

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agro - Vétérinaires et Biologiques

Département d'Agronomie

MEMOIRE DE MAGISTER

Option : Amélioration des Productions Végétales

MICROPROPAGATION – CLONAGE

ET EMBRYOGENESE SOMATIQUE

DU PISTACHIER DE L'ATLAS (*Pistacia atlantica Desf*)

Par

Djamila KEBOUR

Devant le jury composé de :

A . BOUTEKRABT	: Professeur; U. de Blida	Président
F. Z .CHAOUCH	: Chargée de cours; U. de Blida	Promotrice
M. BENMOUSSA	: Maître de conférences; U. de Blida	Examineur
M. BOUDJENIBA	: Maître de conférences; E.N.S. Kouba	Examineur

Blida, Octobre 2004

ملخص

يعتمد عملنا على الزراعة النسيجية عند الفستق الأطلسي بعد إزالة سبات بدوره و تكاثر الشتلات داخل الأنابيب بالتوليد الجيني م الخلايا الجسدية.

الفستق الأطلسي من عائلة انكرديسيات المحتملة للحرارة العالية التي تحتوي عدة أشكال يستحق أن تستغل في إطار اعتبار المناطق الجافة و الشبه الجافة.

بينت تجارب الانتعاش أن بدور الفستق الأطلسي صعبة الانتعاش و غير متجانسة و هذا راجع إلى السبات الذي يصيب الأشجار بصفة عام و الفستق بصفة خاصة . إن عدم تجانس البذور يعود الى شروط التخزين و المعالجة لإزالة السبات و ظاهرة وجود بذور بدون رشم التي هي من خصائص بذور الفستق الأطلسي.

يكون تخزين بذور الفستق الأطلسي في درجة حرارة 2 و4 درجة مئوية لمدة شهر على الأقل لازالة السبات. فيما يتعلق التكاثر المخبري، فإن النتائج المتحصل عليها أضهرة أن هرمونات التطور تلعب دور هام في الزراعة النسيجية. غير أن التكاثر الروشيمي غير الجيني عند الكائنات المسنة تسمح بمضاعفة و توسع القدرات على انتقاء الأنماط الوراثية الجديدة بنسبة تكاثر أعلى مقارنة مع الطرق الأخرى للتكاثر المخبري. ان تفاعل القطع النباتية مختلفة . ان الجزء ما بين البراعم يتفاعل اسن من الأوراق فيما يخص الكالوجيناز عكس الجذور و الفلقتين التين لا تعطيان كالوهات.

النتائج المحصل عليها مع مختلف الاوساط المستعملة تبين أن وسط الزرع MS الذي يتكون من تاليفة ثلاثي الهرمون BAP/ BIA/ANA هو الأكثر ملامة من اثره و التعبير على نشا الاعضاء للزراعة النسيجية للفستق الأطلسي. زيادتا على ذلك نسجل أن الضلام يعطي أحسن الكالوجيناز مقارنة مع 2.4 D.

Dédicaces

*C'est avec un grand respect que je dédie ce modeste mémoire,
au plus beau cadeau que le bon dieu m'ait offert, à ceux que j'ai de plus précieux,
à vous mes chers parents, que Dieu vous protège.*

A mes très chères sœurs ainsi qu'à ma belle sœur Amel et sa famille.

A mes chers frères et beaux frères.

A M^{me} Chaouch F/Z et à tous mes Enseignants.

*A toutes mes nièces et tous mes neveux que j'adore, chacun par son
prénom, surtout Mouna, Samir, Amine et Imad..*

A tous mes amis (ies) en particulier KECHAD Dahbia que j'aime beaucoup.

A toute la promotion PGRS 2001-2002.

Djamila.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer aujourd'hui, ma profonde reconnaissance à M^{me} CHAOUCH F/Z, chargée de cours à la faculté des Sciences Agronomiques -Vétérinaires et Biologiques de l'Université de SAAD DAHLAB -Blida, Département d'Agronomie, d'avoir bien voulu diriger mes travaux et d'en être la promotrice. Je la remercie vivement pour sa contribution positive et enrichissante, pour son soutien et ses encouragements ainsi que pour les conseils judicieux qu'elle m'a prodigués.

J'exprime mes vifs remerciements à M^r BOUTEKRABT, Professeur à l'Université de SAAD DAHLAB -Blida, Département d'Agronomie qui malgré ses nombreuses occupations, m'a fait l'honneur de présider ce jury et d'examiner ce travail. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon plus grand respect.

Que M^r BENMOUSSA, Maître de Conférences à l'Université de SAAD DAHLAB -Blida, Département d'Agronomie, trouve mes sincères remerciements pour avoir accepté d'examiner ce travail. Son expérience me sera bénéfique pour la valorisation de mon travail.

Mes remerciements vont également à M^r BOUDJENIBA, Maître de Conférences à l'E.N.S de Vieux Kouba, pour ses encouragements et son extrême bonté, je le remercie également d'avoir bien voulu honorer ce jury.

Je ne voudrais pas non plus oublier de remercier très sincèrement M^r ACHOUCH, Maître de Conférences à l'Université de SAAD DAHLAB -Blida, pour ses précieux conseils.

Je remercie D^r KHEMCI pour son aide précieuse, sa gentillesse et son esprit scientifique.

Je ne peux m'empêcher de remercier M^r BENAÏSSA, chargé de cours à l'Université de SAAD DAHLAB -Blida pour ces encouragements et sa gentillesse.

Je ne peux également m'empêcher de remercier le personnel (Administratifs , Laborantins et Bibliothécaires) du département d'Agronomie (Nabila, Nacera, Ouahiba, Baya, Malika, Hassina, Houria, Malik, Youcef, F/Z, Cherifa, Yamina, Samya, Djamila ...), pour leur aide ainsi que le personnel de la bibliothèque Centrale de l'Université SAAD DAHLAB-Blida, pour leur esprit scientifique.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Classification botanique du pistachier de l'Atlas	16
Tableau 2.1	Composition de solutions minérales	50
Tableau 2.2	Milieu M.S avec deux concentrations	51
Tableau 2.3	Solution vitaminique MOREL 1952	51
Tableau 2.4	La solution fer EDTA- glycine et antioxydant	51
Tableau 2.5	Combinaisons hormonales utilisées lors de notre expérimentation	53
Tableau 3.1	La longueur moyenne des vitro-plants après un mois culture.	Annexe 1
Tableau 3.2	Analyse de la variance indiquant la longueur moyenne des vitro plants	68
Tableau 3.3	Nombre moyen de nœuds après un mois culture.	Annexe 1
Tableau 3.4	Analyse de la variance indiquant le nombre moyen de noeuds	69
Tableau 3.5	Nombre moyen de feuilles après un mois de culture	Annexe 1
Tableau 3.6	Analyse de la variance indiquant le nombre moyen de feuilles	71
Tableau 3.7	Taux de débourrement des micro- boutures (un mois après repiquage)	75
Tableau 3. 8	Effet des sub-cultures sur l'allongement moye de la Tige.	79
Tableau 3.9	Effet des sub-cultures sur le nombre moyen de feuille.	81
Tableau 3.10	Effets des milieux de culture avec les différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance sur le pourcentage des cals.	Annexe 1
Tableau n° 3.11	Effets des milieux de culture avec les différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance sur le pourcentage des cals.	86
Tableau 3.12	Effet des milieux de culture avec les différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance combinées sur la surface moyenne des cals	Annexe 1
Tableau n° 3.13	Effet des milieux de culture avec les différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance combinées sur la surface moyenne des cals	89
Tableau 3.14	Couleur et texture des cals issus d'entre noeuds des différents milieux.	91
Tableau n° 3.15	Couleur et texture des cals issus de feuilles des différents milieux	96

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	: Biologie du pistachier de l'Atlas	22
Figure 1.2	: Les différentes voies de multiplication in vitro	33
Figure 3.1	: Les contaminations et les anomalies que présente le pistachier de l'Atlas	64
Figure 3.2	: Effet de la durée des traitements au froid humide (2 à 4° C °) sur la germination de quatre espèces de <i>Pistacia</i>	62
Figure 3.3	: Effet de la durée des traitements au froid humide (2° -4°) sur la rapidité de germination de quatre espèces de <i>Pistacia</i>	62
Figure 3.4	: Schéma de fragmentation	67
Figure 3.5	: Evolution de l'élongation moyenne des vitro-plants en fonction des conditions de culture (milieu avec ou sans hormones).	68
Figure 3.6	: Evolution du nombre de nœuds en fonction des conditions de culture (Avec ou sans hormones).	69
Figure 3.7	: Evolution du nombre de feuilles en fonction des conditions de culture (Avec ou sans hormones).	70
Figure 3.8	: Evolution du nombre moyen des racines en fonction des conditions de culture (avec ou sans hormones)	72
Figure 3.9	: Libération des phénols	77
Figure 3.10	: Effet de la fragmentation sur l'allongement moyen de la Tige.	78
Figure 3.11	: Effet de la fragmentation sur le nombre moyen de paire de feuilles	80
Figure 3.12	: Effets des milieux de culture avec les différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance sur le pourcentage d'obtention des cals (EX1 : entre-nœuds, EX2 : feuilles et EX3 : racines)	86
Figure 3.13.	: Foyer cellulaire hautement actif.	93
Figure 3.14	: Effet des différentes combinaisons et concentrations en auxines et cytokinines combinées et les différents types d'explant sur la surface moyenne des cals.	89
Figure 3.15	: Etude histologique: Origine des néoformation des bourgeons	99

LISTE DES ABREVIATIONS ET DE SYMBOLES

AIA	: Acide indol acétique (auxine)
AIB	: Acide indol butirique (auxine)
ANA	: Acide naphthalacétique (auxine)
2,4-D	: Acide 2-4-dichlorophénoxyacétique (auxine)
BAP	: 6-Benzyl amino purine (cytokinine)
KIN	: 6-Furfury amino purine (Kinétine)
AG3	: Acide gibbérellique
NaOH	: Soude
HCl	: Acide chlorhydrique
Hyp- ca	: Hypochlorite de calcium
C°	: Celcius
UF	: Unité Fourragère
MAD	: Matières azotées digestibles
Kgs	: Kilogrammes
MS	: Matières sèches
cm	: Centimètre
m	: Mètre
Σ	: Somme
π	: 3.14
S	: Surface de circonférence ($\pi D^2/4$)
D ₁	: Diamètre horizontale de la circonférence
D ₂	: Diamètre verticale de la circonférence
SCE =	: Somme des carrés des écarts
M	: Moyenne arithmétique
n	: nombre de plants

TABLE DES MATIERES

RESUME	2
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION	11
1. RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES	16
1.1 Présentation de l'espèce	16
1.2 La répartition géographique du pistachier de l'Atlas	24
1.3 Régénération pistachier de l'Atlas	26
1.4 Milieux de culture	42
2. MATERIEL ET METHODES	48
2.1 Lieu de l'expérimentation	48
2.2 Matériel végétal	48
2.3 Désinfection	48
2.4 Milieux de culture	48
2.5 Conditions de culture	53
2.6 Dispositif expérimental	54
2.7 les techniques histologiques	54
2.8 Mode d'expression des résultats	56
3. RESULTATS ET INTERPRETATIONS	58
3.1 Les contaminations et la germination des graines	58
3.2 Analyse des paramètres étudiés	66
3.3 Bouturage par vitro propagation	72

3.4 Effets de type de fragmentation sur la morphogenèse des microboutures de pistachier de l'Atlas	78
3.5 Effets des hormones de croissance sur la callogenèse	84
3.6 Etude histologique: Origine des néoformation des bourgeons	97
CONCLUSION	100
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	104

INTRODUCTION

A l'orée de la dernière décennie de notre millénaire, les ressources alimentaires à destination fourragère diminuent continuellement dans les zones arides et semi- arides, pour de multiples raisons, entre autre le défrichement intensif, la sur exploitation des sols et le déboisement.

Par ailleurs, l'augmentation de la population humaine, l'introduction de nouvelles techniques culturales inadaptées à savoir la mécanisation , le dry farming., le surpâturage et l'éradication des espèces ligneuses en zones arides proprement dites (100-350mm) sont à la base de la dégradation de la végétation naturelle et delà la rupture des équilibres naturels , c'est à dire entre l'utilisation des ressources naturelles et la capacité de leur régénération, d'une façon générale et par conséquent à la destruction du sol (érosion éolienne et hydrique, diminution de la matière organique, dégradation de la structure). Ce qui accentue la désertification ; phénomène souvent irréversible, particulièrement dans les zones très sèches (inférieur à 200mm) ce qui entraîne les conséquences les plus graves à long et à court terme. Selon le programme des nations unies pour l'environnement (PNUE), plus d'un tiers (1/3) de la superficie émergée du globe est actuellement menacée par la désertification. L'Afrique, à elle seule perd chaque année 37000 km² de désert [1].

Les espèces autochtones jouent un rôle important dans la restitution des sols devenus peu fertiles; elles contrôlent l'érosion et répondent aux besoins de la population humaine et de la densité du cheptel de plus en plus en hausse sans hypothéquer l'avenir de l'humanité.

Parmi ces espèces, on a le pistachier de l'Atlas; (*Pistacia Atlantica Desfontaine*), qu'on appelle communément le Bétoum, qui est l'arbre par excellence des régions sud de la Méditerranée, se trouvant généralement à l'état sauvage dans les Dayas. C'est une espèce qui a été très répandue jadis, mais actuellement, elle est très dispersée. Au regard de ces caractéristiques, le pistachier de l'Atlas mérite que l'on s'y intéresse et il n'est pas exagéré aujourd'hui d'affirmer que l'essence est complètement négligée et que la nécessité de la sauvegarder en la multipliant s'avère urgente dans le cadre plus général de la

reconstitution des zones arides; d'autant plus qu'elle présente un intérêt agronomique certain, en tant que porte greffe pour le pistachier vrai (*Pistacia véra*).

Au sud de Laghouat par exemple, dans la région appelée communément plateau "des Dayas", la disparition du couvert végétal due au surpâturage, a entraîné l'ensablement de presque toutes les dayas, allant du simple voile éolien à la formation dunaire.

A ce stade, le bétoum qui affectionne ces dépressions se trouve étouffé et meurt. L'arbre est pratiquement en voie de disparition. Au cours de ce dernier siècle, il a reçu un coup rude. Les herbivores et les bergers le détruisent dès qu'il apparaît. Le pistachier de l'Atlas mérite d'être préservé pour diverses raisons :

Cette essence doit être protégée, car de même que pour l'arganier, on ne peut rien mettre à sa place. En Algérie, cette espèce est mentionnée dans le décret exécutif N° 93-285 du 23 Novembre 1993 fixant la liste des espèces végétales non cultivées protégées.

Le pistachier de l'Atlas se caractérise par une grande longévité. En effet, le sujet le plus gros mesure six mètres de circonférence de tronc, dix-huit mètres de hauteur et vingt cinq mètres de frondaison, il doit approcher les trois siècles d'âge. [2]

La multiplication par graine est possible et présente dans tous les cas une grande diversité génétique. Celle-ci est nécessaire car elle assure la pérennité des peuplements en dépit des aléas climatiques, ou des agressions auxquels ils sont soumis tout au long de leur existence.

Malheureusement, cette diversité se traduit par une importante hétérogénéité de comportement des semences, notamment au niveau de la germination (problèmes de dormance) ce qui rend difficile l'obtention d'une germination groupée et complète[3].

En Algérie, au niveau de nos pépinières, sa multiplication générative pose de sérieux problèmes liés aux contraintes précitées, à défaut d'une étude exhaustive comme cela a pu être le cas pour d'autres espèces.

A cet égard, seule la multiplication végétative paraît être le meilleur moyen pour reproduire conformément les caractéristiques génétiques des individus sélectionnés dans notre flore.

Ces caractéristiques ne s'expriment que chez les individus matures, qui à ce stade de développement voient, leurs capacités organo-génétiques très réduites [4]; [5], faible taux d'enracinement et donc de multiplication ([6]; [7] rendant difficile l'utilisation de cette technique pour certaines espèces.

Pour surmonter ces difficultés de nombreux chercheurs font appel aux techniques de la culture in vitro et notamment à la micro - propagation qui nécessite l'utilisation de structures juvéniles ce qui constitue un handicap chez les végétaux ligneux) [8]. Et c'est dans ce contexte que notre étude se veut à la fois la connaissance d'une espèce saharienne à usages multiples peu connue chez nous, et la mise en place d'une nouvelle technique pour sa propagation par le biais des vitro - méthodes.

Par ailleurs, la maîtrise de la micro propagation du Bétoum revient à optimiser les possibilités de régénérer l'espèce en premier lieu , d'exploiter sa variabilité génétique en second lieu (clonage) et l'embryogenèse somatique de l'espèce en troisième point, (mise au point de semences artificielles). Ainsi, à partir d'un matériel juvénile, nous essayerons de lancer un programme de vitro-propagation et ce par la technique de multiplication par élongation- fragmentation, tout en étudiant les différents facteurs pouvant optimiser les conditions de culture.

Au cours du présent travail, nous nous sommes assignées trois objectifs

* La micro- propagation du pistachier de l'Atlas à partir de semences.

* L'obtention d'un grand nombre de copies rigoureusement conformes d'un même individu de haute valeur génétique. Et ainsi constituer alors un clone.

* Le troisième objectif vise l'initiation de la callogenèse, la multiplication des cals par fragmentation et l'induction des embryons somatiques à partir d'explants à savoir, les feuilles, les entre nœuds, les cotylédons et les racines.

CHAPITRE 1

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1 Présentation de l'espèce

1.1.1 Historique du pistachier de l'Atlas :

En 1798, le Pistachier de l'Atlas a fait dans le passé l'objet d'une confusion assez fréquente, il avait une silhouette qui évoque celle du frêne [9].

En 1924, LAPIE et MAIGE, [9] ont découvert que le bétoum était une variété de thérébinthe à feuilles plus petites. MATHIEU REYNARD [9], a été le premier qui a découvert le bétoum, il eut le privilège d'exploiter et d'inventorier l'extraordinaire peuplement de cette espèce, existant à l'époque au sud de Laghouat.

1.1.2 Monographie de l'espèce :

Le pistachier de l'Atlas, Bétoum en arabe, Iggh en berbère, est largement réparti à l'Est méditerranéen (Grèce, Chypre, Turquie, Syrie, Palestine, Crimée, dans le Caucase, en Iran, en Afghanistan et jusqu'en Inde). Mais il existe également dans le sud de l'Afrique du nord à l'état disséminé dans l'étage aride et semi - aride[10].

On le trouve dans l'Atlas méridien, dans les parties les mieux arrosées de l'Atlas saharien, où il peut atteindre 20 m d'altitude et dans le Hoggar à l'état de pieds isolés ou par petits bouquets.

1.1.3 Systématique de l'espèce :

Le genre *Pistacia* serait dérivé du mot grec *pistake*, d'origine perse que les iraniens emploient pour désigner les fruits. [11]

Le pistachier appartient à la famille des anacardiées, qu'on appelle aussi térébinthacées, cette famille regroupe trois genres : *Pistacia*, *Rhus* et *Schinus*.

La classification botanique de l'espèce selon ZOHARY, 1952 [12] est comme suit
Tableau 1.1:

Tableau 1.1: Classification botanique de l'espèce

Règne	Végétal
Embranchement	Spermatophytes
Sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous Classe	Archiclamydes
Ordre	Sapindales ou térébinthales
Famille	Anacardiacees
Sous Famille	Roidées
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>Pistacia atlantica Desf</i>
Nom vernaculaire	Pistachier de l'Atlas

L'étude monographique du genre *Pistacia* montre que ce dernier comprend quatre sections et dix espèces ZOHARY,(1952) in [12].

Section n°1. Section des Lenticella ; renferme deux espèces :

**Pistacia mexicana*

**Pistacia texana*

Section n°2. Section des Lentiscus- ZOH : comprend trois espèces :

**Pistacia lentiscus L*

**Pistacia weinmane*

**Pistacia burnat*

Section n°3. Section desButmella-ZOH : englobe une seule espèce qui est

**Pistacia atlantica Desf*

Section n°4. Section des Térébinthus; cette dernière regroupe quatre espèces dont :

**Pistacia vera L*

**Pistacia terebinthus*

**Pistacia palestina*

**Pistacia chinensis*.

1.1.4 Caractéristiques dendrologiques :

La régénération du pistachier de l'Atlas, se fait rarement dans les touffes de jujubier (*Ziziphus lotus* Desfontaine) dont il est l'hôte classique, (Figure 1.1 Photo A) lui assurant une protection contre le pâturage et les gelées. C'est un arbre de sept à dix m de hauteur pouvant atteindre vingt mètre, à grosse couronne généralement arrondie. Les feuilles sont caduques (Figure 1.1, Photo B). Le tronc est court, avec un diamètre pouvant dépasser un (01) mètre (Figure 1.1, Photo B bis).

L'écorce est d'abord rouge puis grisâtre assez clair avant de devenir un rhytidome dur et crevassé, tisselé en profondeur, disposé en damier et noirâtre comme celui du frêne oxyphylle.

1.1.5 Caractéristiques biologiques :

Les feuilles imparipennées du Bétoum, sont caduques en hiver, elles comportent trois à quatre folioles entières de deux à cinq centimètres de longueur (Figure 1.1, Photo C).

Les fleurs unisexuées du pistachier de l'Atlas sont portées par des pieds différents c'est à dire que c'est une espèce dioïque, qui impose donc une pollinisation croisée, généralement anémophile rarement entomophile [13]. Les fleurs mâles sont des inflorescences terminales à calice de trois à cinq sépales, pubescents avec cinq à sept étamines ; quant aux fleurs femelles, elles sont en grappe, à calice très petit et à ovaire surmonté de trois styles pourpres (Figure 1.1, Photo D).

Les fruits de cette espèce sont des drupes ovoïdes, pointues au sommet (Figure 1.1, Photo E), monospermes, à endocarpe osseux et mésocarpe sec plus ou moins plissé. Ils mûrissent en Septembre, en prenant la couleur verte bleuâtre. Chaque fruit (exocarpe) contient un noyau (endocarpe) dont la graine légèrement oblongue (Figure 1.1, Photo F) est recouverte d'un tégument fin (tégument interne), qui adhère dans la graine mûre, elle a une épaisse couche unicellulaire d'albumen renforcée autour de la radicule et le long des

deux faces extérieures des cotylédons. L'embryon blanc est constitué d'un petit axe embryonnaire et de deux cotylédons. On compte en moyenne 1000 graines/ kilogramme.

Comme la majorité des espèces adaptées à la sécheresse, le pistachier de l'Atlas développe un système racinaire très pivotant, vigoureux, qui s'enfonce rapidement en profondeur jusqu'à cinq à six mètres, ce qui lui permet de végéter sous une tranche pluviométrique relativement faible.

1.1.6 Caractéristiques écologiques et climatiques :

La présence du pistachier de l'Atlas indique l'existence d'anciennes forêts claires ou de steppes arborées. C'est un arbre xérophile, il est assez rustique et résiste bien aux rigueurs du froid, supportant les gelées de -15° Celsius, il n'est nullement affecté par les longues périodes de sécheresse et de la chaleur la plus aride [14].

Le Bétoum est le plus ubiquiste des arbres du nord de l'Afrique et du Proche Orient. Du point de vue climatique, le caractère biologique le plus typique du pistachier est sa résistance à la sécheresse [15] . Il semble que le pistachier est plus résistant que le caroubier [12].

Il supporte aussi bien les températures les plus basses (-12°C à Djelfa) que les températures élevées (49°C à Ghardaïa), néanmoins, les jeunes plants craignent les gelées fréquentes dans les zones semi- arides.[16] pense que cette espèce se développe mieux dans des régions à hiver assez froid et à été sec et chaud.

D'après PECH (1948) in [12], en Turquie, le pistachier ne craint ni la chaleur, ni le froid mais il préfère un climat où les variations de températures ne sont pas accentuées, pour ce même auteur, le climat n'a de l'importance qu'à l'époque de la floraison et de la nouaison, le froid, le brouillard et les pluies gênent la pollinisation et par la même occasion la fécondation.

Le Bétoum se développe, en général sous une pluviométrie de 200 à 250 millimètres par an. Une bonne pluviométrie lui assure une bonne végétation, tandis que dans le cas contraire, des irrigations sont souvent nécessaires pour combler le déficit hydrique [17].

En Algérie, il bénéficie d'une pluviométrie de 1300 millimètres par an au niveau de sa limite septentrionale de l'Atlas à l'ouest d'Alger. Il reçoit par contre 600 millimètres sur le bord méridional de l'Atlas tellien. Entre Benchicao et Berrouagua, la tranche pluviométrique va en décroissant 250 millimètres dans la plaine de Boghari, Boughzoul. Il se contente de 70 millimètres dans la région de Ghardaia au pied de l'Atlas saharien.

Espèce frugale, le Bétoum se maintient dans les zones où parfois la croûte calcaire affleure en surface, les sols humides lui sont peu favorables. Les terrains des steppes, terrains arides et terrains désertiques lui conviennent parfaitement [18].

Selon [19], le pistachier n'est pas très exigeant du point nature du sol, il se plaît parfaitement dans les terrains légers, argilo- calcaire, argilo-limoneux (Dayas à Ziziphus lotus), les alluvions de plaines. Il se développe sur les rocailles et les pâturages arides, par contre il redoute l'humidité et les terrains pauvres en chaux, un pourcentage de 25p.100 de chaux lui est indispensable. La présence de sel à forte concentration dans les sols ne le gêne pas [13].

D'après PECH (1948) in [12], la culture du pistachier en Syrie est possible jusqu'à 1000 mètres d'altitude. Il est même considéré comme un arbre de coteaux, de pentes fortes et d'altitudes élevées. [18]. Ce même auteur signale sa présence au Turkestan jusqu'à une altitude de 1200 mètres.

Figure 1.1

<p>Photo A</p> <p>Régénération naturelle du pistachier de l'Atlas</p>	
<p>Photo B</p> <p>Silhouette d'un arbre de pistachier en plein mois de mars.</p>	<p>Photo B bis</p> <p>Silhouette d'un arbre de pistachier en plein en plein feuillage</p>
<p>Photo C</p> <p>Les feuilles du pistachier de l'Atlas</p>	<p>Photo D</p> <p>Les inflorescences du pistachier de l'Atlas (de gauche à droite).</p> <p>Inflorescence male Inflorescence femelle</p>
<p>Photo E</p> <p>Le fruit du pistachier de l'Atlas (de gauche à droite).</p> <p>(mature et immature)</p>	<p>Photo F</p> <p>La graine du pistachier de l'Atlas</p> <p>a- Avant la décortication</p> <p>b- Après la décortication</p>

Figure 1.1



Photo A



Photo B



Photo B bis



Photo C



Photo D



Photo E



Photo F

1.1.7 Intérêts de l'espèce

1.1.7.1 Intérêts socio-économiques

Le Bétoum est une espèce à usage multiple, son importance s'est considérablement accrue ces dernières années, en raison du développement de l'industrie. Toutes les parties de l'arbre sont utilisables, lui conférant un intérêt socio économique particulier, ses intérêts se résument comme suit :

- Fourrage

C'est un arbre très convoité car il fournit au cheptel un complément indispensable à sa nourriture. En effet le pistachier de l'Atlas peut être utilisé comme espèce pastorale, les feuilles constituent un excellent fourrage pour les ruminants et plus particulièrement en période de disette (émondés, il fournit un apport fourrager appréciable), et la valeur nutritive est estimée à 0.35 Unité Fourragère(UF) et 41 grammes de matières azotées digestibles (MAD) par kilogrammes(Kg)de matières sèches (MS) [20].

- Bois

Le bois du pistachier de l'Atlas est largement utilisé comme bois d'œuvre et de feu, il donne un bon charbon. C'est un bois lourd, peu résilient et de bonne conservation, cette dureté le met quelque peu à l'abri des coupes [21]. Le suintement du tronc donne l'encre rouge des " tolbas". La production de résine mastic par l'écorce, est très utilisée en pharmacologie. [22].

- Fruits

Ses fruits sont très riches en huiles comestibles, elles ont été substituées à l'huile d'olive[11]. Comme ils sont consommés par la population locale.

1.1.7.2 Intérêts écologiques

Le pistachier de l'Atlas occupe, généralement des sols peu profonds dans lesquels, par son système racinaire très développé, il participe à la stabilisation et à la conservation du sol, il contribue aussi de façon favorable à la lutte contre l'érosion et la désertification qui menacent constamment l'humanité. Le pistachier joue un rôle important dans

l'équilibre de l'écosystème semi-désertique. Le verger, par sa longue durée de vie, est un élément de fixation de la population et permet d'abriter des cultures vivrières nécessaires à la consommation à court terme.

Par rapport à d'autres espèces, il utilise de façon très efficace l'eau du sol et du sous-sol. Cet arbre a été planté, au vue de sa grande capacité d'adaptation, sur des terrains de mauvaise qualité, inaptes à toutes autres cultures (sols pauvres, forte pente, etc.).

En tombant chaque année, les feuilles donnent de bons sols. Cette espèce est considérée comme la plus résistante à l'asphyxie racinaire par rapport aux autres espèces du genre *Pistacia*, elle est aussi utilisée comme porte - greffe pour le pistachier comestible appelé communément pistachier vrai (*Pistacia véra*) [11].

Par sa tolérance aux conditions extrêmes de salinités, le pistachier de l'Atlas peut valoriser de larges zones des régions arides et semi arides où le problème de salinité s'accroît de plus en plus [23].

1.2 la répartition géographique du pistachier de l'Atlas

1.2.1 Dans le monde

L'aire du *Pistacia atlantica* s'étend depuis les îles Canaries à l'ouest jusqu'au proche orient vers l'est. D'après [24], les centres de dispersion du pistachier sont au nombre de cinq régions dans le monde :

- 1- En Asie orientale et occidentale, de même qu'en Chine centrale et méridionale, on rencontre: *Pistacia chinensis*.
- 2- L'Asie centrale et occidentale, se présentent comme étant la partie du *Pistacia véra*, Pistachier de Kaboul.
- 3- En Amérique du nord, deux espèces principales sont assez connues: *Pistacia mexicana* HBK et *Pistacia texana* Swingle.
- 4- La zone tropicale de faible importance et représentée par *Pistacia oleasa*.
- 5- La région méditerranéenne est la plus riche en espèces du pistachier compte plusieurs espèces tels que:

*Le Lentiscus (*Pistacia lentiscus*)

*Le Bétoum (*Pistacia atlantica*)

*Le Térébinthe (*Pistacia térébinthus*)

*Le Pistachier vrai (*Pistacia véra*)

*Le Pistachier palestinien (*Pistacia palestinae*).....etc.

1.2.2 En Algérie :

Le pistachier de l'Atlas est presque entièrement localisé en Afrique du nord. Il vit à l'état dispersé dans toutes les forêts chaudes des hauts plateaux algériens. Il est caractéristique des régions septentrionales, [25], et [26], Sa présence est constatée au Hoggar [27], il constitue un peuplement " clair ".

On trouve notamment, le lentiscus (*Pistacia lentiscus*), le Bétoum (*Pistacia atlantica*) et le Térébinthe (*Pistacia térébinthus*), qui vivent à l'état spontané. Ils sont très abondants dans certaines régions, où ils constituent la meilleure indication de possibilité pour que le Pistachier vrai y prospère.

D'après les travaux de [28] qui ont permis de définir les zones favorables à la culture du pistachier, tenant compte des minima de température et de la pluviométrie, où ils ont proposé trois (03) grandes zones différentes en Algérie :

- Zones favorables :

Les zones les plus favorables, répondent à des critères de climats et de sols favorables, elles regroupent les régions suivantes :

-Le sud des hauts plateaux de Sedrata.

-Les hauts plateaux et le sud pré-desertique de Tébessa, Ain m'lila, Ain Beida, Khenchella et Chelghoum Laid, Batna , N'gaous, El Eulma, Bordj Bou Araridj, Sidi Aissa, Bouira (sud), Djelfa, Saida, Frenda, El Bayadh, Mecheria et Aflou.

- Zones moyennement favorables

Elles répondent à l'ensemble des exigences climatiques du pistachier, dont le sol lui convient avec quelques amendements, ces zones regroupent l'ensemble des régions suivantes :

-Arris, les hautes plaines steppiques de Ain Oussera et K'sar Chellala

- Zones peu favorables

Ces zones qui répondent à l'ensemble des critères de climat à l'exception de l'altitude et dont le sol peut ou ne pas convenir, elles regroupent les régions suivantes :

-Mont du Hodna, la plaine du Hodna et djebel El Kerrouch.

1.3 Régénération du pistachier de l'Atlas :

Le pistachier se reproduit aussi bien par la voie végétative (bouturage, marcottage) que par la voie générative (par semis). Cette dernière voie est, souvent utilisée dans les stratégies d'amélioration, elle permet la création d'un matériel nouveau, présentant par rapport au matériel disponible une supériorité qualitative et quantitative, par le biais de la recombinaison des gènes portés par les deux parents [29] .

1.3.1 Par la voie générative :

La régénération par semis est prépondérante chez le pistachier. C'est un outil pour conserver la diversité biologique de l'espèce. Ainsi pour pouvoir répondre à un objectif de production de semences de qualité, il est nécessaire de prendre en compte un certain nombre de leurs caractéristiques [30] :

- Le matériel à grande valeur génétique entraîne automatiquement une hétérogénéité de comportement notamment au niveau de la germination.

-Les Fructifications plus ou moins régulières qui rendent nécessaires la conservation.

- Le phénomène de dormance qui affecte les semences des feuillus.

Cette dormance se caractérise par son hétérogénéité, (conséquences de la variabilité génétique) elle peut non seulement varier d'un lot à un autre, mais à l'intérieur d'un même lot, ce qui rend difficile l'obtention d'une germination groupée et complète.

La germination comme étant l'ensemble des processus physiologiques qui vont du début de la réhydratation de la graine à la sortie de la radicule[31] et [32]. Et pour pouvoir atteindre ce processus physiologique, il faut respecter certains points à savoir :

* Conservation des graines :

Parmi les facteurs qui influent sur la conservation, il y'a ceux qui interviennent, avant la conservation comme la maturité, le traitement après la récolte et durant la conservation comme la teneur en eau et la température de conservation [33] et [34].

* Température de conservation :

Les graines du pistachier de l'Atlas appartiennent à la catégorie des semences "orthodoxes" c'est à dire qu'elles supportent une déshydratation assez poussée de 8 à 9 p.100 [35] et se conservent bien ensuite en récipient hermétique à une température de 2 à 4° C [36]. Dans ce cas, on peut les conserver le plus longtemps possible.

* Dormance et son élimination :

Les graines du feuillus en général et le pistachier en particulier présentent souvent des phénomènes de dormance, qui s'opposent à leur germination. C'est le cas du pistachier, qui est affecté d'une dormance embryonnaire très profonde associée à une légère inhibition tégumentaire [30].

D'après [37] cette dormance, qu'elle provienne de l'embryon (dormance embryonnaire) ou des enveloppes (inhibition tégumentaire), peut être considérée comme un système régulateur de la germination. Les mécanismes de la dormance et de son élimination ont donné lieu à un certain nombre de théories d'interprétations, faisant intervenir soit des hormones végétales, soit des modifications des voies métaboliques (pentoses phosphates) à ceci s'ajoutent souvent des phénomènes de perméabilité à l'eau et à l'oxygène, voir de la présence de certains composés dans les téguments [38].

Selon [39] le froid est un facteur important pour la levée de la dormance, l'étude du rôle du froid dans la levée de la dormance embryonnaire découle des observations empiriques.

En outre, [40], mesurent des quantités d'acide abscissique (ABA) dans les téguments, dans l'axe embryonnaire et dans les cotylédons des graines de pêcher et signalent que leur quantité assez élevées (80 à 90p100), baisse considérablement pendant la durée de la stratification.

Selon [41], l'acide abscissique est parfois rendu responsable de la dormance de diverses semences car l'acquisition de l'aptitude à germer correspond à sa disparition plus ou moins totale.

Donc pendant la stratification des graines, l'équilibre entre les différents régulateurs, évolue progressivement en faveur des activateurs de la germination (cytokinines et gibbérellines) et que cette évolution correspond à la levée progressive de la dormance.

D'après [42], [43], les effets de l'acide gibbérellique AG_3 ont été déterminés sur le niveau de l'acide abscissique (ABA) contenu dans la semence du pistachier pendant la stratification.

Pour ce faire la semence est trempée dans l' AG_3 à différentes doses (0; 125 et 500 ppm) pendant 24 à 48heures. Après cette application, les graines sont mises en stratification pendant 12, 24 à 36 jours, le niveau de l'acide abscissique est déterminé par la suite.

En conclusion, ils trouvent que l'acide gibbérellique (AG_3) utilisé, permet de réduire le temps de stratification, et en même temps il y'a eu réduction du taux d'ABA des graines surtout, pour celles traitées avec une dose de 500 ppm. Une bonne germination a été observée chez les graines traitées avec 500 ppm de l' AG_3 et stratifiées pendant 36 jours. Ainsi, ils estiment que l'acide gibbérellique (AG_3) entraîne un fort taux de germination et par la stratification les inhibiteurs de croissance diminuent progressivement contrairement aux stimulateurs qui apparaissent et croissent de façon très rapide.

L'acide gibbérellique (AG_3) peut lever l'inhibition de la germination causée par l'ABA, il s'oppose également à l'induction de la dormance par la température élevée et stimule aussi la germination des semences dont la dormance est normalement éliminée par un traitement au froid.

La maturité de la semence joue un rôle important car une immaturité à la récolte se traduit par une faculté germinative faible et surtout par une inaptitude à la conservation [37] . Les traitements destinés à lever la dormance, appelés pré - traitements, interviennent le plus souvent, après la conservation et avant le semis, mais ils peuvent être également appliqué avant conservation [46] .

Cette nouvelle stratégie, associant la levée de dormance et la conservation est très intéressante pour la praticien; elle permet de fournir à tout moment des semences sèches prêtes à germer sans aucun pré traitement préalable au semis [47].

1.3.2 Par la voie végétative :

La reproduction par la voie végétative, appelée communément la multiplication par voie asexuée, est basée sur deux principes : la totipotence cellulaire et la régénération (dédifférenciation puis la différenciation).

1.3.2.1 Techniques classiques :

- Macro - bouturage

Le bouturage est une technique traditionnelle en horticulture, basée sur le principe de développement des racines sur un rameau prélevé de l'arbre mère pour l'obtention d'un individu complètement indépendant [48]. Le bouturage permet de reproduire d'une manière conforme les individus sélectionnés lors de l'étape de l'amélioration. Le bouturage chez le pistachier est une méthode très utile, pour permettre une multiplication plus performante des génotypes sélectionnés.

L'extension du bouturage sous brouillard artificiel (mist) a permis l'augmentation du nombre d'espèces pouvant être traitées en boutures ligneuses ou herbacées [49] .

Ainsi, des travaux réalisés sur l'enracinement des boutures semi -ligneuses, provenant des pied - mères étiolés et enracinés sous brouillard, trempées dans une solution d'AIB (2000 et 4000 ppm) ont permis l'obtention de pourcentages d'enracinement respectifs de 50 p.100 et 80 p.100 de *Pistacia atlantica Desf.* Le taux d'enracinement est fonction des doses élevées d'AIB [50].

Le bétoum répond mal au bouturage ligneux, faute de l'état physiologique du matériel végétal, à savoir la sève très oxydante qui induit la mort des cellules Au niveau de sections.

L'enracinement des boutures devient faible avec l'âge du pied - mère, il est pratiquement nul chez les arbres adultes [51] . Le bouturage peut être favorisé par les hormones de bouturage, qui facilitent l'émission des racines, dont l'auxine est la principale hormone.

* Greffage

Il est très utilisé pour la propagation des variétés à caractères très recherchés par le sélectionneur [52], et à l'établissement de collection des clones [53].

1.3.2.2 La vitro propagation :

La culture in vitro permet le contrôle rigoureux de tous les facteurs intervenant dans la croissance et le développement des plantes, y compris la floraison. La culture in vitro trouve son fondement dans le concept de "totipotence cellulaire", ce dernier confère à chaque cellule, (unité morphologique et physiologique de l'être vivant), capable d'autonomie. Possédant toute l'information génétique nécessaire à régénérer la plante entière, et cela de façon fidèle. Théoriquement, le multiplicateur peut mettre en culture n'importe quelle partie de la plante et en régénérer une multitude d'individus.

La culture in vitro s'est considérablement développée ces dernières années, par sa puissance de multiplication, elle permet l'extension d'un plus grand nombre d'espèces souvent difficiles à multiplier par des méthodes classiques [53], elle permet également l'acquisition d'une très grande vitesse de multiplication et de la propagation de plants identiques à la plante mère [54]. Cette technique peut être exploitée en particulier pour la sélection clonale. Selon [55], la culture in vitro permet une régénération et une guérison d'un grand nombre d'espèces à multiplication végétative délicate et dont l'état sanitaire est affecté par des virus et des mycoplasmes. Elle rend également la production régulière, homogène et peut souvent court-circuiter les problèmes physiologiques liés à la dormance. La technique végétative qui apparaît à ce jour la plus prometteuse est la micro-propagation [56].

1.3.2.2.1 Micro propagation :

C'est une technique en plein essor, elle consiste à reproduire des plantes semblables à la plante de départ par la stimulation des capacités naturelles de multiplication de l'espèce, ou par l'induction d'une nouvelle organogenèse de bourgeons et de racine.

La micro-propagation est un outil puissant pour multiplier de façon exponentielle un clone sélectionné permettant ainsi un gain de temps appréciable par rapport aux méthodes traditionnelles.

Le principe de la multiplication végétative *in vitro* ou micro- propagation consiste à prélever sur la plante un organe ou un morceau d'organe qu'on appelle explant (bourgeon, partie de feuille, partie de racine...), et de le cultiver en conditions aseptiques sur un premier milieu, puis à découper cet explant et le repiquer sur un deuxième milieu riche en hormones de croissance dont le but de provoquer soit le développement de bourgeons pré-existants soit la néoformation de bourgeons ou d'embryons somatiques.

Partant de bourgeons préformés; qu'il s'agisse de méristèmes, d'apex ou de nœuds, la multiplication sera conforme, sans grands risques de mutations ou de variations. Par contre si l'explant mis en culture ne contient pas de méristèmes préformés, la néoformation de bourgeons à partir de cals entraîne parfois une production de copies non conformes plus ou moins abondantes (Figure 1.2).

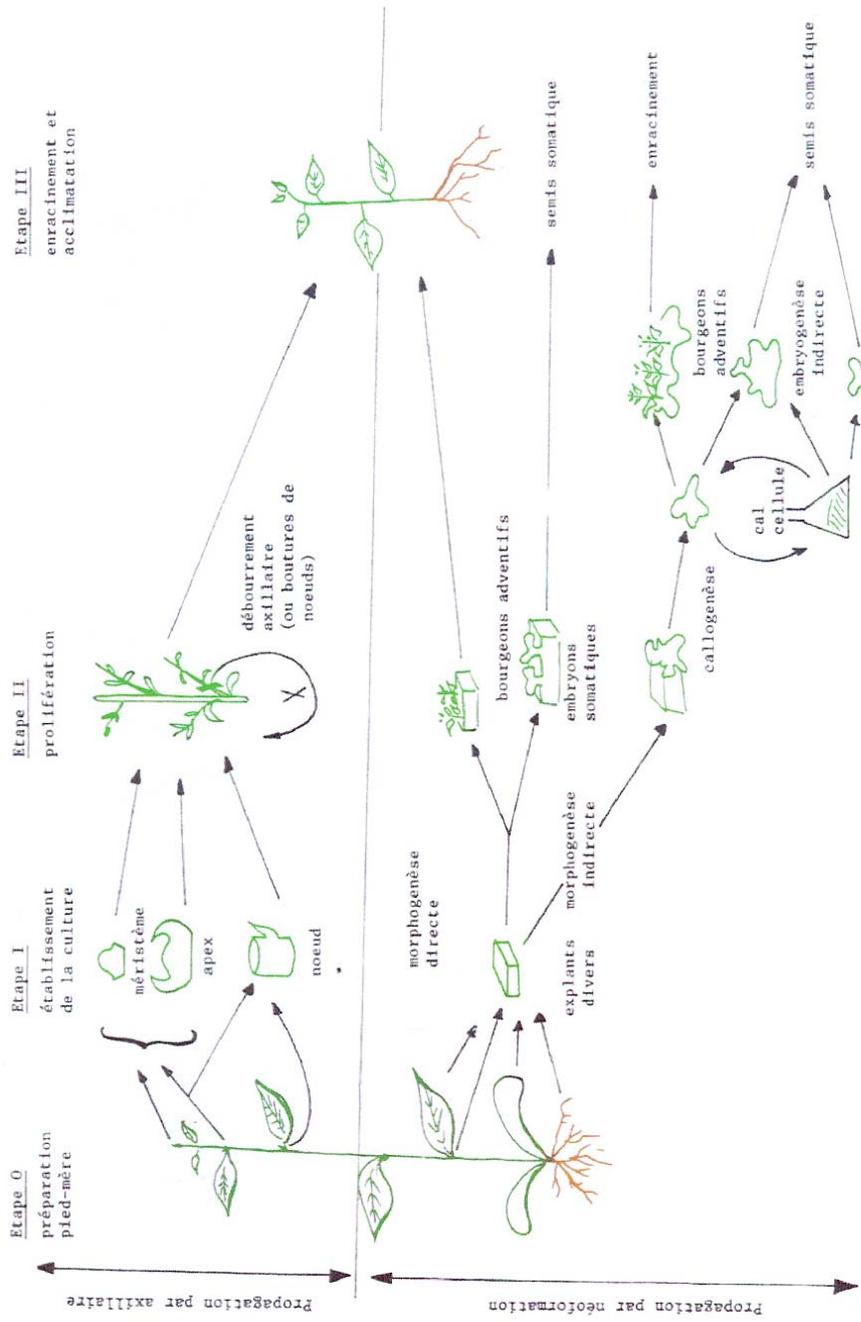


Figure 1.2 : Les différentes techniques de micro-propagation(Georges Shetington 1984)

Les techniques considérées comme les plus stables du point de vue génétique, ne présentent qu'un taux de multiplication relativement faible (quelques unités par mois). Au contraire, les techniques mettant en oeuvre une production indirecte, c'est-à-dire passant par cal indifférencié, d'embryons somatiques peuvent produire journallement des milliers d'individus [56].

Cependant, la culture in vitro d'organes ou de tissus provoque la reprise des mitoses et, en favorisant la dédifférenciation cellulaire, permet l'extension à un grand nombre d'espèces de l'expression de potentialités normalement réprimées [57].

Les diverses modalités de multiplication végétative in vitro sont énumérées par [58] :

La multiplication par bourgeonnement axillaire.

La multiplication par bourgeonnement adventif à partir de cal.

L'embryogenèse somatique.

La culture de protoplastes.

*Bourgeonnement axillaire

Cette technique est particulièrement fiable pour la conservation des ressources génétiques d'un matériel végétal multiplié. Elle consiste à provoquer le développement des bourgeons apicaux ou axillaires préformés [59]. Cette voie de multiplication appelée « multiplication conforme », réside dans le respect de la stricte conformité génétique du végétal à multiplier. C'est pourquoi, beaucoup d'auteurs utilisent aujourd'hui ce mode de multiplication [60], [61], [62] et [63]. Elle se caractérise par le départ de bourgeons préformés qui sont multipliés par division de pousses axillaires ou par boutures de nœuds.

Cette vitro- méthode consiste à favoriser l'élongation des méristèmes initialement portés par les micros- boutures à partir desquelles, un nouveau cycle de multiplication sera entrepris, c'est la méthode dite de multiplication par élongation fragmentation. Pour cette technique, on utilise généralement soit une cytokinine seule soit associée à une auxine mais à faible concentration.

* Bourgeonnement adventif

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

Les bourgeons adventifs sont formés par des organes divers : feuilles, entre - nœuds de tige, tubercules, racine, hampe florale, sans le passage par le stade cal, on parle alors d'organogenèse directe.

Les bourgeons formés sur un cal en culture pourraient être considérés comme un cas particulier de bourgeonnement adventif, on parle alors d'organogenèse indirecte. Elle est le plus souvent utilisée pour l'obtention d'embryons somatiques et rarement pour le bourgeonnement adventif. Les bourgeons adventifs sont souvent le siège de variations génétiques qui peuvent affecter la structure du génome (niveau de ploïdie, recombinaison à la suite d'échange d'ADN entre chromosomes, erreur de réplication d'ADN etc). C'est donc une voie moins sûre du point de vue stabilité génétique, car les divisions cellulaires au niveau des cals présentent parfois des erreurs de copies [64] .

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

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

1.3.2.2.2 Embryogenèse somatique :

En amélioration des plantes, l'intérêt de l'embryogenèse somatique comme voie de régénération serait la création de semences artificielles permettant l'exploitation maximale de la variabilité génétique.

Plusieurs facteurs tels que la composition du milieu de base, les régulateurs de croissance, l'explant affectent l'expression morphogénétique *in vitro*. Cependant, beaucoup d'auteurs ont montré que seuls quelques génotypes posséderaient la capacité à induire des embryons. Cette capacité, chez beaucoup d'espèces, serait génétiquement contrôlée [56].

De nombreuses tentatives ont été réalisées pour stimuler l'embryogenèse à partir de cultures de tissus et de cellules somatiques, sans avoir atteint des résultats significatifs à ce jour [65]. Des résultats satisfaisants pour le bourgeonnement sur cal ont été obtenus par l'équipe de [66] à partir de tiges cultivées successivement sur un milieu riche en BAP, pendant quatre mois de culture puis sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance.

L'embryogenèse somatique, suppose la possibilité d'induire des embryons à partir d'un génotype sélectionné (Induction) de les multiplier (Multiplication), de les faire mûrir (Maturation), puis de les faire germer en une plantule (Germination).

* Initiation et prolifération du tissu embryogénique

L'embryogenèse somatique débute avec un embryon de plante que l'on a retiré d'une graine. L'embryon, ou explant, est placé dans une boîte de Pétri contenant un milieu d'initiation, c'est-à-dire un milieu contenant les éléments nutritifs dont l'embryon a besoin pour commencer à se développer.

Au bout d'environ six semaines, une partie du tissu végétal produit, se transforme en tissu embryogénique présentant un aspect blanc, duveteux et translucide unique en son genre. Il s'agit du stade d'initiation de l'embryogenèse somatique. Le tissu embryogénique continue à proliférer tant qu'il est maintenu dans ce milieu d'initiation.

* Maturation des embryons somatiques

Dès que la quantité de tissu embryogénique est suffisante, la prolifération est interrompue pour permettre la maturation des embryons somatiques. Des amas de tissus sont alors transférés dans un milieu de maturation contenant un régulateur de croissance des plantes, qui favorise la maturation des embryons somatiques. Au bout de six semaines, les embryons somatiques matures, ressemblant aux embryons zygotiques, commencent à apparaître sur les amas.

* Germination des embryons somatiques

Les embryons somatiques matures sont extraits des amas de tissus et placés dans un milieu de germination contenant un mélange d'éléments nutritifs nécessaires aux premiers stades de développement de la plante. Les embryons somatiques germent et forment des racines et des pousses, tout comme les plantes issues de graines. Les plantes propagées par

embryogenèse somatique sont souvent appelées “ plantules somatiques ”, “ semis somatiques ” ou “ plantules dérivées d'embryons somatiques ”.

Un embryon est normalement le résultat du développement d'un zygote provenant de la fusion de deux gamètes haploïdes issue de méiose. Par contre l'embryogenèse somatique désigne l'ensemble des événements provoqués artificiellement “ in vitro ” par choc chimique conduisant à la formation d'un embryon à partir d'une cellule somatique (à 2 n chromosomes) ou germinale.

D'autre part, il existe deux types de développement embryonnaire à partir de cellules non sexuées, “in vitro”:

- L'embryogenèse somatique directe, qui ne fait pas intervenir le cal : Les embryons sont produits directement à partir d'un explant (cellules du nucelle de variétés polyembryogénétiques des Citrus, qui peuvent être considérées comme un des cas particuliers d'embryogenèse somatique naturelle, cellules épidermiques d'hypocotyles de carotte sauvage, . . .).

- L'embryogenèse indirecte qui, au contraire nécessite le passage par un stade de cellules indifférenciées [67] .

En culture “ in vitro ”, l'embryogenèse somatique peut être obtenue par différents explants présentant des potentialités embryogénétiques : les feuilles, les pétioles et les racines qui donnent naissance à des embryons diploïdes appelés embryoïdes [51]. L'embryogenèse somatique peut être assurée par des anthères (androgenèse) et des ovules (gynogenèse). L'embryon somatique est une structure bipolaire caractérisée par la présence précoce et simultanée d'un méristème de tige et de racine. Il ne possède pas de dormance ou de phase de latence, donc sa croissance “ in vitro ” est continue.

De nombreux auteurs décrivent les stades de l'embryogenèse somatique en se référant à l'embryon zygotique du point de vue de l'origine, de la morphologie et du développement. Il est généralement admis que l'embryogenèse expérimentale a été observée sur la carotte pour la première fois par [68], puis par STEWART et coli. (1958) in [57] . Par la suite les facteurs de l'embryogenèse ont été principalement recherchés dans la rupture des corrélations provenant de l'isolement des cellules en milieu liquide agité, dans l'environnement trophique et dans la composition des milieux de culture.

Aujourd'hui, la technique est appliquée sur différentes espèces d'angiospermes et de gymnospermes mais vu la complexité de cette méthode, sa maîtrise se limite à un certain nombre d'espèces. Récemment des résultats ont été obtenus sur *Eluthérocooccus senticosus* par l'équipe de [69] et *Eucalyptus nitens* [70].

L'embryon somatique tire son origine :

- De cals de tissus somatiques ou reproducteurs (comme le nucelle, les embryons zygomatiques matures ou immatures).

- Prend naissance directement au sein de cultures végétatives isolées de protoplastes.

L'embryogenèse somatique adventive (formation d'embryon à partir d'explants de tissus, d'autres embryons issus de cal ou de culture en suspension), peut constituer une dernière source possible d'embryons somatiques [67].

Les interactions des auxines et des cytokinines règlent la morphogenèse des explants mis en culture. Si le rapport entre les deux régulateurs est en faveur de l'auxine, on observera la naissance de racine, s'il est en faveur de la cytokinine on verra apparaître des bourgeons. S'ils sont en équilibre, ils annulent leur effet morphogène, mais conservent leur effet sur la division cellulaire, on obtiendra alors des cals.

Le cal est un tissu cicatriciel qui correspond à des amas de cellules dont la formation résulte à la fois de la rupture de corrélation consécutive à la séparation de l'explant de la plante mère et de l'action "excitatrice" des substances trophiques et des régulateurs de croissance [71].

La formation de cal est une voie qui favorise les variations au sens large de la structure génétique de départ. Dans de nombreux cas, on obtient par cette voie une reproduction non conforme. La culture "in vitro" induit outre des mutations et des remaniements chromosomiques, des modifications qui ne touchent pas les gènes, mais les mécanismes qui contrôlent leur expression (modifications épigéniques) [71].

Pour la majorité des espèces, la réussite est limitée à l'utilisation du matériel juvénile [72], les embryons matures et immatures et les cotylédons.

Selon [73] , l'apparition d'un embryon ou d'un bourgeon à partir d'un cal ou d'un fragment végétal est un événement complexe, qui est sous la dépendance:

- Des conditions intrinsèques: génome, capacité de synthèse des régulateurs naturels, présence de cellules cibles ou tissus cibles ayant conservé certaines aptitudes organogènes, etc.

- Des conditions extrinsèques: nature de l'environnement, milieu de culture, nature et équilibre des régulateurs de croissance.

Le développement d'un embryon somatique se caractérise par un accroissement de la taille des cellules, par divisions longitudinales précoces conduisant à la formation d'agrégats cellulaires en présence d'auxine. Nous observons ensuite un développement des deux ébauches cotylédonaire disposées dans la région opposée au suspenseur et l'embryon devient alors de type coeur.

Le passage d'un milieu riche en auxine à un milieu sans auxine ou contenant une faible concentration de celle-ci, permet le développement des embryons au-delà du stade globulaire [74] . Ces embryons présentent parfois un certain nombre d'anomalies comme la soudure des cotylédons en une sorte d'entonnoir au fond duquel le méristème caulinaire peut ne pas se mettre en place ou ne pas fonctionner [75].

Selon [76], la maturation des embryons nécessite un milieu dépourvu de substance de croissance et une concentration de saccharose élevée.

Les conditions de culture jouent un rôle primordial et doivent être contrôlées périodiquement. Pour ces facteurs nous avons :

* Température

Les phases de germination et d'embryogenèse proprement dites se déroulent habituellement à température ambiante, mais quelques expériences ont été conduites en employant des températures qui sont sensiblement écartées [67].

En effet, [77] et [78] ont montré l'effet bénéfique des basses températures sur le rendement androgénétique de *Datura innoxia*. Le même traitement fut appliqué à plusieurs espèces et il s'avère qu'il augmente généralement le pourcentage d'anthère embryogène et semble jouer un rôle très important.

* La lumière

- L'intensité d'éclairement

L'embryogenèse somatique a pu être développée sous différentes photopériodes et intensités lumineuses. [79] montrent que chez le tabac une forte intensité lumineuse peut stimuler la fonction d'embryon [80]. Tandis que l'induction de callogenèse (embryogenèse somatique indirecte) est liée à l'obscurité chez la patate douce (*Ipomoea batatas* L.) [81] et le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) [76].

- La photopériode

D'une manière générale, l'embryogenèse somatique est réalisée avec une durée d'éclairement de 16 heures et 8 heures d'obscurité.

* Les échanges gazeux :

Ils affectent la croissance des tissus embryogènes que se soit en milieu solide ou en milieu liquide. Sur le premier, la croissance des tissus embryogènes est réduite lorsque les boîtes de pétri sont scellées hermétiquement. Dans ces conditions, il y a accumulation d'éthylène. Alors que sur un milieu liquide la multiplication des tissus embryogènes n'est possible que si celui-ci est agité suffisamment [82].

* Milieu de culture

Les milieux de culture choisis doivent être les plus parfaitement adaptés aux besoins nutritifs de la plante étudiée afin de laisser s'exprimer pleinement son potentiel génétique [67].

L'initiation des tissus embryogènes a été observée sur des milieux de cultures dont la composition minérale est parfois différente. La modification porte le plus souvent sur la forme de la source d'azote; nitrate, ammonium, acides aminés, sur la nature et la concentration de source de carbone et en dernier sur la concentration en régulateur de croissance [82].

En effet, [83] note que le facteur essentiel pour l'expression des pouvoirs embryogènes des tissus, c'est la présence des auxines dans le milieu et en particulier le 2,4-D. Cet apport permet la différenciation et la division des cellules, alors que le

développement des embryons s'effectue dans un milieu dépourvu d'auxine ou contient une faible concentration.

* Le matériel végétal

Pour le choix du matériel végétal, plusieurs facteurs rentrent en Jeu.

- Type d'explant

Les tissus de racines, tiges, pétioles, feuilles et bourgeons axillaires ont été surtout utilisés chez les espèces favorables (feuilles, tiges, racines, bourgeons axillaires de *Ipomoea batatas* L. (patate douce), [84] , des bourgeons apicaux et axillaires du *Phoenix dactylifera* L. (palmier dattier), [76] .

Mais également chez des espèces présentant une faible aptitude à l'organogenèse tel que le palmier à huile [51] . Nous pouvons utiliser des boutons floraux qui présentent une bonne aptitude à l'embryogenèse somatique chez la vigne [85] , [86] ont utilisé des embryons zygotiques immatures d'*Elutherococcus senticosus* pour induire l'embryogenèse somatique.

- Age physiologique de l'explant

Jusqu'à présent la plus grande partie des résultats en micro-propagation in-vitro a été obtenue sur la multiplication de génotype issu des graines ou des plantes juvéniles, c'est à dire sur un potentiel génétique jeune [87] . En effet nous constatons que lorsque les tissus deviennent trop âgés, les réactions de cyto- dédifférenciation deviennent incomplètes et très rares[54] .

- Epoque de prélèvement

L'explant ne peut être prélevé en toutes saisons, il est souhaitable de travailler sur un matériel pour lequel la dormance a été levée [82] . Cela est dû à des modifications des équilibres internes des régulateurs de croissance lors des différentes saisons.

Actuellement, les graines sont traitées par le froid, ou par des éclaircissements spécifiques ou encore par des régulateurs de croissance afin de provoquer un bouleversement de ces équilibres internes et permettre une organogenèse dirigée [67].

- Génotype

La capacité de fournir des embryons somatiques est liée à l'espèce. Au sein d'une même espèce un génotype donne des embryons somatiques ; tandis qu'une autre ne peut fournir que des bourgeons. Les résultats des dernières années montrent l'influence de la constitution génétique des plante - mères sur la réussite de la culture in vitro.

1.4. Milieux de culture :

C'est un milieu préparé dans les conditions aseptiques du laboratoire. Il doit répondre aux exigences nutritionnelles des tissus mis en culture ; il est constitué de quatre catégories d'éléments.

1.4.1 Les éléments minéraux :

Les tissus mis en culture ont besoin d'une source continue de substances minérales; les macro-éléments, sont recherchés en grande quantité, les micro-éléments, sont par contre recherchés en quantité plus faible. La solution en macro-éléments est constituée de sulfatés, phosphates et de nitrates , elle apporte l'azote, le magnésium, le soufre, le potassium, le phosphore et le calcium.

Les cellules végétales ont besoin de micro-éléments qui sont apportés sous forme de sels de sulfates et de sels de chlorures ; ils comportent le cuivre, le zinc, le manganèse, le bore, le molybdène, le cobalt, parfois de l'iode.

1.4.2 La source de carbone et d'énergie :

Le milieu doit contenir une source de carbone et d'énergie.

1.4.3 Les vitamines et acides aminés :

Les vitamines, telle que la biotine, sont des substances nécessaires à la croissance des explants végétaux en culture axénique et les acides aminés (glutamine, asparagine, glycine, arginine...) ont un effet favorable sur le développement des tissus.

1.4.4 Régulateurs de croissance :

Les régulateurs de croissance sont des composés organiques qui, en très faible quantité et grâce à l'arrangement particulier de leurs molécules, déclenchent, inhibent ou

modifient le développement des plantes [86]. Il existe les régulateurs naturels (auxines et cytokinines) rencontrés dans la matière végétale et les régulateurs de synthèse. Ces derniers peuvent produire les mêmes effets que leurs analogues structuraux naturels, parfois en les amplifiant notablement. Les régulateurs actuellement connus semblent participer à la régulation d'une multitude d'activités biologiques. La distribution et la concentration des auxines, cytokinines, gibbérellines, associées avec d'autres types d'hormones tels que l'acide abscissique et l'éthylène, sont des facteurs vitaux dans le contrôle global de la croissance et de la différenciation au sein de la plante mère.

* Les auxines

Les auxines sont des régulateurs qui possèdent plusieurs propriétés: différenciation des tissus vasculaires, contrôle de la croissance apicale et de la formation des racines et de leur élongation, maturation des fruits et stimulation de la synthèse de certaines enzymes cellulases, peroxydases [87].

L'acide indole acétique (AIA) est l'auxine naturelle la plus fréquente dans les plantes, il existe beaucoup d'autres auxines d'origine synthétique. Les plus fréquemment utilisées sont le 2.4D, l'AIB, et l'ANA. L'AIA est en général assez instable contrairement à l'ANA qui elle, résiste à l'autoclavage ou à la lumière. On lui reproche sa faible stabilité à la lumière [88] et [87]. Elle est synthétisée à partir de tryptophane dans les primordia foliaires, à la base des méristèmes, dans les jeunes feuilles et au cours de la maturation des graines.

A forte concentration, ces auxines peuvent être phytotoxiques. Plusieurs d'entre elles sont d'ailleurs des herbicides commerciaux (le 2.4D, dicamba et picloram). Le taux d'auxine endogène est régulé naturellement par des enzymes oxydatives. Ce sont les peroxydases, présentes dans les tissus des plantes cultivées « *in vitro* », sous différentes iso-formes. Au cours l'enracinement adventif, l'activité peroxydasique totale subit de fortes fluctuations. On observe une forte augmentation au cours de la phase d'induction des racines. Ensuite, au cours de la phase d'initiation racinaire, l'activité peroxydasique est faible.

La teneur en phénols totaux subit une variation parallèle mais inversée par rapport à celle des peroxydases. Ceci peut s'expliquer par l'action inhibitrice des phénols sur l'AIA

oxydase [89] et [90]. Les composés phénoliques agissent souvent en synergie avec les auxines.

Il est fréquent de trouver des auxines conjuguées dans les tissus des plantes, et cela en quantités plus importantes que l'auxine libre. Du point de vue physiologique, elles jouent un rôle au niveau transfert stockage, biosynthèse et action auxinique. C'est un moyen de détoxifier et de réguler les quantités d'auxine endogènes actives, principalement après un traitement auxinique externe.

Les propriétés principales des auxines sont :

- Stimulation de la division et de l'agrandissement des cellules.
- Différenciation des tissus vasculaires, le xylème notamment.
- Contrôle de la croissance apicale, de la formation des racines et de leur élancement.
- Maturation des fruits, abscission des fruits et des feuilles.

* Les cytokinines

D'un point de vue chimique, Les cytokinines sont des substances chimiquement proches de l'adénine [88]. La biosynthèse des cytokinines semble se faire essentiellement dans les extrémités de racines et dans les jeunes fruits (liquides séminaux). Il existe de formes naturelles de cytokinine (Zeatine) mais aussi de nombreuses formes synthétiques 2IP, Kinétine etc...

L'intervention des cytokinines est signalée dans de nombreux phénomènes physiologiques [87]. Les Principales propriétés biologiques des cytokinines sont:

- Stimulation de la division cellulaire :

Les cytokinines interviennent dans la régulation de l'activité mitotique en étroite relation avec l'auxine c'est à dire qu'elles stimulent la division cellulaire, favorisent la néoformation de bourgeons ainsi que la ramification des pousses herbacées, (cicatrisation des blessures, grossissement des tubercules, ...).

- Corrélation entre bourgeons :

Elles favorisent la ramification des pousses herbacées. Les cytokinines s'opposeraient à la dominance exercée par le bourgeon apical sur les méristèmes axillaires.

- Organogenèse :

La balance auxine/ cytokinine est déterminante en culture de tissus. La néoformation de bourgeons est favorisée par des teneurs élevées en cytokinine.

- Effet "anti-sénescence" :

Elles retardent la sénescence (les feuilles et des fruits), favorisent la synthèse des protéines.

* Les gibbérellines

De très nombreuses gibbérellines ont été isolées dans les tissus de plante. Leur activité biologique peut varier fortement.

Les sites de biosynthèse des gibbérellines sont les tissus des jeunes pousses et les extrémités des tiges et des racines ainsi que dans les embryons des graines en germination [86].

En culture de tissus, l'effet des gibbérellines est souvent semblable à celui des auxines. Toutefois, la présence de fortes concentrations de gibbérelline dans le milieu peut empêcher la formation des racines. De même, elles inhibent la formation des embryons somatiques. [86]. La GA₃ a généralement un rôle bénéfique pour favoriser le développement de bourgeons ou d'apex méristématiques préformés.

Les gibbérellines favorisent la croissance de plusieurs sortes d'organes végétaux: (croissance des entre-noeuds, croissance des feuilles), accélèrent et régularisent la germination de certaines semences comme le blé et l'orge et lèvent la dormance des bourgeons, etc...

Une des principales actions des gibbérellines est l'élongation des tiges par allongement des entre-noeuds. Aussi, l'emploi de substances antigibbérelliques comme l'ancymidol permet-il de supprimer totalement les entre-noeuds et d'obtenir des amas d'apex méristématiques intéressants pour la multiplication de certaines espèces, asperge [79].

* L'acide abscissique (ABA)

Cette substance de croissance naturelle est synthétisée dans les feuilles matures et véhiculée vers les racines par le phloème et de là peut retourner vers les tiges par le xylème. L'ABA est très souvent considéré comme un inhibiteur de croissance, bien qu'en culture de tissus, il puisse avoir un effet stimulant sur la croissance des cals.

En embryogenèse somatique, il peut provoquer et maintenir la dormance à haute concentration, et par contre favoriser la germination à faible concentration. Il joue aussi un rôle dans la synthèse des protéines de stockage.

L'acide abscissique est un régulateur de croissance naturel. Il favorise l'abscission des feuilles et des fruits, retarde la croissance des rameaux, prolonge la dormance des bourgeons et celle des graines, et fait fermer les stomates en cas de déficit hydrique [71] et [87]. Sa présence dans les tissus végétaux est souvent liée aux conditions de vie difficile [86].

En embryogenèse somatique, il peut provoquer et maintenir la dormance à haute concentration et par contre favoriser la germination à faible concentration [79]. Son inactivation et sa rapide dégradation à la lumière en font une molécule difficile à utiliser [86].

* L'éthylène (C₂H₄)

L'éthylène est un gaz qui agit sur la maturation des fruits, sur la chute des organes caduques. Il inhibe le développement des jeunes pousses et l'élongation des racines [71] et [87]. Il est plus intensément produit dans des tissus qui vieillissent, ou mûrissent, ou qui sont blessés.

C'est une substance de croissance synthétisée à partir de méthionine dans beaucoup de tissus, en réponse à un stress.

Cinq régulateurs de croissance, appartenant à deux groupes différents de phytohormones ont été testés dans le milieu.

-Gibbérelline AG₃

-Auxines : AIA, AIB, ANA, 2.4-D

-Cytokinines :BAP, Kinétine

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1 Lieu de l'expérimentation :

Le présent travail a été effectué au laboratoire d'amélioration des plantes au département d'Agronomie de Blida

2.2 Matériel végétal :

Les graines du pistachier de l'Atlas utilisées pour la réalisation de cette étude, ont été récoltées en Novembre 2002, dans un peuplement naturel de la région de MESSAAD dans la wilaya de DJELFA. Elles nous ont été fournies par l'INRF de DJELFA (Institut National de Recherches Forestières), elles sont issues de pied - mères différents dont l'âge et la provenance sont inconnus.

Ces graines matures sans défaut apparent ont subi un traitement au froid humide à une température de 1 à 4° Celsius durant un mois, dans le but de lever la dormance. Une fois cette durée écoulée, ces dernières sont trempées dans l'eau distillée qui est renouvelée régulièrement, pour éviter l'asphyxie causée par la libération des phénols et pour ramollir l'épicarpe (inhibiteur tégumentaire). Par un test densimétrique, on a pu éliminé les graines vides ou parasitées, celles-ci flottent à la surface de l'eau. Après ce test, les graines restantes ont subi une désinfection et un semis.

2.3 Désinfection :

Avant de lancer la germination, il est nécessaire de désinfecter le matériel végétal, pour cela on a opté pour le mode de désinfection utilisé par [83], qui consiste en :

- une pré- désinfection à l'alcool à 96° pendant 10 secondes
- une deuxième désinfection qui consiste en un trempage dans l'hypochlorite de calcium à 6.p.100 pendant 15 minutes.

- à l'issue de la deuxième étape, trois à cinq rinçages à l'eau distillée stérile s'ensuivent.

2.4 Milieux de culture :

Tous les milieux utilisés dans cette étude sont stérilisés par autoclavage à 120°C, sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes, juste après l'ajustement de leur potentiel hydrogène qui est de 5.7 à 5.8 soit avec du NaOH soit avec du HCl selon que le milieu serait acide ou basique.

2.4.1 Milieux de culture de base :

Un milieu de culture est une solution aqueuse, il s'élabore au moyen d'éléments minéraux majeurs (macro - éléments) et d'éléments mineurs (micro-éléments). Toutefois, le fragment mis en culture est séparé de la plante mère, il n'est donc plus approvisionné en composés élaborés par le métabolisme de la plante, nécessaires à l'entrée en croissance des tissus ou la différenciation d'organes. Ces substances doivent donc venir en complément de la solution minérale, il s'agit de vitamines, d'acides aminés, de sucres et de régulateurs de croissances. Cette solution aqueuse est la plupart du temps solidifiée par une substance extraite des algues; la gélose.

Deux milieux de cultures de base ont été testés, il s'agit du milieu de [84]et [84]dilué au demi (Tableau 2.1). Le milieu de culture est additionné à différentes doses d'hormones de croissance en combinaison qui sont: L'acide gibbérellique AG3 et une auxine, l'acide indolylbutyrique (AIB).

Nous avons établi deux balances hormonales gibbérelline / auxine (Tableau 2. 2), dans le but de mettre en évidence leur influence sur l'allongement des pousses ainsi que les entre - noeuds des vitro -plants. Une meilleure élongation de ces derniers permet une bonne fragmentation des vitro- plants issus de l'introduction primaire. La solution vitaminique utilisée est celle de MOREL (1952) in GAUTHERET (Tableau 2.3).

2.4.1.1 Solutions minérales :

Les solutions minérales testées sont :

- Le milieu de [84] appelé communément milieu MS pour l'embryogenèse somatique.
- Le milieu de [84] dilué de moitié MS/2 pour la croissance des vitro – plants.

Tableau 2.1 : Composition de solutions minérales utilisées lors de notre expérimentation.

Solutions	MS	MS/2
Macro- éléments (g/l)		
NH ₄ NO ₃	1.650	0.825
KNO ₃	1.900	0.950
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.440	0.185
KH ₂ PO ₄	0.170	0.085
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.370	0.220
Micro-éléments (mg/l)		
Mn So ₄ , H ₂ O	16.90	16.90
H ₃ Bo ₃	6.20	6.20
ZnSo ₄ ,7 H ₂ O	8.60	8.60
Ki	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ ,2 O	0.25	0.25
CuSo ₄ ,5 H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ ,6 H ₂ O	0.025	0.025

Tableau 2.2 : milieu MS/2 avec deux concentrations C₀ et C₁

Milieux	Doses hormonales AG3/AIB
MS/2	C ₀ = 0mg.l ⁻¹
	C ₁ = 0.4 / 0.2mg.l ⁻¹

Tableau 2.3 : Solution vitaminique de MOREL (1952) [85] en mg pour 100ml

Vitamines	Concentrations
Panthoténate de Calcium	1mg.100ml ⁻¹
Méso Inositol	100 mg.100ml ⁻¹
Biotine	0.01 mg.100ml ⁻¹
Acide nicotinique	1 mg.100ml ⁻¹
Pyridoxine (vitamine B6)	1 mg.100ml ⁻¹
Thiamine (vitamine B1)	1 mg.100ml ⁻¹

Le tableau 2. 4 englobe la solution stock du fer EDTA; la glycine et l'anti-oxydant utilisée lors de notre expérimentation.

Tableau 2. 4 : La solution stock du fer EDTA en mg/l; la glycine et l'anti-oxydant

Na ₂ EDTA	3730 mg.l ⁻¹
FeSo ₄ , 7H ₂ O	2780 mg.l ⁻¹
Acide aminé : Glycine	20 mg.l ⁻¹
L'anti-oxydant : Acide ascorbique	0.1 g.l ⁻¹

2.4.1.2 Solutions organiques des milieux de culture de base :

2.4.1.2.1 Source de carbone :

Les tissus ou les cellules cultivés en culture in vitro ont une photosynthèse inhibée, c'est pourquoi il faut ajouter au milieu de culture les glucides nécessaires. Comme source de carbone on a utilisé le saccharose (C₁₂H₂₂O₁₁), à une concentration de 20g/l.

2.4.1.2.2 La gélose :

La gélose utilisée pour la solidification du milieu est l'Agar - Agar .Elle évite la mort par asphyxie de la plantule suite à une immersion dans la solution, en réalisant ainsi un complexe colloïdal ayant un assez faible pouvoir de rétention vis à vis des ions [48]. La gélose est utilisée à raison de 8g/l.

2.4.1.2.3 Les combinaisons hormonales :

Pour une étude adéquate de l'embryogenèse somatique, on a opté pour le milieu [89] et pour l'obtention d'embryons somatiques à partir de feuilles, d'entre-nœuds et de racines, nous avons testés des combinaisons d'hormones de croissance avec des concentrations différentes (Tableau 2.5).

Le milieu de [84] dilué de moitié, avec tout ses composants (vitamines, anti-oxydant, acide aminé et fer EDTA), est utilisé pour la micro-propagation et la fragmentation.

Le milieu de [84] est utilisé comme milieu de base pour l'embryogenèse somatique auquel on ajoute des régulateurs de croissance à savoir les auxines et les cytokinines combinées.

Comme Auxine on a utilisé AIB – ANA et 2.4- D et Comme Cytokinine on a utilisé BAP et Kinétine.

Tableau 2.5 : Les combinaisons hormonales utilisées lors de notre expérimentation

Première combinaison : AIB+ANA+BAP mg.l ⁻¹)	
M ₀	Milieu MS sans hormones de croissance (Milieu témoin)
M ₁	0.5 mg/l(BAP) + 1.0 mg/l (AIB)+0.5 mg/l (ANA)
M ₂	2.0 mg/l(BAP) + 2.0 mg/l (AIB)+1.5 mg/l (ANA).
M ₃	1.0 mg/l(BAP) +2.0 mg/l (AIB) + 2.0 mg/l (ANA)
Deuxième combinaison : 2.4.D+AIA+Kinétine (mg.l ⁻¹)	
M ₁ '	1 mg/l (2.4-D) + 1 mg/l (Kinétine)
M ₂ '	1 mg/l (2.4-D)+2 mg/ (Kinétine)
M ₃ '	1 mg/l (2.4-D) + 1mg / (BAP)

2.5 Conditions de culture :

Les vitro-plants placés dans des tubes à essais ou dans des boîtes de pétrie sont entreposés dans un phytotron où la température et la photopériode sont maintenues au seuil optimum de croissance selon les phases.

- La température réglée dans le phytotron est de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, la température réelle à l'intérieur des récipients de culture peut être supérieure de 2 à 4° C à celle du phytotron, on réglera alors la température de la salle de culture à 2° C au dessous de celle que l'on désire [48] et [52].

Comme le prouvent de nombreux travaux, la lumière est indispensable pour réguler certains processus morpho-génétiques, l'éclairage est assuré par une série de néons d'une intensité lumineuse de l'ordre de 2000 à 3000 lux environ.

-la Photopériode est réglée selon les différentes phases de culture; la phase micro-propagation est caractérisée par une photopériode de 16 heures de lumière et de 8 heures d'obscurité pendant un mois. Elle est de neuf semaines pour la phase d'embryogenèse somatique, répartie comme suit; une obscurité totale sur une durée de trois semaines suivie d'une photopériode de 16 heures de lumière et de 8 heures d'obscurité pendant six semaines.

2.6 Dispositif expérimental :

Etant donné que toutes les conditions de l'environnement sont contrôlées, nous avons opté pour la randomisation totale avec un seul facteur pour notre expérimentation.

Facteur n°1: milieu de culture. Noté F₁ comprenant deux variantes :

M₀ (milieu sans hormones)

M₁ (milieu avec hormones)

Chaque traitement est répété quinze fois. Durant l'expérimentation, les observations réalisées après un mois de mise en culture, portent sur les paramètres suivants :

-la longueur moyenne de la tige en cm ;

-le nombre total moyen de feuilles ;

-le nombre total moyen de nœuds.

2.7 Les techniques histologiques :

Elles sont utilisées pour l'examen microscopique des différentes étapes du développement des explants mis en culture (entre- nœuds, feuilles.....).

Nous avons d'abord utilisé la technique utilisant l'historésine LKB qui nous a permis de définir la nature et l'origine des bourgeons et embryons somatiques obtenus.

Cette technique a été réalisée au laboratoire d'Anatomie et de Pathologie du Docteur KHEMCI.

2.7.1 Fixation des organes :

Le mélange glutaraldéhyde tampon phosphate paraformaldéhyde est le fixateur utilisé pour les organes inclus dans un type de résine spéciale, historésine LKB (Annexe 1.2).

Pour permettre une meilleure fixation des cellules, les organes végétaux sont fixés pendant 48 heures après un passage de 2 à 3 heures sous vide pour éliminer l'air existant dans les tissus.

2.7.2 Déshydratation :

C'est une opération qui consiste à tremper les organes fixés dans des bains d'éthanol à concentration croissante (Annexe 2).

2.7.3 Imprégnation :

Après déshydratation, les organes végétaux sont imprégnés dans un mélange composé de 50 ml de résine de base (GMA) spécial LKB et d'un sachet d'activateur. L'imprégnation se fait pendant une nuit, le vide partiel est indispensable pour faciliter cette imprégnation.

2.7.4 Inclusion :

Elle consiste à plonger les organes dans des moules contenant le milieu d'inclusion, à température ambiante sous la loupe pour orienter les organes rapidement avant la polymérisation de la résine.

2.7.5 Confection des coupes :

L'histologie LKB permet d'obtenir des coupes de 3 μm d'épaisseur. Elles sont recueillies dans un bac contenant de l'eau distillée, étalées sur une lame à l'aide d'un pinceau puis séchées et conservées.

2.7.6 Coloration :

Nous avons utilisé la double coloration PAS - Aniline blue black (Annexe 2) afin de visualiser les polysaccharides et les protéines. Après coloration, les coupes sont immédiatement montées à l'EUPARAL. Les observations des coupes et les photographies sont réalisées au microscope photonique Zeiss .

2.8 Mode d'expression des résultats :

Afin de comparer la morphogenèse des plantes d'une subculture à l'autre et l'influence de celle-ci sur la morphogenèse des vitro-plants; les résultats obtenus sont traités par le calcul de l'intervalle de confiance dont la formule utilisée est :

$$\bar{M} \pm t_{\alpha} (\zeta_{\text{ech}} / \sqrt{n}) \rightarrow \bar{M} \pm t_{\alpha} ((\text{SCE}/n(n-1))^{1/2})$$

$$t_{\alpha} = 1.96 (\alpha = 0.05)$$

\bar{M} Moyenne de l'échantillon

SCE = somme des carrés des écarts c'est-à-dire $\sum (\bar{M} - M_i)^2$

n = nombre de plants utilisé lors de l'expérimentation

En troisième partie de notre travail, les explants (feuilles, entre-nœuds et racines) sont récupérés et utilisés lors de l'embryogenèse somatique. Les observations faites après un mois concernent:

- La surface moyenne des cals exprimée en cm^2
- Le pourcentage des cals
- La couleur et la texture des cals
- Le pourcentage des cals ayant émis des racines ou bourgeons.
- La croissance des cals, dans les différents traitements est exprimée par la moyenne (les mesures de surface effectuées sur 20 cals différents avec 2 répétitions selon la formule suivante:

$$S = (\pi((D_1 + D_2)/2)^2)/4$$

Les résultats ainsi obtenus sont traités par une analyse de la variance au seuil de signification $\alpha = 5\%$. Le test de NEWMAN et KEULS permet de constituer les groupes de traitements homogènes en se basant sur les différences significatives (P.P.D.S). Lorsque la différence observée entre les moyennes extrêmes d'un groupe de K moyennes sera inférieure à la P.P.D.S, alors nous pouvons déduire que K moyennes constituent des groupes homogènes.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 Les contaminations et la germination des graines

3-1-1 Les contaminations :

Une semaine à dix jours après la mise en culture les vitro-plants ont atteint une longueur de cinq centimètres, les infections (cryptogamiques ou bactériennes) apparaissent, les tubes contaminés sont éliminés.

Les contaminations rencontrées lors de notre expérimentation sont d'origine cryptogamique et bactérienne. Elles ont été très fréquentes au début de notre expérimentation, c'est-à-dire de l'ordre de 70 p.100 sur un nombre de 144 graines mises à germer. Les contaminations cryptogamiques prennent naissance sur le milieu gélosé et finissent par couvrir toute la surface du milieu de culture, elles se manifestent par le développement d'un mycélium souvent blanchâtre ou grisâtre, parfois noirâtre ou verdâtre (Figure 3.1, Photo A), elles sont dues aux manipulations et au végétal, donc elles sont faciles à maîtriser.

Quant aux contaminations bactériennes elles se présentent sous forme d'un voile opaque laiteux, plus souvent limité à la base des vitro-semis. A la surface du milieu gélosé, elles se manifestent sous forme d'un anneau laiteux, plus blanc que le milieu de culture ou prenant une couleur rosâtre. (Figure 3.1, Photo B).

Avec une désinfection adéquate (6p.100 d'hypochlorite de calcium), les contaminations fongiques ont pu être maîtrisées au fur et à mesure de l'expérimentation. Cependant les contaminations bactériennes persistent et semblent être difficiles à éliminer.

Le taux total des contaminations fongiques ne dépassant pas les 10p.100 durant toute la durée de notre expérimentation. Tandis que les infections bactériennes occupaient la grande part des problèmes de contaminations rencontrées lors de notre travail, et cela surtout à partir du mois de juin quand la température dépasse les 34°C dans la chambre de culture.

Ce qui nous pousse à penser que le matériel végétal renferme, dans ses tissus les contaminants. Selon [91], malgré toutes les précautions prises afin de limiter les infections du noyer, un halobactérien laiteux apparaît de nouveau autour des méristèmes après un mois de culture.

Certains tissus peuvent héberger des agents pathogènes internes, qui ne sont pas éliminés par les méthodes de désinfection classiques[56], c'est ainsi que certains contaminants peuvent ne pas se manifester avant plusieurs jours de subcultures. En effet, on a observé des infections bactériennes après deux à trois semaines de mise en culture pour quelques sujets.

3-1-2 La germination des graines:

Dans notre expérimentation nous avons utilisé deux lots de graines de deux récoltes différentes :

-Le premier lot, comprend les graines récoltées en avril 2001. Nous avons enregistré un taux de germination faible, 18p.100 de l'ensemble des graines seulement qui ont germé, la vitesse de germination est très lente (les graines nécessitaient plus de 40 jours pour germer) cela confirme la difficulté de conserver leur pouvoir germinatif, [37] signale que les graines mûres reprennent une vie active lorsque certaines conditions soient réunies à savoir :

- *La conservation du pouvoir germinatif de la graine,

- *La levée de certaines inhibitions (dormance d'origine tégumentaire ou embryonnaire)

- *Les conditions extérieures soient propices à la germination, notamment la température et l'humidité.

- Le deuxième lot, comprend les graines récoltées en novembre 2002, dont leur taux de germination était élevé, il atteint les 70 p 100 (la vitesse de germination était plus rapide), l'amplitude du temps moyen de germination est situé entre 6 à 12 jours.

Nous avons pu distinguer trois sortes de comportement des graines durant la germination :

*Des graines, après un temps de latence de 8 à 10 jours, ont des taux de germination très variables. Le reste des graines est caractérisé par une germination faible, le maximum de la germination est atteint après 12 jours. (Figure 3.1, photo C)

*Des graines, après un temps de latence de cinq jours, ont un rythme de germination plus accéléré. (Figure 3.1, photo D).

Ceci s'explique par le fait que nous avons utilisé des graines qui présentent un état physiologique propre à chaque graine, une dormance embryonnaire très variable et une population très hétérogène due à la semence, (Figure 3.1, photo E).

Au cours de notre expérimentation, nous avons observé également, l'existence de sujet déformés, qui seraient peut être due à l'utilisation de l'hypochlorite de calcium, à des doses plus ou moins fortes. Mais dans d'autres essais où on a utilisé des doses d'hypochlorite de calcium plus faible ont donné les mêmes déformations, ce qui nous informe sur le patrimoine génétique de la graine (Figure 3.1, photo F).

Des graines qui n'ont subi aucun changement (environ 10 p. 100) à part que les cotylédons doublent de volume, (Figure 3.1, photo G), elles peuvent ne pas présenter d'embryon, phénomène très connu chez le pistachier. L'écart temporel dans la période de pollinisation, la compatibilité des parents, ainsi que la distribution spatiale des arbres producteurs de pollen, sont les causes de l'existence des fruits parthénocarpiques.

Les graines du pistachier de l'Atlas, comme toutes les graines du genre *Pistacia*, germent difficilement, les taux de germination sont généralement faibles et dépassent rarement les 70 p 100.

Quelques graines commencent à germer dès le cinquième jour et d'autre un peu plus loin dans le temps. Au bout de trois semaines toutes les graines auront germé et donneront de toutes petites plantules, (Figure 3.1, photo H). Toutefois, il

faut noter que certaines graines ne germent pas, [30] pense que c'est à cause du problème de dormance qu'on rencontre le plus souvent chez les feuillus, ce même auteur dans des travaux qu'il réalisa en 1986, avance que la germination dépend de l'époque de récolte des graines (graines immatures), mais aussi des conditions de stockage.

Figure 3.1

Photo A Contaminations Cryptogamiques	Photo B Contaminations Bactériennes
Photo C Germination lente de graines ne présentant pas une stratification	Photo D Germination rapide de graines présentant une stratification
Photo E Hétérogénéité des vitro semis	Photo F Malformation des vitroplants
Photo G Graines parthénocarpiques	Photo H Graines non germées

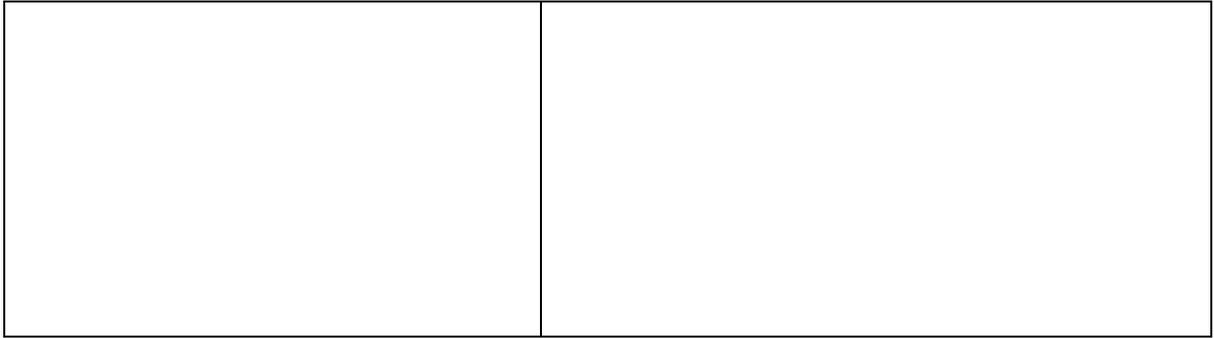


Figure 3.1

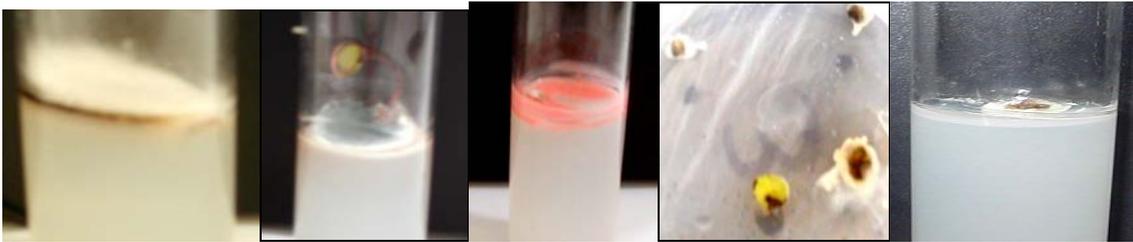


Photo A

Photo B



Photo C

Photo D



Photo E



PhotoF



Photo G

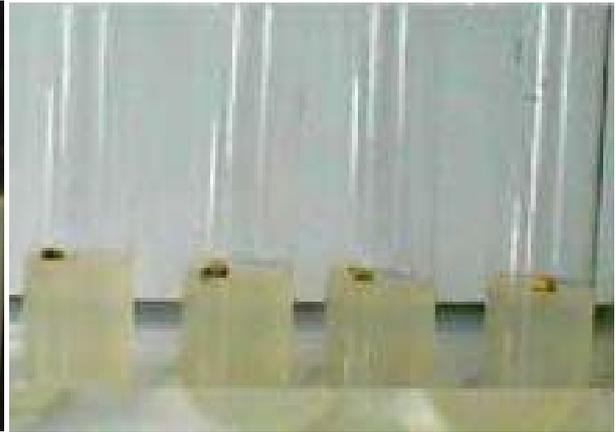


Photo H

La germination des semences de *Pistacia atlantica* est très difficile, voire capricieuse même, selon [30], ce problème est dû à la dormance qui caractérise les feuillus. Chez le pistachier, la dormance se lève par un simple pré - traitement au froid de 2 à 4°C qui dure un jusqu'à deux mois, plus cette durée est longue plus la levée est rapide. Suite aux travaux réalisés en Espagne, il semble que le traitement au froid humide (2 à 4° C pendant un mois) influe d'une façon significative sur le pourcentage et la vitesse de germination de quatre espèces de pistachier étudiées[47].

Le taux de germination est globalement au maximum (80%) après trente jours de stratification, mais la vitesse de germination augmente graduellement avec la durée du traitement de froid appliquée. Il faut noter aussi l'importance de l'interaction entre les deux facteurs de variation considérés. Le comportement est spécifique à chaque espèce étudiée (figures 3.2 et 3.3) [47] .

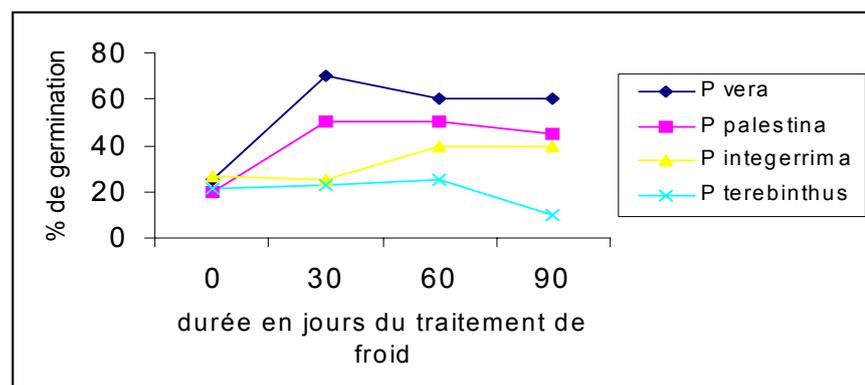


Figure 3.2 : Effet de la durée des traitements au froid humide (2 à 4°C) sur la germination de quatre espèces de *Pistacia*

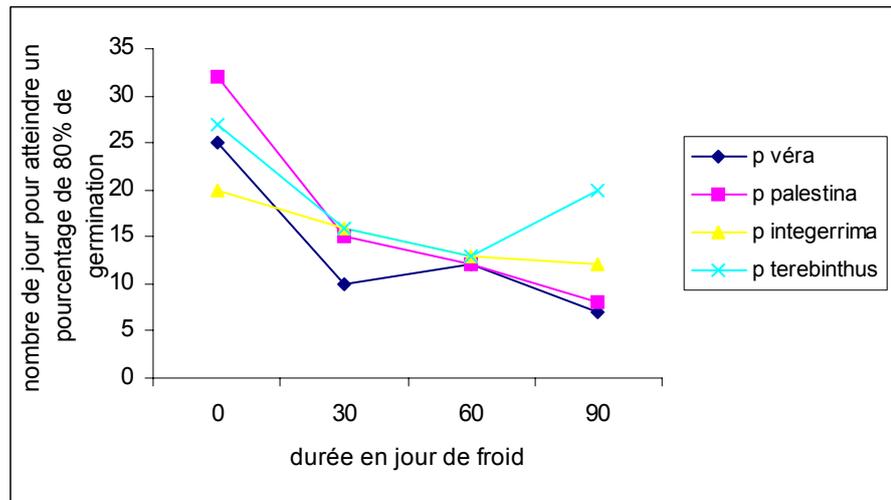


Figure 3.3 : Effet de la durée des traitements au froid humide (2° à 4°C) sur la rapidité de germination de quatre espèces de *pistacia*

D'après [32], in OLNEY et POLLOCK (1960) montrent sur des graines de cerisier que pendant le traitement au froid (+5°C), il y'a un transfert d'azote et de phosphore des cotylédons vers la radicule et l'axe embryonnaire. Ce transfert correspond à une synthèse de composées phosphorylés. La dormance semble donc être en relation avec un blocage du métabolisme du phosphore.

Par ailleurs d'après [22], les graines de bétoum exigent une stratification et ne doivent être semées qu'à une température moyenne ayant atteint au moins 12 ° C.

La découverte d'une cytokinine dans les graines de pommier et ajoute que l'activité cytokinique augmente pendant la durée du traitement au froid [41].

3.2 Analyse des paramètres étudiés :

Un mois après la mise en culture (introduction primaire), les vitro-plants indemnes de toutes infections et atteignant un bon allongement (7 à 9 centimètres), sont fragmentées en micro-boutures d'un nœud.

Les micro-boutures ainsi obtenues sont transférées sur le même milieu frais dont sont issues leurs plante-mères et seront à leur tour fragmentées un mois après. Le type de fragmentation pratiqué dépend de l'aspect des vitro-semis

obtenus en introduction primaire (figure 3.4).

- la fragmentation du vitro-semis se fait en micro-boutures d'un nœud, si ce dernier présente un bon allongement de l'axe principal. Dans le cas contraire, on se contente de les séparer de leurs racines et de les repiquer sur le même milieu frais.

- la séparation par élongation puis par fragmentation du vitro-semis, peut donner des micro-boutures, avec des ramifications qui prennent naissance à partir des bourgeons axillaires de la base. Ces ramifications peuvent être plus ou moins allongées, mais dans le cas où elles sont courtes et les nœuds disposés sous forme d'une rosette, on se contente alors de les séparer.

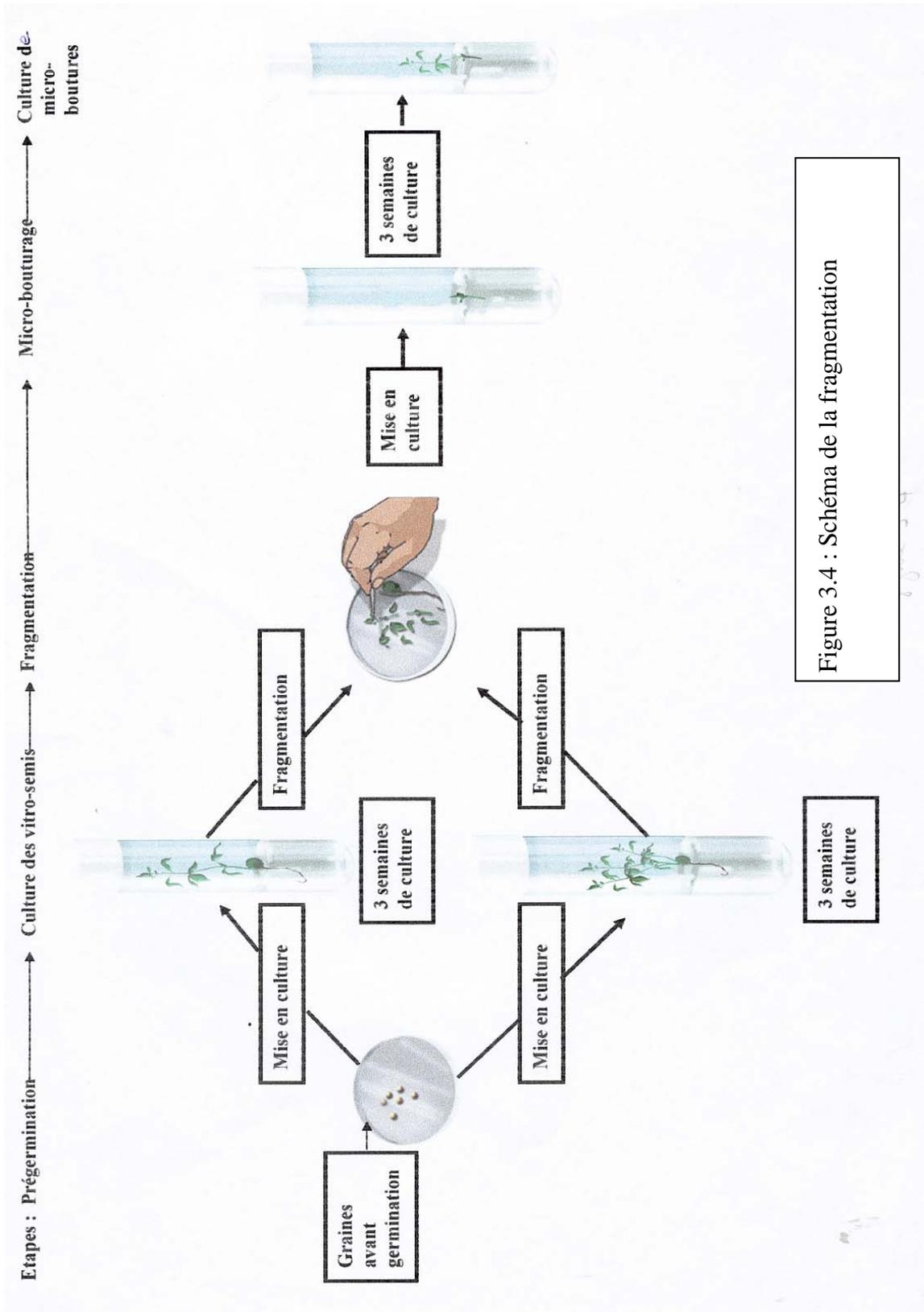


Figure 3.4 : Schéma de la fragmentation

3.2.1 Elongation moyenne des vitro- plants :

Les résultats obtenus en 4 semaines montrent que les conditions de culture “ milieu avec hormones ” sont les plus favorables pour ce paramètre : 5 cm contre 3.03cm. (Figure 3.5).

En effet l'analyse de la variance (Tableau 3.1. Annexe 1) avec un risque $\alpha = 0.05$ révèle un effet significatif du milieu avec Hormones sur l'élongation des vitro-plants. La comparaison de moyenne deux à deux, permet de dégager deux groupes homogènes A et B (Tableau 3.2).

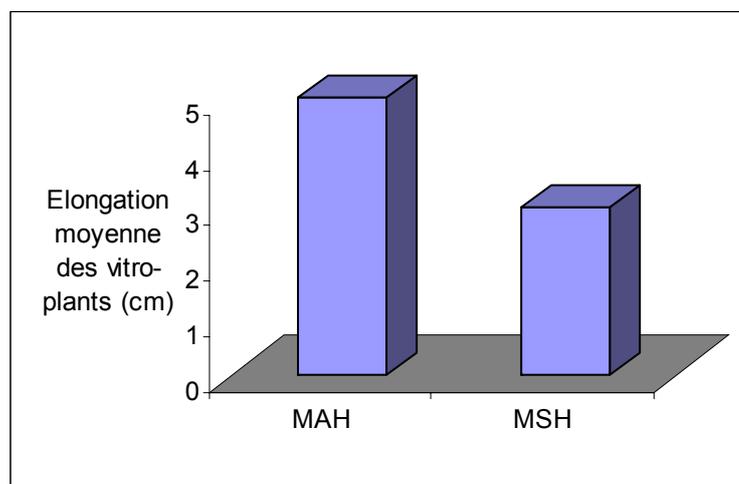


Figure 3.5 : Evolution de l'élongation moyenne des vitro-plants en fonction des conditions de culture (milieu avec hormones et sans hormones). (MAH : Milieu avec hormones ; MSH : Milieu sans hormones).

Tableau 3.2 : longueur moyenne des vitro-plants après un mois.

Traitements	longueur moyenne (cm)	Groupes homogènes
MSH (MS/2-C ₀)	3.03	B
MAH (MS/2-C ₁)	5	A

3.2.2 Nombre moyen de nœuds par vitro- plants :

Le nombre moyen de nœuds produits au cours de la quatrième semaine, varie en fonction du milieu testé (avec ou sans hormones). En effet, ce nombre varie entre 3 et 1.86 nœuds par vitro- plants respectivement milieu avec hormones et milieu sans hormones (Figure 3.6). Les observations acquises ont donc permis de dire qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux traitements.

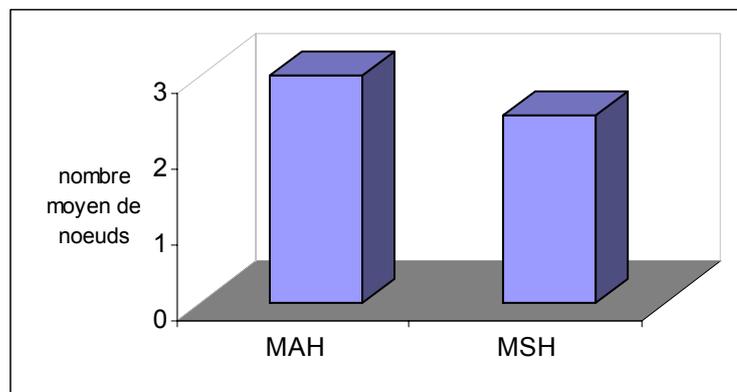


Figure 3.6 : Evolution du nombre de nœuds en fonction des conditions de culture (milieu avec hormones [MAH] et sans hormones [MSH])

L'analyse de la variance (Tableau 3.3 ; Annexe 1) effectuée à quatre semaines de culture révèle un effet non significatif des milieux testés sur le nombre moyen de nœuds par vitro- plant. Le test de la PPDS, fait apparaître un seul groupe (Tableau 3.4), les résultats s'avèrent affirmatifs.

Tableau 3.4: Analyse de la variance du nombre moyen de nœuds

Paramètres Traitements	Nombre moyen de nœuds	Groupes homogènes
MSH (MS/2-C ₀)	1.86	A

MAH MS/2-C ₁)	3	A
---------------------------	---	---

3.2.3 Nombre de feuilles :

Les observations ne montrent pas une grande différence en nombre de feuilles entre les deux milieux (figure 3.7), par contre la taille des feuilles et leur épaisseur sont fortement influencées. En effet, tous les vitro-plants obtenus sur milieu avec hormones présentent des feuilles plus grandes et plus épaisses que pour celles obtenues sur le milieu sans hormones.

Le nombre moyen de feuilles produites au cours de la quatrième semaine, varie en fonction du milieu testé (avec ou sans hormones). En effet, ce nombre varie entre 11 et 9.95 feuilles par vitro- plants respectivement, sur milieu avec hormones et milieu sans hormones (Figure 3.7). Les observations acquises ont donc permis de dire qu'il n'y a pas de différence significative entre le deux traitements.

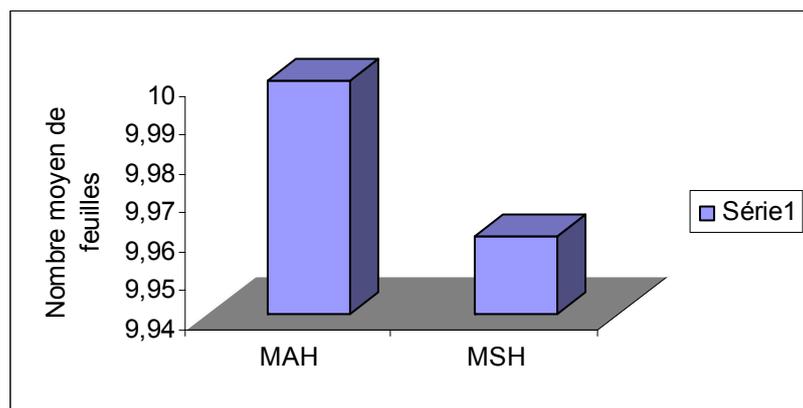


Figure 3.7: Evolution du nombre de feuilles en fonction des conditions de culture (Avec ou sans hormones).

L'analyse de la variance (le tableau 3.5 ; Annexe1), au risque $\alpha = 0.05$, n'indique aucune différence significative, ceci montre que le facteur milieu (avec ou sans hormones) n'a pas d'effets visibles sur la production foliaire. Il est admis

que c'est l'interaction génotype avec l'environnement qui détermine l'expression phénotypique des individus, il reste cependant difficile d'apprécier la part de l'environnement dans cette interaction [92].

Le test de la PPDS, fait apparaître un seul groupe (Tableau 3.6), les résultats s'avèrent affirmatifs.

Tableau 3.6: Analyse de la variance du nombre moyen de feuilles.

Paramètres Traitements	Nombre moyen de feuilles	Groupes homogènes
MSH (MS/2-C ₀)	9.95	A
MAH MS/2-C ₁)	11	A

Le nombre de feuilles n'est pas influencé par l'apport hormonal, donc cela, ne permet pas de déduire que les hormones sont, sans efficacité. En fait, [93] affirme que le nombre de feuilles ne peut être classé comme sensible ou influencé par le facteur milieu car le milieu influe directement le génotype et indirectement le nombre de feuilles. Ce qui permet d'expliquer le fait que le nombre de feuilles n'est pas influencé mais la taille et l'épaisseur des feuilles sont positivement influencées.

3.2.4 Nombre moyen de racines :

Quelles que soient les conditions de culture testées, chaque vitro-plant produit en moyenne une racine qui prend directement naissance à sa base sans qu'il y ait formation de cal, et cela pour les deux concentrations d'hormones utilisées. Mais une légère différence s'est révélée pour le milieu contenant les hormones de croissance (AG3/AIB ; 0.4/0.2). D'après [90], des substances comme l'acide gibbérellique ou des polyphénols sont considérées comme de bons stimulants pour la rhizogenèse. Le nombre moyen des racines ainsi que leur longueur sont corrélés positivement aux taux d'enracinement (figure 3.8).

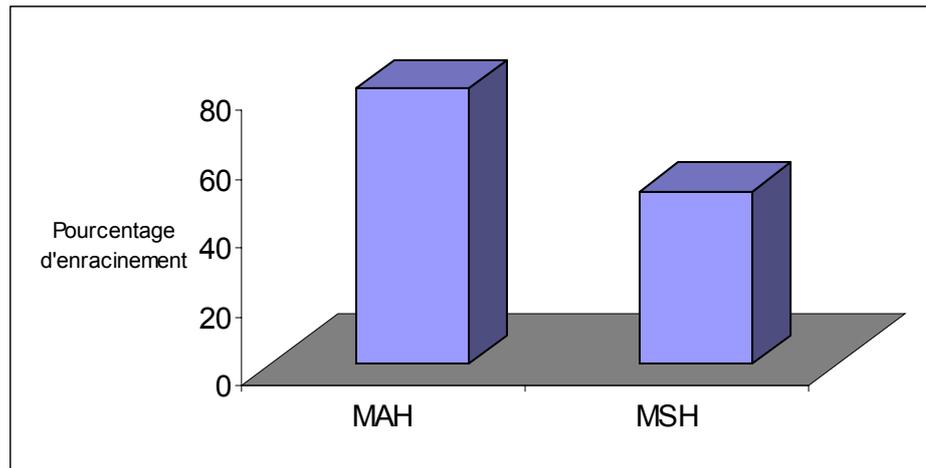


Figure.3.8: Evolution du nombre moyen des racines en fonction des conditions de culture (milieu avec hormones [MAH] et sans hormones [MSH]).

Selon [94], l'AIB et l'obscurité ont un effet bénéfique, qui ne s'exerce que pendant les premiers stades d'enracinement (initiation, induction). En présence de lumière et d'AIB de façon permanente dans le milieu, l'allongement des racines est réduit mais il n'est pas inhibé totalement.

3.3 Bouturage par vitro- propagation :

3.3.1 Micro – bouturage :

Les micro- boutures obtenues après fragmentation de vitro - semis, sont issues de l'introduction primaire, elles ont été repiquées sur des milieux de culture identiques à ceux utilisés pour les vitro – semis. Ceci devrait expliquer l'absence de toutes contaminations au niveau des sub – cultures. [56] confirment que certains tissus peuvent héberger des parasites internes qui ne sont même pas éliminés par les méthodes de désinfection classique, c'est ainsi que certains contaminants peuvent ne pas se manifester avant plusieurs sub - cultures. Par ailleurs, l'élimination de plants apparemment contaminés n'exclut pas la présence latente de bactéries endophytes.

3.3.1.1 L'oxydation phénolique :

Le brunissement des tissus et du milieu environnant est dû à l'oxydation des phénols qui sont des pièges d'oxygène. Ils s'oxydent très facilement en quinones qui sont toxiques pour les tissus[52].

Ainsi, la quantité d'oxygène disponible pour le métabolisme des plantes se trouve diminuée d'autant plus que la température s'élève.

Le brunissement des tissus isolés et cultivés en culture in vitro est un phénomène connu, il n'est pas particulier au pistachier de l'Atlas. Ce brunissement inhibe la croissance des tissus et entraîne finalement leur dépérissement (figure 3.9, Photo A).

Ce phénomène est plus ou moins accentué selon plusieurs facteurs:

*L'espèce: plus sévère chez les espèces qui contiennent naturellement beaucoup de tannins ou d'autres hydroxy-phénols, comme les ligneux.

*L'âge des tissus: les tissus jeunes brunissent moins que les tissus âgés ou lignifiés.

*L'époque de prélèvement: [95] ont relevé que des explants de *Hamamelis* prélevés en Mai, ont plus tendance à brunir que ceux prélevés en Juillet et Août.

*Les substances de croissance: les explants prélevés sur de jeunes feuilles de palmier à huile ont tendance à brunir moins vite en présence d'auxines dans le milieu de culture [96]. Par contre les cytokinines sont connues pour stimuler la synthèse des composés phénoliques.

*Nature du milieu: la nature du milieu de culture a aussi été relevée comme étant un facteur important. [54] ont trouvé que des explants de carotte survivent mieux en milieu liquide contenant des inhibiteurs d'oxydases que dans un milieu solide de même composition. Le manque d'oxygène réduisant le potentiel de réduction de la solution (oxydation plus lente).

De même il a été rapporté qu'une augmentation de pH du milieu augmente le taux de brunissement.

Nous avons remarqué que la libération des phénols est de plus en plus faible en passant d'une sub-culture à une autre, on peut expliquer cela par le fait que le végétal devient de plus en plus juvénile en passant à travers les

différentes sub-cultures, et on sait par ailleurs que la juvénilité du matériel végétal utilisé participe aussi à la diminution de la sécrétion phénolique. Selon [97], en culture « in-vitro », un matériel végétal jeune bruni moins qu'un matériel lignifié.

3.2.1.2 Le débourrement :

Les vitro-plants âgés de 4 à 5 semaines, obtenus à partir de semis et ayant atteint un allongement important de 7 à 9 cm (figure 3.9, photoB), ont été fragmentés en micro-boutures d'un noeud et repiqués sur les mêmes milieux de culture de départ.

Les observations nous ont permis de constater que le débourrement a eu lieu une semaine après le repiquage. Les bourgeons présentent un gonflement, quelque temps après, s'effectue l'écartement des écailles. L'apparition des deux premières feuilles s'effectue 6 à 8 jours après l'introduction en première sub-culture, les tissus juvéniles présentent souvent une plus grande aptitude à l'organogenèse que les tissus provenant d'organes adultes. [98], indique que plus le pied mère est jeune, plus l'élongation est rapide et plus on a la chance d'obtenir une tigelle allongée.

Les plants jeunes qui fournissent les plants les plus réactifs et que les potentialités diminuent avec l'âge[52]. La majorité des bourgeons débourrés présentent un faible allongement ; en un mois, ils n'atteignent que 3 cm de longueur. Généralement ce sont les bourgerons axillaires qui démarrent les premiers en formant des ébauches foliaires.

L'allongement s'est accompagné par les sécrétions phénoliques de tous les vitro-plants et cela au niveau de chaque sub-culture. (Figure 3.9, photo C).

Les taux de débourrement des micro-boutures ont atteint les 90 p100 lors de la quatrième sub-culture sur le milieu contenant les hormones de croissance. Nous avons obtenu des taux élevés assez rapprochés entre les traitements (Tableau 3.7) l'utilisation de plantules aseptiques permet d'éviter le traumatisme éventuel des tissus des micro - boutures, causé par la stérilisation à l'hypochlorite de calcium.

La formation de cals importants à la base des micro - boutures mises en

culture, est due soit au milieu de culture qui ne présente pas un équilibre optimum en sels minéraux [99], ou en régulateurs de croissance.

Ces cals semblent stimulé une activité cellulaire. Ils sont de nature granuleuse et friables. En revanche, un léger brunissement affecte la totalité des cals et leur croissance devient peu active, et ceci, suite à l'élaboration de substances phénoliques dans le milieu de culture (figure 3.9, photo D).

Figure 3.9

<p>Photo A</p> <p>Brunissement des tissus.</p>	<p>Photo B</p> <p>Fragmentation de microbouture d'un nœud.</p>
<p>Photo C</p> <p>Libération de phénols :</p> <ul style="list-style-type: none">-après fragmentation- sur des explants	<p>Photo D</p> <p>Formation de cal à la base de vitro plant.</p>

Figure 3.9

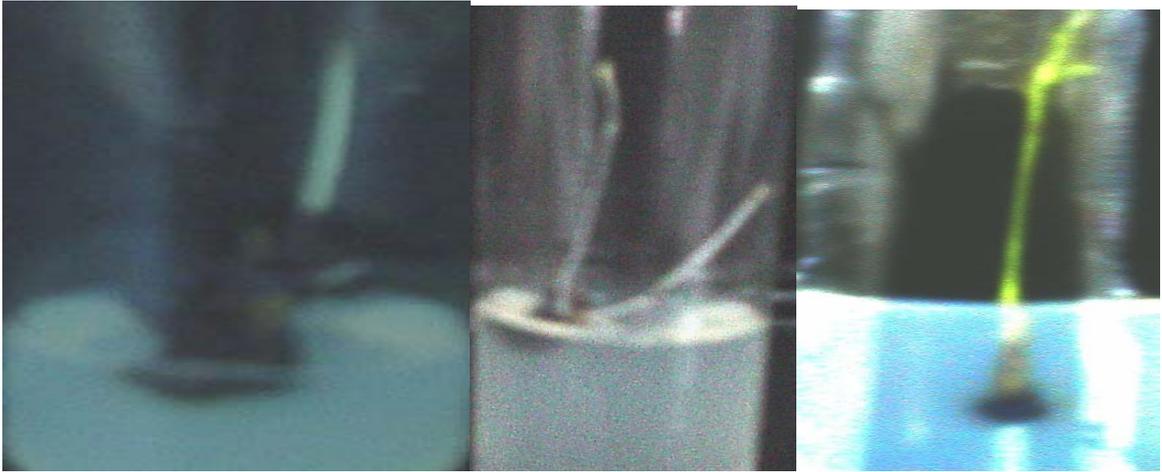


Photo A

Photo B

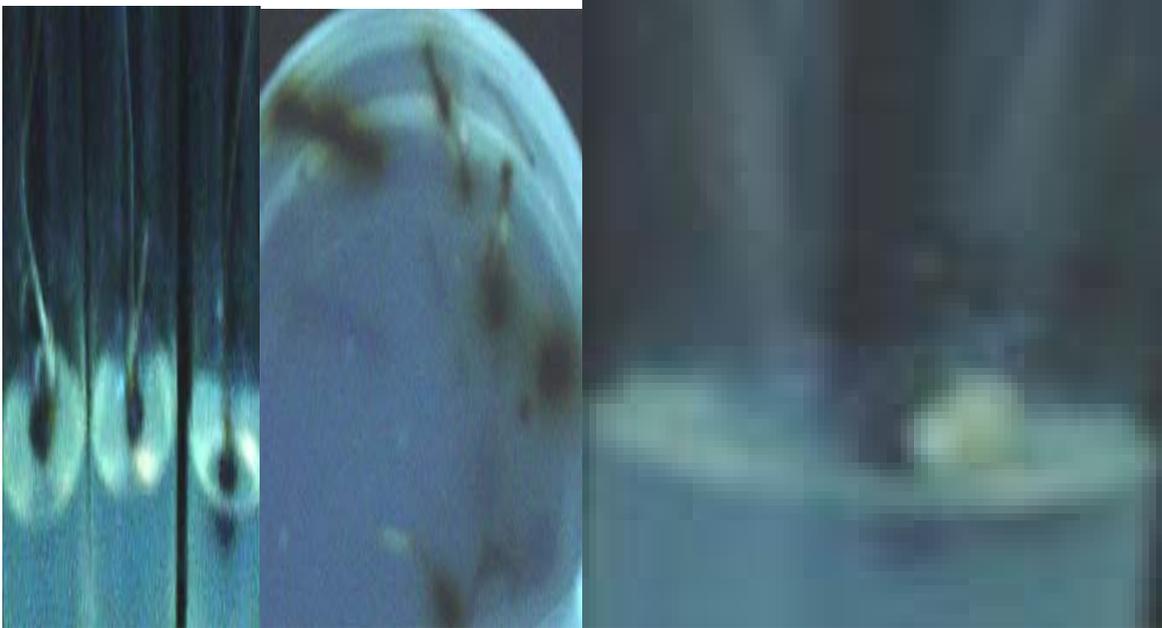


Photo C

Photo D

Lors de notre expérimentation, nous avons pu enregistrer la formation des cals de nature nodulaire,

La présence de cals à la base des micro- boutures a considérablement entravé la croissance de ces dernières, c'est-à-dire qu'elle a bloqué l'initiation racinaire et a limité les échanges entre le milieu de culture et le méristème caulinaire.

Nous nous sommes confrontés aussi aux problèmes de la chute des feuilles et brunissement d'apex des micro-boutures, qui sont probablement dûs aux fortes doses d'hormone rhizogénèse[91].

La combinaison hormonale influence le débourrement surtout lorsque le végétal devient de plus en plus jeune.

Tableau 3.7: taux de débourrement des micro-boutures (un mois après le repiquage)

	Première sub-culture		Deuxième sub-culture		Troisième sub-culture		Quatrième sub-culture	
	MSH	MAH	MSH	MAH	MSH	MAH	MSH	MAH
Nombre de micro-boutures de départ	80	120	50	80	30	12	12	12
Nombre de micro-boutures débourrées	14	90	9	50	10	10	8	11
Taux de débourrement (%)	17.5	75	18	62	33.33	83.33	66.66	91.66

MSH : milieu sans hormones - **MAH** : milieu avec hormones

3.4 Effets du type de la fragmentation sur la morphogénèse des micro - boutures de pistachier de l'Atlas :

3-4-1 Effet des sub-cultures sur la longueur moyenne de la tige :

Après un mois de culture, les micro-boutures du pistachier de l'Atlas présentent un allongement de 7 à 10 cm. En effet, on remarque que l'allongement moyen de la tige est nettement plus élevé à la deuxième sub-culture (Sb₂) avec 4,9 cm par rapport aux autres sub-cultures qui présentent des valeurs de 3,6 cm pour la sub-culture 1 (Sb₁), 3,2 cm pour la sub-culture 3 (Sb₃) et 2,8 cm pour la sub-culture 4 (Sb₄). La culture primaire (Cp) présente quant à elle la plus faible valeur (1,84 cm) (figure 3.10).

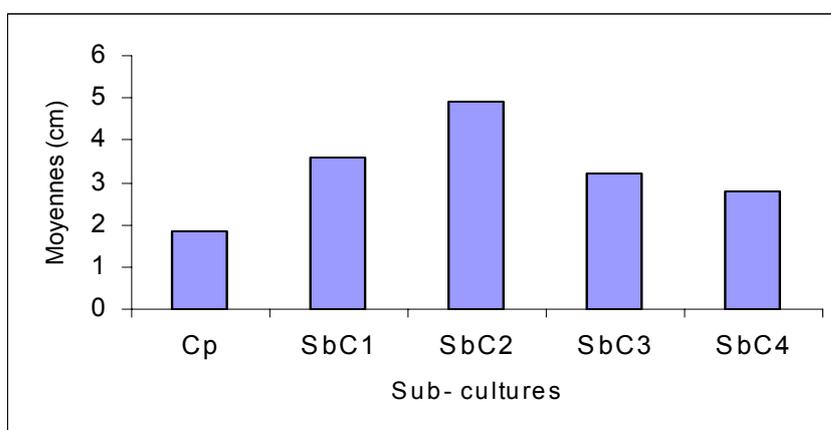


Figure 3.10: Effet des sub-cultures sur l'allongement moyen de la Tige.

Les micro-boutures après avoir eu un développement très rapide au cours des deux premières semaines, subissent un arrêt plus ou moins important de la croissance. En effet les vitro-plants obtenus après la fragmentation se dessèchent et se nécrosent, nous pensons que cela pourrait être dû à l'élévation de la température dans la salle de culture (choc thermique), ou à l'épuisement du milieu de culture à partir de la troisième semaine du repiquage des micro- boutures. Ce qui nous a poussé à faire des transferts fréquents dès l'apparition d'un dessèchement du milieu de culture, sur le même milieu frais. Les nécroses pourraient être dus aussi aux fortes concentrations en éléments minéraux, en particulier en ammonium NH_4^+ qui devient toxique et provoque le dépérissement des boutures [100].

L'analyse de l'intervalle de confiance au seuil de 5p.cent, indique qu'il

n'y a pas une différence significative entre les sub-cultures et la culture primaire (tableau 3.8). Ainsi nous constatons selon les résultats obtenus que la fragmentation favorise l'allongement des tiges du pistachier de l'Atlas. Le passage d'une subculture à une autre, n'a pas d'influence sur l'allongement des tiges.

Tableau 3.8 : Effet des sub-cultures sur l'allongement moyen de la Tige.

Culture Paramètres	Cp	SbC1	Sb C2	Sb C3	SbC4
Moyenne	1.84±0.42	3.6±0.84	4.9±2.02	3.2±1.62	2.8±1.03
p.intervalle de confiance	[1.42-2.26]	[2.76-4.44]	[2.88-6.92]	[1.58-4.82]	[1.77-3.83]

Par ailleurs [56], affirment que le choix de l'explant le plus approprié et son positionnement sur le milieu sont d'importants facteurs à considérer en vue d'une production maximale. La richesse du milieu en éléments minéraux joue un rôle très important dans l'allongement et le développement des plantules. Le milieu de [84] dilué au demi est le milieu le plus favorable à l'allongement.

D'après [48], le milieu de [84] est caractérisé principalement par une très forte teneur en azote dont le tiers est apporté sous forme réduite (ions NH_4^+) et une concentration élevée en potassium (K^+). En outre, l'azote est l'élément minéral qui favorise le développement végétatif tandis que le potassium favorise la division cellulaire.

3-4 -2 Effet des sub - cultures sur le nombre moyen de paire de feuilles :

Nous avons pris en considération le dénombrement des feuilles chez Le pistachier de l'Atlas, afin d'évaluer l'importance de la production foliaire qui constitue un critère de sélection de grande importance pour l'alimentation du cheptel ovin.

Nos observations sur la production du nombre moyen de paire de feuilles sont effectuées après un mois de culture pour chaque sub-culture. Nous avons constaté que la sub-culture 2 (Sb_2) présente le nombre moyen de paire de feuilles par vitro- plant le plus élevé (7 ,10).

La sub-culture 3 (Sb_3) présente la plus faible valeur qui est de l'ordre de 2.83 par rapport aux autres subcultures (Figure 3.11).

Au niveau de la subculture 3 (Sb_3), le suivi a été interrompu suite aux manifestations microbiennes. La contamination (bactérienne) a touché la totalité des vitro -plants, qui a induit soit des nécroses, soit un dessèchement.

Cela peut être dû soit à des bactéries latentes, qui se manifestent après plusieurs subcultures [56]. Soit aux transmissions suite à des manipulations non aseptiques [101]. Les travaux de [102] confirment cette hypothèse. Plusieurs *Bacillus* ont des formes résistantes à l'alcool, au flambage et à l'autoclavage (20 min/110°C) tels que *Staphylococcus*, *Micrococcus* ou *Lactobacillus*, contaminants classiques de la peau.

Les sub-cultures (Sb_1), (Sb_4) et la culture primaire (Cp) présentent respectivement des moyennes de l'ordre de 6, 5.63 et 5.55 (Figure3.11).

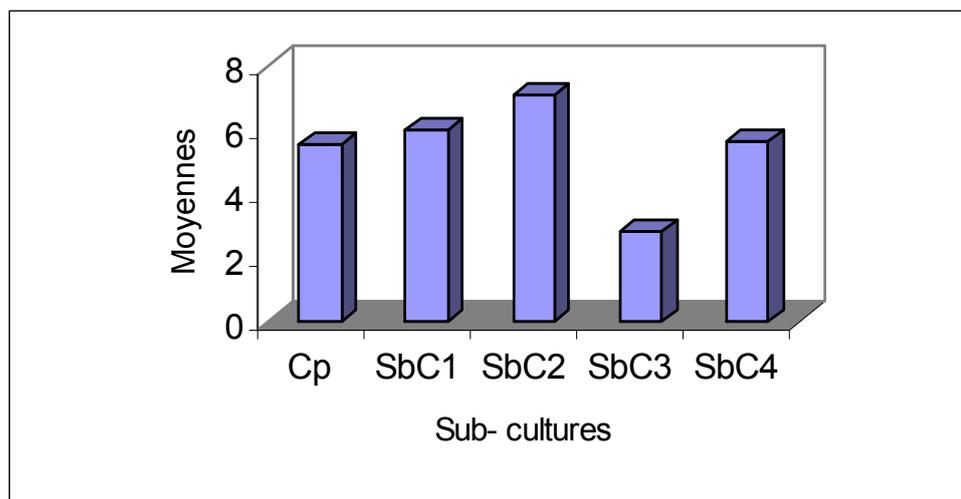


Figure 3.11: Effet des subcultures sur le nombre moyen de paire de feuilles.

Les résultats obtenus montrent qu'après un mois de culture, pour chaque

subculture, la production foliaire est presque similaire pour les 4 sub-cultures ainsi que la culture primaire.

L'analyse avec l'intervalle de confiance au risque de 0.05 (Tableau 3.9), indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les subcultures et la culture primaire (Cp).

Tableau 3.9: Effet des sub-cultures sur le nombre moyen de feuilles.

Culture Paramètres	Cp	SbC1	Sb C2	Sb C3	SbC4
Moyenne	5.55±1.6	6±1.82	7.1±1.9	2.8±1.03	5.63±1.62
p.intervalle de confiance	[3.95-7.15]	[4.18-7.82]	[5.2-9]	[1.77-3.83]	[4.01-7.26]

Nous avons quand même obtenus un bon développement du feuillage, du point vue nombre et qualité des feuilles. En effet les feuilles sont nombreuses, grandes et d'un vert vif. Sachant que le pistachier de l'Atlas est une espèce fourragère, très appréciée par le cheptel, son feuillage constitue un critère de sélection de grande importance.

En outre [52], rapportent que la culture "*in-vitro*" maintient la plante dans un état juvénile avec une végétation plus abondante et une ramification importante, de même que la richesse du milieu de culture de [84], en azote ammoniacal facteur favorisant le développement végétatif.

Les tissus et les plantules cultivées "*in-vitro*" présentent une certaine variabilité de croissance d'une culture à l'autre, ainsi le taux de multiplication et l'intervalle de temps qui sépare deux repiquages peuvent être variable[52].

Quelque soit les modalités de multiplication élongation - fragmentation ou hyper-ramification, ce type d'explant ne donne lieu, cependant qu'à une

multiplication par bourgeonnement axillaire. Nous voulons donc reproduire un nombre maximum de plantules utilisables à chaque subculture.

3-4-3 Effet des sub-cultures sur la longueur moyenne de la racine principale :

Après un mois de mise en culture et ceci pour chaque sub-culture, les tiges des vitro- plants n'ont pas émis des racines. Le milieu de culture utilisé contient de la gibbérelline et une auxine qui est l'AIB qui sont des marqueurs inhibiteurs de l'enracinement.

La rhizogenèse se résume dans le pourcentage de plantules racinées et le nombre de racines formées par plantule. Ce phénomène est expliqué par [102], qui montre que dès les toutes premières heures qui suivent la blessure faite à des plantules de vigne, de fortes augmentations sont enregistrées pour quatre marqueurs : production d'éthylène, AIA libre, O-dihydroxyphénol, et phénols, les teneurs des 3 derniers composés étant même supérieures à la base des plantules qu'à leur sommet. En même temps, l'activité peroxydasique chute. Après 12 ou 24 heures, les tendances vont s'inverser. Les premiers marqueurs ont tendance à diminuer tandis que l'activité peroxydasique augmente. Celle-ci continue à augmenter pour atteindre un sommet. A ce moment les primordias racinaires apparaissent et l'activité peroxydasique chute.

Les composés phénoliques, eux varient en sens opposé à celui de l'activité peroxydasique totale.

Ces variations dans le temps, observées par [102] en auxines AIA libres, confirmées par plusieurs autres, dont [103], peuvent expliquer pourquoi des clones présentant une capacité rhyzogénétique élevée, peuvent être associés à des hautes ou à des faibles teneurs en auxines endogènes, ces teneurs dépendent avant tout du moment où l'analyse est réalisée.

S'il est admis par tous, que l'auxine joue un rôle prépondérant dans le mécanisme de l'enracinement adventif, c'est cependant la blessure de la tige au moment du micro-bouturage qui donne le signal initial. Celui-ci peut ensuite être amplifié par l'apport d'auxine exogène.

Toutefois, cet apport doit être fourni en quantités correctes. Ainsi, [104]

montrent bien que des doses d'auxine trop faibles, comme trop fortes, appliquées à des pommiers faciles ou difficiles à raciner, diminuent de manière identique l'efficacité du traitement.

préconise de remplacer les longs traitements (15-30 jours) en présence d'auxine à faible concentration (1-2mg/l) par des traitements courts, de quelques heures à quelques jours, à des concentrations 20, 50 ou 100 mg/l. Dans ce type de traitement, les auxines naturelles AIA sont préférées aux auxines synthétiques car elle peuvent plus facilement se détoxifier [105].

Un traitement à l'obscurité durant les premiers jours (2-10 jours) de la phase d'enracinement, souvent a un effet bénéfique. Entraînant une variation de l'activité peroxydasique et de la quantité en composés phénoliques, l'obscurité a un effet sur l'enracinement [106]. Toutes les espèces peuvent réagir négativement.

D'après [107], améliore la qualité de l'enracinement, par l'absence de cals, racines fines, n ajoutant 100 mg/l de riboflavine au milieu de culture. En effet, comme l'ont mesuré [108], en la présence de la lumière, la riboflavine détruite par photo-oxydation, 90% de l'auxine IBA présente dans le milieu de culture en moins de 12 heures. Le rôle bénéfique de la riboflavine est donc d'annuler l'effet de l'auxine quand l'induction a eu lieu et que la présence d'auxine n'est plus nécessaire. A ce moment au contraire, sa présence retarde la croissance des racines.

L'apport de gibbérelline elle-même dans le milieu enracinement a très généralement un effet inhibiteur [109], [110] ont obtenu un meilleur enracinement de clones d'asperges en ajoutant une anti-gibbérelline, l'ancymidol, au milieu d'enracinement qui doit contenir des doses de sucres extrêmement élevées (80 g/l). Pourtant, d'une manière générale, l'apport de hautes concentrations en sucre a plutôt des effets négatifs sur l'enracinement.

En pratique, la solution minérale utilisée pour l'enracinement est diluée, souvent de moitié, par rapport à celle préconisée pour la prolifération. [111] signale sur pommier l'effet stimulant de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sur l'initiation et l'allongement des racines, alors que le NH_4NO_3 a un effet inhibiteur au niveau allongement. La

rhizogenèse est le phénomène d'organogenèse le plus généralement impliqué dans la multiplication végétative.

D'après [112], ces deux éléments seraient indispensables à la production des racines. Par ailleurs [113] et [114], affirment que dans la plus part du temps, la présence de bourgeons est nécessaire à la rhizogenèse. Elle se traduit par l'obtention de meilleurs résultats au niveau du pourcentage des boutures enracinées, de la cinétique d'apparition des racines néoformées et de leur nombre.

Comme les bourgeons, la feuille exerce ordinairement un effet stimulateur sur la rhizogenèse. Sa présence à coté du bourgeon est obligatoire pour la réussite du micro-bouturage.

Selon [48], la néoformation de racines serait déclenchée par l'action d'une substance mobile synthétisée par les feuilles, en suite, elle migre vers la base de la tige. Cette substance hypothétique spécifique à la rhizogenèse avait été appelée "rhizocaline", celle-ci se trouve en association avec les auxines selon [113] et [114].

Par ailleurs la présence de l'un de ces organes serait nécessaire pour la néoformation de l'autre.

Ainsi la néoformation racinaire, semble être en relation avec la juvénilité du matériel végétal et l'aptitude rhizogène de l'espèce. La fragmentation est une méthode de rajeunissement du matériel végétal. La juvénilité réapparaît avec l'apparition de l'aptitude rhizogène du végétal. En effet c'est au niveau de la troisième sub-culture et de la quatrième sub-culture que le pourcentage d'enracinement s'améliore.

3.5 Effets des hormones de croissance sur la Callogenèse :

Dans cette partie, nous allons étudier l'influence des combinaisons d'hormones de croissance à différentes concentrations en auxines (AIB, 2,4-D et ANA) et Cytokinine (kinétine et BAP) ainsi que les différents types d'explants utilisés

G.H	C	B	A	A	A	A	A
------------	---	---	---	---	---	---	---

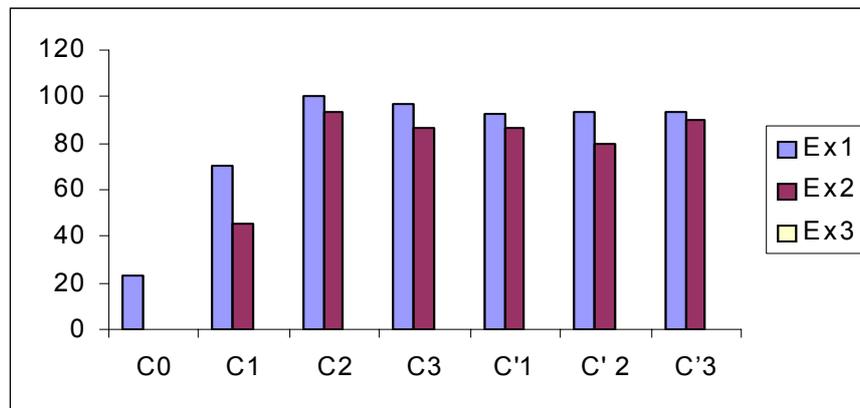


Figure 3.12: Effet des différentes combinaisons et concentrations en Auxines et Cytokinines combinées et les différents types d'explants sur le pourcentage moyen des cals. (EX1 : entre-nœuds, EX2 : feuilles et EX3 : racines)

D'après les résultats obtenus, (Tableau 3.11 et la figure 3.12), le pourcentage des cals obtenus à partir d'entre-nœuds ($EX_1=(100\pm 00)\%$) est nettement supérieur à celui obtenu par les feuilles ($EX_2=(93.33\pm 11.55)\%$) pour la concentration C_2 , (concentration qui s'est avérée la meilleure).

Concernant le facteur 2, les différentes concentrations entraînent une action très hautement significative au risque $\alpha=5\%$, dont les plus grands pourcentages sont représentés par la combinaison tri-hormonale (BAP/AIB/ANA) correspondant à la concentration C_2 .

Les résultats obtenus, ont montré qu'il est possible d'induire une callogenèse à partir de divers explants prélevés sur des plantules (entre-nœuds et feuilles). Cette callogenèse est cependant irrégulière, d'où des dimensions et des couleurs variables des cals produits. Ces derniers se sont également avérés non caulogènes. Ceci indique que la composition minérale et hormonale des milieux testés n'est pas optimale. [135] et [136].

En règle générale, on peut admettre que ce sont les plantes jeunes qui fournissent les explants les plus réactifs, les potentialités diminuant avec l'âge. Les explants constitués de tissus différenciés, tels que les fragments de tige, de racines, de feuilles, de fleurs, de fruits, etc., où la mise en culture devra provoquer un retour en

arrière complet pour redonner aux cellules la capacité d'entrer d'abord en division, puis, ensuite, de retrouver un pouvoir organogène (Figure 3.13, Photo A).

Concernant le facteur 2, les différents milieux entraînent une action très hautement significative, dont les plus grands pourcentages sont représentés par la combinaison hormonale "2,4-D - kinétine".

Ces pourcentages varient entre $(100.00 \pm 0.00)\%$ et $(96.67 \pm 5.77)\%$ obtenus respectivement par les concentrations C_2 et C_3 et sont meilleurs que ceux obtenus par la combinaison hormonale (2.4D-kinétine) ou (2.4D/ BAP); dont le pourcentage des cals varie de $(80.00 \pm 10.33)\%$ à $(90.01 \pm 3.32)\%$ obtenus respectivement par les concentrations C'_2 et C'_3 .

Le milieu témoin présente la plus faible aptitude à la callogenèse. Ils sont de l'ordre de $(23.22 \pm 10.00)\%$ pour l'explant EX_1 (Entre-nœud) et de (00.00 ± 00.00) pour l'explant EX_2 (Feuilles) et EX_3 (Racines) (Figure 3.13, Photo B).

L'effet des deux facteurs combinés sur le pourcentage des cals montre aussi une action très hautement significative dont nous pouvons tirer les observations suivantes :

3.5.1.1 Effet des différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance combinées sur le pourcentage des cals issus d'entre-nœuds :

Le pourcentage des cals varie de $(23.00 \pm 10.00)\%$ à $(100.00 \pm 0.00)\%$. Il est obtenu respectivement par les concentrations C_0 , et C_2 . Par conséquent, la concentration C_2 donne une bonne aptitude de callogenèse que les autres concentrations.

3.5.1.2 Effet des différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance combinées sur le pourcentage des cals issus de feuilles :

Le plus grand pourcentage de cals $(93.33 \pm 11.55)\%$ est représenté par la concentration C'_3 et le plus petit $(46.67 \pm 11.55)\%$ est représenté par la

concentration C_1 . Nous remarquons que la concentration $C_0 = (0,00 \pm 0,00) \%$ ne présente aucune aptitude à donner des cals. Les autres concentrations présentent des valeurs intermédiaires.

3.5.2 Effet des milieux de culture avec les différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance combinées sur la surface moyenne des cals :

L'analyse de la variance est indiquée dans le tableau 3.12 (Annexe1). Ce tableau nous révèle que la variance facteur 1 et la variance facteur 2 ainsi que la variance interfactorielle présentent une action très hautement significative sur la surface moyenne des cals. Par conséquent, les différents types d'explants ainsi que les modifications de combinaisons et concentrations en régulateurs de croissance entraînent un effet très hautement significatif sur la surface moyenne des cals.

Un mois après la mise en culture, on a obtenu selon le test de NEWMAN – KEULS au seuil de signification $\alpha = 5\%$ (tableau 3.13).

Tableau 3.13 : Effet des milieux de culture avec les différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance combinées sur la surface moyenne des cals.

F1	F2	C_0	C_1	C_2	C_3	C'_1	C'_2	C'_3
EX1		0.56 ± 0.43	0.82 ± 1.52	1.84 ± 0.37	1.70 ± 1.27	1.27 ± 0.79	1.35 ± 0.91	1.28 ± 0.94
EX2		$0,00 \pm 0,00$	0.71 ± 1.21	1.60 ± 1.23	1.44 ± 0.46	1.28 ± 0.99	1.24 ± 0.88	1.29 ± 0.70
G. H.		D	C	A	A	B	B	B

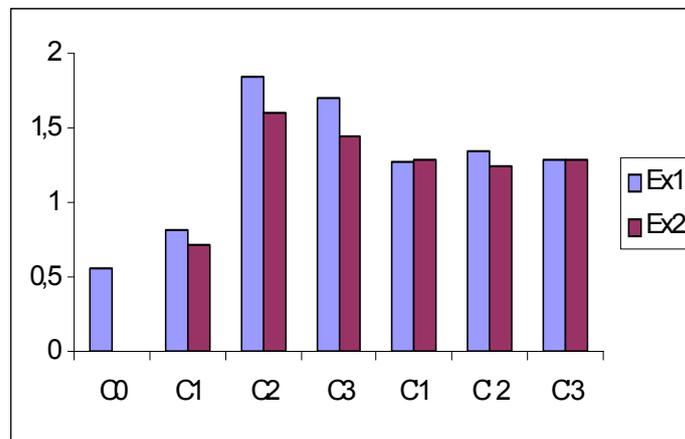


Figure 3.14: Effet des milieux de culture avec les différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance combinées sur la surface moyenne des cals. (EX1 : entre-nœuds, EX2 : feuilles et EX3 : racines)

Un mois après la mise en culture, les résultats montrent que la surface moyenne des cals issus des entre-nœuds (qui est de $(1.26 \pm 0.89) \text{ cm}^2$) est nettement supérieure à celle obtenue par les feuilles (qui est de l'ordre de $(1.08 \pm 0.79) \text{ cm}^2$) (tableau 3.13 et figure 3.14).

Pour le facteur 2, les différentes concentrations utilisées ne réagissent pas de la même manière sur la surface moyenne des cals. Les plus grandes surfaces moyennes des cals sont obtenues par combinaisons tri-hormonale (BAP/AIB/ANA) avec une valeur maximale représentée par la concentration C₂ et C₃ = $(1.72 \pm 0.8) \text{ cm}^2$ et $(1.57 \pm 0.86) \text{ cm}^2$ et une valeur minimale représentée par la concentration C₀ = $(0.56 \pm 0.43) \text{ cm}^2$ (figure 3.13, photo B Bis).

Les surfaces moyennes des cals obtenues par la combinaison (2.4D- kinétine) viennent en deuxième position. Elles varient entre $(1.27 \pm 0.89) \text{ cm}^2$ et $(1.29 \pm 0.82) \text{ cm}^2$ qui sont obtenues respectivement par les concentrations C₁, et C₃. Le milieu témoin présente un pouvoir callogène nettement faible à comparer avec les milieux contenant des hormones de croissances. La surface moyenne obtenue sur des cals d'entre - nœuds (EX₁) est de l'ordre de $(0.56 \pm 0.43) \text{ cm}^2$; alors que pour les feuilles (EX₂), il ne présente aucun pouvoir callogène.

3.5.2.1 Effet des milieux de culture avec les différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance combinées sur la couleur et la texture des cals issus d'entre-nœuds :

Les différents milieux de culture utilisés au cours de cet essai donnent des cals de couleur et texture variés (tableau 3.14) (voir figure 3.13).

Nous remarquons que les cals issus d'entre noeuds diffèrent par leur couleur et leur texture en fonction des milieux et leurs concentrations en hormones de croissance.

Les cals mis à l'abri de la lumière sont généralement de couleur beige à jaune, de texture friable à consistance molle, caractéristiques morphologiques des cals embryogènes d'après [65] (Figure3.13, Photo C).

Contrairement aux cals exposés à la lumière, ces derniers sont de couleur beige-vert à blanc-vert. Avec une texture noduleuse de consistance molle, caractéristiques morphologiques de cals non embryogènes. Ces derniers sont aptes à être conduit vers une organogenèse bien définie, car la couleur verte indique de la présence d'une initiation de bourgeons.

Le milieu témoin donne des cals bruns dont la surface est trop petite qui finira par se dessécher, caractéristiques morphologiques des cals non embryogènes .

Tableau n° 3.14 : Couleur et texture des cals issus d'entre-noeuds des différents milieux.

Milieux	Aspect à la lumière	Aspect à l'obscurité	Importance du cal
M ₀	Explants Bruns-Desséchés	Explants Bruns- Desséchés	/
M ₁	Friable et granuleux, parfois dur de couleur Beige verte	Beige foncé ,Friable de consistance peu ferme de couleur Beige foncé	Faible
M ₂	Compact, granuleux ou friable de couleur verte	Compact, granuleux ou friable, de couleur blanche ou beige	Important
M ₃	Friable et granuleux, parfois dur de couleur verte	Compact, granuleux ou friable, de couleur blanche ou beige translucide	Important
M' ₁	Compact, granuleux ou friable de couleur verte translucide	Compact, granuleux, friable de couleur beige à brune	moyen

M' ₂	Friable et granuleux, parfois dur de couleur verte	Compact, friable et granuleux Peu dur, de couleur beige et brune	moyen
M' ₃	Compact, granuleux ou friable de couleur verte	Beige vert - Noduleux de consistance molle	Important

Figure 3.13

<p>Photo A</p> <p>Aptitude des explants à la callogenèse.</p>	<p>Photo B</p> <p>Inaptitude des explants à la callogenèse(feuilles).</p>	<p>Photo B Bis</p> <p>Inaptitude des explants à la callogenèse (entre – nœuds).</p>
<p>Photo C</p> <p>La Couleur de cal obtenu sur milieu avec hormones.</p>		

<p style="text-align: center;">Photo D</p> <p>Morphologiques des cals embryogènes exposés à l'obscurité.</p>	<p style="text-align: center;">Photo E</p> <p>Morphologiques des cals embryogènes exposés à la lumière.</p>
--	---

Figure 3.13

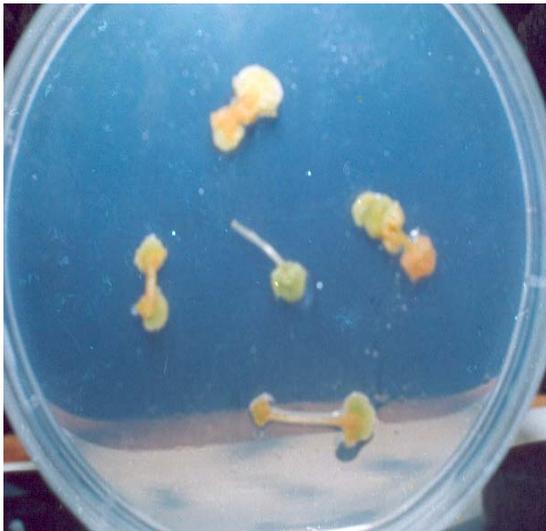
Photo A
bis

Photo B



Photo B

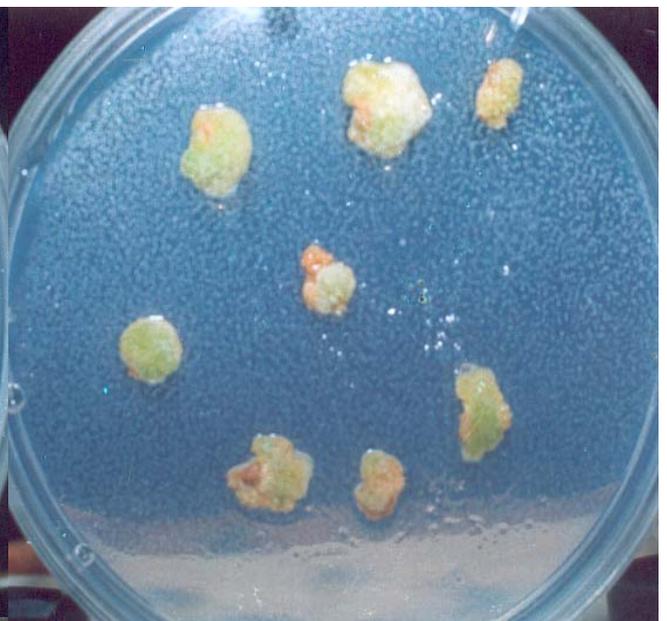
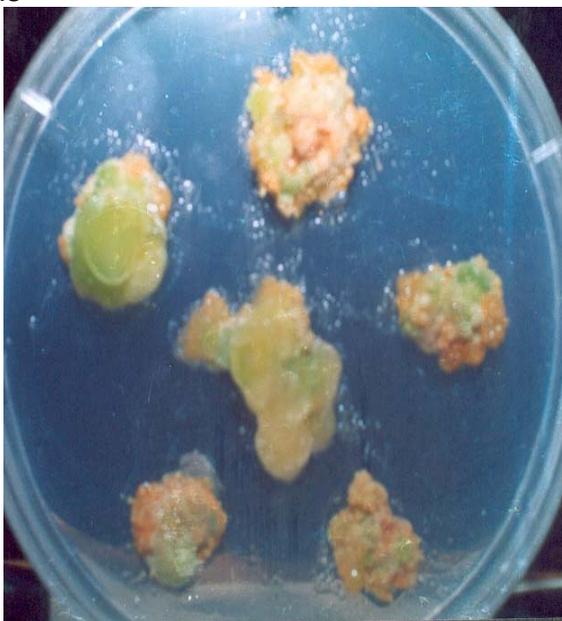


Photo C

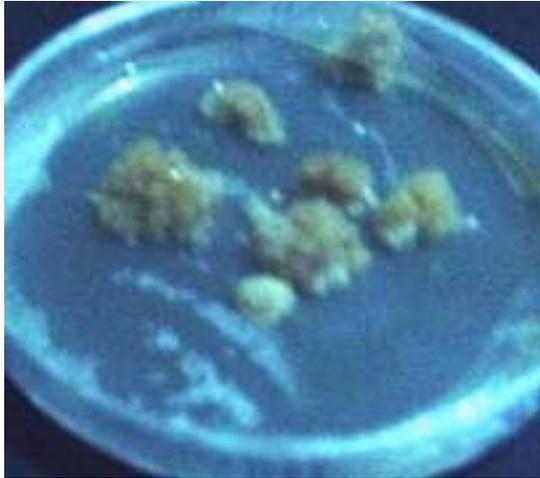


Photo D



Photo E

3.5.2.2 Effet des milieux de culture avec les différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance combinées sur la couleur et la texture des cals issus de feuilles :

Les cals issus des feuilles diffèrent par leur couleur et leur texture selon les conditions de culture où ils se trouvent (tableau 3.15).

Cependant, les cals mis à l'abri de la lumière ont donné de cals de couleur beige de texture friable, caractéristiques morphologiques des cals embryogènes.

Contrairement à ceux exposés à la lumière, qui sont de couleur blanche verdâtre de texture noduleuse peu compacte, caractéristiques morphologiques de cals caulogène. Le milieu témoin, donne des cals bruns et desséchés ce qui indique la présence de cellules mortes.

D'après nos résultats, nous constatons que l'aptitude à la callogenèse diffère non seulement en fonction des milieux de culture utilisés mais aussi selon le type d'explant utilisé. Les entre-noeuds montrent une meilleure aptitude à la callogenèse par rapport aux feuilles.

Selon [118], [119];] et [79], les fragments prélevés à différents niveaux de la

plante ne donnent pas les mêmes résultats. Cela est dû à l'état physiologique interne des cellules de l'explant. Cette hypothèse a été confirmée par et [118], [120] et [90]. [121]et[122], confirment que les cellules initiatrices sont déjà différenciées mais dépourvues de capacité embryogène.

En outre, d'après [123] et [124]; les bouleversements de comportement semblent être essentiellement liés aux coupures des corrélations entre l'implant et la plante mère ; ainsi qu'à son nouvel environnement (tableau 3.15).

Tableau 3.15 : Couleur et texture des cals issus de feuilles des différents milieux

Milieux	Aspect à la lumière	Aspect à l'obscurité	Importance du cal
Mo	Explants Bruns- Desséchés	Explants Bruns- Desséchés	/
M ₁	Friable de couleur Blanc – verdâtre	Beige et Friable	Faible
M ₂	Compact, Blanc - verdâtre	Compact, granuleux ou friable, de couleur blanche ou beige	Important
M ₃	Friable et granuleux, Beige foncé	Granuleux et friable, parfois dur Couleur beige, blanc ou brun	Important
M' ₁	Compact, granuleux , de couleur verte translucide	Compact, granuleux, friable de couleur beige à brune	moyen

M' ₂	Friable et granuleux, de couleur verte	Compact, friable et granuleux Dur, de couleur beige et brune	moyen
M' ₃	Compact, granuleux ou friable de couleur verte blanc de consistance peu ferme	Beige jaunatre Noduleuse de consistance peu compacte	Important

3.6 Etude histologique Origine des néoformation des bourgeons :

Partant de différents explants de pistachier de l'Atlas, entre-noeuds, feuilles, on a obtenu, en présence de différentes concentrations d'hormones de croissance, des cals noduleux, ces dernier sont définis par [125] comme des masses cellulaires denses et indépendantes formant des unités sphériques cohésives.

Les coupes histologiques de ces cals nodulaires, nous ont permis de mettre en évidence des foyers de cellules hautement actives (figure3.15, Photo A).

Ces unités méristématiques se distinguent par un cytoplasme assez dense et granuleux résultant de la présence de nombreuses protéines de réserves amylacées, un noyau volumineux et un nucléole dense, un épiderme constitué, soit de cellules riches en phénols, soit de cellules en division active. Ce type de cellules a toutes les caractéristiques de cellules embryogènes (figure3.15, Photo. B).

Par ailleurs, nous observons la formation d'un massif cellulaire bien individualisé délimité par un dépôt de substances polysaccharidiques.

Des assises cellulaires plus denses sont visibles à la périphérie des nodules. Ces assises cellulaires sont formées de cellules alignées en division active qu'on appelle communément : le cambium. (figure3.15, Photo. C).

Les massifs cellulaires se sont développés très rapidement, pour former le centre vasculaire. Des amyloplastés sont présents dans le parenchyme nodulaire en périphérie du centre de vascularisation

(figure3.15, Photo. D).

La coupe histologique d'un cal nodulaire montre la néoformation d'un bourgeon à proximité du centre de vascularisation du nodule. Ultérieurement, une néovascularisation s'établit entre les primordia foliaires et le centre de vascularisation. (Figure 3.15, E). Parfois, un deuxième bourgeon est régénéré, situé sur le même plan que le premier. Il s'agit d'un bourgeon axillaire néoformé (Figure 3.15, F).

Figure 3.15

<p>Foyer cellulaire hautement actif.</p>	<p>Cellules embryogènes</p>
<p>Cellules alignées : Cambium</p>	<p>Massif cellulaire donnant le centre de vascularisation.</p>
<p>Formation de primordia foliaires.</p>	<p>Néofomation d'un bourgeon axillaire.</p>

Figure 3.15

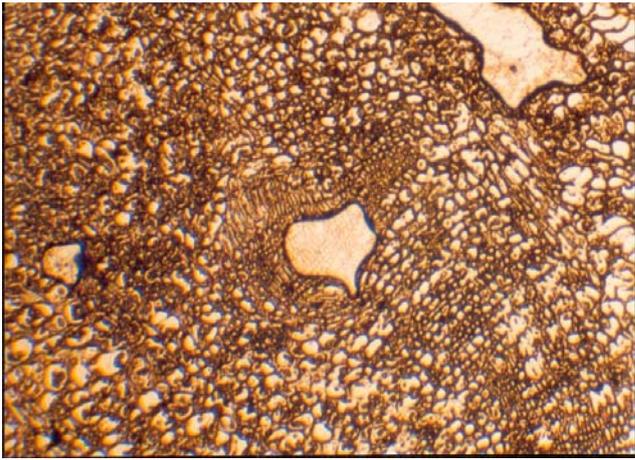


Photo A

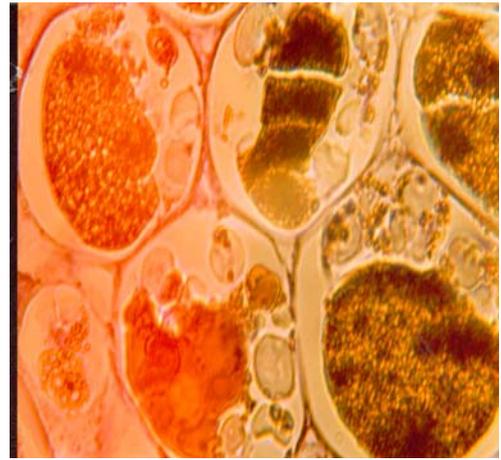


Photo B

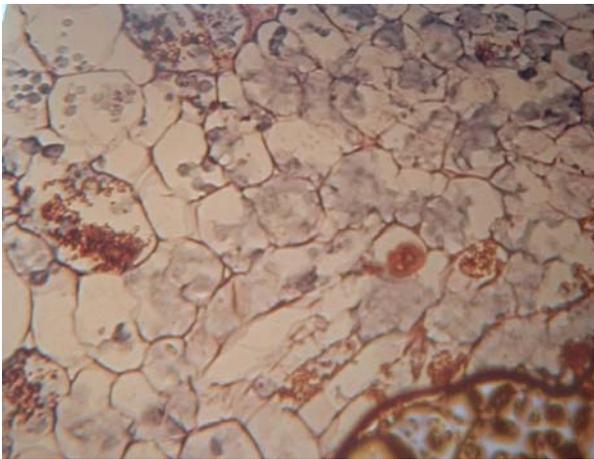


Photo C

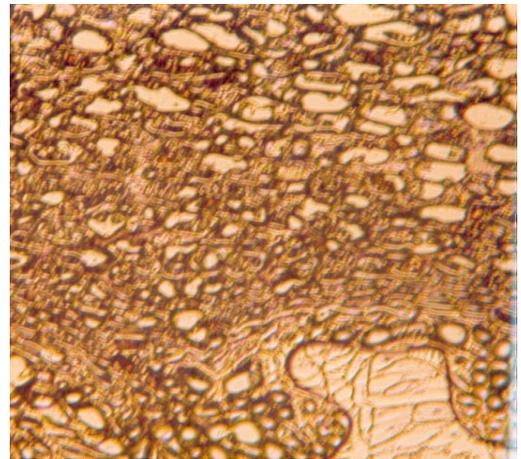


Photo D

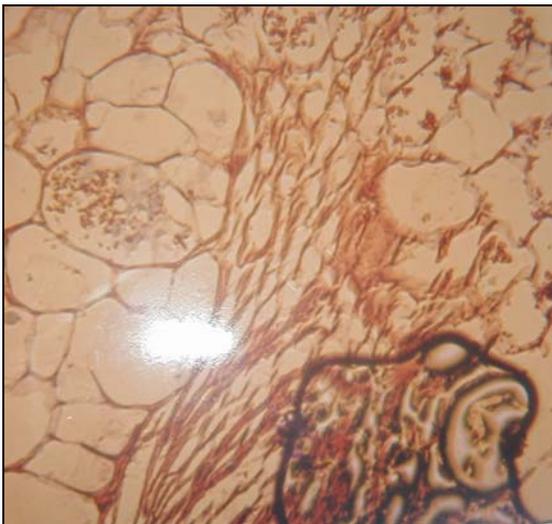


Photo E

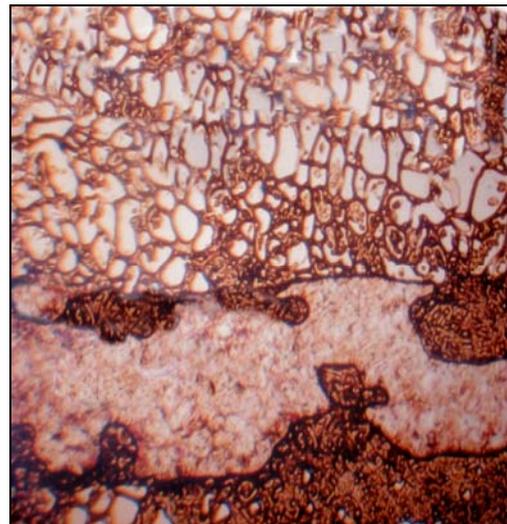


Photo F

CONCLUSION

Les résultats obtenus lors de nos essais et ceux obtenus sur d'autres essais relatifs à la stérilisation du matériel végétal ont montré l'importance de la désinfection pour l'obtention d'une culture stérile. Dans nos essais, une désinfection à l'hypochlorite de calcium à une concentration de 6 p.100 pendant 15 mn n'a pas donné de bons résultats faute d'agents pathogènes et endogènes que contient l'espèce.

Les contaminations les plus courantes sont d'origine bactérienne et cryptogamique. Les contaminations cryptogamiques sont en nombre moindre et maîtrisable à comparer avec les contaminations bactériennes. Selon [101], l'apport dans les milieux de culture classiques de 265 mg/l de peptone (Bacto-Difco) et de 88 mg/l d'extraits de levure (Bacto-Difco) permettait l'expression de bactéries latentes et l'élimination aisée des cultures contaminées.

En ce qui concerne la germination, un gros problème d'hétérogénéité et de présence de graines vides dans le lot de semences employé, s'est posé. Il nous a fallu tout d'abord entreprendre des essais sur la germination et la levée de dormance des graines de pistachier, afin de remédier aux problèmes d'hétérogénéité des plantules rencontrés lors de l'expérimentation. Les expériences ont montré que cette hétérogénéité est due à la dormance primaire d'origine embryonnaire. Un prétraitement au froid (2 à 4° C) humide de 3 à 4 semaines a permis de lever la dormance des graines et d'obtenir une population homogène de jeunes semis. Notons que la méconnaissance de cette dormance s'est souvent traduite par un gaspillage important de semences. La réalisation d'un bon prétraitement est souvent difficile pour le pépiniériste qui ne dispose pas d'installation nécessaire. De plus le mode de conservation des graines est un paramètre important dans l'expression de la germination ultérieure des graines. Il serait donc utile d'adopter l'idée d'intégrer le traitement de levée de dormance au processus de conservation, et de ce fait, avoir des graines sèches, prêtes à germer. Pour ce qui est des graines vides, une étude approfondie serait intéressante pour bien comprendre les différentes étapes du cycle reproducteur qui conduiraient à l'obtention d'une semence viable.

Au terme de cette étude, et sur la base des résultats obtenus, nous suggérerons ce qui suit pour la production de plants du pistachier :

- Par voie de stockage la conservation des graines de pistachier de l'Atlas, doit se faire à une température comprise entre 2 et 4°C pendant une durée d'un mois.

La connaissance des caractères propres du matériel végétal induit en multiplication un intérêt primordial, car la vitro propagation, par le biais des milieux nutritifs, les hormones de croissance et l'environnement artificiel des cultures peut déclencher, orienter et optimiser une organogenèse.

C'est pourquoi, la relation "milieu de culture- organogenèse d'un matériel végétal" est très étroite.

En effet, en absence de références bibliographiques sur la callogenèse chez le pistachier de l'atlas, les différentes combinaisons en hormones de croissances testées dans le milieu MS (1962) n'ont pas conduit à un bourgeonnement néoformé, qui présente un grand intérêt pour la recherche des variants somaclonaux.

La combinaison cytokinine /auxine (AIB-BAP-ANA) s'est avérée favorable pour la callogenèse. Contrairement à la combinaison (2-4D-Kinétine).

Le milieu de base (MURASHIGE et SKOOG 1962, dilué de moitié avec hormones) utilisé pour nos essais, est le plus favorable pour la longueur de vitro.

Il est important de souligner qu'une bonne réaction morphogénétique des explants nécessite la réunion de certaines conditions à savoir:

- L'état sanitaire du matériel végétal: celui ci est décisif pour l'optimisation du nombre d'explants en culture.

- L'environnement (photopériode- température): qui exerce un effet considérable sur le bon développement des cultures.

- La composition du milieu de culture a un effet important sur le bon déroulement du processus morphogénétique.

- Les régulateurs de croissance: l'emploi des différents régulateurs de croissance séparément ou en diverses combinaisons s'est révélé efficace pour l'induction de la néoformation caulogène et callogène.

-L'âge du pied mère: l'âge du matériel végétal sur lequel est prélevé l'explant est un élément très important pour la réussite de la culture.

Nous nous sommes aussi orientés vers la recherche d'une méthode de fragmentation appropriée, selon l'aspect des vitro- plants.

Quelque soit la modalité de multiplication, fragmentation en micro- boutures, isolement des hyper- ramifications ou fragmentation de touffes, la multiplication de cette espèce se fait toujours par le bourgeon axillaire. Ainsi, on peut dire que la fragmentation en micro- boutures est la méthode de multiplication qui donne le plus grand nombre de fragments donc de vitro- plants.

La technique de l'embryogenèse somatique s'est révélée plus ou moins satisfaisante. L'apparition sporadique d'embryons au cours de nos expériences suggère bien que les cals obtenus possèdent un potentiel embryogène dont l'expression est limitée par des conditions de culture non optimales. Il y aurait également d'autres facteurs en cause, notamment l'utilisation d'explants présentant des cicatrices. Il n'en demeure pas moins, que le travail effectué a mis en évidence des aptitudes callogènes du pistachier de l'atlas. Ceci constitue une base de travail pour les recherches dans ce domaine.

En effet, de la totalité des explants testés pour la callogénèse, nos observations ont permis de noter que les entre – nœuds sont plus callogènes que les feuilles, contrairement aux racines et cotylédons qui ne sont pas du tout callogènes faute de la libération des phénols. Par conséquent un matériel juvénile réagit mieux qu'un matériel adulte.

Une coupe et une analyse histologique plus approfondies des cals nodulaires seraient nécessaires pour montrer les étapes manquantes de la formation de l'embryon somatique.

ANNEXE 1

Tableau 3.1 : Analyse de la variance de l'élongation moyenne des vitro- plants après un mois de culture.

	SCE	DDL	Carres Moyens	Test F	Prob(P)	ET	CV(%)
Variance totale	173.79	149	1.17				
Variance facteur 1	31.83	1	31.83	50.43	0.0000		
Variance facteur 2	7.54	4	1.88	2.98	0.0210	0.79	25.3
Variance inter $F_{1,2}$	46.05	4	11.51	18.24	0.0000		
Variance Résiduelle	88.37	140	0.63				

Tableau 3.3 : Analyse de la variance de nombre moyen de noeuds par bourgeons après un mois de culture.

	SCE	DDL	Carres Moyens	Test F	Prob(P)	ET	CV(%)
Variance totale	105.97	149	0.71				
Variance facteur 1	0.24	1	0.24	0.44	0.5149		
Variance facteur 2	8.17	4	2.04	3.76	0.0063	0.74	37.1
Variance inter $F_{1,2}$	21.43	4	5.36	9.85	0.0000		
Variance Résiduelle	76.13	140	0.54				

Tableau 3.5 : Analyse de la variance nombre moyen de feuilles par plantule après un mois de culture.

	SCE	DDL	Carres Moyens	Test F	Prob (P)	ET	CV(%)
Variance totale	2787.50	149	26.15				
Variance facteur	0.04	1	0.04	0.00	0.8653		
Variance facteur	150.20	4	30.40	1.30	0.2342	4.9	120.6
Variance inter	237.50	4	50.20	2.30	0.0810		
Variance Résid	2420.00	140	19.00				

Tableau 3.10: Effets des milieux de culture avec les différentes combinaisons et concentrations en auxines et Cytokinines combinées et les différents types d'explants sur le pourcentage moyens des cals

	DDL	S.C.E.	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V.
Var. Totale		103411,39	1752,74				
Var. Facteur 1	2	13399,77	13399,77	43,15	0,0000		
Var. Facteur 2	6	60728,93	6747,66	21,73	0,0000		
Var. Inter F ₁₋₂	12	16861,90	1873,54	6,03	0,0000		
Var. Résiduelle	39	12420,80	310,52			17,62	27,8%

Tableau 3.12: Effets des milieux de culture avec les différentes combinaisons et concentrations en auxines et Cytokinines combinées et les différents types d'explants sur la surface moyenne des cals

	DDL	S.C.E.	Carres moyens	Test F	Proba	E.T.	C.V.
Var. Totale	59	98730,15	1673,39				
Var. Facteur 1	2	6795,36	6795,36	29,84	0,0000		
Var. Facteur 2	6	7111,35	7901,82	34,92	0,0000		
Var. Inter F ₁₋₂	12	11708,31	1300,92	5,71	0,0000		
Var. Résiduelle	39	9110,13	227,75			15,09	27,1

ANNEXE 2

Technique Histologique

1-La fixation

Glutaraldehyde – Paraformaldéhyde - caféine se prépare avec des solution dans l'ordre suivant:

- Tampon phosphate de sodium à 0.2 M pH neutre 50 ml
- Paraformaldéhyde à 10% 20 ml
- Glutaraldehyde à 25% 4 ml
- Caféine 1 g
- Eau distillée 26 ml

Préparation du tampon phosphate pH 7.2 à 0.2 M

- Solution A: $\text{Na H}_2 \text{P O}_4$ anhyde 24 g
- Eau distillée 100 ml
- Solution B: $\text{Na H}_2 \text{P O}_4 \cdot 12 \text{ H}_2 \text{O}$ 7.169 g
- Eau distillée 100 ml

Solution tampon:

- Solution A 28 ml
- Solution B 72 ml

Préparation de la formaldéhyde à 10%

- 2 g de paraformaldéhyde dans 20 ml d'eau distillée - chauffer à 60-65°C jusqu'à dissolution
- ajouter quelques gouttes de soude N jusqu'à obtenir la limpidité et laisser refroidir

2-La déshydratation

- Ethanol 70°30mn
- Ethanol 70° 1H
- Ethanol 95° 15mn
- Ethanol 95° 30mn
- Ethanol 100..... 15mn sous vide
- Ethanol 100 1H

3-L'imprégnation

- Résine de base 50 ml
- Activateur 0.5 g

Agiter jusqu'à dissolution de l'activateur

Imprégnation:

- 1^{er} bain 15 mn sous vide
- 2^{eme} bain toute la nuit

4-L'inclusion

Le kit d'inclusion se compose de 15 ml de milieu d'imprégnation auquel on ajoute 1 ml de durcisseur.

5-Coloration

5.1. Coloration P.A.S- hématoxyline de GROAT

Elle permet de colorer l'amidon en rouge, le noyau en gris clair et les nucléoles en noir.

- hydrolyse par l'acide périodique (à 1%) 5 mn
- lavage à l'eau courante
- réactif de Schiff à l'obscurité 10 mn
- hématoxyline de GROAT 4mn-
- lavage à l'eau courante puis à l'eau distillée
- déshydratation sur une platine chauffante
- montage à l'EUPARAL

Préparation de l'acide périodique Schiff (P.A.S)

- 1 g de fushine basique dans 200 ml d'eau bouillante, laisser refroidir à 50°C, puis filtrer.
- A 30°C ajouter 2 g de métabisulfite de sodium anhydre et 20 ml d'HCl
- Ajouter 0.5 g de charbon actif et filtrer rapidement. A utiliser à l'abri de la lumière.

Préparation de lhémétoxyline de GROAT

Solution A: dissoudre 1 g d'alun de fer et d'amonium ($\text{NH}_4 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) dans 50 ml d'eau distillée y ajouter 0.8 ml d'acide sulfurique.

Solution B: dissoudre 0.5 g d'hématoxyline dans 50 ml d'éthanol à 95°.

Mélanger A + B puis filtrer.

5.2. Coloration' P.A.S -Aniline blue black

Elle colore les parois et les composés polysaccharidiques dont l'amidon en rouge, les noyaux et les nucléoles en bleu vert, les réserves protéiques en bleu noir.

- hydrolyse par l'acide périodique à 1% 5 mn
- lavage à l'eau courante
- coloration au réactif de Schiff à l'obscurité 10 mn
- lavage à l'eau courante
- coloration à l'aniline blue black dans une étuve à 50°C 7mn
- lavage rapide à l'eau courante puis à l'acide acétique à 7%
- déshydratation par séchage rapide sur platine chauffante puis montage.

Préparation de l'aniline blue black

Naphtol blue black à 1% dans 7% d'acide acétique.

REFERENCES

1. AJAHI F., TOPOUZIS D., ANAZA S., PRADERVAND P., EPHSON B, « arrêter le désert .Rev n° 3 l'agriculture africaine; (1990), 17-21,.
2. BOUDY P., : Economie forestière nord- Africaine : monographies et traitements des essences forestières. Ed.larose. paris.27, ,(1950), : 417-419.
3. MULLER C., BONNET- MASIMBERT M et LARROPE E., nouvelles voies dans le traitement des graines dormantes de certains feuillus : hêtre , frêne, merisier. Rev . for. Fr., 42(3) ,(1990), 329-345.
4. BONGA JM., “Végétative propagation tissue and organ culture as an alternative to rooting cutting”, (1982),.
5. FRANCKET A., :Rajeunissement et micropropagation des ligneux :colloque international sur la culture in vitro des essences forestières IUFRO, Fontaine bleue, Ed. AFOCEL ,(1982), 55-63.
6. HAISSIG B.E ., DAVIS TD. et REMENSCHIEDER D.E., : Recherching the controls of adventitious rooting.Physiol Plant., 84; (1992:3),10-317.
7. JAY- ALLEMAND C., CAPPELLI P and CORNU D., - Root developmentof in vitro hybrid walnut microcutting in a vermiculite- containig gerlite medium.Scientia horticulturae, 51, (1992), 335-342.
8. ZIMMERMAN R.H., Application of tissue culture propagation to woody plants: tissue culture in forestry;(1985).
9. Agence nationale pour la conservation de la nature : le pistachier de l'Atlas., (1993).
10. QUEZEL P. et SANTA S., -Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris CNRS. Tome 1 et 2 (1962),;1170p,.
11. ANONYME, journée d'étude sur les zones arides et sahariennes à Ghardaia, ,(2002),34-41.
12. GUESSOUM A.,:Etude phénologique du pistachier (pistacia véra L) dans un verger de Beni Tamou wilaya de Blida.Thèse d'Ing-INA. Alger , (2001),.44p.
13. CARRA J ., : l'affinité du pistacia vera sur pistacia atlantica. Annals de l'institut agricole d'algerie, tome v-fascicule.11 ,(1950), 1-4.
14. LARUE M., - le pistachier en Iran, fruit d'outre mer, volume 15, n°3 ,(1960),139-142.

15. SPINA. P, PENNISI. F,: La culture du pistachier en Sicile. Rev. Orto floro fructicult. Ital; ,(1957), 533- 557, Henke R. R. et Humes K. W. Ed Plenum publishing corporation.
16. BROUSSE G.,: Etude bibliographique sur la nature du pistachier .Polycopié .INA El Harrach ,(1974), 40 p.
17. GRUNDWAG M., - Seed set in some pistacia L.(anacardiacea) species after inter and intra specie pollinisation.israel j.bot24 ,(1975), 201-208.
18. EVREINOFF.A.V,:Notes sur le pistachier. Pomologie Française, vol 1,(1964),115-123.
19. KHELIL. A, KELLAL. A, : Possibilité de culture et délimitation des zones à vocation pistachier en Algérie. Fruits, Vol. 35 ,(1980),177- 185.
20. AOUDJIT. H et MOUISSA. H, : Contribution à l'étude de la propagation végétative du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica Desf*). Thèse ing. INA, EL-HARRACH. Alger , (1997),96p.
21. OZENDA. P, : Flore du sa11ara. Ed du CNRS. Paris ,(1977),622p.
22. MANJAUZE. A,: Note sur la régénération du bétoum par semis naturel Dans la place d'essais de Kef. Lefaa. Bull. soc. His.Nat de l'Afrique du Nord. Tome 57 , (1968) ,59- 65.
23. WHITEHOUSE. W.E,: The pistachio nut, a new crop for the Western United states. Econ. Bot , (1957), 281 – 321.
24. KHALIF T., -Recherches sur la culture du pistachier- thèse de doctorat-Université de Gembloux ,(1959),150p.
25. .MAIRE R .,: Carte phytogéographique de l'Algérie et de la Tunisie. Notice et carte G.G.A service cartogéographie Alger. ,(1926),47p.
26. MANJAUZE. A, : Répartition et écologie de Pistacia atlantica Desf En Algérie. Bull. Soc. Ris. Nat de l'Afrique du Nord, (1968),5-131..
27. QUEZEL P. et SANTA S., -Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris CNRS. Tome 1 et 2 . ,(1962),1170p.
28. KHELIL. A, KELLAL. A, : Possibilité de culture et délimitation des zones à vocation pistachier en Algérie. Fruits, Vol. 35 ,(1980), 177- 185.
29. BONNET- MASIMBERT M. et VILLAR M. ,: L a maîtrise e la reproduction sexuée .R.F.F., xxxviii, N° ,(1986), p 49-58.

30. MULLER C., Conservation des graines et les problèmes de levée de dormance chez les feuillus précieux. N° spécial «les feuillus précieux : frêne, merisier, et grands érables ». Rev. For. Fr., 44 sp : , (1992),39 – 46.
31. HELLER R.,: Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivé in vitro .Ann. Sci. Nat. Biol. Vég. ,(1980), 14 :12.
32. COME D.,: les obstacles à la germination Ed. Masson et Cie, Paris ,(1987),162 p.
33. ROBERTS E.H.,1983 Loss of seed viability during storage.Advances in reearch and technology of seeds 8, (1970),9-34,.
34. MULLER C., et LAROPPE E., : Conservation et germination des semences. Rev.For.Fr. Vol. XLV, 3,(1993), 253-260.
35. ROBERTS EH , Predicting the variability of seeds seed Sci.Technol., (1993),499-514,.
36. MULLER C.,. Le point sur la conservation des semences forestieres et la levée de dormance. Rev. For. Fr., 38(3) , (1986), 202 -204.
37. COME. D., : Quelques aspects de la régulation métabolique des dormances Colloque Biologique de semences.13-16 mars – ANGERS, (1989),4p.
38. SUSKA B.,: Physiological aspect of seed conservation. Ann. Sci. For. (1989),72-84,.
39. MAZLIAK P., : Physiologie Végétale, croissance et développement. T.2 ,(1982) .
40. HAISSIG B.E.,. Metabolic process in adventitious rooting of cuttings. In : Jackson M.B (Ed). « New root formation in plants and cuttings ».Martinus Nijhoff publishers, Dordrecht. (NLD) ,(1986), 141 – 189.
41. ROUSKAS, D.,:. Conservation strategies of Pistacia genetic resources in Greece. Dans Workshop "Taxonomy, Distribution, Conservation and Uses of Pistacia Genetic Resources", Palermo, Italie, 1995, Padulosi, S., Caruso, T. et Barone, E. (éds). IPGRI, Roma, ,(1996), 37-41.
42. GASPAR T.. “New growth regulators in tissue culture. Proceedings of the BPTCG autumn symposium “: "New hormones in the control of plant cell, tissue and organ culture". Ulg,(November 18th, 1994).

43. GASPAR T., KEVERS C., BOUILLENNE H., MAZIERE Y. et BARBE J.P. :
 "Ethylene production in relation to rose micropropagation through axillary budding. *In* : "Biochemical and physiological aspects of ethylene production in lower and higher plants". Eds H. Clijsters, M. De Proft, R. Marcelle et Pouche, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (The Netherlands), (1989), 303-312.
44. MULLER C. et BONNET - MASIMBERT M., Levée de dormance clés faines avant leur conservation: résultats préliminaires *Ami. Sci. For.*, 42 (4),(1985),385- 396.
45. CORNU. D, « Amélioration des arbres forestiers. *Revue forestière* » Française n° special ,(1986), 60 – 68.
46. LETACON F., GARBAYE J., BOUCHARD D., ET CHURIN J.L « Les différentes techniques de production de plants et la mychorization chez les feuillus précieux. » *Rev. For. Fr. N°sp*,(1992).
47. ANONYME, : « la multiplication du pistachier in option méditerranéenne » Série B, étude et recherches n° 16 Amélioration d'espèces à fruits à coque : noyer, amandier, Pistachier. Ed E GEMAIN ,(1997),147P.
48. MARGARA. J, : « Bases de multiplication végétative. Les méristèmes et L' organogenèse » . Ed . INRA. Paris ,(1984), 262p.
49. BRETAUDEAU J., et FAURE Y., « Atlas d'arboriculture fruitière ». Vol .1, Tec .Doc.Lavoisier,(1992),289p.
50. CORNU .D et BOULAY M., : la multiplication végétative .Techniques horticoles et culture in vitro. *R.F.F.*, XXXVIII, N°sp ,(1986), 60-68.
51. AIT RADI A ., - Multiplication par voie végétative et par semis de *pistacia atlantica* Desf et *ailanthus altissima*.thèse d'ingénieur INA,(1979), 40p.
52. AUGER., B.BEAUCHESNE G., BOCCON J., GIBOD, DECOUTYE L., DIGAT B., JALOUZOT R., MORAND J-CL., REYNOIRD JP., STRULL D.G. et VIDALIE M., : La culture *in-vitro* et ses applications horticoles. Technique et documentation. Lavoisier ,(1989), 225p .
53. BOXUS PH., : La production de plants sains à partir de méristèmes. .Ed. Station de culture fruitière et maraîchère. Gembloux, (1975),120-123.
54. BOXUS PH., : La maîtrise des techniques de multiplication in vitro : Réalités et perspectives. *Annales de Gembloux*, 96,(1990) , 33 – 42.

55. MARGARA J., - Bases de la multiplication végétative (Les méristèmes et l'organogenèse). Ed. I.N.R.A.. Paris,(1989), 230p.
56. ZRYD JP Culture de cellules, tissus et organes végétaux, Fondement théorique et utilisation pratique. Ed. press polytechnique remands Suisse ,(1988),308 P.
57. QOUIRIN M.,: Premiers résultats obtenus dans la culture in vitro du méristème apical de sujets porte greffes de pommier. Bul. Agron. Gembloux, (2) ,(1974),189-192.
58. CORNU D., CHAIX C., :Multiplication par culture in vitro de Merisiers adultes (*Prunus avium*) application à un large éventail de clones. Coll. Inter. sur la culture in vitro des essences forestières AFOCEL. ,(1981),71 – 79.
59. VIETEZ A.M., SAN JOSE C. and VIETEZ E.,: In vitro plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L. J. Hort. Sci., 60 ,(1985), 99 – 106..
60. WOODS A., : The potential for the in vitro propagation of a number of economically important plants for the aride areas, In « Plants for arid land »- Proc. Kew int. conf, economic plants for the arid land. Royal Botanic Gardens, Kew. 23 - 27 july 1984. Wickens *et al.*, Ed ,(1985) ,333-342.
61. BADJI S., MERLIN G., I . N'DIAYE, Y. MAIRONE Y., DOIRE P., PALMA B., COLLONA J.B., GESLOT A. et NEVILLE P., - Multiplication végétative *in vitro* d'*Acacia Senegal* (L.) Will. Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. , (1991), 303 - 308. Groupe d'étude de l'arbre. Paris.
62. BOXUS PH., :Le point de vue du multilicateur.dans : genie génétique et amélioration des plantes. Coll. Info. Scient.C.R.A., Gembloux –Namur, 6 fev. ,(1991),25-36.
63. KINET J.M.,BENREBIHA F.,BOUZID S., LALHACAR S., DUTUIT P., : Le réseau Atriplex . Allier biotechnologies et écologie pour une sécurité alimentaire accrue en région arides et semi-arides. Rev. Cahiers d'agricultures vol. 07 n° 06 ,(1998),505-509.
64. NICOLAS G., LUTTS S. KINET M., M ultiplication in-vitro d'*Atriplex halimus* et bourgeonnement axillaire et adventif. Rapport scientifique annuel:1^{er} Juin 1997 au 31 Mai 1998.Ed. Univ. de Paris Sud XI,(1998).
65. PIATTI M.F., « Embryogenèse somatique et synchronisation du développement embryonnaire ». Thèse de doctorat de pharmacie. Paris XI. ,(1990),130 p.
66. REINERT J., “Morphogenese und ihre Kontrolle ans gewede karotten Naturwissen“ (1958),311-345.

67. CHOI Y.E., KIM Y.N. et Yegh E. S., "High frequency of *plant* production via somatic embryogenesis from *callus* or cell Suspens on *cultures* in *Eleutherococcus senticosus* Rev. *Annals of botany* n° 83 ,(1999),309-314.
68. GOACOLOU J. et PERDRIZET E., « Multiplication végétative et culture des plantes *in vitro* ». Ed. : I.N.R.A. ; Paris,(1988).
69. BENLHABIB O., « Culture 'in vitro' de tissus de Beta vulgaris L. . Induction de cals et essais de régénération ». D.E.A. , Univ. Paris XI, Orsay, (1983) ,52 p.
70. BOURGKARAD F., :Etude en milieu solide et en milieu liquide en vue d'une recherche de l'embryogenèse somatique chez *Séquoia sempervirens* . Mémoire de DEA Université de Nancy,(1986), 6 p.
71. BIGOT C., - Multiplication végétative *in vitro* par néoformation de bourgeons et d'embryons somatiques. (*la multiplication végétative des plantes supérieures*). Ed. INA - Paris,(1980), : 133 -157.
72. TOURTE Y., « Génie génétique *et* biotechnologie: concepts et méthodes, application à l'agronomie et aux bioindustries ». 2ème cycle Ed. DUNOD Paris, (1998), 209 P.
73. SAKA H., AMARA A.B. et KERMICHE A., - Embryogenèse somatique du palmier dattier (*Phoenix Dactylifera* L.}. Induction de la callogenèse à partir d'organes de rejets de quelques cultivars.Ed. : I.N.R.A.A. ; Rev. Semes. n° 0. Alger ,(1997),1-7.
74. ZANG V., BOCCONGIBO D.J., LESPINASSE Y.,: Obtention d'embryons de pommiers (*Malus domestica* Borkl) après culture d'anthers. Ed. C.R.A Paris ,(1987),443 P .
75. NORRELL B., -Etude physiologique, cytologique et ultrastructurale de l'embryogenèse chez *Daucus carota* L. et de l'androgenèse chez *Nicotiana tabacum* L. D.E.A. des sciences naturelles de l'université de Paris. ,(1974), 72- 81.
76. AMMIRATO P.V., : Embryogenesis. Dans Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1, Techniques for Propagation and Breeding. Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V. et Yamada Y. (Eds.), MacPublishing Co., New-York, (1983), 82-123.
77. HAMDANI F., Essai d'obtention de cals embryogènes chez l'*atriplex halimus*. Th. Ing. Blida ,(1997) ,53p.

78. SIHAMACKR D., CAVALCANTE J.M., TIZROUTINES., ALLOT M., MUSSIO I., D., SERVAES D., NZOGHE D., DUCREUX G.,: Embryogenèse somatique chez la patate douce ,caractérisation et régénération des plantes. Ed. John libbey Eurotexte Montrouge France,(1995), 647 P .
79. BOXUS Ph., -*Multiplication végétative (Biotechnologies végétales Ed. Belgique, (1995),37-164.*
80. RAGHVAN Y., Molecular embryology of flowering plants. Ed. Cambridge university press New-Work U.S.A,(1997) 1028P.
81. LEBRUN L.,Etude de l'embryogenèse somatique in-vitro chez la vigne (*Vitis* sp) et application à la sélection de plantes tolérant de fortes concentrations en chlorure de sodium, (1986).
82. BOUZOULA R., -Essai d'obtention des *cals* embryogènes à partir de *plantule* (in-vivo et in-vitro) chez *Atriplex halimus*. Thèse Ing. Blida,(2000), 53 P.
83. MESTOURI. M, : Micro-propagation et multiplication par semis *in vitro* Et *in situ* du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica Des*) Thèse ing, inst d'agronomie, Université de Blida ,(2001),60p.
84. MURACHIGE T et SKOOG .F ., : A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.*, 15 ,(1962),473-497.
85. GAUTHERET R. J., : La culture des tissus végétaux .Ed. Masson. Paris ,(1959),863p.
86. CHAUSSA T. R et COURDUROUX JC. , Régulateurs de croissance et multiplication végétative des plantes supérieures ,(1980) .
87. HELLER R., : Physiologie végétale. T2 développement Paris. Ed . Masson . ,(1982),215p .
88. CHAUSSAT. R et BIGOT. C.: La multiplication végétative des plantes, Ed Gauthier et Villars. Paris. ,(1980),277 p
89. DRUART Ph., KEVERS C., BOXUS Ph. et GASPARD T .,« *In vitro* promotion of root format apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases”. *Z. Pflanzenph* 108: ,(1982) 429-436.
90. GASPARD TH., KEVERS C., DEBERGH P., MAENE L., PAQUES M., BOXUS TH., “ Vitrification : morphological, physiological and ecological aspects. *Cell and tissue culture in forestry* » VI,(1984),: 152 -166.

91. MEYNIER V.,: application de quelques technique de multiplication in vitro à la propagation végétative du noyer DEA biologie et physiologie végétale, Université NANCY .France ,(1982) ,48 p.
92. HASSANE S., « : Multiplication et clonage de *Atriplex halimus* par le bourgeonnement axillaire ». Ing . Blida, , (1997) 43p.
93. NIZAR MOURAD A., : « Etude en cytologie ultrastructurale e la différenciation cellulaire dans les cultures de tissus de *Passiflora quadrangularis L.* (Passifloracées)». Doct . Nany I,(1976)100, p.
94. NAVATEL J.C. and BOURRAIN L.,”:Incidence of some factors affecting root expression of *Malus* rootstock Jork 9 cost 87 plant in vitro culture working. Group «rooting regeneration » , (may,1992),22 - 23 .
95. GAUTHERET R.J.,: « La culture des tissus et des cellules des végétaux ». Ed. : Masson. Paris. ,(1977),262 P.
96. HELLER R., ESNAULT R.et LANCE C.,: Physiologie végétale : Nutrition. 6ème édition. Ed. : DUNOD. Paris. T. 1 ; ,(1998),323 P.
97. AIT CHIT M., :Problèmes rencontrés en culture in vitro du palmier (phoenix dctyliféraL.) par la technique d’organogenèse. In compte rendu du deuxième minaire maghbine sur la mutiplication rapide du palmier dattier par les techniques de culture in vitro .Marrakach 9-12 oct,(1989), 27-36.
98. BOULAY M., - Recherche préliminaires sur l'embryogenèse somatique d'Eucalyptus gunni.Article Ed. Afocel Paris ,(1987),23-37.
99. BOULARESS F A., : Contribution à la mise au point d’une méthode de vitro propagation de chataigner (cstanea sativa Mill à partir de micobouturage et embryon zygotique. Thèe .ing. institut agronomique. BLIDA,(1992),39p.
100. BEAUCHESNE G., : Les milieux minéraux utilisés en culture in vitro et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique. C.R. Acad. Agric. Paris. 67 ,(1981),1389 – 1397.
101. BOXUS ph et Terzi, J.M. big losses due to bactériel contaminations can be avoided in mass propagation scheme. Acta Hortic . 212 ,(1988), 91-93,.
102. LEIFERT C., RITCHIE J.Y et WITES W.M., :Contaminats of plant tissue and cell cultures. World j. microbial. And Biotech. 7 : ,(1991),452-469.

103. MONCOUSIN C., Rooting of *in vitro* cuttings. In : "Biotechnology in agriculture and forestry. HighTech and micropropagation I". Vol. 17. Ed. Y.P.S. Bajaj, Springer-Verlag, Berlin, ,(1991), 231-261.
104. AUDERSET G., GAVILLET S., MICHELI J., O'ROURKE J., RIBAUX M. et MONCOUSIN Ch. Histological analysis and the evolution of biochemical markers during the *in vitro* rooting of *Me domestica* Borkh. 'Jork 9'. Adv. Hort. Sci. 8 : ,(1984), 5-10.
105. COLLET G.F., NOWBUTH L. et LE C.L., : Comparaison of the easy-to-root 'Jork 9' and 'Cepiland' and the difficult-to-root 'EMLA 9' and 'Lancep' *Malus* M9 rootstocks *in vitro*. Adv. Hort. Sci. 8 :,(1994), 4548,
106. COLLET G.F. et LE C.L.. Micropropagation de porte-greffes de pommier et de poirier. II Enracinement *in vitro* de *Pyrus malus* L. (M25, 26, 27, MM 106, M9 type Jork) et de *Cydonia oblonga* Mill. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 20 : ,(1988),131-138.
107. DRUART Ph.. Contribution à l'élaboration de techniques de production en masse *in vitro* d'es ligneuses utilisables en culture fruitière. Thèse, Fac. Sci. Agron., Gembloux (Belgique),),(19873), 29 p.
108. DREW R.A., Me COMB J.A. et CONSIDINE J.A.. Rhizogenesis and root growth of *Carica pa* L. *in vitro* in relation to auxin sensitive phases and uses of riboflavin. Plant Cell Tissue Org. Cult. 1-7,(1993).
109. CABONI E., SPERANZA S. et DAMIANO C.,:Effects of gibberellic acid on *in vitro* rooting of almond. Adv.Hort.Sci.8 ,(1994), 53-55.
110. DESJARDINS Y., TIESSEN H. et HARNEY P .M.. « The effect of sucrose and ancymidol on *in vitro* rooting of nodal sections of asparagus ”. Hort Science, 22,(1987),131-133.
111. DRUART Ph.. « Etude de l'enracinement. In "Rapport activité 1991-1992" , Centre de Reche Agronomiques de l'Etat, Gembloux (Belgique), (1992), . 45-46.
112. TRIPATHI B .K., : Etude De la nutrition minérale et la néoformation de racines par les tissus de topinambour cultivés *in vitro* .col Int CNRS, (1971),193-201-208.
114. HARTMANNH.T. et KESTER D.E.,: Plants propagation principales and pract es. Prentice Hall, INC, Engenvod. Chiffs N.S, USA 4, ,(1993), 727p.

113. FAVRE J.M., : La rhizogenèse, aspects divers d'un processus d'organogenèse végétale. Uni. Paris, (1977),:37-52,.
115. HELLER R., « Physiologie végétale de développement, » 3^{ème} Ed., Pais, New York, (1985),101p.
116. MAIZA F., « Analyse des aptitudes organogénétiques de plusieurs variétés de Citrus en vue d'aboutir à leur multiplication végétative in vitro », Thèse doc. 3^{ème} cycle, (1980),76 p.
117. KHELIFI -SLAOUI M., ZIANE N., KHELLIFI L., « Essai de micropropagation du Citrange troyer : Citrus sinensis L.× Poncirus trifoliata L. » (Raf) Ann.Agr. I.N.A. Vol. 17, n° 1& 2,(1996), :120-126
118. NOVAK F.J.,and KONECMA D.,”Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures of alfa (Medicago sativaL.)”; Physiologie.(105), (1982), 279-284,.
119. DAIKH H.,: Essai d'induction de variantes de pommes de terre (Golanum rubrosum); à partir de tissu in vitro. Mémoire . Ing. Agro..I.N.A.El Harrach,(1983), .52p.
120. TISSERAT.B.,:Somatic.embryogenesis.in.angiosperms.Hort.rev. (1):, (1979), 1-78
121. SHARP P.W.R., :The physiologie of in vitro asexual embryogenesis. Hort. reviews ,(1980), :168-310.
122. EVANS D. A., “ Soy beam tissue cultures, soy beam genetic”. Nex tetter.(8); (1981), :27-29.
123. LUTZ A., « L'expression de la variabilité morphologique après régénération dans les cultures de tissuss et de cellules ». Bull.Soc.Bot.Fr.Actual.Bot.(132) ,(1985) ; :35-50.
124. NOZERAN R., « L'expression de la variabilité dans les cultures d'organes » Rev .Actualités botaniques.(314), (1985), :17-21.
125. BUVAT R., « Recheches sur la dédifférenciation des cellules végétales .Ann.Sci.Nat. Bot., 11^{ème} série , 5 ; (1965), 228p.