., 2002 – *Multiplication des plantes horticoles*. Ed. Tec & Doc-Lavoisier, Paris, 248 p.
48. Auge R. & Boccon-Gibod J., 1989 – *Les applications à l'horticulture*. pp. 63-90 cité par Auge R., Beauschene G., Baccon Gibon J., Decopurtye L., Digat B., Jalouzot R., Minier R., Morand J.C.L., Reynoird J.P., Strullu D.G. & Vidalie H., 1989 – *La culture in vitro et ses applications horticoles*. Ed. Tec & Doc-Lavoisier, Paris, 225 p.
49. Dore C. & Varoquaux F., 2006 – *Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées*. Ed. Quae, France, coll. "Savoir-faire", 812 p.
50. Cornu D. & Boulay M., 1986 - La multiplication végétative : Techniques horticoles et culture in vitro. *Forest. Franc*, 38 : 60-68.
51. Walali L., 1993 - *La multiplication in vitro des espèces ligneuses : Etat actuel et perspectives de développement*. pp. 399-406 cité par CHLYAH H., DEMARLY Y., AUPELF., UREF., 1993 - *Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes ?*. Ed. Jhon Libbey Eurotext, France, 409 p.
52. Martin B. & Prat D., 1985 - Biotechnologie et forêt : quelle place pour la foresterie clonale. *Biofutur*, 40: 39-49.
53. Druart PH. & Boxus PH., 1985 - Comportement de variétés fruitières autoenracinées par culture *in vitro* : premières observations. *Fruit Belge*, 411: 194-197.
54. Rugini E., 1984 - In vitro propagation of some olive (*Olea europaea* L.) cultivars with different root ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae*, 24: 123-134.
55. Belkoura I., Ouazzani N., Sghir S., 2007 - Application des techniques de multiplication *in vitro* chez l'olivier : pour une production de plants sains et la conservation de la biodiversité. *Journées Méditerranéennes de l'olivier, 22-26 Octobre 2007, Meknès*. 1: 2-6.
56. Santos C.V., Brito G., Pinto G., Fonseca H.M.A.C., 2003 - *In vitro* plantlet regeneration of *Olea Europaea* ssp. *maderensis*. *Scientia Horticulturae*, 97: 83–87.
57. Bartolini G., Leva AR., Benelli A., 1989 - Advances *in vitro* culture of the olive propagation of cv. Maurino. *Acta Hort*, 286: 41–44.
58. Leva AR., Petrucceli R.G., Panicucci M., 1992 - Ruolo di alcuni microelementi carboidrati nella proliferazione *in vitro* di cv. Di olivo (*Olea europaea* L.) *In Atti quattà olio extravergine di oliva, 1-3 Dicembre, 1992, Firenze* : 333.
59. Mencuccini M., 1995 - Micropropagazione e miglioramento genetico *in vitro* dell'olivo. Stato dell'arte e prospettive future. *Riv. Fruttic. Ortofloricolt.* 57 (12): 73–82.

60. Rugini E. (1986) - Olive (*Olea europaea* L.). In Bajaj YPS. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 5. Trees I*. Berlin: Springer-Verlag, p. 253–267.
61. Navarro L., Roistacher C.N., Murashige T., 1975 - Improvement of shoot-tips grafting *in vitro* for virus free *Citrus*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100 (5) : 471-479.
62. Desvignes JC., Bovey R., Cornaggia D., Grastnu N., 1990 - *Maladies à virus à mycoplasmes et à viroïdes des arbres fruitiers*. Ed. CTIFL, Paris, 124p.
63. Amedjkouh H., 2004 - *Essai d'assainissement de trois variétés autochtones de Vigne de table (Vitis vinefera L.) atteintes de viroses, par culture in vitro de méristèmes*. Thèse Magister Sciences de la Nature, USTHB, Alger, 133 p.
64. Boxus P., 1995 - Multiplication végétative, micropropagation et embryogénèse somatique *in* Biotechnologies végétales. Ed. CNED/AUPELF- UREF, 191p.
65. Egertsdotter U & Arnold S.V., 1998 - Development of somatic embryos in Norway spruce. *Jou. EXP. Bot* 49 (319): 155 - 162.
66. Zorinians SE., Nosov AV., Monoforte-Gonzalez M., Mendes-Zeel M., 2003 - Variation of nuclear DNA content during somatic embryogenesis and plant regeneration. *plant science* 164 (2) : 141-146.
67. Demarly Y. & Sibi M., 1996 – *Amélioration des plantes et biotechnologies*. Ed. John Libbey Eurotext, France, 151 p.
68. Piatti M.F., 1988 - *Embryogénèse somatique et synchronisation du développement embryonnaire*. Thèse Doc Etat pharmacie. Paris VI, France, 130 p.
69. BrahaddA N., Walali L.D.E., Abousalim A., 2008 - Effet du sucre sur l'embryogénèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine marocaine. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 12 (3): 245-250.
70. Rugini E., 1988 - Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 14: 207-214.
71. Lambardi M., Capuana M., Sozzi L., Giannini R., 1995 - Factors affecting *in vitro* adventitious bud induction from excised embryos of Swiss stone pine (*Pinus ombra* L.). *Forest Genet*, 2: 49-58.
72. Rugini E. & Cariccato G., 1995 - Somatic embryogenesis and recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) 'Canino' and 'Maraiolo'. *Plant Cell Rep.*, 14: 257-260.
73. Orinos T. & Mitrakos K., 1991 - Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (*Olea europaea* L.) var. 'sylvestris' (Miller) mature zygotic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 27: 183-187.
74. Lafon J-P., Tharaud-Prayer C., Levy G., 1998 – *Biologie des plantes cultivées – Physiologie du développement, génétique et amélioration*. Ed. Tec & Doc Lavoisier, France, T.2, 150 p.

75. Boccon-Gibod J., 1989 – *La technologie de la culture in vitro*. pp. 37-62 cité par Auge R., Beauschene G., Baccon Gibon J., Decopurtye L., Digat B., Jalouzot R., Minier R., Morand J.CL., Reynoird J.P., Strullu D.G. & Vidalie H., 1989 – *La culture in vitro et ses applications horticoles*. Ed. Tec & Doc-Lavoisier., Paris, 225 p.
76. Margara J., 1989 – *Bases de la multiplication végétative, Les méristèmes et l'organogénèse*. Ed. INRA, Paris, 260 p.
77. Chaussat R. & Bigot C., 1980 - *La multiplication végétative des plantes*. Ed. Gauthier et Villars, Paris, 277 p.
78. Mansseri-Lamrioui A., 2011 - *Etude de la multiplication par clonage « in vitro » du merisier (Prunus avium L.)*. Thèse Doctorat Biologie, Univ. M'hamed Bougara, Boumerdes, Algérie, 161 p.
79. Heller R., Esnault., Lance C., 2004 - *Physiologie végétale : développement*. Ed. Dunod, Paris, France, T.2, 366 p.
80. Minier R., 1989 – *Le point de vu d'un utilisateur*. pp. 199-207 cité par Auge R., Beauschene G., Baccon Gibon J., Decopurtye L., Digat B., Jalouzot R., Minier R., Morand J.CL., Reynoird J.P., Strullu D.G. & Vidalie H., 1989 – *La culture in vitro et ses applications horticoles*. Ed. Tec & Doc-Lavoisier., Paris, 225 p.
81. CIDES., 1999 - *Micropropagation en entreprise - Cahier de références techniques* Ed. CIDES 1999, Québec, Canada, 44 p.
82. Boustany N., 2011 - *The Millenium Olives (Olea europea L.) in Lebanon: Rejuvenation, Micropropagation and Olive Oil Variation During Maturation and Conservation*. Scuola di Dottorato in Scienze dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari, Univ. Degli Studi., Sassari, Italy, 144 p.
83. Zuccherelli G. & Zuccherelli S., 2002 - *In vitro* propagation of fifty olive cultivars. *Acta Hort*, 586: 931-934.
84. Ali A., Ahmad T., Abbasi N.A., Hafiz I.A., 2009 - Effect of different media and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of olive cultivar 'moraiolo'. *Pak. J. Bot.*, 41(2): 783-795.
85. Zryd JP., 1988 - *Culture de cellules, tissus et organes végétaux : Fondements théoriques et utilisations pratiques*. Ed. Lausanne, Presses Polytechnique Romandes, Suisse, 308 p.
86. CEVIE., 1997 - *Les Multiples Applications de la Culture in vitro des Végétaux Supérieurs*. C.E.V.I.E. Institut Botanique ASBL, 8ème édition, Liège, Belgique, 154 p.
87. Yakoub-Bougdal S., Cherifi D., Bonaly J., 2007 - Production de vitroplants d'*Olea europea* var Chemlal. *Cahiers Agricultures*, 16 (2) : 125-127.
88. Leva A.R., Petruccelli R., Muleo R., Goretti R, Bartolini G., 1995 - Influenza di fattori trofici, regolativi e condizioni del mezzo nutritivo sulla coltura in vitro di diverse cultivar di olivo. *Atti del Convegno: L'olivicoltura Mediterranea: stato e*

prospettiva della coltura e della ricerca. Rende, 26-28 Gennaio, Italy. In Istituto Sper. Olivicoltura ed., vol. unico : 239-248.

89. Chaari-Rkhis A., Maalej M., Drira N., Standardi A., 2011 - Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L. 'Oueslati'. *Turk J Agric For*, 35: 403-412.

90. Rokba ZA., Loxou VK., Lionakis SM., 2000 - Regeneration of olive (*Olea europaea* L.) *in vitro*. *COST 843, WG1: Developmental biology of regeneration, 1st meeting, 12-15 Octobre 2000, Geisenheim, Germany, p. 25-26.*

91. Tsogas M. et Bouriquet R., 1982 - Propagation de l'Epicéa par culture *in vitro* d'embryons et de plantules. *Etu. et Rech. AFOCEL*, 9 (22) : 346-367.

92. Dumanois C., Braut-Boucher F., Cosson L., Paris M., 1986 - Multiplication végétative *in vitro* du Chanvre (*Canabis sativa* L.). Application à la conservation des clones sélectionnés. *Agronomie*, 5: 487-495.

93. Michel M.K., Jara M.G., Louvieux J., Louis B.L., Yannick U.S., Luciens N.K., Gédéon N.K., Eddie T.B., Emery K.L., Werbrouck S., Michel V.K., 2014 - Influence de la composition du milieu et des conditions de culture sur la prolifération *in vitro* de l'hybride de bananier FHIA- 01 (AAAB). *IJIAS*, 5 (3): 280-293.

94. Chaouia C., 2009 - *Etude des facteurs de régénération, des techniques de multiplication et de production : cas du kiwi (Actinidia chinensis PL.)*. Thèse Doctorat en Sciences Agronomiques, Inst. nati. agro., El Harrach, 127 p.

95. Van Der Krieken WM., Breteler H., Visser MHM., Mavridou D., 1993 - The role of the conversion of IBA into IAA on root regeneration in apple: introduction of a test system. *Plant Cell Rep*, 12: 203-206.

96. Banaldi R., Bertazza G., Bregoli AM., Fasola F., Rotondi A., Predieri S., Serafini-Fracassini D., Slovin JP. & Cohen JD., 1995 - Auxins and polyamines in relation to differential *in vitro* root induction on microcuttings of two Pear cultivars. *J. Plant Growth Reg*, 14: 49-59.

97. Snir I., 1983 - A micropropagation system for sour cherry. *Sci. Hort.* 1: 85-90.

98. Ghorbel A., Chatibi A., Miliki A., Kchour M.E. & Zemni H., 1994 - *Propagation in-vitro du pêcher-amandier GF 557 pp. 263-274 cité par Dubois J., - Quel avenir pour l'amélioration des plantes*. Ed. John Libbey Eurotext., Paris, 513 p.

99. Francllet A., 1979 - Rajeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation végétative. *AFOCEL, Etudes et Recherches*, 12 : 3-8.

100. Hadid M.R., 2006 - *Evaluation expérimentale des propriétés physiques d'un milieu de culture hors sol*. Thèse Magister, Univ. M. Mammeri., Tizi-Ouzou, 112 p.

101. Short KC., 1990 - Application of *in vitro* techniques for the production and improvement of horticultural plants pp. 15-27 cité par. Sangwan R. S. & Sangwan-Noreel B.S., - *The impact for the biotechnology and agriculture*. Ed. Kluwer Acad, the Neetherlands, 00 p.

102. García-Férriz L., Ghorbel R., Ybarra M., Mari A., Belaj A. & Trujillo I., 2002 - Micropropagation from adult olive trees. *Acta Hort (ISHS)*, 586: 879-882.

103. Leva A.R., Petruccelli R., Montagni G., Muleo R., 2006 - Field performance of micropropagated olive plants (cv. Maurino): Morphological and molecular features. *Acta Horticulturae*, 586: 891-894.
104. Tabti D., 2010 - *Régénération in vitro de plants sains à partir d'apex caulinaires d'olivier Olea europea L. var. CHEMLAL*. Thèse Magister, Eco. Nati. Scien. Agro., El Harrach, Algérie, 71 p.
105. Himour S., 2008 - *Etude comparée de régénération de plants par voie végétative en culture in vitro*. Thèse Magister, Biodiversité et Production Végétale, Faculté de biologie, Univ. Mentouri., Constantine, Algérie, 85 p.
106. Beddek A., 2009 – Contribution à l'étude de la micropropagation d'olivier (*Olea europaea L.*) cv. Chemlal. Thèse Ingénieur agro., Univ. Mouloud Mammeri, Tizi-ouzou, Algérie, 96 p.
107. Sghir S., Chatelet P., Ouazzani N., Dosba F., Belkoura I., 2005 - Micropropagation of eight Moroccan and French olive cultivars. *HortScience*, 40 (1):193-196.
108. Yekkour A., 2004 – *Contribution à l'étude de la micropropagation de l'olivier cultivé (Olea europaea sativa L.)*. Thèse Ingénieur agro., Inst. Nat. Agro, El Harrache, Algérie, 66 p.
109. Ahanhanzo C., Adoukonou-Sagbadja H., Yehouessi W., Ahoton L., Ganglo J.C., Djikpo-Tchibozo M.A., Agbidinoukoun A. & Agbangla C., 2013 - Étude de l'influence du chlorure mercurique sur la survie in vitro d'explants et de l'aptitude à la régénération de teck (*Tectona grandis L. f.*, Verbenaceae). *J. Appl. Biosci*, 65: 4935–4944.
110. Aksil Y. & Bouhabid H., 2010 – *Effet de quelques régulateurs de croissance sur la micropropagation de l'olivier (Olea europea L.) cv. Chemlal*. Thèse Ingénieur agro., Univ. Mouloud Mammeri, Tizi-ouzou, Algérie, 87 p.
111. Chaari Rkhis A., Ouled Messaoud S., Maalej M., Drira N., 2010 - Variations morphologique et physiologique chez les vitroplants de l'olivier (Var. Chemchali de Gafsa) au cours de l'acclimatation. *Revue Ezzaitouna*, 11 (2): 1-15.
112. Rezaei F., Uliaie E.D., and Valizadeh M., 2013 - Optimization of *In vitro* Regeneration Protocol for Some Spring and Winter Cultivars of Canola Using Different Explants. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*, 2: 316-319.
113. Belguendouz A., 2012 - *Essai de substitution des milieux de culture en micropropagation et la physiologie de la microtubérisation de la pomme de terre (Solanum tuberosum. L.)*. Thèse Magister Agro, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 125 p.
114. Abdelli K. & Mekhelfi KH., 2012 – Régénération in vitro de l'olivier « *Olea europea L.* » variété (chemlal) par microbouturage. Thèse Master II Biologie., Univ. Hassiba Ben Bouali, Chlef, Algérie, 48 p.
115. Rashid HA. & Quarashi R.J., 1989 - High frequency embryogenic calls induction and its regeneration in three wheat cultivars. *2nd International*

Symposium on Genetic Manipulation in Crops, 29-31 august 1988, CIMMYT, El Batan, Mexico: 205 – 215.

116. Kevers C, Hausman JF, Faivre-Rampant O, Evers D, Gaspar T., 1997 - Hormonal control of adventitious rooting: progress and questions. *Angew Bot.*, 71: 71-79.

117. Ali A., Ahmad T., Abbasi N.A. and Hafiz I.A., 2009 - Effect of different concentrations of auxins on *in vitro* rooting of olive cultivar 'moraiolo'. *Pak. J. Bot.*, 41(3): 1223-1231.

118. James D.J., 1983 - Adventitious root-formation *in vitro* in apple rootstocks (*Malus pumila*) II. Uptake and distribution of indol- 3yl-acetic acid during the auxin-sensitive phase in m.9 and m.26. *Physiologia Plantarum*, 57:154–158.

119. Tanimoto E., 2002 - Regulation of root growth by plant hormones: Roles for auxin and Gibberellin. *Crit Rev Plant Sci*, 24:249-265.

120. Grigoriadou K., Vasilakakis M., Eleftheriou EP., 2002 - *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar 'Chondrolia Chalkidikis'. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 71:47–54.

121. Haddad B. & Haddad N., 2012 – Propagation *in vitro* de l'olivier (*Olea europaea* L.) cultivar Chemlal. 1^{er} *Symposium scientifique « Med Mag Oliva 2012 » : Productivité oléicole et défis du future*, 19-23 Février 2012, Hôtel El Mouradi, Monastir, Tunisie, p 52.

122. Mencuccini M., 2003 – Effect of medium darkening on *in vitro* rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea eropaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 97: 129-139.

123. Guan H. & De Klerk G., 2000 - Stem segments of apple microcuttings take up auxin predominantly via the cut surface and not via the epidermal surface. *Sci. Hortic*, 86: 23-32.

124. Hnoui D., Handaji N., Arsalane N., Masoui M., Rachidai A., 2000 – Microbouturage *in vitro* et greffage *in vivo* de vitroplants d'hybride triploïdes de mandariniers. *Al Awamia*, 101 :9-18.

125. Rugini E., Jacobini A., Bazzoffia A., 1988 - A simple *in vitro* method to avoid initial dark period and to increase rooting in fruit trees. *Acta Hort*, 22: 438-440.

126. Padilla I.M.G., Vidoy I., Encina C.L., 2009 - Influence of indole-butyric acid and electro-pulse on *in vitro* rooting and development of olive (*Olea europea* L.) microshoots. *Plant Cell Rep*, 28 (9):1411-20.

127. Ozkaya M.T. & Celik M., 1995 - The effect of rooting and combination of auxin polyamine on the rooting ability of Turkish olive Gemlit and Domat . *Acta. Hort*, 356:31-34.

128. Baker CM. & Wetzstein HY., 2004 - Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 36(3): 361-368.

129. Kollmeier M., Felle H.H., & Horst W.J., 2000 - Is basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation. *Pl. Physio.*, 122: 945-956.
130. Taiz L. & Zeiger E., 2010 - *Plant Physiology*. Fifth Ed. Sinauer Associates Inc. Pub, 782 p.
131. Lahcen A., 2003 – Contribution à l'amélioration des moyens de multiplication végétative d thuya de berberie (*Tetraslinis articulata*. Vahl-Master). Thèse Magister agro., Inst. Nat. Agro, El Harrache, Algérie, 81 p.
132. Mao A.A., Wetten A., Fay M.F., Caligari P.D.S., 2000 - *In vitro* propagation of *Litsea cubeba* (Lours) Pers., a multipurpose tree. *Plant Cell Rep*, 19: 263–267.
133. Gaspar TH., Smith D., Thorpe T., 1977 - Arguments supplémentaires en faveur d'une variation inverse du niveau auxinique endogène au cours des deux premières phases de la rhizogenèse. *C.R. Acad. Sci, Série D*, 285 : 327-330.
134. Lee N., Wetzstein H.Y., Sommer H.E., 1985 - Effect of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedling of *Liquidambar styraciflua* L. to wards improved acclimatization and field survival. *plant physiology*, 78: 637-641.
135. Boujnah D., 1997 - *Variations morphologiques, anatomiques et éco-physiologiques en rapport avec la résistance à la sécheresse chez l'olivier Olea europaea L.* Thèse de Doctorat d'Etat, Faculté Landbouwkundige, Univ. de Gent., Belgique, 258 p.
136. Pospisilova J., Ticha I., Kadelcek P., Haisel D., Plzakova S., 1999 – Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, 42: 481-497.