

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques

Département d'Agronomie

MEMOIRE DE MAGISTER

Option : Amélioration des Productions Végétales

**MICRO-PROPAGATION DU PISTACHIER
DE L'ATLAS (*Pistacia atlantica Desf*),
PAR L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE
ET ETUDE DU CARYOTYPE**

Par

OUKARA Fatma Zohra

Devant le jury composé de :

BENREBIHA F.Z.	Maître de conférence, U. de Blida	Examinatrice
ABDEL HUSSAIN M.S	Maître de conférence, U. de Blida	Examinatrice
BENMOUSSA M.	Professeur, U. de Blida	Examineur
CHAOUCH F.Z.	Chargée de cours, U. de Blida	Promotrice
BOUTEKRABT A.	Professeur, U. de Blida	Président

Blida, 30 AVRIL 2007

الملخص

يعتبر الفستق الحلبي واحد من أهم أصناف النباتات المحلية السائدة في الجنوب الجزائري (المناطق الجافة والشبه الجافة) يمكن أن يزرع في هذه المناطق نظرا لتحمله لقسوة المناخ، الرياح القوية، فترة الجفاف الطويلة..... من أهم العوامل المسببة لتدهور هذا الصنف من النبات نجد الاستغلال المفرط للغابات، حرق الغابات و تأثير الحيوانات السليبي. إن التكاثر الجيني لنبات الفستق يعترضه صعوبات متعددة ، لهذا السبب اعتمدنا في تجربتنا على طريقة جديدة لتكاثره ألا و هي التكاثر عن طريق الرشيمات الغير جنينية .

ينقسم هذا العمل إلي قسمين (جزئين) :

الجزء الأول:يتعلق بتكاثر الفستق الحلبي عن طريق زراعة البذور داخل أنابيب و ذلك بعد إزالة سبات البذور بوضعها تحت درجة حرارة 2 إلى 4 درجة مئوية لمدة شهر محاولة الحصول على الكالوجيناز عن طريق استعمال قطع مختلفة من نبات الفستق المتكاثر داخل أنابيب (أوراق ،مابين البراعم ، جذور و الفلقتين) مزروعة فوق أوساط زراعية مختلفة تحتوي هرمونات التطور. محاولة استخلاص طريقة لأقلمة نباتات الفستق الحلبي الناتجة عن الزراعة في الأنابيب. و أخيرا محاولة الحصول على رشيمات غير جنينية بواسطة مختلف الكالوجيناز المحصل عليها سابقا. فيما يخص الكالوجيناز فإن تفاعل القطع النباتية مختلف، على حسب الأوساط الزراعية المستعملة أن الجزء ما بين البراعم يتفاعل أحسن من الأوراق عكس الجذور و الفلقتين اللتين لم يظهر أي تفاعل كالوجيني. أن مختلف الأوساط الزراعية المستعملة أظهرت أن الوسط الزراعي MS الذي يحوي فيتامينات مورال و تأليفه ثنائي الهرمون (2,4 D /BAP) أعطت أحسن النتائج فيما يخص الكالوجيناز أولا و تكوين الرشيمات الغير جنينية ثانيا. يمكن الحصول على الرشيمات الغير جنينية عن طريق نقل الكالوجيناز الى وسط زراعي يحتوي على الهرمون 2,4 D

الجزء الثاني يتعلق بدراسة صبغيات الفستق الحلبي في مرحلة الانقسام النصفى و ذلك باستعمال طرق متعددة للحصول على الطريقة الانجع التي تظهر الصبغيات. لقد عرف هذا العمل صعوبات و ذلك نظرا لصغر حجم صبغيات الفستق الحلبي. توصلنا من خلال عملنا هذا الى ان عدد صبغيات الفستق الحلبي هو $2n=2$. إن هذه النتيجة حول عدد الصبغيات غير نهائية و قابلة للمجادلة.

الكلمات الرمز : الفستق الحلبي، تكاثر مخبري، أقلمة، رشيمات غير جنيني، صبغي، سيتولوجية.

RESUME

Le pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica Desf*) est l'une des espèces autochtones, très répandues dans le sud algérien (régions arides et semi-arides). Il peut être cultivé et supporté les vents forts et les longues périodes de sécheresse. Les principaux facteurs qui contribuent à sa dégradation sont l'exploitation forestière, les incendies de forêt et l'action des animaux. La multiplication sexuée et végétative de cette espèce pose beaucoup de difficultés. La raison pour la quelle nous nous sommes intéressées dans cette étude à une nouvelle technique de multiplication à savoir l'embryogenèse somatique.

Cette étude comporte deux parties :

Dans la première, nous nous sommes intéressées à la multiplication de pistachier de l'Atlas, par la germination des graines in vitro, après la levée de dormance par une stratification des semences au froid (2-4° C) pendant 30 jours. La quantité de vitro-semis obtenue est partagée en deux; une partie est destinée à une éventuelle acclimatation, l'autre partie est destinée à la callogenèse. Concernant l'acclimatation, qui se déroule en plusieurs étapes; les résultats obtenus ont permis de mettre en place une méthode d'acclimatation du pistachier de l'Atlas. Quant à la callogenèse, les vitro-semis ont été fragmentés en feuilles, entre-nœuds, racines et cotylédons. Ces fragments sont cultivés sur des milieux de culture contenant des combinaisons hormonales différentes. La réaction des explants est différente; les entre-nœuds réagissent mieux à la callogenèse que les feuilles. Les résultats concernant l'induction de l'embryogenèse somatique, ont montré que la présence de 2.4D dans le milieu de culture, avec une dose de 0.5 mg/l, est nécessaire pour l'apparition d'embryons somatiques.

Au cours de la deuxième partie, nous nous sommes intéressées à l'étude des chromosomes de pistachier de l'Atlas. Ce travail a été difficile car les chromosomes de pistachier sont très petits et les divisions mitotiques sont rares. Nous avons trouvé que le pistachier de l'Atlas est une espèce diploïde avec $2n = 28$. Cependant, l'information sur le nombre de chromosomes et la caryomorphologie de cette espèce est inachevée et contradictoire.

Mots clés : Pistachier de l'Atlas, micropropagation, acclimatation, callogenèse, embryogenèse somatique, chromosomes.

ABSTRACT

The pistachio of the Atlas (*Pistacia atlantica Desf*) is a member of the Anacardiaceae family and one of the autochthonous species, very answered in the Algerian south (arid and semi-arid regions). He/it can be cultivated and can be supported the strong winds and the long periods of drought. The main factors that contribute to his/her/its deterioration are the lumbering, forest fires and the action of animals. Multiplication sexuée and vegetative this species puts a lot of difficulties. The reason for the what we were interested in this survey in a new technique of multiplication to know the somatic embryogenèse .

This survey includes two parts :

In the first we were interested in the multiplication of pistachier of the Atlas, by the in vitro seed germination, after the raised of dormance by a stratification of seeds to the cold weather (2-4° CS) during 30 days. The quantity of vitro - seedling gotten is shared in two; a part is destined to a possible acclimatization, the other part is destined to the callogenèse. Concerning the acclimatization, that takes place in several stages; the gotten results permitted to put a method of acclimatization of the pistachier of the Atlas in place. As for the callogenèse vitro - seedlings have been broken up in leaves, enter - nœuds, roots and cotyledons. These fragments are cultivated on surroundings of culture containing some different hormonal combinations. The reaction of explantses is different; enter - nœuds react better to the callogenèse that leaves. Roots and cotyledons have been eliminated of the experimentation. Results concerning the induction of the somatic embryogenèse showed that the presence of 2.4D in the middle of culture, with a dose of 0.5 mg/l, is necessary for the somatic embryo apparition.

During the second left, we were interested in the survey of chromosomes of pistachio of the Atlas. This work could be difficult with pistachio since its chromosomes were extremely small, frequently having only a few cell divisions visible in a single root tip. However, information on chromosome numbers and karyomorphology in *Pistacia atlantica Desf* is incomplete and inconsistent. .

Key words :

Pistachio of the Atlas, micropropagation, acclimatization, callogenèse, somatic embryogenesis, chromosome

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu " Dieu" qui ma donné la force, la santé et le courage de pouvoir achever ce modeste travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à M^{me} CHAOUCH F.Z d'avoir suivi attentivement la progression de ce travail. Je la remercie vivement pour sa contribution positive et enrichissante, pour ses conseils judicieux ainsi que pour son soutien et ses encouragements.

J'exprime mes vifs remerciements à M^r BOUTEKRABT, qui malgré ses nombreuses occupations, m'a fait l'honneur de présider ce jury et d'examiner ce travail.

J'adresse toute ma gratitude à M^r BEN MOUSSA qui m'a fait l'honneur d'être examinateur de mon jury de thèse.

Mes remerciements vont également à M^{me} BENREBIHA d'avoir bien voulu honorer ce jury.

J'adresse mes remerciements à M^{me} ABDEL HUSSAIN qui m'a fait l'honneur d'avoir accepté d'être membre de ce jury.

Je remercie M^{me} AMIROUCHE, chargée de cours à l'U.S.T.HB. Pour son aide précieuse, sa gentillesse et son esprit scientifique.

Je voudrais associer à ces remerciements tout le personnel (administratifs, laborantins et bibliothécaires) du département d'agronomie, pour leur aide.

Je ne saurais terminer, sans témoigner ma vive reconnaissance à ma famille pour le soutien et l'aide moral et financier qu'elle m'a apporté tout au long de la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	
RESUME	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES ABREVIATIONS	
INTRODUCTION	11
CHAPITRE 1: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.1. Présentation de l'espèce	14
1.2 .Multiplication du pistachier	19
1.3. Exigences des cultures en culture in vitro	30
1.4. L'acclimatation	33
1.5. Données générales sur la cytogénétique	35
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	
2.1. Lieu de l'expérimentation	40
2.2. Matériel végétal	40
2.3. Désinfection du matériel végétal	41
2.4. Milieux de culture	41
2.5. Conditions de culture	45
2.6. L'acclimatation	46
2.7. Etude des chromosomes du pistachier	47
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	
3.1. La germination des graines	50
3.2. Analyse des variables étudiées	52

3.3. L'acclimatation	55
3.4. Initiation de la callogenèse	63
3.5. Multiplication des cals	71
3.6. Essai d'induction d'embryons somatiques	72
3.7. Effet des différents traitements utilisés pour le caryotype du pistachier de l'Atlas	78
CONCLUSION	82
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

LISTE DES FIGURES

Figure 3.1 : Taux de germination de graines de <i>Pistacia atlantica Desf</i> fonction des Conditions de culture (milieu sans hormone avec hormones M ₁)	51
Figure 3.2 : Vitro-semis issus de germination de graines de <i>Pistacia atlantica Desf</i> sur milieu de culture sans hormones de croissance	51
Figure 3.3 : Vitro-semis issus de germination de graines de <i>Pistacia atlantica Desf</i> sur milieu de culture avec hormones de croissance	52
Figure 3.4 : Longueur moyenne des vitro- semis issus de milieu sans et avec hormones de croissance	53
Figure 3.5 : Nombre moyen des feuilles des vitro- semis issus sur milieu de culture sans et avec hormones de croissance	54
Figure 3.6 : Nombre moyen des noeuds des vitro- semis issus sur milieu de culture sans et avec hormones de croissance	55
Figure 3.7 : Vitro- semis de <i>Pistacia atlantica Desf</i> acclimatés sous film plastique	58
Figure 3.8 : Vitro- semis de <i>Pistacia atlantica Desf</i> acclimatés, après 15 jours (le film plastique retiré)	58
Figure 3.9 : Dessèchement de vitro- semis de <i>Pistacia atlantica Desf</i> avant l'enlèvement du film plastique	59
Figure 3.10 : Plantules acclimatées de <i>Pistacia atlantica Desf</i> , transférées dans des pots	61
Figure 3.11 : Dessèchement de plantules de <i>Pistacia atlantica Desf</i> après le transfert en pot	62
Figure 3.12 : Plantules de <i>Pistacia atlantica Desf</i> acclimatées dans	

une mini- serre	62
Figure 3.13 : Plantules de <i>Pistacia atlantica Desf</i> acclimatées dans une serre avant le transfert au champs	63
Figure 3.14 : Effet des différentes combinaisons et concentration en hormones de croissance et les différents types d'explants sur le pourcentage de la callogénèse	65
Figure 3.15 : aptitude des explant à la callogenèse	66
Figure 3.16 : Apparition des racines sur des entre-nœuds cultivés sur un milieu de culture contenant ANA/BAP	66
Figure 3.17 : Apparition des racines sur des feuilles cultivées sur le milieu de culture contenant ANA/BAP	67
Figure 3.18 : cals de couleur blanche issus à partir des entre-nœuds	68
Figure 3.19 : cals de couleur blanche issus à partir des feuilles.	69
Figure 3.20 : cals de couleur verte issus à partir des feuilles.	70
Figure 3.21: cals obtenus après multiplication sur le même milieu de culture (la couleur est passée de blanc au beige)	72
Figure 3.22 : Aspect macroscopique d'un tissu embryogène de <i>Pistacia atlantica Desf</i> (embryons somatiques en stade nodulaire)	74
Figure 3.23: Aspect microscopique d'un tissu embryogène (présence de la classe I et II)	79
Figure 3.24: Cellules présentant des noyaux en interphase (i) et prophase (p)	
Figure 3.25: Cellules présentant des noyaux en anaphase (a) et en télophase (t)	79
Figure 3.26: cellule présentant une plaque métaphasique (nombre de chromosome $2n = 28$)	80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Composition de solutions minérales utilisées.	42
Tableau 2.2 : Solution vitaminique de MOREL (1952).	42
Tableau 2.3 : la solution stock du fer EDTA; la glycine et l'anti-oxydant	43
Tableau 2.4 : concentration en hormone de croissance de milieu de germination	44
Tableau 2.5 : les combinaisons hormonales utilisées pour l'embryogenèse somatique	44
Tableau 3.1 : Taux des germinations des graines	51
Tableau 3.2 : longueur moyenne des vitro semis après un mois	53
Tableau 3.3 : nombre moyen des feuilles	54
Tableau 3.4 : Nombre moyen des nœuds.	55
Tableau 3.5 : Effet de l'acclimatation sur la longueur moyenne de la tige	56
Tableau 3.6 : Effet de l'acclimatation sur le nombre moyen des feuilles	57
Tableau 3.7 : Effet du substrat (sol + sable + tourbe) sur la longueur moyenne de la tige	60
Tableau 3.8 : Effet du substrat (sol + sable + tourbe) sur le nombre moyen des feuilles	61
Tableau 3.9 : Effet des régulateurs de croissance sur la réponse callogène des explants	65
Tableau 3.10 : Effet des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals issus des entre-nœuds	68
Tableau 3.11 : Effet des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals issus de feuilles	69
Tableau 3.12 : Effet des milieux d'initiation sur la multiplication des cals	71
Tableau 3.13 : pourcentage de cal présentant des nodules	74

INTRODUCTION

En Afrique, environ deux milliards d'hectares sont considérés comme des terres arides et semi-arides, dont les trois quarts sont touchés par la désertification. La quasi-totalité de ces zones dégradées est considérée comme des terres de parcours principalement utilisées par la population nomade. L'Algérie est l'un des pays qui sont affectés par une désertification croissante qui avance d'année en année vers les terres cultivées. En plus de la désertification, il existe d'autres facteurs qui entraînent la réduction et la dégradation de la végétation naturelle et la rupture des écosystèmes arides et semi-arides, entre autres: l'augmentation de la population humaine, l'érosion (éolienne et hydrique), l'exploitation anarchique de la végétation comme fourrage et bois de chauffage.

La majorité des plans nationaux de la lutte contre la désertification; afin de protéger et améliorer les zones arides; réserve une place importante à la plantation d'arbres et d'arbustes forestiers et fourragers. Par ailleurs, le programme de repeuplement des zones arides et semi-arides, doit comprendre plusieurs espèces manifestant une tolérance élevée aux conditions de sécheresse, de salinité et intéressante sur le plan agronomique. En effet, les espèces autochtones jouent un rôle important dans la reconstitution et le repeuplement des espaces forestiers dégradés. Elles contrôlent l'érosion et répondent aux besoins de la population humaine.

Parmi ces espèces autochtones, le pistachier de l'Atlas *Pistacia atlantica Desf* , appelé aussi le bétoum est l'arbre par excellence des régions sud de la méditerranée. Il se trouve généralement à l'état sauvage dans les dayas [1]. Le pistachier de l'Atlas est une espèce très rustique, il s'adapte aux conditions les plus dures des zones arides.

Les conditions climatiques de la plupart des régions agricoles montagneuses et semi-arides de notre pays sont favorables à son extension. Son intérêt économique est certain, il présente un bois de qualité, il est utilisé à des fins culinaires et médicinales par la population locale, il est utilisé comme porte greffe du pistachier comestible.

En Algérie, si la régénération de l'espèce avait été protégée depuis longtemps, elle se serait traduite par la constitution de populations plus homogènes, plus nombreuses et plus productives [2]. Le déclin du pistachier est dû d'abord à des raisons économiques et à des budgets investis très limités dans la production et la régénération des pistacheraies naturelles des dayas. Parmi les facteurs ayant contribué à la dégradation des pistacheraies on peut citer :

- l'exploitation intense des pistachiers comme fourrage et bois de chauffage par les bergers et les populations locales;
- le pâturage empêchant la régénération naturelle et le développement des jeunes pousses;
- le réseau routier qui traverse la plupart des dayas (destruction de certaines d'individus);
- le mauvais état sanitaire des arbres.

La multiplication du pistachier de l'Atlas présente des difficultés. Sa reproduction sexuée aboutit le plus souvent à la production de fruits parthénocarpiques dépourvus de graine. En plus, les graines sont pourvues d'un endocarpe osseux qui inhibe la germination et le pouvoir germinatif ne peut être gardé plus d'un printemps. La multiplication végétative, du pistachier de l'Atlas par les techniques classiques, est très difficile à cause de la sève très oxydante, qui au contact de l'air, induit la mort des cellules.

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 des sujets juvéniles, ce qui constitue un handicap chez les espèces ligneuses [3], et c'est dans ce contexte que notre étude se veut, à la fois la connaissance cytogénétique du pistachier de l'Atlas et la mise en place d'une

nouvelle technique pour sa propagation par le biais des vitro-méthodes. L'embryogenèse somatique connaît un intérêt croissant depuis les années 80. Elle apparaît comme étant la meilleure méthode de multiplication végétative [4]. En effet, elle permet d'assurer en permanence un taux élevé d'individus sains, juvéniles et homogènes, en réduisant ainsi les coûts élevés liés à la propagation "in vitro" [5]. Les données chromosomiques ont longtemps été un outil pour des cytogénéticiens et des sélectionneurs. Les études de chromosomes sont souvent utiles dans la suggestion taxonomique. FASIHI et GHAFFARI [6], ont évalué l'espèce et la sous espèce de la pistache iranienne pour trouver leur distribution écologique et leur caryotype.

En Algérie, le pistachier de l'Atlas est une espèce très polymorphe et présente une grande aire de répartition géographique. A notre connaissance, aucune recherche basée sur la cytogénétique n'a été effectuée sur le pistachier de l'Atlas. Son étude caryologique serait-elle d'un grand intérêt bien que très peu de comptages chromosomiques aient été consacrés à cette espèce. C'est dans ce contexte, que nous nous sommes intéressée au dénombrement chromosomique du pistachier de l'Atlas, de la région de Djelfa afin de voir s'il existe des polymorphismes au sein de cette espèce.

Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressées à quatre objectifs :

- La micro-propagation du pistachier de l'Atlas à partir de semences pour une acclimatation des vitro-semis.
- Initiation de la callogenèse et la multiplication des cals sur différents milieux de culture.
- Induction et développement des embryons somatiques.
- Détermination du nombre de chromosomes de pistachier de l'Atlas par l'utilisation des techniques cytogénétiques.

CHAPITRE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Présentation de l'espèce

1.1.1 Historique de l'espèce

En 1798, le pistachier de l'Atlas a fait l'objet d'une confusion assez fréquente [7]. Cent ans plus tard, FLICH et LAPIE, en 1897 semblent avoir mal distingué l'originalité de l'espèce. Ils l'appelaient térébinthe [8]. Par la suite BATTANDIER et TRABUT ont bien séparé *Pistacia terebinthus* de *Pistacia atlantica* [7]. Les pistachiers sont vraisemblablement originaires des régions forestières sub-tropicales de l'ancienne zone méditerranéenne [9]. L'étude monographique du genre comprend 4 sections et 11 espèces. *Pistacia vera* est la seule espèce produisant des fruits comestibles [10]. Il est probablement originaire d'Asie Centrale [11].

En Algérie, le pistachier est présent à l'état spontané sous diverses conditions pédo-climatiques. Il se trouve représenté par des espèces sauvages en particulier *Pistacia atlantica* Desf. L'aire de répartition de *Pistacia atlantica* au Maghreb et plus particulièrement en Algérie a été décrite par MONJAUZE [1].

1.1.2. Classification botanique de pistachier

Le pistachier de l'Atlas appelé aussi betoum est un arbre dioïque appartient à la famille des Anacardiacees. ZOHARY [12], montre que ce genre comprend 4 sections et 11 espèces parmi ces espèces on trouve *Pistacia atlantica* Desf.

Selon EMBERGER [13], *Pistacia atlantica Desf* est classé taxonomiquement de la façon suivante :

Règne : Végétal.

Sous-embranchement : Angiosperme.

Classe : dicotylédone.

Ordre : Térébinthales.

Famille : Anacardiaceae.

Sous-famille : Rhoiadeae.

Genre : *Pistacia*.

Espèce : *Pistacia atlantica Desf.*

1.1.3. Caractéristiques botaniques du pistachier

Le pistachier de l'Atlas est un arbre dioïque, dont on distingue les fleurs mâles et les fleurs femelles portées par des pieds différents, sa pollinisation est anémophile rarement entomophile [2]. Dans les bonnes conditions, le bétoum peut atteindre 25 mètres de hauteur et 1 mètre de diamètre au niveau du tronc [2]. Les feuilles du pistachier sont caduques, elles comportent 7 à 11 folioles entières de 3 à 5 cm de longueur, sur 1 cm de largeur, elles sont alternes mesurant jusqu'à 12 cm de longueur totale [14]. Les fleurs sont apétales et rougeâtres; les fleurs femelles sont en grappes axillaires à calice très réduit et à ovaire de 3 stylets. Les fleurs mâles sont des grappes terminales à calice de 3 à 4 sépales et 5 à 7 étamines [2] et [14].

MORSLI [15], a identifié quatre stades phénologiques pour la floraison mâle et cinq pour les fleurs femelles :

Floraison mâle

- inflorescence groupée ;
- pré-déhiscence des inflorescences ;
- déhiscence des inflorescences ;
- fanage des inflorescences.

Floraison femelle

- fleurs femelles non apparentées;
- début d'apparition des fleurs;
- fleurs apparentées;
- fleurs femelles en cours de pollinisation;
- fleurs femelles fécondées.

Le fruit est une drupe, de couleur rougeâtre mesurant entre 6 à 8 mm de largeur [16]. Il est ovale et quelquefois trapu. Il atteint sa maturation en Septembre en prenant la couleur bleuâtre [2]. Le système racinaire du pistachier de l'Atlas a un type d'architecture bien hiérarchisée, comportant un épais pivot vertical, orthogéotrope à croissance rapide et indéfinie et de fines racines latérales plagiotropes à croissance lente et peu durable [17].

1.1.4. Exigences pédo-climatiques du pistachier de l'Atlas

Selon MONJAUZE [1] le pistachier de l'Atlas ne serait à sa place que dans la moitié de l'étage aride tempéré et de l'étage semi-aride, se trouvant généralement dans les dayas. MAGGS [18] a recommandé de retenir l'isotherme 5° C comme limite pour la culture du pistachier. Par ailleurs, KHELIL et KELLAL [19] ont retenu l'isotherme 2° C pour la délimitation des zones à vocation pistachière en Algérie. Il faut noter que cette espèce supporterait des températures de -17° C [20] à -30° C [21]. Cependant, cette espèce reste très sensible aux gelées printanières qui détruisent les fleurs [21]. D'après BROUSSE [9], le bétoum supporte bien les températures les plus basses (-12°C à Djelfa) que les températures élevées (49°C à Ghardaïa). L'une des principales caractéristiques du pistachier est sa très grande résistance à la sécheresse [21] et [20].

L'altitude d'implantation du pistachier de l'Atlas varie de 100 à 1200 m d'altitude, d'après EVREINOFF [22]. Il semble que l'altitude comprise entre 600 à 1200 m permet un meilleur développement de l'espèce. Selon BOUDY [23], le bétoum se développe sous une tranche pluviométrique très faible jusqu'à 150 mm. Cependant, MONJAUZE [2], note que le bétoum ne peut se développer que sous

une tranche pluviométrique allant de 250 à 600 mm.

Bien que le pistachier se trouve planté sur une large gamme de sols, cette espèce est réputée être gypso-calcaïque, préférant des sols profonds et bien drainés [20]. Il faut également noter que le pistachier tolère des conditions de salinité [11] et peut ainsi valoriser de larges zones des régions arides et semi-arides où le problème de salinité se pose avec acuité.

BELHADJ [24], souligne que le pistachier de l'Atlas se régénère et pousse toujours à l'intérieur du jujubier (*Ziziphus lotus*) qui constituerait une bonne protection aux jeunes pousses, contre les vents et le pâturage. En plus de cela, le sol où les feuilles du *Z. lotus* tombent deviendrait acides et faciliterait ainsi la germination des graines. Enfin, il faut retenir que les zones de culture de l'olivier et de l'amandier paraissent être favorables au développement du pistachier [20].

1.1.5. Répartition géographique du pistachier de l'Atlas

1.1.5.1. Dans le monde

D'après KHALIF [25], 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- En Asie Centrale et Occidentale, se présente comme étant la zone de *Pistacia vera*, ou pistachier de Kaboul.
- 3- En Amérique du nord, deux espèces principales sont assez connues; *Pistacia mexicana* et *Pistacia texana Swingle*.
- 4- La zone tropicale de faible importance est occupée par *Pistacia oleaza*.
- 5- La région méditerranéenne est la plus riche en espèces du pistachier, elle compte plusieurs espèces telles que :

- * Le lentisque: *Pistacia lentiscus*.
- * Le bétoum: *Pistacia atlantica*.
- * Le térébinthe: *Pistacia terebinthus*.
- * Le pistachier vrai: *Pistacia vera*.

* Le pistachier palestinien: *Pistacia palestinae*.

MONJAUZE [2], ajoute que le *Pistacia atlantica Desf* est largement réparti au sud de la méditerranée et au Moyen Orient.

1.1.5.2. En Algérie

Les populations des pistachiers (*P. lentiscus*, *P. terebinthus*, *P. atlantica*) se trouvent à l'état de groupements isolés concentrés particulièrement dans les régions des dayas entre Djelfa et Tiaret en passant par Laghouat [26]. Le même auteur rapporte que le pistachier de l'Atlas se trouve entre Mascara, Sidi Bel Abbès et Saida. Il le signale aussi à Djelfa, M'Sila, Biskra, au sud de Laghouat, au Mzab, à Ouargla, dans le secteur de Sahara et dans le Hoggar.

BABA AISSA [27], ajoute que le pistachier de l'Atlas est une espèce nord-africaine, endémique, relativement commune dans toute l'Algérie (avec une prédilection pour les lieux arides), mais moins répandues dans le Sahara : Hassi R'mel, Hoggar et Tassili.

1.1.6. Intérêts de l'espèce

Le pistachier de l'Atlas est l'une des espèces autochtones qui joue un rôle considérable, dans les régions arides et semi-arides. L'ensemble de l'arbre; feuilles, fruits, bois et racines, a des usages multiples, constituant des intérêts socio-économiques et écologiques importants.

1.1.6.1. Intérêts écologiques

Le pistachier de l'Atlas est l'espèce la plus représentée de la steppe pastorale et des zones arides en raison de ses caractéristiques. Le bétoum occupe généralement les sols peu profonds grâce à son système racinaire puissant qui peut aller jusqu'à 5 à 6 mètres de profondeur. Il contribue favorablement à la lutte contre l'érosion et la désertification qui menacent les régions arides et semi-arides [28].

Le pistachier de l'Atlas tolère parfaitement les conditions de salinité les plus extrêmes, donc cette espèce peut valoriser de larges régions arides et semi-arides où le problème de salinité s'accroît de plus en plus [11].

1.1.6.2. Intérêt socio-économiques

Les populations locales utilisent les semences du bétoum à des fins culinaires et médicinales [24]. Le même auteur ajoute que le fruit est riche en huile comestible. Les graines sont séchées, écrasées ou moulues et ramassées avec de l'eau sucrée et consommées en boulettes ou bien séchées et croquées telles quelles comme des cacahuètes. L'écorce produit une résine mastic qui exsude naturellement de façon abondante par temps chaud. Les populations locales s'en servent pour usage médicale [2]. L'arbre fournit un bois d'artisanat et de feu, il donne un bon charbon. C'est un bois lourd et de bonne conservation [16].

Toutes les espèces du pistachier constituent un apport en fourrage considérable pour l'alimentation du bétail, surtout en automne. Les feuilles constituent un excellent fourrage pour les ruminants [28]. Le pistachier de l'Atlas est utilisé comme porte-greffe de *Pistacia vera*, il est considéré comme le plus résistant à l'asphyxie racinaire par rapport aux autres espèces du genre *Pistacia*.

1.2 .Multiplication du pistachier

Comme la plupart des plantes, le pistachier peut se multiplier par deux méthodes de propagation qui s'opposent par de nombreuses caractéristiques : la reproduction sexuée et la multiplication végétative. Selon BOXUS [29], la reproduction par voie sexuée donne souvent naissance à la création des types génétiques nouveaux par recombinaison des gènes, lors de la fusion des gamètes. Au contraire, la multiplication végétative faisant intervenir seulement le processus de mitose reproduira des individus conformes aux parents.

1.2.1. Multiplication par voie sexuée ou semis

La multiplication sexuée 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 [30]. La germination des semences de *Pistacia atlantica* passe pour être difficile et capricieuse [19]. Cette difficulté est due à plusieurs facteurs qui sont liés, soit à la semence elle-même, soit aux conditions de récolte et de conservation des graines.

La maturité de la semence joue un rôle important car une immaturité à la récolte se traduit généralement par une faculté germinative faible et surtout par une inaptitude à la conservation [31]. D'après MONJAUZE [2], la semence du pistachier de l'Atlas est très huileuse pour être conservée plus d'un printemps, mais conservée en chambre froide, elle peut rester quelques années. Cependant, KHELIL et KHELLAL [19], affirment que les graines du pistachier de l'Atlas perdent leur faculté germinative très rapidement après quelques mois de conservation au frais. D'après MORSLI [15], la reproduction sexuée du pistachier de l'Atlas aboutit le plus souvent à la production de fruits parthénocarpiques. Ce phénomène se traduit sur le terrain par une diminution de semences fertiles.

Les graines de feuillus présentent souvent des phénomènes de dormance, qui s'opposent à leur germination. C'est le cas de la graine du pistachier, qui est affectée d'une dormance embryonnaire associée à une légère inhibition tégumentaire [32]. Les mécanismes de la dormance et de son élimination ont donné lieu à un certain nombre de recherches, faisant intervenir soit des facteurs physiques soit des facteurs chimiques [33]. Selon MAZLIAK [34], le froid est un facteur important pour la levée de la dormance. Cela a été déjà signalé par MONJAUZE [1] disant que, les graines du bétoum exigent une stratification et elles ne doivent être semées qu'à une température moyenne ayant atteint au moins 12° C. Il ajoute aussi que le pourcentage de la germination est globalement au maximum après 30 jours de la stratification, mais la vitesse de germination augmente graduellement avec la durée du traitement au froid appliqué.

HAISSIG [35], explique le rôle de la stratification des graines de pêcher par la baisse des quantités de l'acide abscissique (ABA) pendant la durée de la stratification. Selon ROUSKAS [36], l'acide abscissique est parfois rendu responsable de la dormance de diverses semences car l'acquisition de l'aptitude à germer correspond à sa dispersion plus ou moins totale. D'après CHAUSSAT et BIGOT [37], le traitement à l'acide gibbérellique permet généralement une meilleure germination des embryons dormants. GASPAR [38], affirme qu'une bonne germination a été observée chez les graines du pistachier traitées avec 50 ppm de l'AG3 et stratifiées pendant 36 jours. Selon BROUSSE [9], les coques des graines de *P. atlantica* gênent la germination et doivent être enlevées avant la plantation. Le pourcentage ne dépasse pas 50% lorsque les graines en coque sont trempées pendant une journée dans de l'eau du robinet à 10°-15°C. Le même auteur ajoute que le mésocarpe doit être éliminé car il est considéré comme un inhibiteur de germination.

AIT RADJ [39], obtient en laboratoire, après 45 jours d'essai 60% de germination pour les graines scarifiées mécaniquement, et 20 à 28% de germination avec des graines traitées à l'aide d'une solution normale d'acide sulfurique. ALETA et al [40], soulignent qu'une scarification chimique en utilisant l'acide sulfurique concentré augmente le pourcentage; en facilitant la levée de l'inhibition des semis, mais elle n'influe pas sur la rapidité de germination.

1.2.2. Multiplication par voie asexuée ou végétative

La reproduction asexuée est basée sur deux principes : la totipotence cellulaire et le pouvoir de régénération dont la dédifférenciation et la différenciation [41] ; [42]. MARGARA [43], ajoute que la propagation végétative, quelles que soient les modalités, implique toujours la formation de méristèmes nouveaux par le phénomène de régénération. Les horticulteurs ont depuis des siècles, développé des techniques artificielles de multiplication végétative comme le bouturage, le marcottage et le greffage. En reproduisant des individus génétiquement identiques à la plante-mère, ils créent ainsi des clones homogènes [29]. Le même auteur note que l'introduction des techniques de multiplication "in-vitro" ou "micropropagation", a bouleversé complètement la reproduction végétale.

En effet, partant d'un fragment de plante placé en conditions plus ou moins aseptiques, la plante-mère peut être multipliée en un an en plusieurs millions d'exemplaires.

1.2.2.1. Bouturage

Selon PREVOST [44], le bouturage consiste à séparer un fragment de végétal (rameau, feuille, méristème) que l'on maintient en vie afin qu'il reforme les organes qui lui manquent. Cette technique traditionnelle permet de produire d'une manière conforme les individus sélectionnés lors de l'étape de l'amélioration. Les travaux réalisés par AIT RADI [39], sur le pistachier, montrent que les résultats obtenus ne sont pas significatifs, même après traitement des boutures à l'acide indolylacétique (AIA) à une concentration de 0,6 et 5 g/l. DJERAH [45], confirme l'échec du bouturage du pistachier. Il ajoute que la plupart des travaux concernant ce type de multiplication n'ont pas donné de résultats positifs. Selon SAHLI [14], le bétoum répond mal au bouturage ligneux à cause de sa sève très oxydante. Celle-ci provoque la mort des cellules au niveau des sections.

Grâce aux travaux effectués à Rome, les techniques de multiplication végétative par bouturage semi-ligneux ont parallèlement beaucoup progressé pour *P. atlantica*. L'étiollement des pied-mères avant prélèvement des boutures, ainsi que le traitement à l'acide indolbutyrique de ces boutures permettent désormais d'obtenir des taux d'enracinement économiquement valable [40]. L'obtention de plants de *P. atlantica* a été possible en utilisant des boutures semi-ligneuses, provenant de pied-mères étiolés, et enracinées sous brouillard artificiel après traitement à l'acide indolbutyrique.

1.2.2.2. Micro-propagation

La micro-propagation, contrairement au bouturage, s'effectue tout au long de l'année par la mise en jeu successive de différents milieux de culture. On provoque le développement de bourgeons, puis des racines afin de reconstituer un plant.

Les régulateurs de croissance jouent un rôle prépondérant dans ces différentes phases d'organogenèse: les cytokinines, favorisent le bourgeonnement et les auxines, la formation des racines [42]. Le principe de la micro-propagation consiste à prélever sur la plante, un organe ou un morceau d'organe, qu'on appelle explant et de le cultiver en conditions aseptiques, sur des milieux de culture choisis selon le but désiré par le chercheur.

Les diverses modalités de multiplication végétative "in vitro" sont amenées par ZRYD [46] et concernent :

- la multiplication par bourgeonnement axillaire ;
- la multiplication par bourgeonnement adventif à partir de cals ;
- l'embryogenèse somatique ;
- la culture des protoplastes.

MARGARA [43], envisage trois méthodes de multiplication "in vitro" :

1- La culture de méristème; cette méthode demeure la plus généralisable et la plus sûre pour éviter l'apparition des variants. Elle a de plus, le mérite d'associer la lutte phytosanitaire à la multiplication.

2- La reconstitution de plante par néoformation de bourgeons et de racine sur un cal.

3- L'embryogenèse somatique pourrait être dans l'avenir le complément idéal des manipulations réalisées au niveau cellulaire (mutagenèse, fusion des protoplastes), permettant la régénération à partir de cellules séparées.

Chez le pistachier, la culture "in-vitro" se heurte à plusieurs problèmes liés au choix de l'explant, à l'initiation aseptique, à la nécrose des bourgeons, à la régression des potentialités en sub-culture, et surtout à l'enracinement et à l'acclimatation des vitro-plants [47].

1.2.2.2.1. Multiplication par bourgeonnement axillaire

Selon BOXUS [29], cette technique s'applique à presque toutes les plantes sous l'une des deux formes possibles :

1- Formation à partir d'une jeune pousse unique de pousses axillaires multiples, grâce à l'introduction dans le milieu de culture d'une cytokinine qui supprime la dominance apicale. Les axillaires se développent et forment des touffettes composées de pousses axillaires. Celles-ci sont ensuite séparées et replacées individuellement sur un nouveau milieu afin de poursuivre la multiplication.

2- Allongement de la jeune pousse initiale qui va se développer comme un sarment formant une tige avec beaucoup de nœuds. Ceux-ci peuvent être individualisés et replacés sur un nouveau milieu d'allongement.

D'après CORNU et al [48], cette voie de multiplication appelée (multiplication conforme), réside dans le respect de la stricte conformité génétique du végétal à multiplier. La prolifération des pousses axillaires est en principe illimitée. Toutefois, dans la pratique, pour des raisons de conformité, elle est souvent limitée à 10 ou 12 sub-cultures successives [29].

1.2.2.2.2. Multiplication par bourgeonnement adventif

MARGARA [43], souligne que la production spontanée de bourgeons adventifs est relativement rare dans les conditions naturelles. Un des apports de la technique des cultures "in vitro" associée dès son origine à l'emploi des régulateurs de croissance a été d'exploiter la potentialité non exprimée de néoformer des bourgeons après dédifférenciation cellulaire poussée. Ce mode de multiplication repose sur l'utilisation de tissus différenciés pouvant avoir deux évolutions possibles, soit une formation directe de bourgeons adventifs, soit une évolution en cal sur lequel des bourgeons néoformés prennent naissance.

Selon BOXUS [49], cette voie, de point de vue stabilité génétique, est moins sûre, car des divisions cellulaires au niveau des cals présentent parfois des erreurs de copies. MARGARA [43], note que le défaut principal de la formation de plantules à partir de cal est de faciliter la production de variants, surtout lorsque, sont utilisées des mélanges complexes de régulateurs de croissance. Cette technique a été utilisée par MEDEROS et TRUJILLO [50] pour multiplier de pistachier de l'Atlas. Grâce à cette technique CHATIBI et al [47] ont pu avoir des néoformations de bourgeons adventifs à partir de feuille de *Pistacia vera*, prélevées sur des plantules issues de vitro-semis. A la lumière des résultats obtenus, il apparaît que la combinaison entre trois hormones (BAP, AIB, ANA) à des concentrations respectives de 0,5; 1,0; 0,5 mg/l et 1,5; 2,0; 0,5 mg/l, demeurent les plus adéquates pour l'induction de pousses adventives vigoureuses.

1.2.2.2.3. Embryogenèse somatique

1.2.2.2.3.1. Définition

L'embryon zygotique provient du développement du zygote, lequel résulte de la cellule œuf dans le sac embryonnaire. Un apport important de la technique des cultures "in vitro" à la biologie a été de montrer que des cellules somatiques (à 2n chromosomes) pouvaient produire des structures comparables à des embryons, méritant l'appellation d'embryons somatiques [43]. BOXUS [29], a défini l'embryogenèse somatique comme l'ensemble des événements provoqués artificiellement "in vitro" et conduisant à la formation d'un embryon à partir d'une cellule somatique ou germinale, mais sans passer par la fusion gamétique. Les embryons somatiques sont donc en principe génétiquement identiques aux cellules dont ils proviennent et contiennent le même nombre de chromosomes. Les embryons somatiques possèdent une structure bipolaire (axe tige-racine), sont sans connexion vasculaire avec le tissu sous-jacent et peuvent donc être facilement séparés de celui-ci [46].

Selon BOXUS [29], 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) qui pourra se développer en une plante (CONVERSION). Il existe deux types d'embryogenèse somatique, le premier type est l'embryogenèse somatique directe, le second type est l'embryogenèse somatique indirecte. Une embryogenèse somatique directe a été observée, par DUHEM et al [51], sur des embryons zygotiques immatures de cacaoyer. L'embryogenèse somatique indirecte nécessite un passage par un stade de cellule indifférenciées : le cal [52].

1.2.2.2.3.2 Intérêts de l'embryogenèse somatique

MARGARA [43], note que l'embryogenèse somatique paraît être la méthode théoriquement "idéale" de multiplication végétative. Elle devrait en particulier permettre d'utiliser, dans l'avenir les résultats éventuels de manipulations au niveau cellulaire (mutagenèse, fusion de protoplastes,...). ZRYD [46], ajoute que l'embryogenèse somatique apparaît comme une alternative intéressante pour la propagation des plantes. Ceci permettrait de multiplier des espèces ayant un coût élevé de production à l'unité, d'individus particulièrement performants provenant des cultures "in vitro" ou enfin de plantes transformées, qu'il pourrait être difficile de manipuler par voie sexuée. En effet, le même auteur ajoute que les embryons somatiques pourraient être transformés en graines artificielles étant donné que ceux-ci sont morphologiquement semblables aux embryons zygotiques donc, on peut penser qu'ils possèdent des caractéristiques physiologiques identiques.

AUGE et al. [53], note que dans un avenir relativement proche, bien que la tâche soit encore très difficile, on saura sans doute enrober des embryons dormants dans des supports sphériques, contenant un milieu nutritif et protecteur pour l'embryon, les conserver au froid et les semer comme des graines normales. PIATTI [52], montre que la multiplication "in vitro", passant par l'embryogenèse somatique, implique l'utilisation d'un matériel juvénile, un cycle de multiplication du végétal sur lui-même relativement court et un nombre d'individus impressionnants

(de l'ordre de milliers à un million d'embryons pour 1 litre de milieu de culture). De ce fait, la production de semis peut être rentabilisée.

1.2.2.2.3.3. Les facteurs de l'embryogenèse somatique

D'après MARGARA et PIOLLAT [54], l'apparition d'un embryon somatique à partir d'un fragment végétal ou d'un cal est un événement complexe, il est sous la dépendance de conditions intrinsèques, dont le génotype, et des conditions extrinsèques, tels que le milieu de culture, la nature de l'équilibre en régulateurs de croissance et la nature de l'environnement.

a. Conditions intrinsèques

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'un autre ne peut fournir que des bourgeons [55]; [46]. Selon MARGARA [43], l'aptitude à produire un embryon somatique s'exprime d'une manière reproductible que chez certaines espèces dans des conditions définies, à partir de certains tissus, sur un milieu de culture approprié. Et l'importance des facteurs génétiques demeure toujours essentielle. LEBRUN [56], montre que chez la vigne, l'existence d'un effet très significatif du génotype au niveau quantitatif pour l'obtention des cals primaires embryogènes et au niveau de la qualité de l'embryogenèse.

Selon ZRYD [46], diverses parties de la plante peuvent convenir comme explants, pour obtenir des embryons somatiques. L'embryogenèse somatique est observable à partir de tissus variés mais chez une même espèce donnée, tous les tissus n'ont pas la même aptitude. Les tissus de racine, de tige, de pétiole, de feuille, ont été surtout utilisés chez des espèces favorables (pétiole de persil, VASIL et HILDEBANDT, 1966 in [43], (fragment de tige de fenouil, MAHESHWARI et GUPTA, 1965 in [43]), mais également chez des espèces présentant une faible aptitude à l'organogenèse (palmier à huile, RABECHAULT et MARTIN, 1972 in [43]).

D'après LEBRUN [56], les boutons floraux présentent une bonne aptitude à l'embryogenèse somatique chez la vigne. AUGÉ et *al.* [53], constatent que lorsque les tissus deviennent trop âgés, les réactions de dédifférenciation deviennent incomplètes et très rares. En ce qui concerne les graminées, seul l'embryon zygotique immature ou les tissus très jeunes répondent bien à l'embryogenèse somatique [46]. BOXUS [29], montre qu'il est possible d'induire des tissus embryogènes à partir d'embryons zygotiques immatures de pin, mais aussi plus récemment à partir d'aiguilles d'arbres âgés de plusieurs dizaines d'années pour l'épicéa.

b. Conditions extrinsèques

La nature de l'environnement (la lumière, l'hygrométrie et la photopériode) et la nature du milieu de culture ainsi que l'équilibre hormonale jouent un rôle primordial sur l'embryogenèse somatique. En culture "in vitro", TEOULE [57], note que les températures classiquement utilisées varient entre 22° C et 26° C et sont généralement favorables pour le déroulement de l'embryogenèse somatique. En effet, les basses températures appliquées à plusieurs espèces, s'avèrent qu'elles augmentent généralement le pourcentage d'anthères embryogènes et semblent jouer un rôle très important [58]. La germination des embryons somatiques nécessite un traitement par le froid 4° C [53]. Chez le cacaoyer, l'induction de l'embryogenèse somatique se déroule à l'obscurité, tandis que le développement des embryons somatiques nécessite le maintien à la lumière [51].

D'après FKI et *al.* [59], la phase de callogenèse est conduite à l'obscurité totale, à une température de 20° C. Après 8 mois, les cultures sont placées en conditions photopériodiques de 16 h dans une chambre de culture dont la température est de 28° C à la lumière et 21° C à l'obscurité. DRUART [60], note que la qualité de la lumière est sans influence sur le déroulement de l'embryogenèse somatique. Cependant, l'induction de l'embryogenèse somatique indirecte est liée à l'obscurité chez la patate douce [5] et le palmier dattier [61]. 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 [52].

BOXUS [29], note que l'initiation des tissus embryogènes a été observée sur des milieux de cultures dont la composition minérale est parfois fort différente. Les modifications portent le plus souvent sur la forme de la source d'azote : nitrate, ammonium; acides aminés; sur la nature et la concentration de la source de carbone et en dernier, sur la concentration en régulateurs de croissance. Cependant, la concentration de ces composés varie d'une espèce à l'autre. Ces variations ont une faible incidence sur les réactions des cellules. Les facteurs essentiels sont les régulateurs de croissance [63]. L'induction de l'embryogenèse somatique nécessite des repiquages fréquents des tissus en croissance active sur un milieu riche en auxine, suivie de transfert sur un milieu sans auxine (LEVIN, 1951 in [43]).

La présence des auxines dans le milieu et en particulier le 2,4D, s'avère le facteur essentiel pour l'expression des pouvoirs embryogènes des tissus. Le développement des embryons somatiques s'effectue sur un milieu dépourvu d'auxine [63]. Par ailleurs, BOXUS [29] note que la présence du 2,4D et de la BAP est indispensable à la multiplication des embryons somatiques et même à leur développement. ZRYD [46], affirme que les embryons somatiques se développent lorsque le cal a été transféré sur un milieu sans auxine ou contenant une faible dose de celle-ci. De nombreux produits ou extraits naturels de composition mal définie et variable, ont souvent été utilisés dans les expériences sur l'embryogenèse somatique.

AUGE et al. [53], notent que les chercheurs ont constaté que la capacité embryogène d'une souche de cellule dans le milieu riche en auxine, s'annulait complètement au bout de huit semaines, et pouvait être restaurée en ajoutant au milieu le charbon actif. L'addition du charbon actif au milieu de culture permet d'avoir les meilleurs taux de développement des embryons somatiques de cacaoyer [51]. L'embryogenèse somatique peut se réaliser aussi bien sur le milieu gélosé qu'en suspension liquide [46]. L'auteur explique ceci par la facilité d'observer les embryons sur milieu liquide que sur le milieu solide.

La multiplication des tissus embryogènes en suspension dans un milieu liquide est 2 à 4 fois plus importante que sur un milieu gélifié avec l'agar [29]. La culture en milieu gélosé, présente l'inconvénient de fournir des cals, où il est difficile d'observer les embryons. Par contre; le milieu liquide possède l'avantage de permettre une meilleure observation des embryons [46].

1.3. Exigences des cultures en culture "in vitro"

La multiplication "in vitro" des plantes, communément appelée micro-propagation consiste à produire un type parental donné, à partir d'un fragment plus ou moins grand de ce végétal, placé en condition d'asepsie plus ou moins rigoureuse [49]. Quelle que soit la technique utilisée; la micro-propagation requiert des conditions très précises de milieu de culture et d'environnement.

1.3.1. Le milieu de culture

Tout milieu de culture est constitué d'éléments minéraux, d'une source de carbone, de vitamines, de régulateurs de croissance et de gélose pour les milieux solides. Chaque espèce a des exigences propres vis-à-vis des éléments minéraux, des vitamines et de l'alimentation carbonée. Il est difficile d'étudier pour un nouveau matériel l'équilibre le plus convenable, d'où la technique consistant à essayer successivement toutes les formules minérales complètes ou diluées, pour obtenir le meilleur résultat.

1.3.1.1. Les éléments minéraux

On utilise en général, des milieux de composition connus déjà éprouvés tels que MURACHIGE et SKOOG, 1962; HELLER, 1953; NITSCH, 1956[37]. Les cellules végétales mises en culture ont des besoins élevés en macro-éléments et des besoins très faibles en micro-éléments.

1.3.1.2. La source de carbone

Généralement les sources de carbone les plus utilisées sont le saccharose et le glucose, à des concentrations variables selon la nature de l'explant.

1.3.1.3. Les vitamines

Les vitamines sont des substances nécessaires à la croissance des explants. Il existe plusieurs solutions des vitamines élaborées par différents auteurs telle que les vitamines de MOREL in [49].

1.3.1.4. Les régulateurs de croissance

Les régulateurs de croissance sont des composés organiques qui, en très faible quantité, déclenchent, inhibent ou modifient le développement des plantes [64]. Il existe les régulateurs de croissance naturels (auxines et cytokinines) rencontrés chez les végétaux et les régulateurs de croissance de synthèse. Ces derniers peuvent provoquer les mêmes effets que leurs analogues naturels.

Les régulateurs actuellement connus semblent participer à la régulation d'une multitude d'activités biologiques. En effet, ils participent au contrôle de nombreuses étapes du développement, qu'il s'agisse de la croissance, de la différenciation des organes végétatifs ou reproducteurs, de la formation des graines ou de leur germination [65]. Parmi les différents types de phytohormones, nous distinguons trois principales classes : les auxines, les cytokinines et les gibbérellines.

- 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 élévation ainsi que la maturation des fruits [66]. L'acide indole acétique (AIA) est l'auxine naturelle la plus fréquente dans les plantes. Il existe d'autres auxines d'origine synthétique, les plus fréquemment

utilisées sont le 2,4D, l'AIB et l'ANA. D'après MARGARA [67], le choix de l'auxine est fonction de l'objectif de la culture, de ce fait l'ANA, est souvent utilisé dans certaines recherches à caractère physiologique, alors que le 2,4D qui est une auxine très forte, devient rapidement toxique aux concentrations élevées et provoquent la réaction hyperhydrique des tissus. Son utilisation est préconisée pour les travaux sur l'embryogenèse somatique. Cependant, les fortes concentrations de substances de croissance, qui stimulent la néoformation de racines, inhibent celle des bourgeons [68].

- Les cytokinines

Toutes les plantes possèdent des cytokinines. Ces dernières sont élaborées essentiellement par les racines et également au niveau des embryons [53]. L'intervention des cytokinines est signalée dans de nombreux phénomènes physiologiques. Elles stimulent la division cellulaire, favorisent la néoformation des bourgeons ainsi que la ramification des pousses herbacées, retardent la sénescence des feuilles et des fruits, favorisent la synthèse des protéines, lèvent la dormance de certaines graines [66]. Il existe des formes naturelles de cytokinines (zeatine) et de nombreuses formes synthétiques; 2IP, kinétine, BAP,.....etc.

- Les gibbérellines

Les gibbérellines favorisent la croissance de plusieurs sortes d'organes végétaux (Entre-nœuds, feuilles), accélèrent et régularisent la germination de certaines semences et lèvent la dormance des bourgeons [37]. En culture "in vitro", 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 [29].

1.4. L'acclimatation

Selon BOUTHERIN et BRON [69], l'acclimatation des plants issus de vitrocultures est la dernière étape de ce mode de multiplication (micro-propagation). L'acclimatation est la phase de croissance qui succède aux conditions "in vitro". Certains préfèrent le terme "sevrage", qui sans doute préjuge mieux les stress que vont subir les vitroplants peu habitués aux stress hydrique, puisque vivants en atmosphère confinée, pas plus qu'aux stress pathologiques, puisque vivants en conditions aseptiques, ni qu'à des stress physiologiques importants, puisque élevés sur milieux sucrés, ils n'ont guère besoin de photosynthétiser [29]. Il est, en effet, important de bien passer ce stade sous peine de voir annuler les efforts précédents pour cela, il faut maîtriser trois éléments :

- le climat ;
- le substrat ;
- la protection sanitaire.

1.4.1. Le climat

Avant d'évoquer chaque paramètre du climat, il faut se souvenir que :

- 1- La plantule née en "in vitro" est en atmosphère saturée où les mouvements d'air sont nuls.
- 2- La température assurée est relativement élevée et très régulière.
- 3- La lumière est artificielle, la plantule ne "connaît" donc pas le soleil.

1.4.1.1. L'humidité relative

Le maintien, pendant les premiers jours de l'acclimatation, d'un degré hygrométrique élevé, proche de la saturation, est un des points les plus importants. Il faut bien évidemment limiter les pertes d'eau, dues aux conditions anatomiques et physiologiques particulières des vitro-plants. Ceci peut s'obtenir en maintenant les plantules à l'étouffée sous un film plastique. L'eau contenue dans le substrat, en s'évaporant, créera une humidité relative élevée, si le volume de la bâche plastique est bien proportionné au volume du substrat, celui-ci doit rester humide, mais jamais gorgé d'eau [29].

Ce système simple et peu coûteux, donne en général une entière satisfaction. En effet, le "mist" système ou le "fog" système donne aussi des atmosphères saturées en eau sans apporter l'eau au niveau des substrats. La fréquence de la diffusion sera graduellement réduite afin d'endurcir les plantes. Ce système donne d'excellents résultats et est pratiquement indispensable pour réussir l'acclimatation des plantes délicates [69]. Un excès d'humidité surtout à la surface du sol peut entraîner des pourritures du collet [29].

1.4.1.2. La lumière

Les feuilles des vitro-plants sont minces et ressemblent en général à des feuilles d'ombre. Elles devront donc être acclimatées pendant 3 à 4 semaines sous ombrage partiel, surtout en période estivale [29].

1.4.1.3. La température

Les températures de l'air et du substrat doivent être si possible contrôlées. Un chauffage de fond sera installé si nécessaire sur les tablettes de serre. La serre elle-même sera chauffée et refroidie [29].

1.4.1.4. Le substrat

En dehors des qualités traditionnelles d'un substrat de multiplication léger et drainant, il devra être irréprochable sur le plan sanitaire. Le classique mélange 2/3 tourbe et 1/3 sable ou perlite, est généralement le substrat le plus utilisé dans le processus d'acclimatation [53]. Le pH ne doit pas être trop élevé, le milieu ne doit pas être trop riche [29].

1.4.1.5. La protection sanitaire

Lors de l'acclimatation, température et hygrométrie élevées sont des conditions favorables à l'explosion de certains fungi, comme le *Botrytis*. Pour prévenir ce dernier, il faut toujours utiliser un substrat désinfecté depuis plusieurs semaines au moins [29].

1.5. Données générales sur la cytogénétique

La cytogénétique est la science qui fait le lien entre la cytologie et la génétique. Elle a pris une part active à la compréhension des mécanismes héréditaires et du monde végétal dans sa diversité. C'est aussi une des nombreuses disciplines sur lesquelles s'appuie l'amélioration des plantes. Elle se situe avant tout en amont de la sélection. JAHIER [70], note que la cytogénétique participe à :

- la connaissance du matériel végétal utilisé: nombre de chromosomes, polyploïdie, allopolyploïdie....
- l'établissement de carte génétique.
- l'exploitation de la variabilité intra-spécifique et inter-spécifique ou induite.

Par ailleurs, la cytogénétique a trouvé un nouveau domaine d'application dans l'étude et l'utilisation des produits issus de culture "in vitro" (hybrides somatiques, variants somaclonaux). La cytogénétique peut être impliquée au niveau même de la création variétale en participant à l'explication et la résolution de problèmes ponctuels rencontrés par les sélectionneurs: instabilité, stérilité.

1.5.1. Etude des chromosomes lors de la division cellulaire

JAHIER [70], rapporte que les méthodologies employées, en cytogénétique, sont nombreuses. Elles concernent avant tout l'étude des chromosomes lors de la mitose et la méiose, par les techniques classiques mais aussi par des techniques plus récentes: hybridation in situ.

1.5.1.1. La mitose

La mitose est le processus par lequel une cellule-mère donne deux cellules filles absolument identiques à elle-même. Elle conduit à la répartition du matériel génétique en parts égales lors de la division cellulaire. La mitose comprend quatre étapes principales :

- La prophase : au cours de laquelle les chromosomes deviennent apparents se fissurent longitudinalement en deux filaments identiques: deux chromatides sœurs. A la fin de cette étape, la membrane nucléaire se fragmente et semble disparaître.

- La métaphase : pendant laquelle les chromosomes se répartissent dans un plan appelé plaque métaphasique ou plaque équatoriale, située au plan équatoriale d'un fuseau de division constitué de microfibrilles.

- L'anaphase : correspond à la séparation des deux chromatides de chaque chromosome et à leur migration de part et d'autre de la plaque équatoriale vers les deux pôles du fuseau de division.

- La télophase : durant laquelle les chromosomes sont scindés en deux lots identiques, le fuseau de division disparaît, la membrane nucléaire réapparaît, deux noyaux sont formés, contenant la même garniture chromosomique que le noyau parental.

Après cette phase, la cellule entière se divise et chaque cellule fille formée contient un des noyaux fils.

1.5.2. Observation des chromosomes, techniques de base

Les techniques d'observation des chromosomes n'ont pas cessé d'évoluer depuis les premiers examens du noyau par Flemming, en 1888. Ceci signifie que l'intérêt, que le monde scientifique a porté aux chromosomes ne s'est jamais démenti. Les chromosomes ont à la fois une certaine constance et un certain polymorphisme, aussi bien pour ce qui concerne leur nombre que leur forme, leur phénotype. JAHIER [70], note que les techniques présentées ont pour objectif la réalisation de préparations chromosomiques qui permettent de :

- Dénombrer les chromosomes ;
- Etudier leur morphologie pour l'établissement de caryotype ou pour la mise en évidence de modification chromosomique.

Le matériel d'étude est constitué de semences germées, de plantes ou de tissus en culture "in vitro", placés dans des conditions permettant une croissance active. Le prélèvement des tissus se fait au moment, où le pourcentage de cellules en division (index mitotique) est élevé. JAHIER [70], signale sept phases principales pour la réalisation des préparations:

1.5.2.1. Le prétraitement

Il se fait par trempage des tissus en division dans un agent mitoclasique qui a pour effets principaux de :

- bloquer les divisions mitotiques au stade métaphasique,
- contracter les chromosomes.

Les agents utilisés sont la colchicine, l' α -bromonaphtalène et l'eau froide (0 à 2°C). Chaque molécule de colchicine, alcaloïde extrait de la colchique, se lie étroitement à une molécule de tubuline et empêche sa polymérisation. Cette association provoque la disparition du fuseau mitotique et empêche tout mouvement des chromosomes en quelques minutes [71].

1.5.2.2. La fixation

La fixation a pour but d'assurer une immobilisation des constituants cellulaires dans un état aussi voisin que possible de l'état vivant. Elle doit être adaptée, à la préservation des constituants chimiques (ADN) et de la structure nucléaire ou chromosomique [71]. Selon JAHIER [70], les fixateurs utilisables sont très nombreux. Ceux qui sont utilisés dans les techniques décrites sont: l'acide acétique et les fluides I et II proposés par Carnoy (1986).

Carnoy I: éthanol- acide acétique (3:1), Carnoy II: éthanol- chloroforme- acide acétique (6:3:1). La durée de la fixation doit être supérieure à 30 minutes; elle peut être prolongée pendant quelques jours [71].

1.5.2.3. Le stockage

Il est possible de différer les autres phases. Le matériel peut être conservé pendant plusieurs mois dans l'éthanol, le plus souvent éthanol 70%. Certains fixateurs comme le Carnoy I peuvent également servir de solution de stockage.

1.5.2.4. L'hydrolyse

Cette étape est généralement nécessaire pour obtenir ultérieurement un bon étalement des cellules et des chromosomes entre lame et lamelle. L'agent le plus fréquemment employé pour le ramollissement des tissus est l'acide chlorhydrique. L'hydrolyse dissout les sels pectiques de la lamelle moyenne et permet l'éclaircissage du cytoplasme. En outre, l'acide chlorhydrique libère les groupements aldéhydiques sur les molécules de sucre de l'ADN par destruction des liaisons entre les bases puriques et le désoxyribose.

1.5.2.5. La coloration

Le colorant le plus utilisé est le réactif de Schiff, préparé à partir de la fushine basique. Il se fixe sur les groupements aldéhydiques libérés lors de l'hydrolyse, pour donner une coloration rouge aux chromosomes. Cette technique de coloration est appelée technique "Feulgen" décrite pour la première fois par Feulgen en 1926.

1.5.2.6. Le montage

Ces techniques présentées concernent les mitoses dans les méristèmes racinaires. Dans ce cas, la zone méristématique hydrolysée est colorée et isolée, déposée sur une lame dans une goutte d'eau acétique ou de carmin acétique, et écrasée entre lame et lamelle pour assurer la dissociation des cellules. Il faut éviter un écrasement trop violent car il y a risque d'éclatement des cellules. Puis, afin d'assurer un bon étalement des chromosomes, un léger chauffage de la lame est conseillé avant d'exercer une pression homogène sur la lamelle.

1.5.2.7. L'observation

Les chromosomes végétaux ont une longueur moyenne d'environ 6 μm . Les cellules en division sont repérées rapidement au microscope photonique à l'aide d'un objectif de faible grossissement $G=10$ généralement. L'observation des chromosomes est faite à un grossissement supérieur entre 1000 et 1500 (oculaire x objectif). La conservation des préparations pendant plusieurs années peut être souhaitée pour de nombreuses raisons (lames de démonstration, possibilité d'étudier ultérieurement le matériel pour un autre objectif....).

1.5.3. Etablissement de caryogrammes

JAHIER [70], note qu'il est possible d'obtenir par cellule un caryotype, représentation sous forme de dessin ou de photographie de chaque paire chromosomique. L'ensemble de ces caryotypes permet d'établir une carte d'identité chromosomique ou caryogramme. L'auteur ajoute que le caryogramme peut être recherché :

- pour des raisons d'ordre taxonomique, correspondant alors à l'acquisition d'un nouveau critère de classification,
- pour l'étude des remaniements chromosomiques.

L'établissement d'un caryogramme repose sur l'analyse d'un minimum de 15 à 20 plaques métaphasiques complètes présentant des chromosomes bien étalés et très nets.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1. Lieu de l'expérimentation

L'expérimentation concernant la vitro-propagation dont, l'embryogenèse somatique, s'est déroulée au laboratoire d'amélioration des plantes au département d'agronomie à l'université de Blida. En ce qui concerne l'étude du caryotype l'expérimentation s'est effectuée au laboratoire d'éco-génétique au département de biologie à l'université de Bab Ezzouar.

2.2. Matériel végétal

Dans notre étude, nous avons utilisé des graines du pistachier de l'Atlas, provenant de pied-mères différents. Ces graines ont été récoltées en Novembre 2003 dans un peuplement naturel de la région de MESSAAD dans la wilaya de DJELFA, elles nous ont été fournies par l'INRF (Institut National de Recherches Forestières). Pour la levée de dormance des graines, nous avons suivi le procédé indiqué par ROUSKAS, (1996) in ALETA et al [40] qui consiste à faire subir aux graines un traitement au froid humide à une température de 4° C pendant 40 jours.

Après la stratification, les graines ont été trempées dans de l'eau distillée, changée régulièrement pendant 24 heures afin de ramollir l'épicarpe. Par un test densimétrique nous avons éliminé les graines qui flottent car elles sont vides. Le mésocarpe dur a été éliminé à l'aide d'un coupe-ongle (scarification mécanique), car celui-ci est considéré comme un inhibiteur de la germination [40]. Par la suite les graines ont subi une désinfection et un semis.

2.3. Désinfection du matériel végétal

Pour la désinfection des graines, nous avons suivi la méthode de MESTOURI [72] qui consiste à faire un trempage des graines dans de l'alcool (éthanol 96°) pendant 10 secondes, suivi d'un trempage dans l'hypochlorite de calcium à 6% pendant 15 minutes enfin, les graines sont rincées trois à cinq fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer toutes traces d'hypochlorite de calcium. La désinfection du matériel végétal se déroule dans des conditions d'asepsie totale sous hotte à flux laminaire, juste avant la mise en culture des graines.

2.4. Milieux de culture

Un milieu de culture s'élabore au moyen d'éléments minéraux majeurs (macro-éléments) et d'éléments mineurs (micro-éléments). Toutefois, d'autres substances doivent donc venir en complément de la solution minérale; il s'agit des vitamines, des acides aminés, d'une source de carbone et des régulateurs de croissance. Le milieu de culture est une solution aqueuse, elle est solidifiée par une substance extraite des algues; la gélose. Deux milieux de culture de base ont été utilisés, il s'agit du milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) [73] et MURASHIGE et SKOOG (1962) [73] dilué au demi (tableau 2.1). L'ajustement de potentiel hydrique pH qui est de 5,7 à 5,8 se fait par l'utilisation du NaOH et HCL selon que le milieu serait acide ou basique. Les milieux de culture distribués dans des tubes à essai à raison de 25 ml par tube, sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120° C, et sous une pression de un bar. Pour les cultures réalisées dans des boîtes de Pétri, le milieu est stérilisé à 120° C pendant 20 minutes avant d'être distribué sous hotte près d'un bec benzène.

2.4.1. Solutions minérales

Pour la germination des graines et la croissance des vitro-semis, nous avons utilisé le milieu de MURASHIGE et SKOOG dilué de moitié (MS/2). Quant à l'embryogenèse somatique? nous avons utilisé le milieu de MURASHIGE et SKOOG, appelé milieu MS.

Tableau 2.1 : Composition des milieux de culture utilisés

Solutions	MS	MS/2
	Macro-éléments mg/l	
NH ₄ NO ₃	1650	825
KNO ₃	1900	950
Ca Cl ₂ .2H ₂ O	440	220
KH ₂ PO ₄	170	85
MgSo ₄ .7H ₂ O	370	185
	Micro-éléments mg/l	
Mn So ₄ .H ₂ O	16.90	16.90
H ₃ Bo ₃	6.20	6.20
ZnSo ₄ .7H ₂ O	8.60	8.60
KI	0.83	0.83
Na ₂ Mo ₄ .H ₂ O	0.25	0.25
CuSo ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025

La présence du fer est nécessaire pour la croissance des plantes est ajouté sous une forme chélatée à la concentration de 10 à 30 mg/l (soit 0,06 à 0,20.10⁻³ mole de fer) [Tableau 2.3]. Les vitamines sont des substances nécessaires à la croissance des explants. Il existe plusieurs solutions des vitamines élaborées par différents auteurs telles que les vitamines de MOREL in [49], utilisées au cours de notre expérimentation (tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Solution vitaminique de MOREL (1952).

Vitamines	Concentration en mg/l
Panthoténate de calcium	1
Méso inositol	100
Biotine	0.01
Acide nicotinique	1
Pyridoxine (vitamine B6)	1
Thiamine (vitamine B1)	1

Tableau 2.3 : la solution stock du fer EDTA; la glycine et l'anti-oxydant.

Na ₂ EDTA	3730 mg/l
FesO ₄ ,7H ₂ O	2780 mg/l
Glycine (acide aminé)	20 mg/l
Acide ascorbique (anti-oxydant)	0.1 g/l

2.4.2. Composition organique des milieux de culture

2.4.2.1. Source de carbone

La faible assimilation chlorophyllienne ou son absence en culture "in vitro" nécessite l'apport de carbone sous forme organique. C'est pourquoi il faut ajouter au milieu de culture les glucides nécessaires. La source de carbone est ajoutée sous forme de saccharose (C₁₂H₂₂O₁₁) à une concentration de 20 g/l pour les étapes de germination des graines et 30 g/l pour les essais de l'embryogenèse somatique.

2.4.3.2. La gélose

Pour la solidification des milieux de culture, nous avons utilisé l'Agar-agar à raison de 8 g/l.

2.4.3. Les combinaisons hormonales

Les hormones de croissance sont ajoutées aux milieux de culture, seules ou associées à des concentrations variables et selon le stade de développement. Pour la germination des graines de pistachier de l'Atlas, nous avons utilisé le milieu de culture de MURASHIGE et SKOOG [73] dilué en demi (MS/2). Dans ce cas nous avons utilisé deux balances hormonales; gibbérelline/auxine (tableau2.4) afin de mettre en évidence leur influence sur l'allongement des entre-nœuds des vitro-plants, car, une meilleure élongation de ces derniers permet une bonne fragmentation par la suite.

Tableau 2.4 : concentration en hormone de croissance du milieu de germination.

Milieu	Dose hormonale AG ₃ /AIB mg/l	
MS/2	M ₀	M ₁
	0	0.4/0.2

Pour l'induction de la callogenèse, nous avons utilisé le milieu MS auquel on ajoute des régulateurs de croissance dont les auxines et les cytokinines sont combinées (tableau 2.5). Les principaux régulateurs de croissance utilisés sont :

- Les auxines : Acide Naphtalène Acétique (ANA), Acide 2-4 dichlorophénoxy-acétique 2,4 D.
- Les cytokinines : 6 benzylaminopurine (BAP).

Tableau 2.5: les combinaisons hormonales utilisées pour l'embryogenèse somatique

Première combinaison 2,4D+BAP mg/l	
A ₀	0 mg/l(2,4D)+0 mg/l(BAP)
A ₁	1 mg/l(2,4D)+1 mg/l(BAP)
A ₂	2 mg/l(2,4D)+2 mg/l(BAP)
A ₃	3 mg/l(2,4D)/3 mg/l(BAP)
Deuxième combinaison ANA+BAP mg/l	
C ₁	1mg/l(ANA)+1 mg/l(BAP)
C ₂	2 mg/l(ANA)+2 mg/l(BAP)
C ₃	3 mg/l(ANA)+3 mg/l(BAP)

Pour augmenter les capacités de production des embryons somatiques, il est nécessaire de passer par une phase de multiplication des cals. Celle-ci permet d'amplifier les masses callogènes en culture, afin de compenser l'insuffisance du matériel végétal initial.

Pour l'induction d'embryons somatiques, nous avons repiqué les cals sur le milieu de culture de base c'est-à-dire sans hormones de croissance. Nous avons utilisé deux types de milieu: solide et liquide.

2.5. Conditions de culture

La mise en culture se déroule dans des conditions d'asepsie totale sous une hotte à flux laminaire. Tous les instruments utilisés (pincés, scalpels, bistouris) lors de la mise en culture doivent être stérilisés au préalable à l'étuve à 180°C pendant une heure. Au cours de la mise en culture, le matériel utilisé est désinfecté à l'alcool 96° et flambé à l'aide d'un bec benzène. Après la désinfection, les graines sont mises à germer à raison d'une graine par tube à essai, contenant environ 25 ml de milieu de culture. Les graines sont réparties suivant les deux traitements M₀ et M₁, chaque traitement est répété 20 fois. Chaque répartition comprend 24 graines.

Les tubes contenant les graines sont placés dans la chambre de culture sous des conditions physiques suivantes :

- La température est réglée à 25 ±1°C;
- La photopériode est de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. La lumière est assurée par une série de néons d'une intensité lumineuse de l'ordre de 2000 à 3000 lux environ.

Des observations journalières ont été effectuées afin de suivre la germination ainsi que l'élimination des tubes contaminés (contaminations bactériennes et cryptogamiques). Après un mois de la mise en culture, la quantité de vitro-semis obtenue (nombre) est partagée en deux; une partie est destinée à une éventuelle acclimatation, l'autre partie est destinée à la callogenèse. Pour les essais d'acclimatation, le travail s'effectue en trois étapes : le transfert des plantules dans des gobelets; le transfert des plantes dans le sol et enfin le transfert des plantes en pleine terre.

Quant à la callogenèse, les vitro-semis ont été fragmentés en feuilles, entre-nœud, racines et cotylédons. Ces fragments ont été mis dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture à raison de cinq fragments par boîte. Les fragments sont répartis suivant les six traitements, chaque traitement est répété trois fois. Les boîtes de Pétri contenant les fragments sont maintenues à l'obscurité totale pendant trois semaines, ceci pendant la phase d'initiation de la callogenèse. Par la suite les boîtes sont exposées à une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. L'entretien des cultures se fait par des repiquages réguliers; toutes les deux semaines. Il consiste à transférer les explants sur un milieu de culture frais de même composition ou de composition différente.

2.6. L'acclimatation

L'acclimatation est la phase qui succède aux conditions "in vitro" [29]. Le vitro-plant est totalement en ambiance artificielle, il va falloir l'acclimater dans un milieu nouveau pour lui; pour qu'il puisse utiliser ses propres mécanismes naturels [74]. L'acclimatation s'effectue en plusieurs étapes délicates:

2.6.1. Première étape: le transfert des plantules dans des gobelets

A la sortie des tubes, les plantules mesurant 2 à 3 cm, sont débarrassées de la gélose à l'aide d'une pince fine, ensuite, les racines sont lavées délicatement à l'eau du robinet dans un bœcher pour enlever ce qui reste comme milieu de culture. Les plantules sont ensuite repiquées dans un substrat composé de 1/3 de sable et 2/3 de tourbe. Le mélange est préalablement stérilisé à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C. Les plantules sont arrosées avec la solution KNOP à raison de 2 arrosages par semaine. Afin de maintenir une humidité relative élevée, proche de la saturation, les petits pots seront recouverts d'un film plastique pour éviter la déshydratation des plantes, le film plastique ne sera enlevé que 15 jours après la première transplantation. Les gobelets sont placés dans une mini-serre au laboratoire, éclairée par une rangée de deux néons, la nature de l'éclairage est donc semblable à celle de la chambre de culture.

2.6.2. Deuxième étape: le transfert des plantules dans le sol

Après 3 à 4 semaines, les plantules repiquées dans le mélange se développent normalement, le substrat utilisé dans la phase de transition est préparé avec les proportions suivantes :

- 50% de sol bien tamisé ;
- 30% de sable fin ;
- 20% de tourbe.

Les plantules sont transférées dans de grands pots, que nous avons placé dans la serre afin de favoriser leur durcissement. Le temps passé en serre durera jusqu'à ce que les conditions du plein champ soient réunies.

2.6.3. Troisième étape: le transfert des plantules en pleine terre

Les plantules seront transférées dans leur milieu naturel c'est-à-dire à Djelfa, pour une éventuelle étude de leur comportement (adaptation).

2.7. Etude des chromosomes du pistachier

Le but recherché par ce travail étant la recherche d'une méthode, permettant l'obtention de plaques métaphasiques, ce qui nous a poussé à réaliser des combinaisons entre :

- les périodes du prélèvement,
- la solution et durées de prétraitement,
- la solution et durées de fixation,
- les durées d'hydrolyse.

2.7.1. Germination des graines

Les graines de pistachier de l'Atlas débarrassées de leur mésocarpe, sont mises à germer dans des boîtes à Pétri, sur une double couche de papier filtre imbibé d'eau, à raison de 25 graines par boîte et à température ambiante.

2.7.2. Prélèvements

Après la germination nous avons réalisé le prélèvement des pointes racinaires longues de 2 à 3 mm sous loupe binoculaire. Les prélèvements sont effectués selon trois périodes durant la journée :

- les prélèvements matinaux à 6h.
- les prélèvements de l'après midi à 13h.
- les prélèvements de fin de journée à 18h.

2.7.3. Prétraitement

Les racines prélevées sont soumises à des prétraitements à l'aide de deux solutions: l' α -bromonaphtalène saturée (100 gouttes/l) et de la colchicine 0,5 %. Les durées de prétraitement testées sont 1h, 2h, 3h, 4h à température ambiante et ceci pour les deux solutions.

2.7.4. Fixation

Après le prétraitement, les racines sont rincées à l'eau distillée et mises dans les fixateurs. Les fixateurs utilisés sont le CARNOY II, qui est composé de l'éthanol, de chloroforme et de l'acide acétique (6:3:1) et la solution de PINNAR composée de l'éthanol, de chloroforme et de l'acide propénoïque (6:3:1). Pour les deux fixateurs, la durée de fixation testée est de 24h à 5°C.

2.7.5. Stockage

Le matériel prétraité et fixé auparavant, a été stocké dans l'éthanol 70° et cela pour qu'on puisse différer les autres traitements à cause de la germination des graines qui n'est pas groupée.

2.7.6. Hydrolyse

Les racines ont été hydrolysées dans une solution d'HCl (1N) à 60°C. Les durées d'hydrolyse testées sont 10 mn, 15 mn et 20 mn. Cette étape est

généralement nécessaire pour obtenir ultérieurement un bon étalement des cellules et des chromosomes, entre lame et lamelle.

2.7.7. Coloration

Le colorant utilisé est le réactif de Schiff préparé à partir de la fushine basique (annexe 1). Il se fixe sur les groupements aldéhydiques, libérés lors de l'hydrolyse pour donner une coloration rouge aux chromosomes. Cette technique de coloration est appelée technique "Feulgen" décrite pour la première fois par Feulgen (1926).

2.7.8. Montage et observation

La zone méristématique hydrolysée est colorée et isolée, déposée sur une lame dans une goutte d'eau acétique ou de carmin acétique et écrasée entre lame et lamelle pour assurer la dissociation des cellules. Il faut éviter un écrasement trop violent car il y a risque d'éclatement des cellules. Puis, afin d'assurer un bon étalement des chromosomes, un léger chauffage de la lame est conseillé avant d'exercer une pression homogène sur la lamelle. Les chromosomes végétaux ont une longueur moyenne d'environ 6 μm . Les cellules en division sont repérées rapidement au microscope photonique à l'aide d'un objectif de faible grossissement $G=10$ généralement. L'observation des chromosomes est faite à un grossissement supérieur entre 1000 et 1500 (oculaire x objectif).

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. La germination des graines

Les graines, après avoir subi une scarification et une désinfection, ont été mises à germer sur un milieu de culture sans hormones de croissance (M_0) et un milieu de culture contenant de l'AG₃/AIB (M_1). L'analyse statistique montre que la moyenne générale de la germination des graines utilisées est de 62,73. Les graines commencent à germer à partir du troisième jour après la mise en culture. Ceci peut être expliqué par un bon état physiologique des graines; obtenu après le traitement au froid d'un mois. Au cours de notre expérimentation, nous avons remarqué que la germination est hétérogène, ceci est dû à l'état de la semence. Un nombre restreint de graines reste à l'état de latence, sans aucun développement. Ce phénomène peut s'expliquer par la parthénocarpie qui est très connue chez le pistachier. Ainsi, la fécondation croisée chez le pistachier de l'Atlas aboutit le plus souvent à la production de fruit parthénocarpique [15].

MULLER [75] pense que le problème de dormance se rencontre le plus souvent chez les feuillus. Il ajoute que la germination dépend de l'époque de récolte des graines (graines immatures), mais aussi des conditions de stockage. Le taux de germination des graines du pistachier sur le milieu sans hormones est de 60.42%, et il est de 65.03% sur le milieu de culture sans hormones de croissance (tableau 3.1). L'analyse de variance ne révèle aucune différence entre les deux milieux de culture utilisés M_0 et M_1 (figure3.1) (annexe 2).

Tableau 3.1: Taux des germinations des graines

Milieu	M ₀	M ₁
Taux de germination	60,42 ± 13,81	65,03 ± 7,88

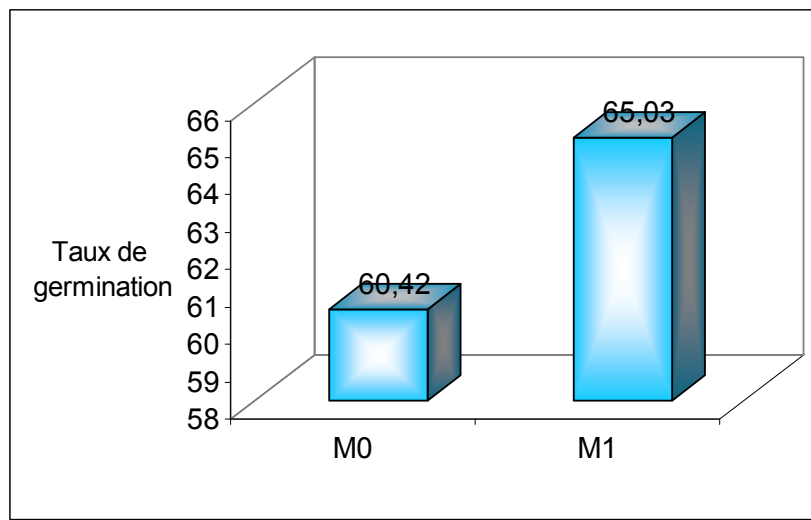
Figure 3.1 : Taux de germination de graines de *Pistacia atlantica* Desf sur milieu avec hormone M₁ et sans hormone M₀.Figure 3.2 : Vitro-semis de *Pistacia atlantica* Desf. obtenus sur milieu de culture sans hormone de croissance



Figure 3.3 : Vitro-semis de *Pistacia atlantica Desf* obtenus sur milieu de culture avec hormones de croissance.

3.2. Influence des milieux sur la longueur moyenne de la tige, le nombre moyen des feuilles et le nombre moyen des nœuds

Un mois après la mise en culture, les vitro-plants indemnes de toute infection et atteignant un bon allongement ont été mesurés afin d'avoir leurs longueurs moyennes, un dénombrement de leurs feuilles et de leurs nœuds a été aussi effectué

3. 2.1. Longueur moyenne de la tige des vitro-semis

Les observations effectuées montrent une très nette différence de croissance entre les vitro-semis issus des deux traitements avec les hormones de croissance utilisés (figure 3.2 et 3.3). L'analyse de la variance (annexe 3) montre un effet significatif de la concentration des hormones sur la longueur des vitro-semis, la comparaison de moyenne, permet de dégager deux groupes homogènes (tableau 3.2).

Tableau 3.2 : longueur moyenne des vitro semis après un mois

Traitements	Longueur moyenne (cm)	Groupe homogène
M ₀	3,46 ± 0,95	B
M ₁	6,46 ± 2,09	A

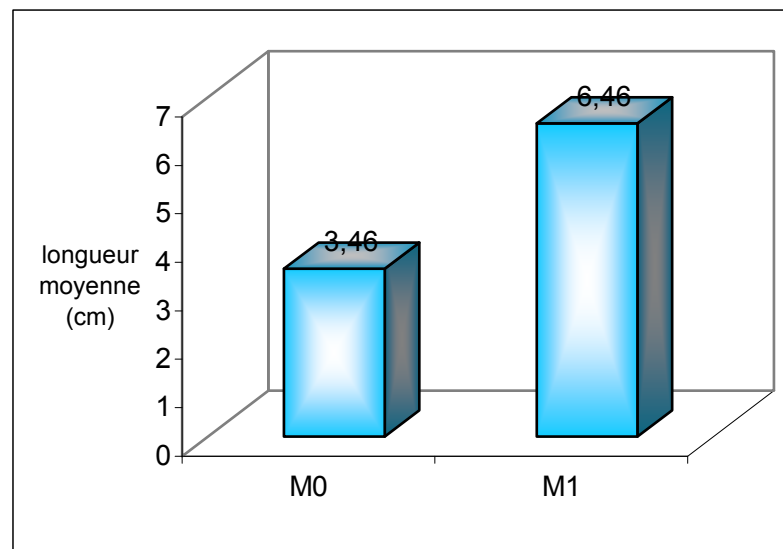


Figure 3.4 : Longueur moyenne des vitro- semis issus de milieu sans et avec hormones de croissance.

3.2.2. Nombre moyen des feuilles

L'analyse de la variance (annexe 4), au risque $\alpha = 0.05$, ne révèle aucune différence significative entre les deux traitements, donc les traitements utilisés n'ont aucun effet sur la production des feuilles et même leur nombre (figure 3.5). Ce résultat confirme celui de SCRIBAN [4], qui note que le nombre de feuille n'est pas influencé par l'apport des hormones, cependant la taille des feuilles est nettement influencée. Ainsi la taille des feuilles des vitro-semis obtenue sur le milieu M₁, est plus importante par rapport aux feuilles des vitro-semis du milieu M₀ (figure 3.2 et 3.3).

Tableau 3.3 : nombre moyen des feuilles

Traitements	Nombre moyen des feuilles	Groupe homogène
M ₀	4,67±1.48	A
M ₁	4.77±1,89	A

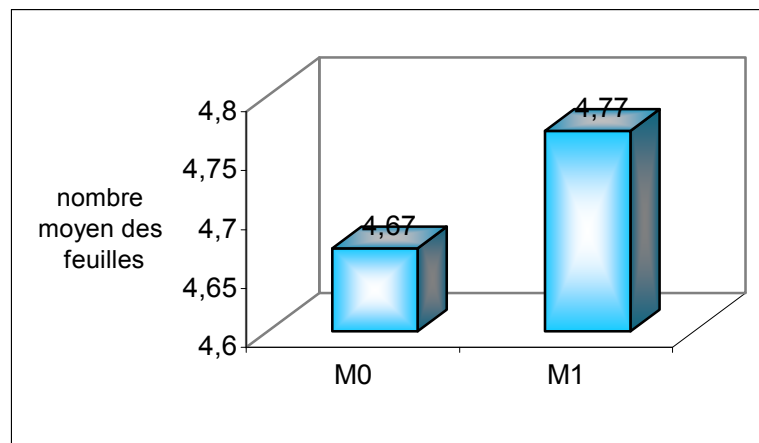


Figure 3.5 : Nombre moyen des feuilles des vitro- semis issus sur milieu de culture sans et avec hormones de croissance.

3.2.3. Nombre moyen des nœuds

Les observations faites après quatre semaines de culture, nous permettent de déduire que le nombre de nœuds est nettement influencé par l'apport des hormones de croissance dans le milieu de culture. L'analyse de la variance (annexe 5) montre un effet significatif des doses hormonales testées sur le nombre moyen de nœuds (figure 3.6). Le test de la PPDS, fait apparaître deux groupes homogènes A et B (tableau 3.4).

Tableau 3.4 : Nombre moyen des nœuds

Traitements	Nombre moyen des nœuds	Groupes homogènes
M ₀	2.26±0,78	A
M ₁	1,59±1,03	B

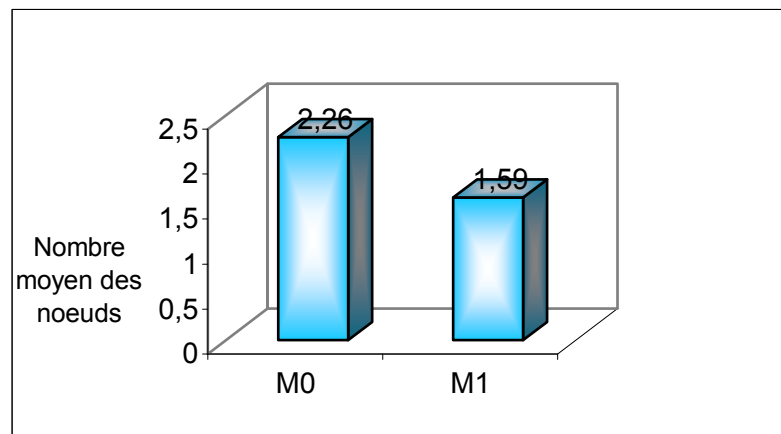


Figure 3.6 : Nombre moyen des noeuds des vitro- semis issus sur milieu de culture sans et avec hormones de croissance.

L'analyse statistique, nous montre que le traitement hormonal utilisé AIB/AG₃ influe positivement sur la croissance des vitro-semis et sur le nombre de nœuds. Cependant il n'a aucun effet sur le nombre des feuilles. L'amélioration de la longueur des vitro-semis et du nombre de nœud, est un critère important. Ils nous permettent d'effectuer une meilleure fragmentation des plantules, pour une éventuelle multiplication.

3.3. L'acclimatation

3.3.1. Le transfert des plantules dans des gobelets

Nous avons transféré 115 vitro-semis sur le substrat constitué d'un mélange de 1/3 de sable et 2/3 de tourbe, dont 72 % se sont développés sur un milieu sans hormones de croissance, présentant un système racinaire bien

développé, les 28% restant ont été cultivés sur un milieu additionné d'hormones de croissance (AG₃/AIB 0.4/0.2 mg/l), ayant une racine principale très réduite. Pendant les cinq premiers jours de l'acclimatation, nous avons observé un arrêt de la croissance, dûe probablement au changement des conditions d'environnement des plantules (diminution de l'humidité, changement de substrat), mais elles reprennent par la suite leur croissance.

Pour estimer la croissance des vitro-plants, après leur sortie des tubes de culture, nous avons procédé à la mesure de la longueur de la tige et le dénombrement des feuilles, afin d'évaluer l'importance de la production foliaire qui, constitue l'un des critères de développement des plantules, pendant 15 jours pour la première étape de transition de notre travail.

3.3.1.1. Effet de l'acclimatation sur la longueur moyenne de la tige

La première mesure a eu lieu le premier jour du transfert sur le substrat (tourbe + sable), la seconde mesure 15 jours après, au moment où nous avons enlevé le film plastique. Les résultats montrent que 99 plantules des 115 vitro-plants acclimatés ont eu une bonne reprise. La longueur moyenne des tiges a augmenté (tableau 3.5) pour le milieu sans hormones de 0.93cm, pour le milieu avec hormones de croissance la moyenne a augmenté de 0.22cm.

Tableau 3.5: Effet de l'acclimatation sur la longueur moyenne de la tige

Nombre de jours	Milieu sans hormones		Milieu avec hormones	
	Nombre de vitro-plants acclimatés	Moyenne de la longueur de la tige	Nombre de vitro-plants acclimatés	Moyenne de la longueur de la tige
1 ^{er} jour d'acclimatation	83	2.84cm	32	2.45cm
15 ^{ème} jour de l'acclimatation	78	3.77cm	21	2.67cm

3.3.1.2. Effet de l'acclimatation sur le nombre moyen des feuilles

Nos observations sur la production foliaire sont effectuées de la même façon que la mesure de la longueur de la tige. Les résultats montrent que durant les 15 premiers jours passés dans les gobelets, les plantules présentent un bon feuillage, d'un vert vif, et ceci pour les deux milieux ; sans et avec hormones de croissance (figure 3.7). Quinze jours, après la sortie du tube de culture (figure 3.8), nous avons dénombré les feuilles. Les plantules obtenues sur les deux milieux de culture présentent une augmentation du nombre de feuilles (tableau 3.6). Durant les 15 premiers jours de l'acclimatation, 16 plantules des 115 acclimatées, n'ont pas survécu au changement, et ceci quelque soit le milieu de culture (tableau 3.5 et 3.6) dont le pourcentage est de 14%. Une partie de ces plantules n'ont pas repris leur croissance et l'autre partie des plantules ont subi un dessèchement, dû probablement au transfert du tube vers le substrat (figure 3.9).

Selon BOXUS [29], suite aux conditions de confinement créées "in vitro", les vitro-plants présentent plus ou moins de profondes modifications morphologiques, anatomiques et physiologiques. Les feuilles des plantules obtenues "in vitro" ne sont que peut ou pas recouvertes de couches cireuses sur l'épiderme, la morphologie et la densité des stomates sont souvent modifiées, leur fonctionnement est altéré, les cellules palissadiques sont moins abondantes et contiennent moins de chloroplastes. Ces modifications sont dûes avant tout, aux conditions de croissance en milieu saturé en eau.

Tableau 3.6 : Effet de l'acclimatation sur le nombre moyen des feuilles

Nombre de jours	Milieu sans hormones		Milieu avec hormones	
	Nombre de vitro-plants acclimatés	Nombre moyen de feuilles	Nombre de vitro-plants acclimatés	Nombre moyen de feuilles
1 ^{er} jour d'acclimatation	83	4.41	32	3.46
15 ^{ème} jour d'acclimatation	78	6.01	21	4.38



Figure 3.7 : Vitro- semis de *Pistacia atlantica Desf* acclimatés sous film plastique



Figure 3.8 : Vitro- semis de *Pistacia atlantica Desf* acclimatés, 15 jours après (le film plastique retiré).

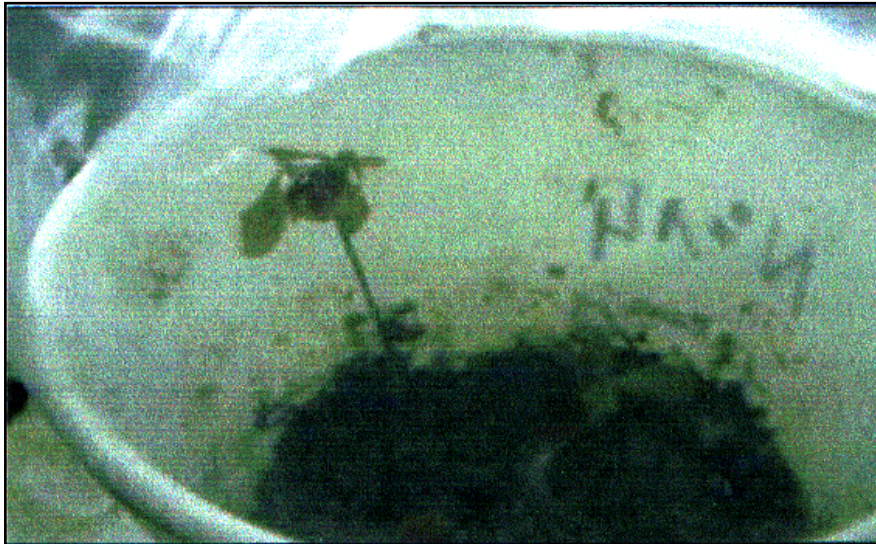


Figure 3.9 : Dessèchement de vitro- semis de *Pistacia atlantica Desf.* avant l'enlèvement du film plastique.

3.3.2. Le transfert des plantules dans le sol

La première partie du transfert s'est faite sur le substrat constitué de tourbe + sable. Pour ce qui est de la deuxième étape, c'est le sol qui est utilisé. Chaque phase doit permettre à la plantule de croître, le passage d'une étape à une autre, doit fournir au plant tous les éléments nécessaires à son développement, en plus d'une irrigation régulière.

Le transfert des plantules du substrat (tourbe + sable) vers le sol (en pot), nécessite une bonne préparation du sol utilisé. Celui-ci est argileux, donc compact. Nous avons alors fait un apport de sable de 30 % afin d'améliorer sa perméabilité et 20% de tourbe, pour l'enrichir. La transplantation dans le sol s'est faite en motte pour ne pas affecter les racines.

Nous avons transféré 94 plantules, en pot, dont 77 restent, en bon état physiologique (figure 3.10). Les plantules qui dépérissent sont au nombre de 17, elles finis par ce dessécher (figure 3.11).

3.3.2.1. Effet du substrat (sol + sable + tourbe) sur la longueur moyenne de la tige

Pour les plantules issues du milieu de culture sans hormones de croissance, la longueur moyenne de la tige a atteint 6.33 cm après 21 jours du transfert en sol, tandis que les plantules obtenues sur le milieu de culture avec hormones de croissance, la longueur n'atteint que 4.41 cm (tableau 3.7). Cette augmentation de la longueur de la tige nous renseigne sur la bonne adaptation des plantules au mélange (50% sol + 30% sable + 20% tourbe) celui-ci semble favoriser la croissance des plantes du pistachier acclimatées.

Tableau 3.7: Effet du substrat (sol + sable + tourbe) sur la longueur moyenne de la tige

Nombre de jours	Milieu sans hormones		Milieu avec hormones	
	Nombre de vitro-plants acclimatés	Longueur moyenne de la tige	Nombre de vitro-plants acclimatés	Longueur moyenne de la tige
Premier jour d'acclimatation en pot	78	4.35	16	3.18
21 jours d'acclimatation en pot	71	6.33	6	4.41

3.3.2.2. Effet du substrat (sol + sable + tourbe) sur le nombre moyen de feuilles

Nous avons observé une augmentation du nombre moyen de feuilles, 21 jours après le transfert en sol pour les plantules issues de la germination sur les deux types de milieux (tableau3.8). Le substrat utilisé (sol + sable + tourbe) semble favoriser la production foliaire, ce qui pourrait montrer qu'il est bien pourvu en éléments nutritifs. Ceci a favorisé la croissance de la tige et la production foliaire.

Tableau 3.8 : Effet du substrat (sol + sable + tourbe) sur le nombre moyen des feuilles

Nombre de jours	Milieu sans hormones		Milieu avec hormones	
	Nombre de vitro-plants acclimatés	Nombre moyen de feuilles	Nombre de vitro-plants acclimatés	Nombre moyen de feuilles
Premier jour d'acclimatation en pot	78	7.31	16	5.87
21 jours d'acclimatation en pot	71	9.50	6	6.5



Figure 3.10 : Plantules acclimatées de *Pistacia atlantica* Desf, en pots



Figure 3.11 : Dessèchement de plantules de *Pistacia atlantica* Desf après le transfert en pot.



Figure 3.12 : Plantules de *Pistacia atlantica* Desf acclimatées dans une mini- serre



Figure 3.13 : Plantules de *Pistacia atlantica* Desf acclimatées dans une serre avant le transfert au champs.

3.4. Initiation de la callogenèse

L'objectif de cette étape est de définir des milieux de culture adéquats, permettant l'expression maximale des aptitudes callogènes de chaque fragment cultivé. Pour cela, nous nous sommes intéressée à l'effet de certaines hormones de croissance sur la capacité callogène de différents explants (feuilles, entre-nœuds, racines et cotylédons).

3.4.1. Effet des régulateurs de croissances sur la callogenèse

Des fragments de feuilles, d'entre-nœuds, de racines et de cotylédons sont prélevés sur des vitro-semis âgés d'un mois. Ils sont ensemencés horizontalement (de façon à ce que la surface des blessures soit au contact avec le milieu de culture) sur le milieu de culture MS additionné d'une gamme de concentration en hormones de croissance. Le pourcentage de callogenèse est généralement faible (tableau 3.9). Le pistachier de l'Atlas est une espèce ligneuse, Cette caractéristique explique la difficulté d'induction de la callogenèse des différents explants.

Ceci est dû à la libération de quantité importante de phénols, qui nécrosent les cellules de l'explant. L'analyse de la variance (annexe 6), montre un effet significatif de la composition hormonale des milieux de culture sur le pourcentage d'obtention de cals (tableau 3.9). Certains fragments ont manifesté, en plus des infections dues à des bactéries et des champignons, un problème de brunissement et de dégénérescence. Ce phénomène a été observé surtout sur les explants de racines et de cotylédons, qui n'ont montré aucune aptitude à la callogenèse. Ces deux types d'explants, ont été éliminés de l'expérimentation. Le pourcentage moyen de cals, obtenu à partir de feuilles est de 20,81 %, et celui obtenu à partir des entre-nœuds est de 23,81%.

L'aptitude à la callogenèse peut varier, selon la partie de la plante que l'on met en culture [46]. Sur les milieux de culture contenant la combinaison hormonale (2.4D+BAP) ; les premières manifestations callogènes, apparaissent après deux semaines de la mise en culture. La prolifération cellulaire débute au niveau des "blessures" au contact du milieu de culture. Sur les entre-nœuds, la callogenèse débute aux extrémités (figure 3.15).

Les concentrations A₁ (1 mg/l 2.4D+1 mg/l BAP) et A₂(2 mg/l 2.4D+2mg/l BAP) permettent d'enregistrer des pourcentages de 46,67 et 100% avec des fragments d'entre-nœuds (figure 3.14). Le milieu A₃ ayant une concentration de 3 mg/l de 2,4D et 3mg/l de BAP n'a pas permis aux entre-nœuds d'exprimer leur pouvoir callogène. Chez les feuilles nous avons enregistré un pourcentage de callogenèse très faible 6,67 %(figure 3.14). Les explants se sont desséchés, ceci peut être expliqué par la présence de 2,4D avec une concentration de 3 mg/l; qui pourrait être une dose phytotoxique. Cependant les feuilles mises en culture sur le milieu A₁ (1 mg/l 2.4D+ 1 mg/l BAP) montrent, une bonne aptitude à développer des cals; dont le taux de callogenèse a atteint 53,33% (figure3.14).

La deuxième combinaison d'hormones (ANA/BAP) a permis l'induction d'une meilleure callogenèse. Les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant les concentrations C₁ (1 mg/l ANA+1mg/l BAP) et C₂ (2 mg/l ANA+2 mg/l BAP) sur des fragments de feuille. Par ailleurs, le milieu témoin T₀ n'a pas permis aux explants d'exprimer leur aptitude à la callogenèse.

Durant notre expérimentation, nous avons observé l'apparition des racines sur les deux explants de feuille, et d'entre-nœud, en utilisant la combinaison hormonale (ANA/BAP); l'auxine ANA semble favoriser l'apparition des racines (figure 3.16 et 3.17).

Tableau 3.9 : Effet des régulateurs de croissance sur la réponse callogène des explants

	T ₀	A ₁	A ₂	A ₃	C ₁	C ₂	C ₃
Ex ₁ (F)	00	53.33	26.27	6.67	20	23.33	10.67
Ex ₂ (EN)	00±00	100±00	46.67	00±00	13.33	6.67	00±0
Ex ₃ (R)	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±0
Ex ₄ (C)	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±0

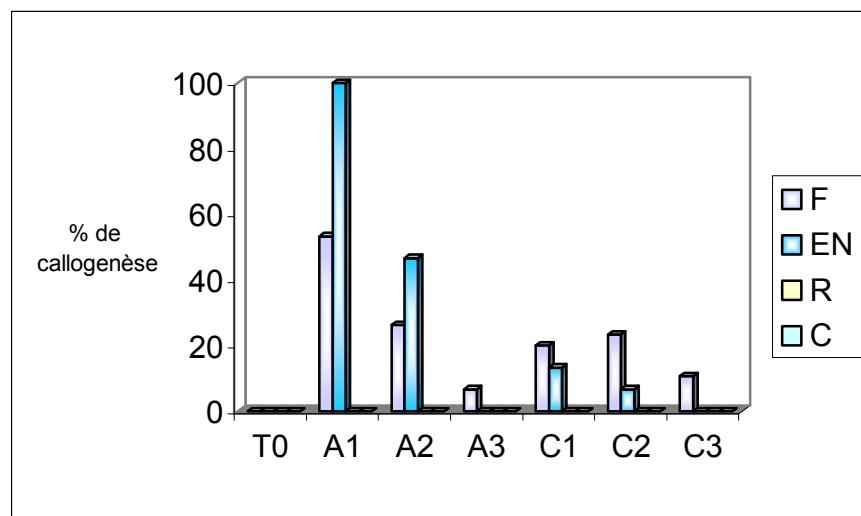


Figure 3.14 : Effet des différentes combinaisons et concentration en hormones de croissance et les différents types d'explants sur le pourcentage de la callogénèse.

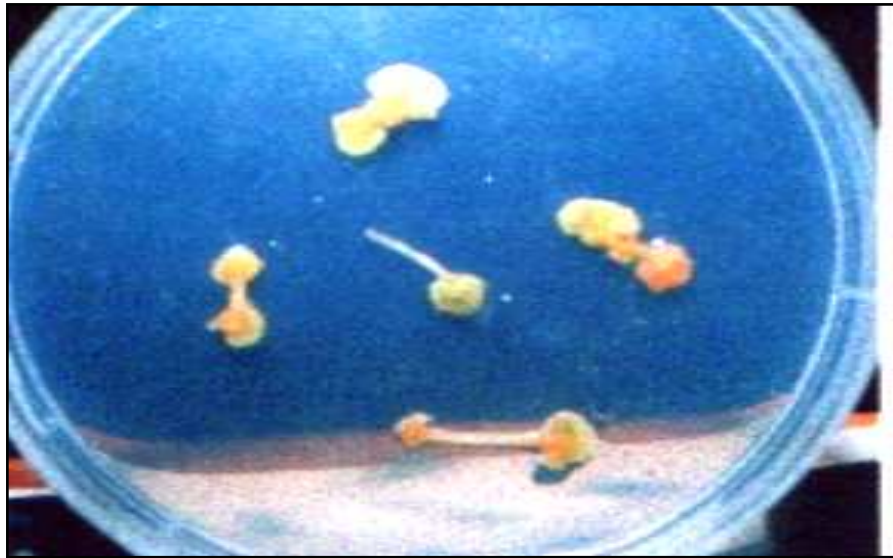


Figure 3.15: prolifération cellulaire au niveau des sections des entre-nœuds.



Figure 3.16 : Apparition de racines sur des entre-nœuds cultivés sur un milieu de culture contenant ANA/BAP.



Figure 3.17 : Apparition de racines sur des feuilles cultivées sur le milieu de culture contenant ANA/BAP.

3.4.2 Effet des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals

3.4.2.1 Effet des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals issus des entre-nœuds

Les cals obtenus présentent des couleurs et des textures différentes (tableau 3.6). Les milieux A₁ et A₂ donnent des cals de couleur blanche et de texture friable (figure 3.18). Ceci est une caractéristique morphologique des cals embryogènes. Tandis que le milieu C₁ donne des cals verts de texture ferme à compacte. Alors que le milieu C₂ donne des cals bruns qui se dessèchent rapidement.

Tableau 3.10 : Effet des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals issus des entre-nœuds.

milieux	Couleur	texture
T ₀	-	-
A ₁	Blanche	Friable
A ₂	Blanche	Friable
A ₃	-	-
C ₁	Verte	Ferme
C ₂	Brune	Cals desséché
C ₃	-	-

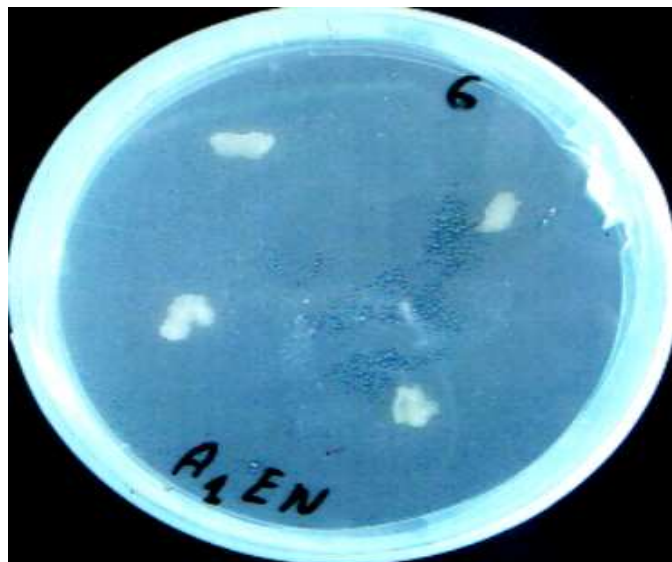


Figure 3.18: cals de couleur blanche issus à partir des entre-nœuds

3.4.2.2 Effet des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals issus de feuilles

La combinaison hormonale 2,4D/BAP donne des cals de couleur blanche à beige et de texture nodulaire et parfois friable (figure 3.19), par contre la combinaison hormonale ANA/BAP ne donne que des cals de couleur verte et de texture ferme à compacte, appelés cals chlorophylliens (figure 3.20).

Tableau 3.11: Effet des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals issus de feuilles

Milieu	Couleur	Texture
T ₀	-	-
A ₁	Blanc-beige	Nodulaire
A ₂	Blanc-beige	Nodulaire
A ₃	Blanc-beige	Nodulaire
C ₁	Verte	Ferme (compact)
C ₂	Verte	Ferme (compact)
C ₃	Verte	Ferme (compact)

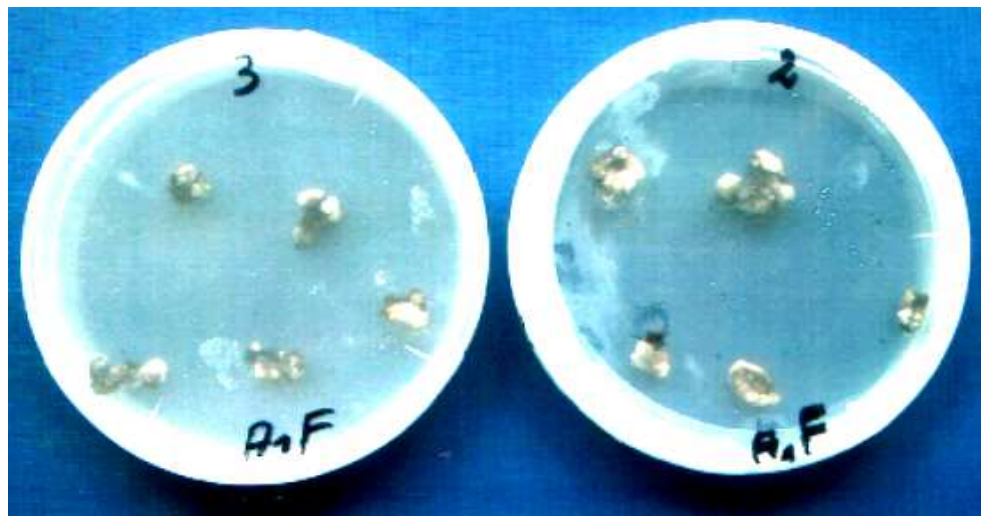


Figure 3.19: cals de couleur blanche issus de feuilles



Figure 3.20: cals de couleur verte (cals chlorophylliens) issus de feuilles

Il ressort de ces essais que l'aptitude à la callogenèse diffère non seulement selon les milieux de culture utilisés mais aussi selon le type d'explant utilisé. En effet BOXUS, [29] et MAIZA [76], rapportent que les fragments prélevés à différents niveaux de la plante ne donnent pas les mêmes résultats. Ceci est dû à l'état physiologique interne des cellules de l'explant; cette hypothèse a été confirmée par NOVAK et al [77] et TISSERAT [78]. La meilleure callogenèse est obtenue sur le milieu MS contenant la combinaison hormonale 2,4D/BAP et avec des concentrations de 1mg/l 2,4D/1mg/l BAP et 2mg/l 2,4 D; 2mg/l BAP avec les fragments d'entre-nœuds. D'une manière générale, la prolifération des tissus débute toujours après deux à trois semaines de la mise en culture. Elle est souvent lente au départ mais aboutit toujours à la formation de cals volumineux.

Nous avons souvent constaté après quelques semaines de culture, un brunissement des tissus, accompagné d'un brunissement de milieu, suivi d'un ralentissement de la croissance des cals. C'est l'émission de composés bruns de nature phénolique qui ont par la suite un effet inhibiteur sur l'activité cellulaire et la croissance des cals. Après plusieurs repiquages réguliers sur milieu neuf, on observe le développement progressif de colonies cellulaires nouvelles, sous forme d'amas sur le cal par division active des cellules. En effet, BOUSSAIDI [79], rapporte que le transfert régulier des cals permet une meilleure alimentation du cal en éléments nutritifs et en régulateurs de croissance.

3.5. Multiplication des cals

Pour augmenter la quantité des cals embryogènes, nous sommes passée par une phase de multiplication des cals afin d'amplifier les masses callogènes, nous avons alors fragmenté et maintenu les cals sur leurs milieux de la callogenèse initiaux. Tous les cals repiqués sur les milieux de cultures C₁, C₂ et C₃ ont été éliminés après la cinquième semaine de repiquage, suite à un fort brunissement puis nécrose ou d'un arrêt de développement. Les milieux d'initiation A₁ et A₂ se sont révélés favorables à une multiplication intense de cals, issus de deux types d'explants de feuille et d'entre-nœuds. Ce sont des cals nodulaires et friables qui gardent leurs pouvoirs de multiplication (tableau 3.12). Après la multiplication, la couleur blanche des cals passe progressivement vers le beige (figure 3.21). Le brunissement, suivi par un dessèchement ou nécrose, est la principale cause de la perte des cultures.

Tableau 3.12. Effet des milieux d'initiation sur la multiplication des cals.

	A ₁	A ₂	A ₃	C ₁	C ₂	C ₃
Cals issus de feuilles	Multiplication intense; cals de couleur beige, friables	Multiplication intense; cals de couleur beige, friables	Multiplication puis dessèchement	Multiplication puis nécrose	nécrose	nécrose
Cals issus d'entre-nœuds	Multiplication intense; cals beiges, friables et nodulaires	Multiplication intense; cals beiges, friables et nodulaire		nécrose	nécrose	nécrose

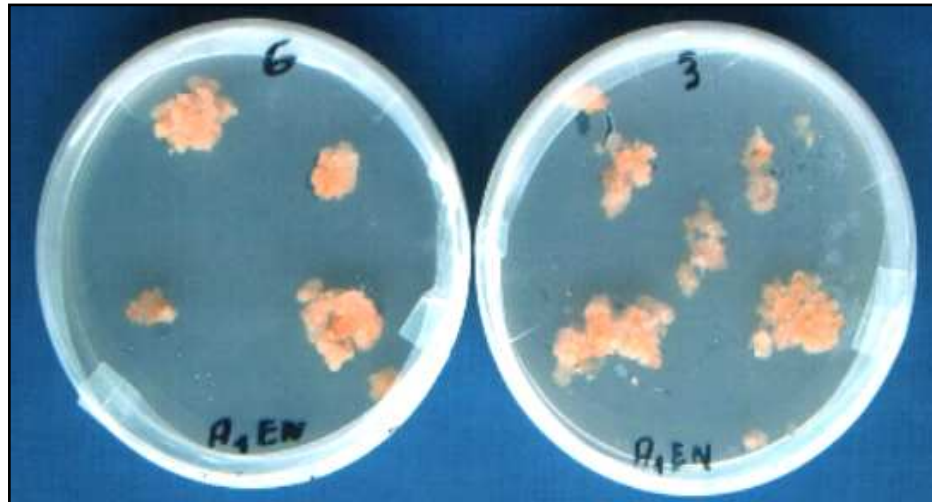


Figure 3.21: cals obtenus après multiplication sur le même milieu de culture (la couleur est passée de blanc au beige)

3.6. Essai d'induction d'embryons somatiques

3.6.1. Essai d'induction d'embryons somatiques sur un milieu solide

Les cals issus du milieu A_1 et A_2 enrichi en 2,4D, et après multiplication sur le même milieu de culture frais, ont été transférés sur le milieu de base sans hormones de croissance. Durant les premiers jours qui suivent le transfert, nous avons noté une augmentation progressive de l'activité mitotique, qui se manifeste par l'apparition de nouvelles cellules en prolifération à la surface des cals. Par la suite, nous avons remarqué que sur ce milieu les cals régressent et prennent au cours du temps une couleur brunâtre. Nous ne nous sommes pas arrivées, donc au stade de l'embryon somatique. Ce résultat ne confirme pas le résultat de ZAID et TISSERAT (1983) [80], qui soulignent que l'induction d'embryons somatiques se fait généralement sur milieu dépourvu d'hormone de croissance.

Ce protocole n'ayant pas favorisé l'induction d'embryons somatiques, nous avons élargi l'expérimentation en testant d'autres milieux de culture où nous avons additionné au milieu de culture des hormones de croissance. Les cals obtenus sur le milieu A_1 et A_2 sont transférés donc sur le milieu de base additionné de 0.5 mg/l de 2.4 D. Nous avons diminué la concentration en hormone testée auparavant dont le 2,4D. La concentration utilisée est $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4D.

Sur ce milieu, les cals semblent réagir favorablement. Ils sont de nature granuleuse et friable. Cependant un léger brunissement affecte la totalité des cals et leur croissance devient peu active après trois mois de culture et ceci, suite à la libération de substances phénoliques dans le milieu de culture. Les cals nodulaires transférés sur le milieu contenant 0,5 mg/l de 2,4D, donnent naissance à des nodules très friables (figure 3.22). Cette formation est tout à fait semblable aux embryons somatiques (au stade de nodulation) décrits par [29] et [81] chez les conifères.

Le pourcentage des cals ayant donnés des nodules est 29,41 % pour les cals issus de milieu A₁, et 36,36 pour les cals issus à partir de milieu de culture A₂ (tableau 3.7).

Tableau 3.13 : pourcentage de cal présentant des nodules

	Nombre de cals transférés	Nombre de cals présentant des nodules	Nombre de cals ayant subi un brunissement	Pourcentage des cals ayant donnés des nodules
Cals issus de milieu A ₁	17	5	12	29,41 %
Cals issus de milieu A ₂	11	4	7	36,36 %

L'évolution morphologique de ces nodules en embryons somatiques se réalise suivant trois stades :

- Stade de nodulation

La réponse positive des cals nodulaires issus des entre-nœuds et des feuilles au milieu d'induction de l'embryogenèse somatique, se manifeste dans un premier temps par la formation à la surface du cal de petits nodules très friables (figure3.22). Ces derniers ont une taille variable entre 3 et 4 mm et se présentent

sous une forme arrondie ou allongée. Les nodules de contour bien délimité peuvent s'isoler les uns des autres comme ils peuvent rester groupés (figure 3.22). Malheureusement, notre expérimentation s'est arrêtée à ce stade, nous n'avons pas pu arriver aux autres stades (maturation et germination des embryons somatiques).

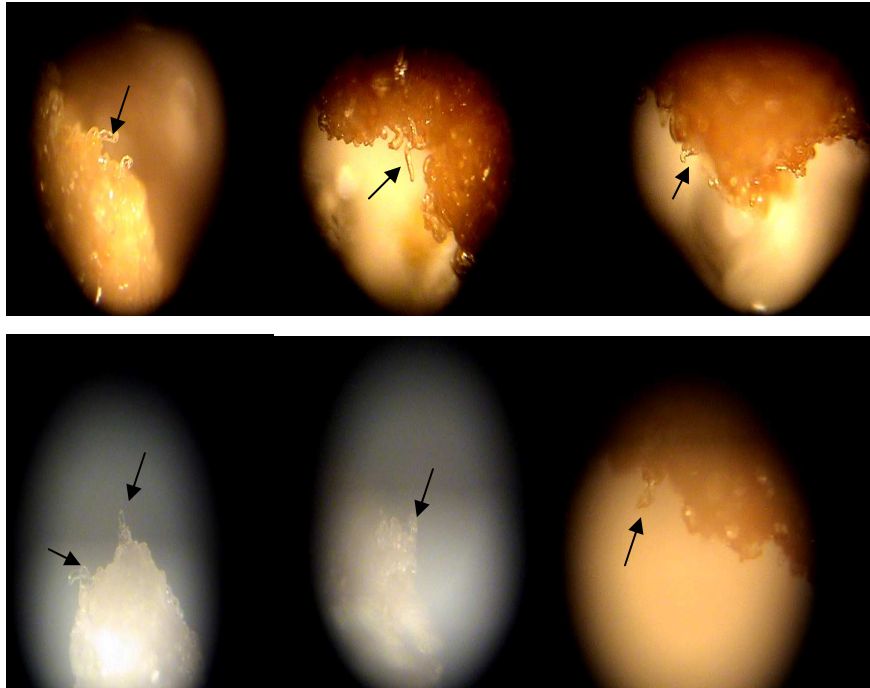


Figure 3.22 : Aspect macroscopique d'un tissu embryogène de *Pistacia atlantica* Desf (embryons somatiques en stade nodulaire)

3.6.2. Induction des embryons somatiques dans un milieu liquide

Les cals issus du milieu A₁ et A₂ ont été transférés dans un milieu de culture liquide dépourvu d'hormones de croissance. Quinze jours après le transfert, des observations microscopiques ont été effectuées à partir des suspensions cellulaires. L'aspect microscopique d'un tissu embryogène en multiplication est essentiellement composé d'embryons présentant une tête (T) et des cellules de suspenseur(S). Selon BOXUS [29], on distingue quatre classes d'embryons définis en fonction de leur morphologie.

- La classe I est constituée d'embryons caractérisés par un pôle

méristématique composé de 2 à 4 cellules (future tête d'embryon), est prolongé par des cellules allongées (future cellule de suspenseur).

- La classe II est composée d'embryons de 16 à 64 cellules méristématiques prolongées par des cellules du suspenseur.

- La classe III est différente de la classe II, par le nombre plus grand de cellules constituant la tête et le suspenseur de l'embryon.

- La classe IV est composée d'embryons dont la tête est en cour de clivage.

D'après les observations microscopiques des suspensions cellulaires nous n'avons remarqué que la présence de la classe I et II, et absence de la classe III et IV même sur milieu pourvu d'hormones de croissance (figure 3.23). L'organisation cellulaire des tissus embryogènes en multiplication est fortement influencée par les substances de croissance. Elle est aussi influencée par certaines protéines extracellulaires qui feraient évoluer les embryons somatiques des classes I et II vers la classe III (MOETAL et al, 1995 in BOXUS 1995).

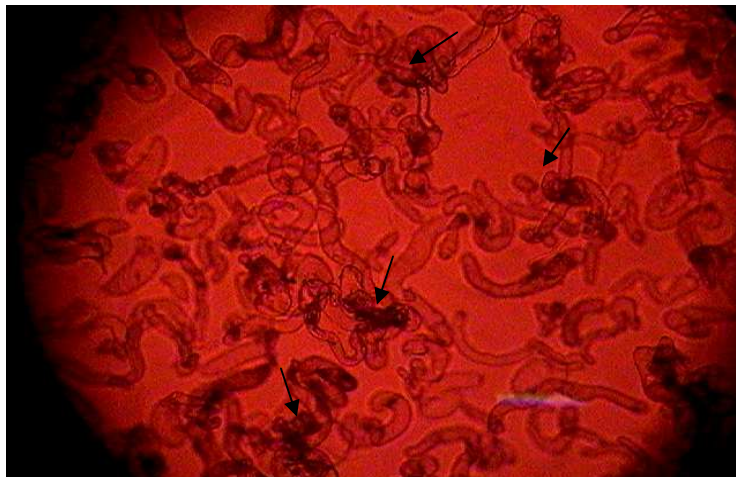


Figure 3.23 : Aspect microscopique d'un tissu embryogène
(Présence de la classe I et II) GX 10

Tous les cals transférés sur le milieu liquide, ont formé des embryons somatiques. Une semaine après le transfert, des contaminations ont affecté la totalité des suspensions cellulaires. Les résultats obtenus, au cours de l'étude consacrée à l'embryogenèse somatique, montrent bien que chez le pistachier de l'Atlas, il est possible mais difficile d'obtenir des embryons somatiques après

passage par une callogénèse. Chez cette espèce, l'induction des embryons somatiques est déclenchée sur un milieu de culture contenant du 2,4 D et de la BAP, avec une concentration inférieure à celle utilisée lors de la callogénèse. Le 2,4 D testé à 1 et 2 mg.l⁻¹ permet l'initiation et l'induction de la callogénèse. A une concentration inférieure à 0,5 mg/l, il induit une induction embryogène. Ces résultats confirment les avantages procurés par l'utilisation du 2,4 D comme agent inducteur de l'embryogenèse somatique. Habituellement, le 2,4D est utilisé à de fortes doses (TISSERAT, 1979 in FKI et al [59] alors que nos expériences montrent qu'il est possible d'induire l'embryogenèse somatique à l'aide de faibles doses (0,5 mg/l).

De nombreux auteurs ont obtenu l'initiation de l'embryogenèse somatique sur un milieu de culture dépourvu de régulateurs de croissance [81]. Dans nos conditions expérimentales, l'embryogenèse somatique s'observe sur le milieu de culture contenant l'auxine (2,4D). L'induction des embryons somatiques se manifeste sur les deux types de milieu solide et liquide. Le temps nécessaire pour l'apparition des embryons somatique est différent sur les deux milieux. Ainsi L'induction de l'embryogenèse somatique s'observe 15 jours après le transfert de cals sur le milieu liquide. Selon FKI et al [82], les milieux liquides permettent une meilleure expression des potentialités embryogènes des tissus.

La méconnaissance de la technique d'embryogenèse somatique, s'est traduite par une difficulté d'obtenir le développement des embryons de l'état globulaire au stade mature différencié et structuré, permettant par la suite leur développement en plantes entières. BOURGKARD et al [83], signalent que l'activité embryogène des cals ne se maintient pas au-delà de 12 semaines de culture. En outre, de nombreux problèmes ont entravé la réussite de la collogénèse et l'embryogenèse somatique, dont le brunissement des cals, qui est dû à la sécrétion des produits phénoliques dans le milieu de culture.

Ce phénomène n'est pas particulier au pistachier de l'Atlas. Il est fréquent chez de nombreuses espèces ligneuses telles que *Olea europea*, [84] et *Pheonix dactylifera* [84].

3.7. Effet des différents traitements utilisés pour le caryotype du pistachier de l'Atlas

3.7.1. Prélèvement

Les observations que nous avons effectuées, ont permis de déduire que les prélèvements réalisés montrent qu'il existe une période qui semble être la plus favorable pour l'obtention d'un maximum de mitose. Ce sont les prélèvements effectués durant l'après midi (14 heures) qui nous ont permis d'observer d'importantes mitoses. Ce résultat a été déjà signalé par BOUABDELLAH [86] sur *Atriplex hamilus*.

3.7.2. Prétraitement

3.7.2.1. Prétraitement à la colchicine

Les prétraitements de courtes durées d'une heure et de deux heures n'ont pas permis de montrer les mitoses, tandis qu'avec les prétraitements de longues durées 3 et 4 heures les résultats sont meilleurs. FASIHI et GHAFFARI [6], signalent que la durée des prétraitements à la colchicine de 3 heures paraît la plus favorable pour observer les mitoses sur *Pistacia vera*.

3.7.2.2. Prétraitement à l' α -bromonaphtalène

Pour l' α -bromonaphtalène, les courtes durées d'une heure et de deux heures ne sont pas suffisantes, les meilleures durées de prétraitement, sont de 3 heures et 4 heures. CHAIB [87], rapporte que lorsqu'on utilise une durée qui dépasse les 4 heures avec de forte concentration de l' α -bromonaphtalène, il se produit un arrêt complet de la division.

3.7.2.3 La fixation

Au cours de nos essais, nous n'avons pas pu distinguer une différence entre les deux fixateurs utilisés carnoy II et PIENNAR, pour une durée de 24 heures, à 5° C.

3.7.2.4. Le stockage

Le stockage du matériel végétal traité dans de l'alcool paraît être favorable, car il permet de garder le matériel intact.

3.7.2.5. L'hydrolyse

L'hydrolyse à l'HCL (1N) à 60°C pendant 15mn, semble être très efficace. Cette méthode permet une bonne coloration ultérieure. La durée de 10 mn n'est pas suffisante car elle ne permet pas un bon ramollissement des tissus qui deviennent de ce fait moins facile à étaler. Pour la longue durée de 20mn, il se produit un fort ramollissement des tissus, cela aboutit à la déformation totale des cellules.

3.7.2.6. La coloration

La coloration basée sur la technique Feulgen, a donné de meilleurs résultats. Elle a permis une coloration parfaite des chromosomes.

3.7.2.7. Observation et dénombrement des chromosomes

L'examen des pointes racinaires après écrasement entre lame et lamelle, se fait, à l'aide d'un microscope optique. Les cellules en division sont repérées rapidement à l'aide d'un objet avec un grossissement de 10. L'observation fait ressortir que la majorité des cellules présentent un noyau en interphase ou en prophase (figure 3.24) quelques cellules seulement peuvent être en anaphase ou en télophase (figure 3.25).

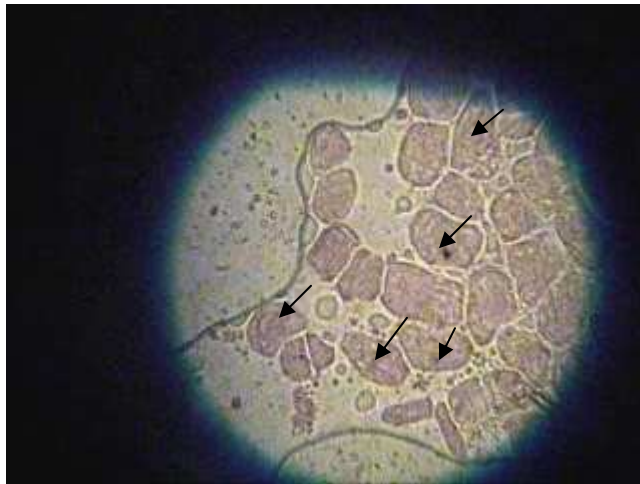


Figure 3.24: Cellules présentant des noyaux en interphase (i) et prophase (p).

Gx 10

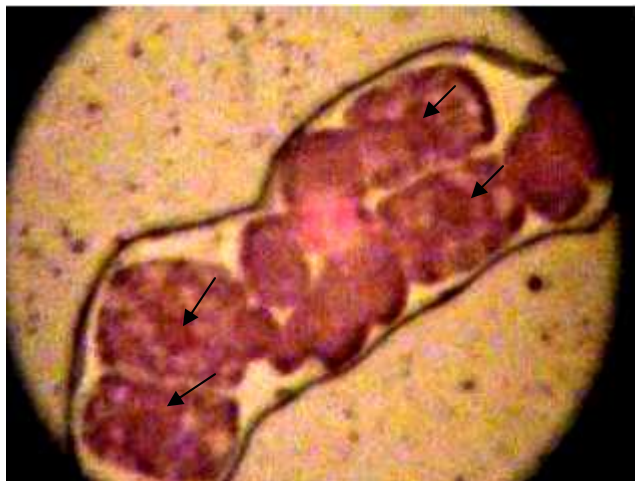


Figure 3.25 : Cellules présentant des noyaux en anaphase (a) et en télophase (t).

Gx 10

Néanmoins, les plaques métaphasiques sont rares malgré, le très grand nombre d'observations effectuées. L'observation des chromosomes a été faite à un grossissement supérieur. Le plus souvent les combinaisons (oculaire x objectif) utilisées donnent des grossissements entre 1000 et 1500. Les chromosomes sont généralement rares et très petits, leur dénombrement est très difficile. Selon FASIHI et GHAFARI [6], l'étude de chromosomes chez le pistachier est très difficile car ses chromosomes sont extrêmement petits.

Au cours de notre travail nous n'avons pu dénombrer que 17 plaques métaphasiques sur 100 pointes racinaires observées. La fréquence des différents stades de division cellulaire n'est pas la même. Il semble donc qu'il y ai des phases longues représentant généralement la prophase et la télophase, la métaphase étant le stade le plus court. Selon FASIHI et GHAFARI [6], on dénombre chez le pistachier de l'Atlas 28 chromosome c'est une espèce diploïde avec un génome $2n=28$ et $n=14$. Concernant notre travail, nous n'avons pas observé les 28 chromosomes. Cependant, nous ne pouvons le prouver, puisque nous avons perdu nos préparations (lames) au laboratoire d'éco-génétique à l'université de Bab Ezzouiar.

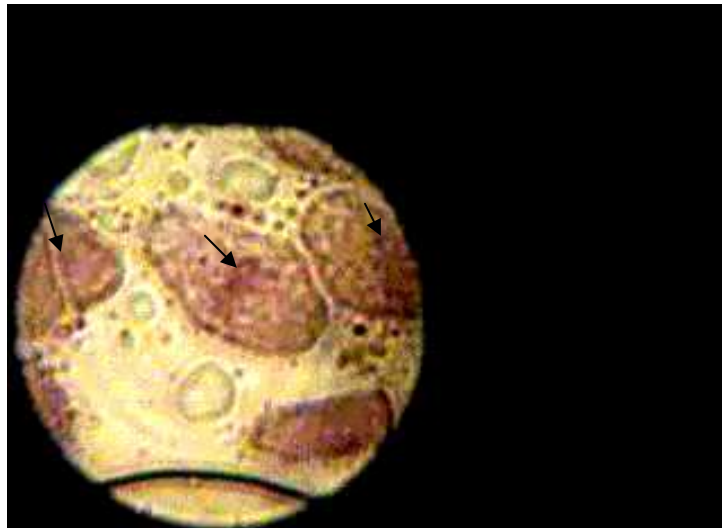


Figure 3.26 : cellule présentant une plaque métaphasique (nombre de chromosome $2n = 28$). Gx100

CONCLUSION

L'expérimentation que nous avons effectuée, sur le pistachier de l'Atlas porte sur trois principaux aspects. La première partie de notre travail, a porté sur l'étude de la germination des graines de *Pistacia alantica Desf*, pour une acclimatation des vitro-semis par la suite. 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.

En ce qui concerne la germination, nous avons rencontré le problème de l'hétérogénéité au niveau de la germination et la présence d'un grand nombre de graines vides. Les expériences ont montré que cette hétérogénéité est due à la dormance d'origine embryonnaire. Pour réduire le temps de latence et améliorer la vitesse de germination, il nous a fallu tout d'abord lever la dormance des graines, par un traitement des graines au froid humide (2 à 4°C), pendant un mois. Ceci nous a permis de lever la dormance et d'obtenir une population plus ou moins homogène des jeunes vitro- semis.

Pour les conditions de culture (apport des hormones), nos résultats ont montré que l'apport des hormones de croissances (AG_3 /AIB: 0.4/0.2 mg/l) influe sur l'élongation des vitro-plants. Tandis que, ce traitement, n'a aucun effet sur la production foliaire.

Au cours de l'acclimatation, nous avons acclimaté des vitro-plants, sur un substrat constitué de tourbe, le pourcentage de réussite est de 86 %.

Pour la deuxième étape nous avons transféré les plantules dans un nouveau substrat composé de 50% de sol + 30% de sable et 20 % de tourbe, le pourcentage de réussite pour cette étape est de 67 %.

Pour la troisième étape, les plantules seront transférées dans leur milieu naturel c'est-à-dire à Djelfa pour une éventuelle étude sur leur comportement (adaptation).

La deuxième partie de notre travail, a porté sur l'initiation de la callogenèse et l'induction des embryons somatiques. Les taux de callogenèse sont influencés par le type d'explant utilisé; ainsi les entre-nœuds sont plus callogènes que les feuilles, contrairement aux racines et cotylédons qui n'ont pas du tout montré une callogenèse.

La technique de l'embryogenèse somatique à partir des explants d'entre-nœuds et de feuille, obtenu par la fragmentation des vitro-plants de pistachier de l'Atlas, s'est révélée plus au moins satisfaisante. L'apparition 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. Le travail effectué a mis en évidence des aptitudes collogènes du pistachier de l'Atlas. Ceci constitue une base de travail pour les recherches dans ce domaine. Cette étude a permis de tester le pouvoir inducteur de 2.4D vis-à-vis de l'embryogenèse somatique. Avec les résultats de cette étude nous avons réussi à optimiser davantage les résultats de l'embryogenèse somatique chez le pistachier de l'Atlas.

Au cours de la troisième partie, l'étude caryologique sur le pistachier de l'Atlas nous a permis d'obtenir un certain nombre de résultats. Nous nous sommes orientées d'abord, vers la recherche d'une méthode permettant l'obtention d'un maximum de plaques métaphasiques, dont le but recherché étant un dénombrement de chromosomes.

Les différents essais nous ont permis d'établir la méthode suivante :

- Les prélèvements effectués dans l'après midi, nous ont permis d'observer d'importantes mitoses ;
- Les pointes racinaires doivent être prétraitées à la colchicine à 1%, pendant une durée de 3 à 4 heures ;
- La fixation des pointes racinaires, effectuée dans les deux fluides (CARNOY I et PINNAR) s'est révélée satisfaisante pour une durée de 24 heures à 5° C ;
- L'hydrolyse à HCl (1N) à 60° C pendant 15 minutes semble être très efficace ;
- Et enfin la coloration basée sur la technique Feulgen semble être très efficace.

Pour l'étude caryologique, nous avons rencontré la difficulté d'étude et d'observation chez le pistachier de l'Atlas qui s'est manifesté par la petitesse de ses chromosomes. La métaphase étant le stade le plus court de la division cellulaire d'où la rareté des plaques métaphasiques rencontrées.

Pour le nombre de chromosome, nous avons trouvé que le pistachier de l'Atlas est une espèce diploïde avec $2n = 28$. Ce résultat est déjà signalé par FASIHI et GHEFFARI [6] sur les provenances iraniennes. Ce travail a été difficile car les chromosomes de pistachier de l'Atlas sont très petits, et les divisions cellulaires sont rares. Vu ces difficultés, nous ne sommes pas arrivés à identifier la forme et la taille des chromosomes.

Cependant, l'information sur le nombre de chromosomes et la caryomorphologie de *Pistacia atlantica Desf.* est inachevée et contradictoire. Ce travail peut être complété par une analyse méiotique qui est plus réussie, mais ceci exige des plants au stade floraison.

APPENDICE A
LISTE DES ABREVIATIONS

AIA	: Acide indol acétique (auxine)
AIB	: Acide indol butyrique (auxine)
ABA	: Acide abscissique
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ANA	: Acide naphthalacétique (auxine)
AG3	: Acide gibbérellique
BAP	: 6-Benzyl amino purine (cytokinine)
2,4D	: Acide 2-4-dichlorophénoxyacétique (auxine)
2IP	: Isopentyladenine
h	: heure
HCl	: Acide chlorhydrique
NaOH	: Soude
°C	: Degré Celsius
Cm	: Centimètre
G	: Grossissement
g/l	: Gramme par litre
mg/l	: Milligramme par litre
m	: Mètre
mm	: Millimètre
mn	: Minute
MS	: MURACHIGE et SKOOG
µm	: Micromètre
pH	: Potentiel hydrogène
%	: Pourcent
°	: Degré
1N	: Normalité 1

APPENDICE B

Préparation de réactif de Schiff:

Solution de fuschine basique décolorée par SO_2

Pour 1l de solution:

- 4 g de fuschine basique
- 800 ml d'eau distillée
- 120 ml d'HCl 1M
- 12 g de métabisulfite de potassium
- 3 g de charbon

-Faire bouillir l'eau distillée dans un erlrmeyer de 2l.

- Eteindre la source de chaleur, attendre l'arrêt total de l'ébullition et verser lentement la fuschine.

-Agiter puis laisser refroidir jusqu'à 50°C .

-Filtrer (sous vide, à l'aide d'un filtre à plaque de verre fritté); puis ajouter le métabisulfite de potassium.

-Si la solution est encore rose ou rouge, ajouter le charbon; agiter fortement (agitation magnétique), pendant 2 mn, puis filtrer.

La conservation se fait dans un flacon en verre fumé, bien bouché.

APPENDICE C

Tableau 1: analyse de la variance de taux de germination.

	S.C.E.	DDL	Carrés moyen s	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var.to tale	5017,7 1	39	128,66				
Var. facteu r1	212,38	1	212,38	1,68	0.2001		
Var. résidu elle	4805,3 3	38	126,46			11,25	17,9 %

Tableau 2 : analyse de la variance de la longueur moyenne des vitro-semis.

	S.C.E.	DDL	Carrés moyen s	Test F	Proba.	E.T.	.C.V.
Var. totale	201,66	39	5,17				
Var. facteur I	101,89	1	101,89	38,81	0.0000		
Var.résid uelle	99,77	38	2.63			1,62	33,3 %

Tableau 3: analyse de la variance de nombre moyen de feuilles

	S.C.E.	DDL	Carrés moyen s	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var. totale	106,52	39	2,73				
Var. facte ur 1	0.05	1	0,05	0.02	0.8847		
Var. résid uelle	106,47	38	2,80			1,67	35,4 %

Tableau 4: analyse de la variance de nombre moyen des nœuds

	S.C.E.	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var. totale	36,05	39	0.92				
Var. facteur1	4,50	1	4,50	5,42	0,0241		
Var. résiduelle	31,55	38	0,83			0,91	47,4 %

Tableau 5: analyse de la variance de pourcentage de callogenèse

	S.C.E.	DDL	Carrés moyens	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var. totale	3444,77	41	804,17				
Var. facteur1	26413,64	6	4402,27	35,56	0,0000		
Var. facteur2	152,38	1	152,38	1,23	0,2765		
Var. Inter F1.F2	4414,24	6	735,71	5,94	0,0004		
Var. résiduelle	3466,51	28	123,80			11,13	50,8%

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. MONJAUZE A., 1968: Répartition et écologie de *Pistacia atlantica Desf* en Algerie. Bull. Soc. Ris. Nat. de l'Afrique du nord. pp 5-131.
2. MONJAUZE A., 1980: Connaissance du bétoum (*Pistacia atlantica Desf*) In Rev. For. Fr. (4). Pp 350-380.
3. ZIMMERMAN R. H., 1985: Application of tissue culture propagation to woody plants, tissue culture in forestry.
4. SCRIBAN R., 1999: Biotechnologie 5^{ème} édition tech. et doc.1017p.
5. SIHACHAKR D., CAVALCANT-ALVES J.M., TIZIROUTINE S., ALLOT M., MUSSIO I., SERVAES A., NZOGHE O. et DUCREUX G., 1995 : embryogenèse somatique chez la patate douce (*Pomœa batatas L.*) Ed. JOHNLIBBEY. Fr. pp 245-260.
6. FASIHI O. et GHAFFARI M., 2001: Chromosome studies on pistachio (*Pistacia vera L.*) from Iran. Rev. Option ;Méditerranèenne : Amélioration d'espèces à fruit à coque noyer, amendier, pistachier. Serie B: etudes et recherches. N 16. Ed. E. Germain.pp 35-40.
7. ANONYME, 1993 : Le pistachier de l'Atlas. Rev. Nat. Agence Nationale pour la conservation de la nature.
8. ANONYME, 1993: Mémento du forestier technique rural en Afrique. 3^{ème} Edition. pp 587-591.

9. BROUSSE G., 1974: Etude bibliographique sur la nature du pistachier. Polygraphie INA El Harrach Alger. 40p.
10. JOLEY L.E., 1979: Pistachio in "JAYNES R. A. Nut tree culture in North America" Hamden Conn Northern Nut Grower Association. Ed. File:// A :/ Le 20% pistachier. Maroc. htm.
11. WHITEHOUS W.E., 1957: pistachio nut, a new crop for the Western United States. Econ. Bot. pp 281-321.
12. ZOHARY M., 1952: Amonographical stady of the genus Pistacia. Palestine Journal Bot. J. Série 5. pp187-228.
13. EMBERGER L., 1960: Les végétaux vasculaires. Tome II Fasicule I in CHADEFAUD et EMBERGER L. Traite de botanique et systématique. Ed Masson et Cie. 262p.
14. SAHLI F., 1997: "Note sur deux espèces sahariennes le cyprès du Tassili et le pistachier de l'Atlas", journées d'étude sur les zones arides et sahariennes du 08 au 10 Avril 1997. Wilaya de Ghardaya . Puplication de l'Institut National de Recherche Forestière (INRF). pp 34-39.
15. MORSLI A., 1992: Analyse de la floraison et de la structure sexuelle d'un peuplement de *Pistacia atlantica Desf* dans un daya de la région de Messaad. PFE. INA. El Harrach Alger.57p.
16. OZENDA P., 1977. Flore du sahara. Ed. du CNRS. Paris. 622p.
17. KHICHANE, 1988: Etude de la morphogenèse et des rythmes de croissance de système racinaire du jojoba (*Simmondsia chnesis Link.*) et de pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica Desf.*) Essai de production de plants en pépinière. PFE. INA. El Harrach Alger.68p.
18. MAGGS D.H., 1973: The pistachio as an Australian Crop. J. Aust. Inst .Agri. Sci. pp10-17.

19. KHELIL A. et KHELLAL A., 1980: Possibilité de culture et délimitation des zones à vocation pistachière en Algérie Fruit, vol. 3. pp 177-185.
20. WOODROOF J. G., 1979: The nuts, Production processing products. Vol. III 2nd Edition. The AVI. Publishing Comp. Inc. Westport Connecticut : File// A: le % 20 au %20. Maroc. htm.
21. SPINA P. et PENNISI f., 1957: La culture du pistachier en Sicile. Rev. Ortofloro- fructiculti. Italie. Pp 533-557.
22. EVEI NOFF A.V., 1964: Note sur le pistachier. Pomologie Française. Vol. 1. pp115-123.
23. BOUDY P., 1950: Economie forestière nord-Africaine: monographies et traitements des essences forestières. Ed. Larose. Paris- 27. pp 417-419.
24. BELHADJ S., 1997: Les pistacheraies algériennes : Etat actuel et dégradation. Rev.opt. medétéraneeenne. Pp 107-109.
25. KHALIF T., 1959: Recherche sur la culture du pistachier. Thèse de doctorat, Université de Gembloux. 150p.
26. MONJAUZE A., 1982: Le pays des dayas de *Pistacia atlantica Desf* dans le Sahara, Algérie. Rev. For. Fra. Pp 350-380.
27. AIT SAID S., 2003: Etude de biosystémation et évolution adaptative de *Pistacia atlantica Desf*, cas de deux population de Djelfa. Mém. Mag. INA ElHarrach Alger. p101.
28. AOUDJIT H. et MOUISSA H., 1997: Contribution à l'étude de la propagation végétative du pistachier de l'Atlas. PFE. INA. El Harrach Alger.61p.

29. BOXUS PH., 1995: Multiplication végétative, micropropagation et embryogenèse somatique (Biotechnologie végétale) Ed. Belgique. 191p.
30. BONNE T.; MASIMBERT M. et VILLAR M., 1986: La maîtrise de la reproduction sexuée Rev. For. Fr. XXXVIII. pp 49-58.
31. MULLER C., 1986: Le point sur la conservation des semences forestiers et la levée de dormance. Rev. For. Fr., 38(3) pp 202-204.
32. MULLER C., BONNET-MASIMBERT M. et LARROPE E.: 1990: Nouvelles voies dans le traitement des graines dormants de certains feuillus, Frêne, Merisier. Rev. For. fr., 42(3). Pp329-345.
33. SUSKQ B., 1989: Physiological aspect of seed conservation. Ann. Sci. For. Pp 72-84.
34. MAZLIAK P., 1982: Physiologie végétale, croissance et développement. T.2.
35. HAISSIG B.E., 1986: Metabolic process in adventitious rooting of cuttings. In: Jackson M.b. Ed. "New root formation in plant and cuttings". Martinus Nijhoff publishers. Dordrecht (NLD). Pp 141-189.
36. ROUSKAS D., 1996: Conservation stratégies of *Pistacia* genetic resources in Greece. Dans workshop "Taxonomy, Distribution, Conservation and Uses of *Pistacia* genetic resources" Palermo, Italie, 1995, Padulosi S. Caruso, et Barone, E.IPGRI. pp.37-41
37. CHAUSSAT R.; BIGOT C., 1980: la multiplication végétative des plantes, Ed. Gauthier et Villars. Paris. 227p.
38. GASPAR T., 1994: New growth regulators in tissue culture. Proceedings of the BPTCG autumn symposium: "New hormone in the control of plant cell, tissue and organe culture". Ulg. November 18th.

39. AIT RADJ A., 1979: Multiplication par voie végétative et par semis de *Pistacia atlantica* Desf. et *Ailanthus altissima*. Th. INA El Harrach Alger. 40 p.
40. ALETAN.; NINOT A.; ROUSKAS D.; ZAKINTHINOS G.; AVANZATO D. et MENDES GASPAS A., 1997: La multiplication du Pistachier. Rev. Option méditerranéenne Amélioration d'espèces à fruits à coque noyer, Pistachier série B: Etudes et recherches N°= 16 Ed. E. Germain pp 121-132.
41. MARTIN C., 1981: La multiplication végétative *in vitro*: une technique de pointe au service de l'agriculture. C.R. Acad. Agr. Fr, 66 pp 629- 637.
42. LIARD O., 1984: Un atout pour l'amélioration forestière; La reproduction asexuée ou végétative. Bull. Soc. Roy. FOR de Belgique 91 (5), pp 191- 203.
43. MARGARA J., 1984: Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse. Ed. INRA. Paris. 262p.
44. PREVOST P., 1999: Les bases de l'agriculture. 2^{ème} Ed. Tec. Doc. Paris. 254p.
45. DJERAH A., 1991: Contribution à l'étude de la multiplication végétative du Pistachier vraie (*P. vera*) dans la pépinière de Timgad. Batna. pp 33-43.
46. ZRYD J.P., 1988: Culture de cellules, tissus et organes végétaux, fondement théorique et utilisation pratique. Ed. Presse polytechnique romande Suisse. 308p.
47. CHATIBI A.; KCHOUK M.; ZEMNI H. et GHOBEL A1., 1998: organogénèse *in vitro* du Pistachier (*Pistacia vera*) cv Mateur à partir de feuilles d'embryons zygotiques in cahier option méditerranéenne. xemo colloque du GREMPA, volume 33 Apdo 20250080 Zaragoza (Espagne) pp: 131-138.

48. CORNU D. et BOULAY M., 1986: la multiplication végétative. Techniques horticoles et culture *in vitro* Rev. Forest. Franç. XXXVIII. N° sp. : pp 60-68.
49. BOXUS PH., 1989: La multiplication *in vitro*, une Biotechnologie intéressant pour le développement, ses perspectives industrielles, annale. De Gembloux 1985. pp 181- 195.
50. MEDEROS., MOLINA S. et TRUJILLO I., 1994: Micro propagation of Pistachio *Pistacia vera* cv Mateur plant tissu cult 4(2), pp: 111- 116.
51. DUHEM K., LE MERCIER N. et BOXUS PH., 1989: Données nouvelles sur l'induction et le développement d'embryons somatiques chez THEOBROMA cacao thé vol XXXIII N° 1. Gembloux Belgique. Pp: 9-14.
52. PIATTI MF., 1990: Embryogenèse somatique et synchronisation du développement embryonnaire. Thèse de doctorat de pharmacie Paris XI. 130p.
53. AUGÉ R.; BEAUCHESNE G.; BOCCON J.; GIBOD.; DECOUTY L.; DIGAT B.; JALOUZOT R.; MORAND J. CL.; REYNOIRD JP.; STRULL D.G et VIDALIE M., 1989: La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed. Technique et documentaire. Lavoisier, 225p.
54. MARGARA J. et PIOLLAT M.T., 1982: Physiologie végétale influence de divers facteurs sur l'organogenèse observée *in vitro* à partir de pétale de *Begoniax. elatior*. C.R. Acad. Sc. Paris. T. 294: pp 181- 184.
55. TANG D.; ZHANG J.; NIUX. Et TSUIO., 1980: The effet of plant hormones on cellus formation and plantlet regeneration in *Cucumis melo*. Rev. Acta. *Sotanica sinica*. V. 22 (2); pp 132-135.

56. LEBRUN L., 1986: 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 sodiu. Mémoire de doctorat Univ. De Paris sud centre d'Orsay 145p.
57. TEOULE E., 1999: Biotechnologie et amélioration des plantes. In SRIBAN R. 5^{ém} Edition. Ed. Technique et Documentaire. Paris. Pp: 597- 627.
58. ZHANG V.; BOUCONGIBO D.J. et LESPINASSE Y., 1987: Obtention d'embryons de pommier (*Malus domestica Borkl*) après culture d'anthere. C.r.a. Cad: Sci. Paris. Pp: 305-443.
59. FKI L.; BAHLOUL M.; MASMOUDI R. et DRIRA N., 2001: Etude des capacités germinatives des embryons somatiques chez le palmier dattier. Colloque et séminaires des modèles biologiques à l'amélioration des plantes IRD Edition Paris. Institut de recherche pour le développement. pp: 255-269.
60. DRUART PH., 1987: Contribution à l'élaboration de techniques de production en masse *in vitro* des ligneuses utilisables en culture fruitière. Thèse. Fac. Sci. Agron. Gembloux Belgique, 329p.
61. SAKA H.; AMARA AB. et KERMICHE A., 1997: 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 semestrielle N°0 Alger. Pp: 1-7.
62. AUGÉ R., 1984: La nouvelle botanique. Culture *in vitro*. Rev. Science et vie Paris (146). Pp: 48-55.
63. RAGHVAN V., 1997: Molecular embryology of flowering plants. Ed. Cambridge University Press. New York USA. 1028p.

64. CHAUSSAT R. et COURDUROUX JC., 1980 : Régulateurs de croissance et multiplication végétative de plantes supérieures. Ed. Gauthier. Paris. Villars. Pp: 31- 50.
65. HELLER R.; ENSAULT R. et LANCE C., 2000: Physiologie végétale : développement. 6^{ème} Ed. DUNOD. Paris. T.: 2.366p.
66. HELLER R., 1982: Physiologie végétale. T.2 développement Paris. Ed. Masson. 215p.
67. MARGARA J., 1989: Bases de la multiplication végétative (Les méristèmes et l'organogenèse) .Ed. I.N.R.A. Paris. 230p.
68. CHAMPAGNAT R.; OZENDA P. et BAILLAUD L., 1969: Biologie végétale : Croissance et morphogenèse et reproduction. Ed. Masson et Cie. Paris. T. 3.506p.
69. BOUTHERIN et BRON., 1989: Multiplication des plantes horticoles. Paris: Ed. Tech. Doc. Lavoisier. 213p.
70. JAHIER J., 1992: Techniques de cytogénétiques végétales. Ed. I.N.R.A. p183.
71. MULERIS M.; RICHARD F.; APIOU F. et DUTRILLAUX B., 1996: Hybridation in situ en cytogénétique moléculaire. Ed.. Tech. Doc. Lavoisier. p180.
72. MESTOURI M., 2001: Micro propagation et multiplication par semis *in vitro* et in situ du Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica Desf*) thèse ing, Blida. 60p.
73. MURASHIG T. et SKOOG F., 1962: A revised medium for rapid growth and biassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Planetarium*, 15, pp 473- 497.
74. MOLET D., 1988: Culture *in vitro* évolution des techniques: Boutures- micro boutures: Mini tubérisation. La pomme de terre française (444). Pp43-46.

75. MULLER C., 1992: Conservation des graines et les problèmes de levée de dormance chez les feuilles précieux. N°= spécial "les feuilles précieux: frêne-merisier et grand érable" .Rev. For. Fr., 44sp: pp39-46.
76. MAIZA F., 1980: analyse des aptitudes organogénétiques de plusieurs variétés de Citrus en vue d'aboutir à leur multiplication végétative *in vitro*. The. Doc. 3^{ème} cycle. 76p.
77. NOVAF J.; KONECMA D., 1980: Somatic embryogenesis in callus and cell suspensions cultures of Alfa (*Medicago sativa L.*) physiologie (105). pp 279-284.
78. TISSERAT B., 1979: Somatic embryogenesis in angiosperms. Hort. Rev. (1). pp178.
79. BOUSSAIDI F.Z., 1989: Essai d'établissement de culture de tissus organogènes à partir de vitro- plants et d'embryons zygotiques de chêne pédonculé (*Quercus robur L.*) thèse de Doctorat. Bio. Vég. Forest. Nancy. France. 104p.
80. ZAID A. et TISSERAT B., 1983: Morphogenetic reponses obtained from variety of somatic explant tissues of date palms. Bot. Mag. 69 pp67-73.
81. LELU M.A.; BOULAY M. et ARNAUD Y., 1987: obtention de cals embryogènes à partir de cotylédons de *Picea abies L.* prélevés sur de jeunes plantes âgées de 3 à 7 jours après germination. C.R Acad. Sci. Paris, 1 305- série III, pp 105-109.
82. BECWAR M.R.; NAGMANE R. et WANN S., 1990: Initiation of embryogenetic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*) Can. J. For. Res. 20.pp 810-817.

83. FKI L.; BAHLOUL M.; MASMOUDI R. et DRIRA N., 2001: Etude des capacités germinative des embryons somatique chez le palmier dattier. Col. Sém. Des modèles biologiques a l'amélioration des plantes. Ed. IRD. Paris, pp 200-221.
84. BOURGKARD F et FAVRE J.M., 1991:Essai d'induction de l'embryogenèse somatique immatures. Biotechnologie appliquée aux arbres forestiers. Complément des annales. A Focel. Edi. Paris, pp25-46.
85. FERGANI K., 1998: Embryogenèse somatique de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) cultivar Deglet Nour. Thèse de Magister en biosystématique et amélioration des plantes. U.s.t.h.b.117p.
86. BOUABDALLAH E., 1996: Diversité génétique de l'*Atriplex halimus in vitro*, établissement d'une collection en serre à l'université de Paris. Pp 45-46.
87. CHAIB A., 1990: Variabilité des populations naturels de *Lathyrus sylvestris L* d'université de Paris et des pays de l'Adour. Paris. 119p.