INDUCTIONS MORPHOGENETIQUES EN CULTURE *`IN VITRO'* DE L'ARGANIER : *ARGANIA SPINOSA* L.

B. BENMAHIOUL [1,2], M. HANHANI [1,2], t BELAROUG [2] & S. ZERHOUNI [2]

[1] Laboratoire de Physiologie & amélioration génétique des ligneux. Département de Foresterie. Faculté des Sciences. Université « *Aboli Bakr Bel Kaiil* » Tlemcen.

- Tél./Fax : 043 2 1 1 8 06 • Email : b benmallioul(cmail.univ-tlemcen.dz

[2] Département de Biotechnologies, faculté des Sciences. Université des Sciences & de la Technologie « Mohamed Boudiaf » *(UST* Oran).

- Tél./Fax : 041 42 80 99

RESUME

Afin de déterminer d'autres voies de la multiplication de l'arganier, Argania spinosa L, des cultures in vitro des bourgeons et d'embryons zygotiques ont été réalisées sur le milieu de base de MS (1962).

L'influence de plusieurs facteurs sur la réactivité de matériel végétatif à savoir l'effet de l'écotype, les apports en macroéléments, phytohormones et le traitement au froid ont été étudiés. En effet, les meilleurs résultats ont été enregistrés avec l'écotype nommé " Arg. I " en présence de la formulation macrominérale de MS et la BA à la dose de ling/I. D'un autre côté, nos essais réalisés sur les embryons ont mis en évidence I 'effet « provenance » sur le développement des embryons zygotiques. Les meilleurs taux de réactivité ont été constatés chez la provenance de « Oggaz » en présence de la même composition minérale et organique précédemment employé chez les bourgeons.

Mots clés : *Argania spinosa.* L, culture in vitro, réactivité, phytohormone, milieu de culture, embryons zygotiques, bourgeons.

ABSTRACT

In order to define other ways of the multiplication of the argon., Argania spinosa L, in vitro cultures of buds and zygotic embryos have been realized on die nutriment media of MS (1962).

The influence of several. factors on the reactivity of vegetative material, namely the effect of the ecotype effect, macroelements contribution,, pinlohormones and cold treatment have been studied. The best results were recorded with the ecotype named "Arg. I - in the presence of the macromineral formulation of MS and BA with the dose of lmg/i. On another side, our tests carried out on the embryos highlighted the effect "source" on the development of the zygotic embryos. The best rates of reactivity were noted at the provenance of "Oggaz" in the presence of the same minerai composition and organics previously employed at the buds.

Key words: *Argania spinosa* L, *in vitro* culture, reactivity, phytohormone, nutriment media, zygotic embryos, buds.

1.INTRODUCTION

L'arganier, Argania spinosa est une espèce végétale de la famille des Sapotacées. C'est un arbre endémique du sud atlantique marocain. Il se trouve également dispersé dans le sud ouest de l'Algérie, notamment dans la région de Tindouf.

Grâce à ses propriétés écologiques et physiologiques, Argania spinosa est l'une des espèces ligneuses les plus adaptées aux régions arides et semi -arides où elle joue un rôle très important dans la lutte contre la désertification et l'érosion. De plus elle présente un grand intérêt économique. En effet, c'est une espèce « mufti-usages » ; chaque partie ou production de l'arbre est utilisable (bois, feuilles, fruits, huiles) et représente une source de revenus pour l'usager.

Malgré tous ces intérêts, l'arganier est complètement délaissé en Algérie à cause principalement des problèmes d'ordres techniques et d'origine anthropique.

Comme pour la plupart des espèces végétales, l'arganier peut se multiplier par semis de graines.

Malheureusement, plusieurs recherches ont montré que la germination des graines est difficile à l'état naturel à cause de la perte de leur pouvoir germinatif lié aux problèmes de la sécheresse (El Mazzoudi et Errafia, 1977). De plus et en raison des revenus importants tirés de l'huile, toute les noix d'argan sont précieusement ramassées. Les quelques graines qui auraient échappé à la récolte et qui auraient germées ne dépassent pas le stade de plantules car elles sont broutées par les animaux (Nouaim et al.. 1991). D'un autre côté, la propagation végétative classique de l'arganier par bouturage et marcottage est une voie difficile et longue. Ces dernières années les recherches ont été orientées vers des techniques biotechnologiques modernes à savoir la culture des tissus végétaux ou la vitroculture. Cette dernière semble être aujourd'hui la méthode la _plus rapide pouvant mener_ à. la production de plants de quantité et qualité, sains et authentiques, grâce aux potentialités de la micropropagation.

Notre travail a porté sur l'étude des obstacles rencontrés au cours de l'introduction in vitro chez l'arganier, notamment l'alimentation nutritive et la réactivité du matériel végétatif du départ.

11- MATERIELS & METHODES

11.1- Matériel végétal

Les cultures réalisées dans ce travail proviennent de deux types de matériel végétal (Planche I, photo let 2):

11.1.1- **Bourgeons**

Des petits rameaux de l'année (non lignifiées) sont prélevés entre les mois de Mars et Mai à partir des sujets adultes de la région de Stidia (Mostaganem).

11.1.2- Embryons

Les embryons utilisés dans nos expériences ont été isolés de graines matures récoltées d'arbres adultes en juillet et conservées à la température du laboratoire. Les graines proviennent de deux régions différentes :

- La région de *'Oggaz'* (Mascara)
- La région de *'Oued El Ma'* (Tindouf)

11.2- Méthodes

11.2.1- Désinfection du matériel végétal

Les expiants sont désinfectés par immersion dans l'alcool pendant environ 60 secondes suivi d'un trempage de 10 minutes dans une solution de chlorure mercurique *«$Hgcl_2$» à* la dose de 1 Dans le but d'éviter la toxicité due au mercure, les expiants sont rincés 2 fois (10 minutes chacun) dans une solution autoclavée de Chlorure de calcium (3 g/1); puis ils sont rincés 3 fois à l'eau distillée stérile.

11.2.2- Conditions de culture

Après désinfection, les petits rameaux sont découpés à l'aide d'une lame stérile en petits fragments de 0,5 à 1 cm de long portant 1 ou 2 bourgeons. Les embryons sont débarrassés à leurs tours de cotylédons. Les expiants sont par la suite repiqués dans des flacons contenants 20 ml de milieu nutritif à raison de 2 à 3 expiants par flacon.

L'ensemble des opérations de désinfection et de repiquage est effectué sous hotte à flux laminaire et devant un bec bunsen.

Les cultures sont placées dans une chambre éclairée avec une photopériode de 16 heures par cycle de 24 heures. La température au tour des récipients est de 25 °C.

11.2.3- Composition des milieux de cultures

Plusieurs milieux de cultures variants par les apports de macroéléments, et les phytohormones ont été testés. La composition de ces milieux testés est résumée dans le tableau 1.

Tableau 1: Milieux de culture utilisés

Macroéléments	MURASHIGE et SKOOG : **MS,** GAMBORG : **B5,** Knop : KN et HELLER : **HE**
Micro-éléments	MURASHIGE et SKOOG: **MS**
Fer	Fer sous forme de Na EDTA 37,2 mg/1 et $FeSO_4$ 27,9 mg/1
Vitamines	MURASHIGE et SKOOG: **MS**
Inositol	Myo-inositol : 100 mg/1
phytohormones	BA, Kin et GA_3
Source de carbone	Saccharose: 30 g/1
Gélose	**Agar :** 9 g/1
PH	6 ajusté avec NOH (1 N) avant autoclavage
Autoclavage	20 minutes à 120 °C

11.2.4- Observations et mesure

Les paramètres d'appréciation tels que le taux de contamination, réactivité des bourgeons et développement des embryons sont régulièrement prélevés. Ces observations qualitatives et quantitatives sont données sous forme de moyennes à l'effectif totale observé N.

III- RESULTATS & DISCUSSION

111.1. EFFET DE L'AGENT DESINFECTANT

Une bonne désinfection du matériel végétatif du départ assure une production en qualité et quantité des vitroplants. A cet effet, nous avons utilisé un agent désinfectant très efficace, il s'agit du chlorure mercurique *($Hgel_2$).*

Nos résultats obtenus montrent l'effet bénéfique de cet agent stérilisant que ce soit sur le taux de contamination ou celui de la réactivité des expiants mise en culture. En effet, des faibles taux de contamination ont été obtenus avec respectivement 10`.)/0 pour les bourgeons et 03,3 % pour les embryons. Cependant le taux de la réactivité est acceptable, variant entre 53,3 et 73,3 % (Fig. 1).

L'efficacité du chlorure de mercure comme agent désinfectant est confirmé par plusieurs chercheurs sur plusieurs essences végétales notamment le Merisier (RIFFAUD et CORNU, 1981), le Noisetier (ALKAI *et al,* 1984) et le Noyer (BENMAHIOUL, 2001). Cependant, des taux d'infections importants ont été enregistré par certains chercheurs chez la même espèce : l'arganier, notamment ceux de BENHAFFEF, 1997 et LOTMANI *et al,* 1998 où ils notent respectivement 36,1% et .50% en utilisant le Mercryle laurylé et l'Hypochlorite de sodium.

111.2. MiCRo PROPAGATION A PARTIR IR DES BOURGEONS

111.2.1- Effet de l'écotype

Des bourgeons provenant de deux sujets d'arganier adultes ayant des caractères morphologiques distincts ont été utilisés (cf. photo 1). Le but de cet essai est d'étudier l'effet de l'écotype sur la réactivité du matériel végétal de départ.

Les résultats obtenus après 5 semaines de culture sur le milieu de base de *Murashige et Skoog (1962),* Montrent une différence de réactivité entre les deux écotypes. En effet, le meilleur taux de débourrement, 66,7 % a été enregistré chez les bourgeons prélevés de l'écotype *"Arg.1 ",* alors qu'il n'est que de 40,7 % chez l'écotype *"Arg.2"* (Tableau 2).

Tableau 2 : Effet de l'écotype sur le taux réactivité des bourgeons.

	Ecotype « Arg.1 »	*Ecotype «Arg.2 »*
Nombre d'expiants mis en culture	27	27
Nombre de bourgeons débourrés	18	11
% de Réactivité	66,7	40,7

L'effet de l'écotype a été déjà signalé par certains chercheurs notamment NOUAÏM, 1995. Comme plusieurs essences végétales, l'arganier est également caractérisé par une grande variabilité génétique et renferme plusieurs clones variants par leur capacité d'organogenèse.

U 1.2.2- Rôle de la solution macro minérale

Dans le but d'améliorer le taux de débourrement des bourgeons, quatre solutions macro minérales ont été testées. Il s'agit des macroéléments de *Murashige et Skoog, (MS),* de *Knop, (KN), de Heller, (HL), et de Gamborg, (B_5).* (cf. tableau 1).

Nos expériences réalisées dans ce sens, ont démontré l'effet bénéfique de la solution macrominérale de MS sur le taux de débourrement des bourgeons. Ce taux n'a pas été amélioré en substituant les macroéléments de MS par ceux de KN, HE ou B5 (Fig. 2).

Le choix de la solution macrominérale est indispensable durant l'introduction in vitro. Elle joue un rôle important dans la survie et l'amélioration de la réactivité des expiants vitropropagagés. C'est le cas du Pin maritime (RANCILIAC, 1981), Noisetier (ALKAI *et al,* 1984) et Eucalyptus (TEXIER et FAUCHER, 1986). De plus, le rôle bénéfique de la solution macrominérale de MS a conduit plusieurs chercheurs à l'utilisée pour micropropager de nombreuses essences végétales, notamment le cas de l'arganier (BOUSSELMAM *et al,* 2001).

111_23 Action des régulateurs de croissance

Afin de déterminer le meilleur traitement hormonal, nous avons testé trois phytohormones (BA, Kin, GA_3) à différentes doses allant de 0,5 mg/l à 2mg/I.

Le milieu de base est constitué des macroéléments, microéléments et vitamines de MS, le saccharose à la dose de 30 g/1 et l'agar-agar à la concentration de 9 g/l.

L'analyse de la figure 3, montre l'effet de la nature et la dose hormonale sur la réactivité des expiants introduits in vitro. En effet, le meilleur taux de débourrement des bourgeons a été obtenu en présence de la BA à la dose de 1 mg/1. Cependant le pourcentage de réactivité diminue en présence des doses supérieures ou inférieures à 1 mg/1 pour les trois hormones testées. En ce qui concerne l'aspect qualitatif, les meilleures microboutures ont été obtenues avec la BA (planche II, photo 3).

Par ordre d'efficacité BA>Kin>GA_3, la première hormone à la dose de 1 mg/1 est le meilleur traitement a été retenu pour la suite de nos essais.

Nos résultats se concordent avec ceux de RANCILLAC, 1981. Ce chercheur signale que la présence d'une cytokinine est indispensable pour induire la caulogenèse chez le pin maritime. De plus, la benzyladénine est plus efficace que la kinétine. Cependant chez d'autres essences ligneuses, notamment l'olivier, la kinétine donne les meilleurs résultats (YAKOUB-BOUGDAL et *al.,* 2000).

111.2.4- Effet du traitement au froid

Le froid est souvent considéré comme l'agent le plus efficace dans l'élimination de la dormance des bourgeons et des embryons dans la nature (CÔME, 1992). Ce facteur a été étudié sur nos bourgeons. En effet, les résultats obtenus n'affichent aucune action positive de ce facteur sur l'amélioration de la réactivité de notre matériel végétal. Au contraire le taux se trouve diminué chez le lot expérimental traité au froid (Tableau 3).

Tableau 3 : Effet du traitement des bourgeons au froid à + 4°C sur leurs réactivité *'in vitro'*.

	Témoin	*Traité 7 jours au froid*
Nombre de bourgeons mis en culture	18	18
Nombre de bourgeons débourrés	15	09
% de Réactivité	83,3	50

L'effet négatif du froid sur le débourrement des bourgeons chez d'autres essences végétales a été signalé par d'autres chercheurs notamment FEBVRE, 1981 et BENMAHIOUL, 2001. Ils notent que le stockage du matériel végétal au froid n'apporte aucune amélioration supplémentaire dans la réactivité 'in vitro', il peut inhibé même leurs développements ultérieurs.

111 3. VITRO PROPAGATION A PARTIR DES EMBRYONS ZN GOTIQUES

111.3.1- Effet de la provenance des embryons

Dans le but de déterminer l'effet *« Provenance-Réactivité »,* nous avons mis en culture des embryons prélevés de graines récoltées de deux régions différentes *(Tindouf et Oggaz)* (Cf. Planche 1, photo 2). Le milieu de base utilisé est celui de *Murashige et Skoog (1962)* additionné de BA à la dose de 1 mg/l.

Les résultats obtenus après 5 semaines de culture montrent une différence de réactivité chez les embryons des deux provenances testées. Nous avons enregistré 93,3% de développement chez les embryons de provenance *« Oggaz »* contre 83,3% chez ceux provenant de Tindouf (Tableau 4 ; Planche II, photo 4).

Tableau 4 : Effet de la provenance des graines sur le développement *'in vitro'* des embryons.

	Provenance « Oggaz »	*Provenance « Tindouf »*
Nombre d'embryons mis en culture	30	30
Nombre d'embryons développés	2 8	2 5
% de Réactivité	93,3	83 3

Comme signalé précédemment, l'arganier présente une grande variabilité génétique. Les gaines des deux provenances étudiées *(Tindouf et Oggaz)* apparaissent différentes. Les graines *d'Oggaz* sont plus volumineuses que celles de *Tindouf (Cf.* Planche I, Photo 2).

Ce qui a été constaté par NOUAIM, 1995 et BOUG HANEM, 1998. En effet ces chercheurs signalent que les meilleurs taux de Germination in vivo chez cette essence sont enregistrés en utilisant des graines mûres et plus volumineuses.

111.3.2 Actions des phytohormones

En présence de la même formulation minérale et organique de milieu nutritif précédemment employé, deux phytohormones (BA et GA_3) ont été étudiées à la dose de 1 mg/1.

Comme le montre la figure 4, la BA à la dose de lmg/1, nous a permis d'obtenir un meilleur taux de développement qui atteint 93,3%. Cependant la substitution de cette phytohormone par la GA_3 n'améliore pas le taux de développement. La qualité des épicotyles obtenues est presque semblable sur les milieux renfermant les deux phytohormones utilisées.

Le développement in vitro des embryons zygotiques de plusieurs essences, nécessite la présence d'une cytokinine, notamment la BA à des doses généralement faibles de l'ordre de I mg/l. C'est le cas par exemple du genre *Juglans* (JAY-ALLEMAND et CORNU, 1986 ; COSSIO et MINOTTA, 1983 ; BENMAHIOUL, 2001). Enfin, nous signalons la formation importante de cal chez la plupart des embryons cultivés (Planche II, Photo 5)

CONCLUSION

Cette étude a été engagée après que l'on ait constaté des obstacles au cours de l'introduction in vitro de plusieurs essences ligneuses (cas de l'arganier), notamment la diminution de l'aptitude organogène liée à la réactivité du matériel végétatif du départ. Elle a montrée que la culture des embryons zygotiques est une technique relativement facile à mettre en oeuvre et efficace pour améliorer l'aptitude organogène des expiants végétatifs (Planche II, Photo 6).

Au cours de ce travail, on a également montré que cette réactivité est liée non seulement au matériel végétal du départ mais également à la composition nutritive du milieu de culture. En effet, les meilleurs résultats ont été enregistrés chez les expiants cultivés en présence de la formulation minérale et organique de MS enrichie de la Benzyladénine (BA) à la dose de 1 mg /1.

La réhabilitation et le développement de l'arganier en Algérie, peuvent avoir un revenu très important dans le domaine économique et écologique du pays. Cependant, la disposition d'un nombre de plantes en quantité suffisante, est tributaire d'une technique de multiplication efficace. La production de plants par micropropagation in vitro est donc une des solutions retenues pour remédier à ce déficit et approvisionner rapidement les pépiniéristes en plants d e base et de qualité.

ICONOGRAPHIE

I- Fiutires :

Figure 1

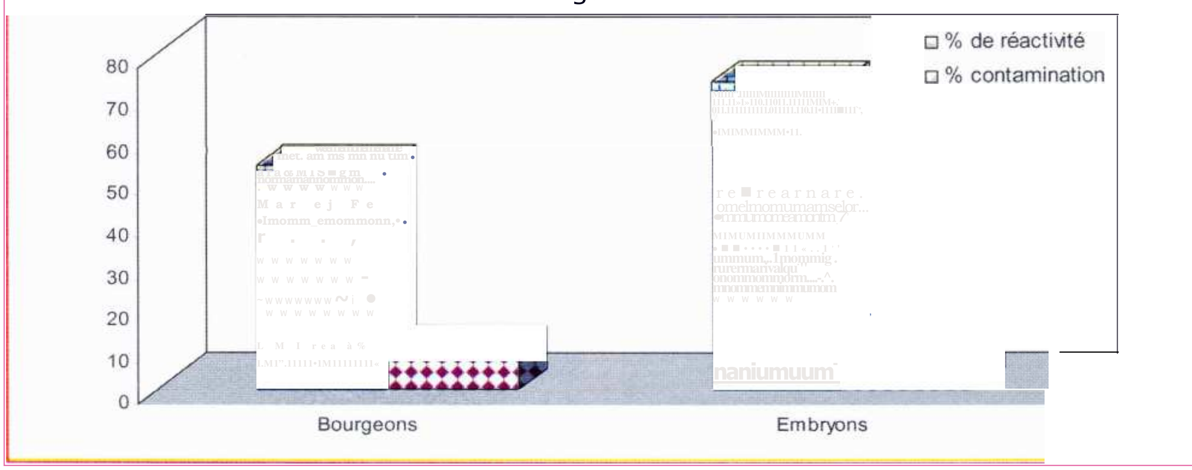


Figure 2

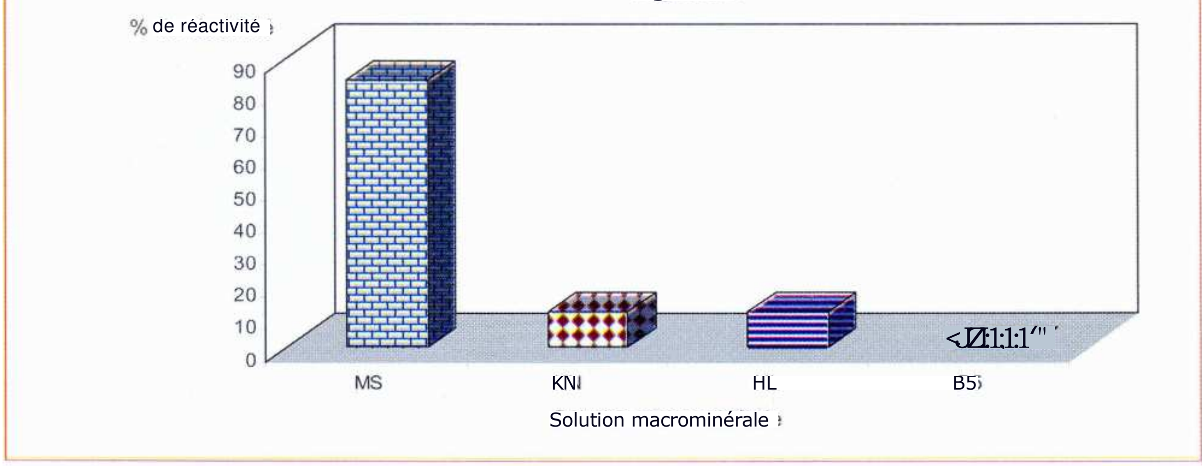


Figure 3

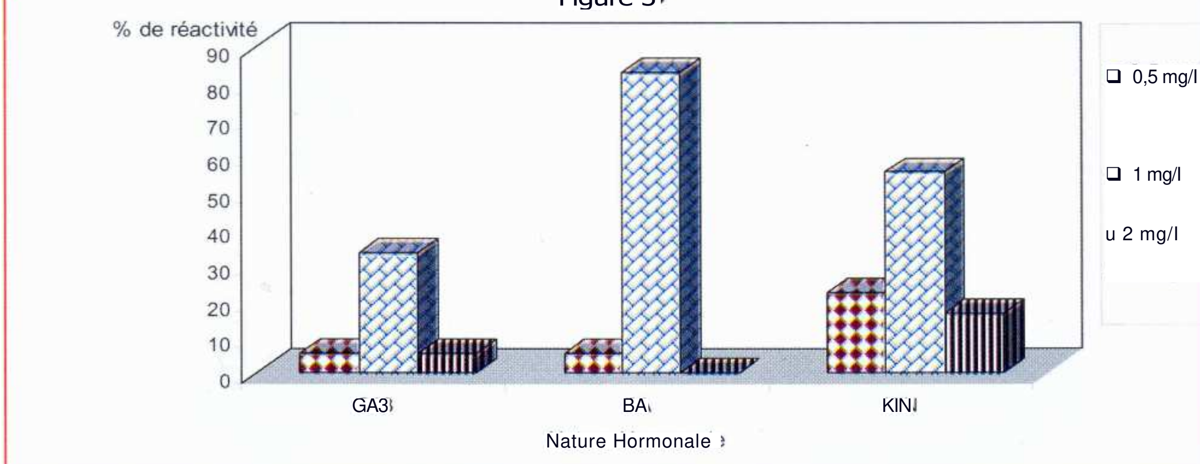


Figure 4

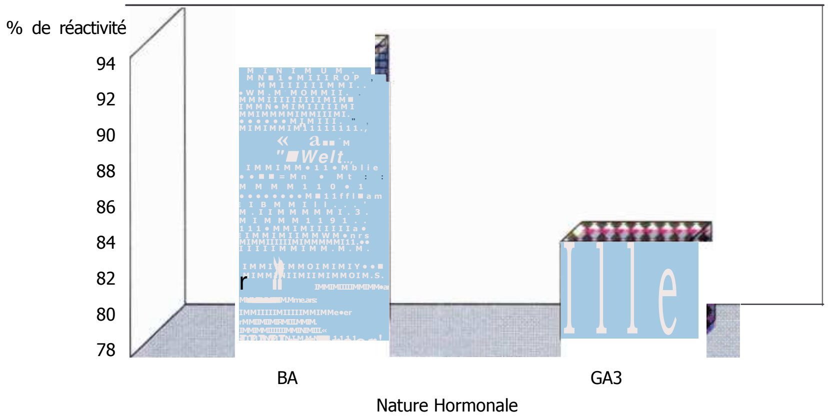


PLANCHE I : (Matériel végétal utilisé)

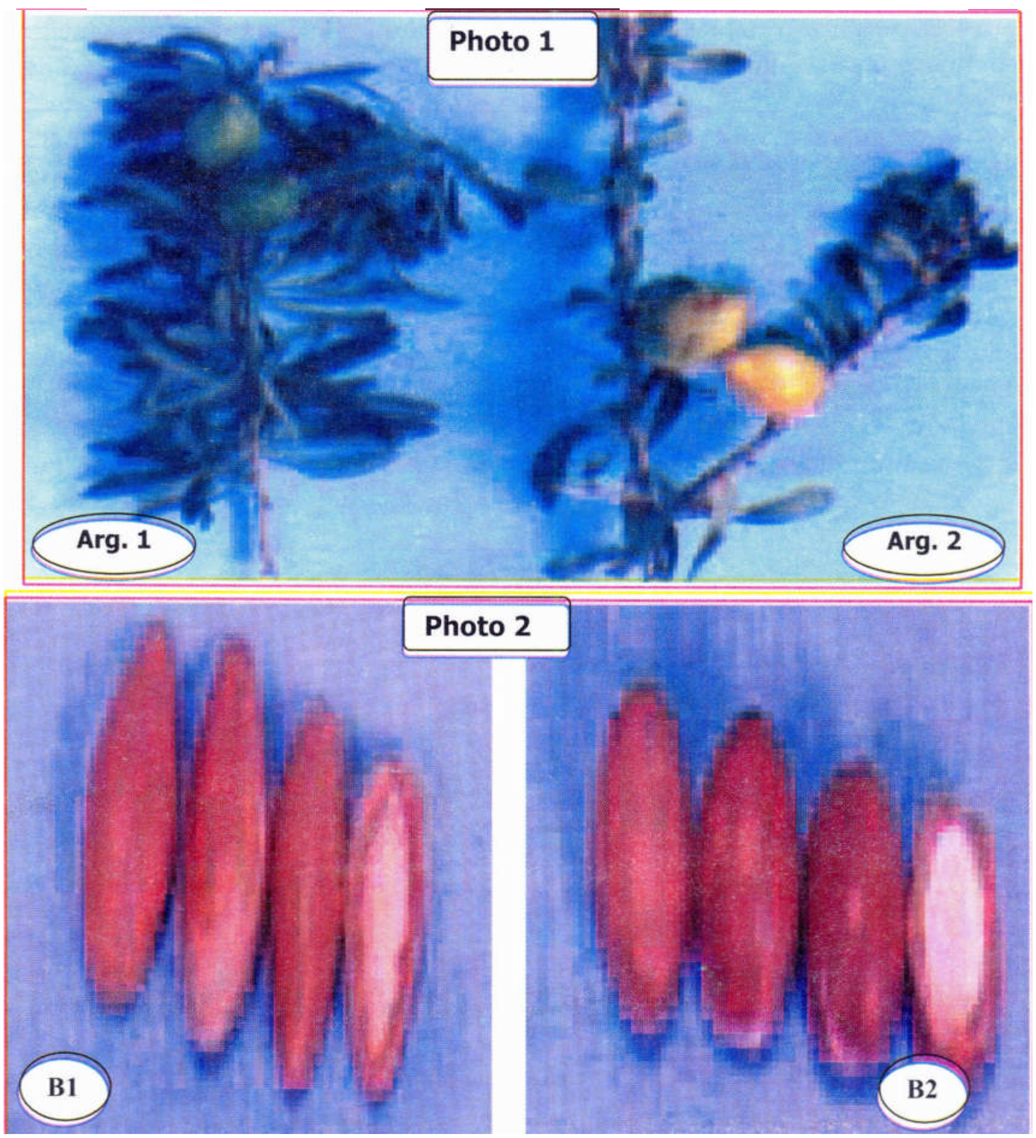


PLANCHE H : (vitroplants obtenus)

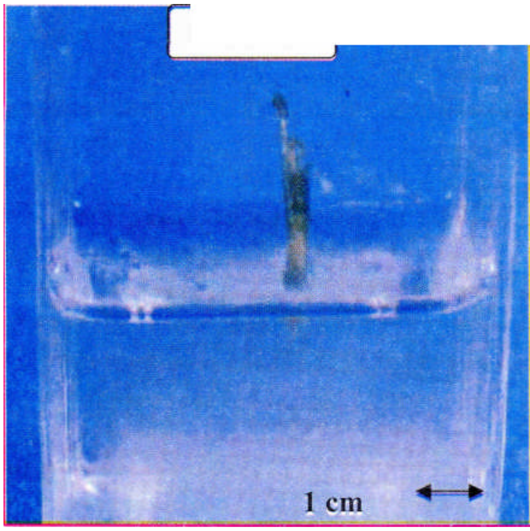
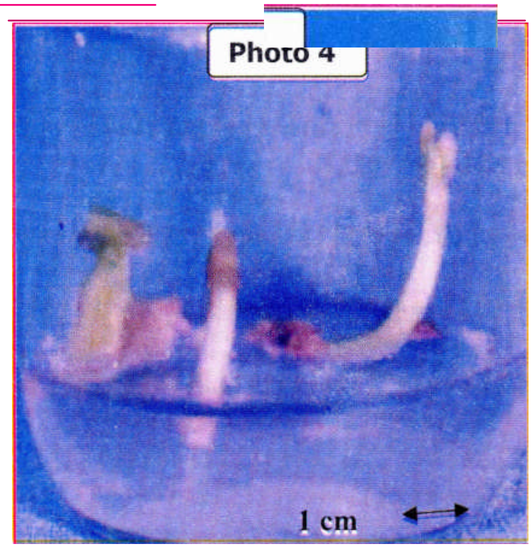


Photo 3



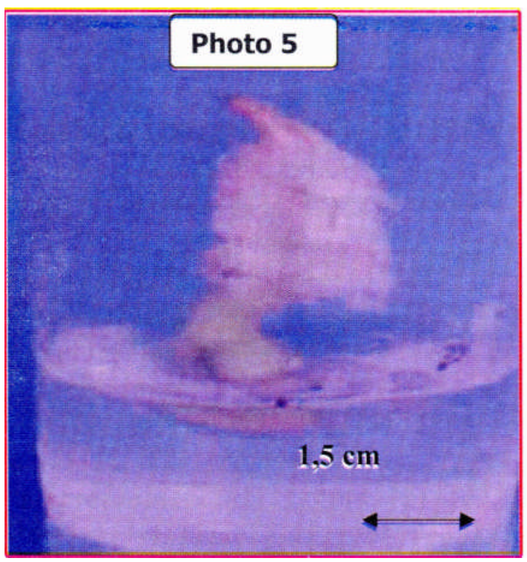


Photo 5
1,5 cm

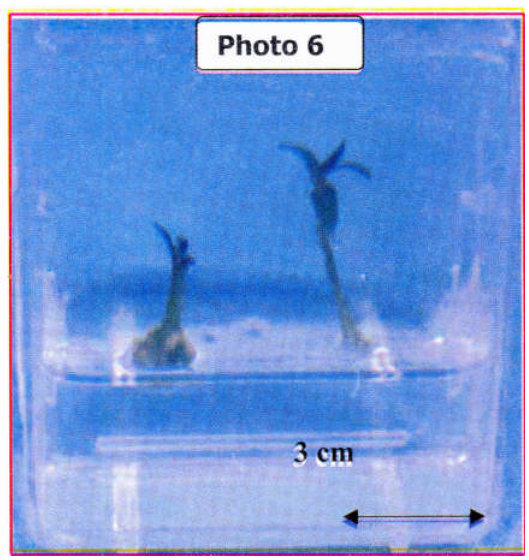


Photo 6
3 cm

Légende des figures & photos

I- Figures :

Figure 1- Effet de la désinfection par *Hg C12* sur les taux de contamination et de réactivité du matériel végétal.

Figure 2- Incidence de la solution macrominérale sur le débourrement des bourgeons.

Figure 3- Effet de la nature et la dose hormonales sur le débourrement des bourgeons.

Figure 4- Action de deux phytohormones (BA et GA3) à la dose de 1 mg/1 sur le taux de développement des embryons.

II- Photos :

Photo 1 -Les deux écotypes testés *(Arg. 1 - Arg.2),* prélevés de la région de Stidia.

Photo 2-Noix d'argan matures récoltées de deux régions différentes :
B1-graines provenant de la région de «Oggaz »
B2- *graines de provenance « Tindonf ».*

Photo 3-Développement d'un bourgeon sur le milieu de base MS en présence de I mg/I de BA

InIcild 4 Bon dey e\ oppernent des embryons de 'Ya picyvem dce Oggaz' s■.m le milieu tx'réfsexuz de la BA 1 mg/1.

Photo 5- Embryon développé sur le milieu MS en présence de 1mg/1 de GA3. Notons la formation de cal à son sommet.

Photo 6- Bon développement des épicotyles après 8 semaines de culture sur le milieu MS en présence de la BA (1mg/1).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AL KAI H., SALESSES G. ET MOURAS A., 1984. Multiplication in vitro du noisetier *(Corylus avellana l.)*. Agronomie, 4 (4) : 399 - 400.
2. BENHAFFEF A., 1997. Essai d'obtention de plants enracinés à partir des feuilles et des bourgeons de l'arganier *(Argania spinosa* (L.) Skeels) par micropropagation in vitro ; mémoire de fin d'études INFSA, Mostaganem
3. BENMAHIOUL B., 2001. Contribution à l'étude de la multiplication végétative in vitro du noyer commun *(Juglans regia* L.). Thèse, magistère. Départ, foresterie. Université de Tlemcen, 85p.
4. BOUGHANEM, 1998. Contribution à la biosystématique de l'arganier *(Argania spinosa* (L.) Skeels) de Tindouf, à travers l'étude de caractéristiques de graines et des Amandes,Mémoire d' ingéniorat Agronomie. Université de TIZI-OUZOU.
5. BOUSSELMAME F., LAHCEN K. ET CHLYH H., 2001. Optimisation des conditions de culture pour l'enracinement in vitro de l'arganier *(Argania spinosa* (L.) Skeels) C.R. Acad. Sci. Paris, 955 - 1000.
6. COME, 1992. Les végétaux et le froid. Edit : HARMANN, paris, 599 p.
7. JAY-ALLEMAND C. ET CORNU D., 1986. Culture in vitro d'embryons isolés de noyer commun *(Juglans regia 1.). Ann.Sci.For.,* 43 (2) :189-198.
8. COSSIO F. ET MINOTTA G., 1983. Prove prel i mi nari di cotura in vitro embriomi isolati di noce *(Juglans regia* I.) econfronta tra differenti combinazioni disali minerali. *Riv. Ortofloro Fruit Ital., 67 :* 287-297.

9. FEBVRE, 1981. Froid et croissance de boutures de saules *(Salix babilonica* 1.) cultivées in vitro. In: *Colloque international sur la culture in vitro des essences forestières.* IUFRO-Fontainebleau, France, 115-118.

10.LOTMANI B, CHOUIEB M, BOUDJMAA M, ARIBI M, BENHAFFAF A, 1998. Micropropagation in vitro de l'arganier *(Argania spinosa* (L.) Skeels) à partir d'explants de feuilles et de microboutures de tige. Séminaire international sur les zones arides, Adrar, 1998.

11.MURASHIGE T. ET SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures, Physiol. Plant. 15 (1962) 473-491.

12.NOUAIM R., 1995. Biologie de l'arganier In : Acte des journées d'étude sur l'arganier ESSAOUIRA 29-30 septembre 1995.

13. RANCILIAC M., 1981. Perspectives d'application des cultures d'organes in vitro à la multiplication végétative du pin maritime *(Pinus pinaster SOL.).* Ann. Sci. Forest, 38 (1) : 55-70.

14.RIFFAUD J.L. ET CORNU D., 1981. Utilisation de la culture in vitro pour la multiplication de merisier *(Prunus avium* 1.) sélectionnes en forêt. *Agronomie 1 (1):* 633-640.

15.TEXIER F ET FAUCHER M, 1986. Culture in vitro d'apex d'Eucalyptus âgé: *Eucallptus parvifolia camp.* Ann. Rech. Syl. AFOCEL 1985, 7-23.