

INITIATION A LA MICROPROPAGATION PAR MICROBOUTURAGE DE L'ARGANIER (*ARGANIA SPINOSA* L. Skeels)

AIZER Nassima¹, ABDELLATIF Nabila², SAIDI fairouz³, CHAOUIA Cherifa⁴

1. Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé. Département de Biologie et Physiologie Cellulaire. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Blida 1. B.P. 270, route de Soumaa ; Blida, Algérie.

2. Laboratoire de Biotechnologie des Productions Végétales. Département des Biotechnologies, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Blida 1. B.P. 270, route de Soumaa ; Blida, Algérie.

Reçu le 26/01/2019, Révisé le 19/12/2019, Accepté le 25/12/2019

Résumé

Description du sujet : L'Arganier, *Argania spinosa* (L.) Skeels, est une espèce forestière de la famille des Sapotacées de l'ordre des Ebénales, endémique du sud-ouest algérien (région de Tindouf) cette espèce est en voie d'extinction. La régénération de cette espèce par voie naturelle est impossible. En effet, le recours aux techniques de biotechnologie végétale s'avère nécessaire pour préserver cette essence naturelle.

Objectifs : L'objectif de notre travail consiste à déterminer les conditions optimales pour la micropropagation par microbouturage de l'arganier.

Méthodes : Des vitrosems d'*Argania spinosa* issues des graines germées *in vitro* sont repiquées sur milieu de culture Murashige et Skoog (MS) additionnés de différentes concentrations de phytohormones (treize combinaisons hormonales d'auxines et de cytokinines pour le débourrement, trois concentrations de gibbérelline (GA3) pour l'élongation caulinaire sont testées.

Résultats et conclusion : Les résultats obtenus montrent que la régénération de l'arganier par microbouturage est plus rapide et efficace pour la préservation de cette espèce. Nous avons enregistré un meilleur taux de débourrement avec un pourcentage de 100% au terme de 80 jours de mise en culture sur un milieu MS contenant (1mg/l Kin et 0,5mg/l AIA). L'adjonction de 1,5mg /l de GA3 au milieu de culture (MS) permet un meilleur allongement caulinaire d'ordre de 5cm des vitro-plants d'arganier après 60 jours de culture.

Mots clés: *Argania spinosa* ; micropropagation ; culture *in-vitro* ; débourrement ; allongement.

INITIATION OF MICROPROPAGATION BY MICROBOUTURAGE OF ARGANIER (*ARGANIA SPINOSA* L.Skeels)

Abstract

Description of subject: The Argan tree, *Argania spinosa* (L.) Skeels, is a forest species of the Sapotaceae family of the order Ebénales, endemic to southwestern Algeria (Tindouf region) this species is on the way extinction. Regeneration of this species by natural route is impossible. Indeed, the use of plant biotechnology techniques is necessary to preserve this natural essence.

Objectives: The objective of our work is to determine the optimal conditions for micropropagation microbouturing of the argan tree.

Methods: *Argania spinosa* vitro-seedlings derived from *in vitro* germinated seeds are subcultured on Murashige and Skoog (MS) culture medium supplemented with different concentrations of phytohormones (thirteen hormonal combinations of auxins and cytokinins for bud burst, three concentrations). of gibberellin (GA3) for the shoot elongation are tested.

Results and conclusion: The results obtained show that regeneration of the argan tree by microbouturing is faster and more effective for the preservation of this species. We recorded a better rate of bud burst with a percentage of 100% at the end of 80 days of culture on an MS medium containing (1 mg / l Kin and 0.5 mg / l AIA). The addition of 1.5 mg / l of GA3 to the culture medium (MS) allows a better elongation of 5cm of the argan vitro-plants after 60 days of culture

Keywords: *Argania spinosa* ; micropropagation, *in vitro* culture; bud burst; elongation.

* Auteur correspondant : AIZER Nassima, Email : nacima.bio@gmail.com

INTRODUCTION

L'arganier, (*Argania spinosa* L. Skeels), est une espèce unique de la famille des Sapotaceae. C'est un arbre endémique de Maroc, il se trouve également dispersé dans le sud-ouest de l'Algérie, notamment dans la région de Tindouf [1]. C'est un arbre épineux, pouvant atteindre 8 à 10 mètres de haut [2, 3], sa longévité peut atteindre 150 à 200 ans et il est très résistant à la sécheresse et à la chaleur [4]. Il joue un rôle très important tant par son intérêt écologique dans le maintien d'écosystème fragilisé par la désertification, que par son intérêt économique.

Cette essence a connu au fil des temps, d'importantes perturbations liées essentiellement au climat et à l'action anthropozogène qui se traduit par des coupes massives et l'utilisation sauvage du bois d'arganier pour la production de charbon. D'autres pratiques d'exploitation favorisent, également, le surpâturage qui a transformé profondément la physionomie de ce fragile écosystème, induisant ainsi une modification profonde dans la répartition spatiale de cette essence [5].

Or, malgré son importance, cette espèce n'est pas valorisée en Algérie, donc l'élaboration d'une stratégie nationale pour la conservation et la lutte contre la disparition de l'espèce en question s'avère indispensable. Elle doit reposer sur la protection et l'intensification du reboisement. Cependant la multiplication

végétative traditionnelle pose d'importants problèmes pour cette raison nous avons utilisé les techniques modernes de multiplication notamment la micropropagation pas microbouturage qui permet à partir d'un matériel de départ souvent très restreint, d'obtenir en un temps court et dans un espace minimum, un rythme de multiplication extrêmement élevé [6].

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

Les graines d'arganier ont été récoltées sur des pieds âgés de 15 ans de l'arboretum d'INRF de Baraki (Algérie), puis elles sont stérilisées et mises à germer.

2. Milieu de culture

Le milieu de culture de base utilisé est celui de Murashige et Skoog (1962) additionné de 0.1g/l d'acide ascorbique, de 30g/l de saccharose et solidifié par 7g/l d'agar, le pH est ajusté à 5.7. Les milieux sont répartis dans des tubes à essais (2.5×20cm) à raison de 15ml/tube ou dans des bocaux, puis autoclavés à 120°C durant 20min.

2.1. Milieu de débourement (initiation)

Afin de sélectionner le milieu le plus performant pour le débourement des bourgeons des micro-boutures d'arganier, treize milieux à concentrations hormonales différentes d'auxines et de cytokinines sont testés (Tableau1).

Tableau 1: Balance hormonale du milieu d'initiation à la micropropagation

Milieux	BAP mg/l	Auxines mg/l	Kin mg/l
Mi0	0	0	0
Mi1	1	0,5 AIA	-
Mi2	1	0,5 AIB	-
Mi3	1	0,5 ANA	-
Mi4	1,5	0,5 ANA	-
Mi5	2	0,1ANA	-
Mi6	-	0,5 AIA	1
Mi7	-	0,5 AIB	1
Mi8	-	0,5 ANA	1
Mi9	-	0,5 AIA	1.5
Mi10	-	0.5AIA	
Mi11	-	-	1

2.2. Milieu d'allongement

Quatre milieux à différentes concentrations de gibbérelline A3 (GA3) sont testés, afin de

mettre en évidence l'influence de cette hormone de croissance sur l'allongement des vitro-plants obtenus (Tableau 2).

Tableau 2: Concentrations hormonales testées pour le milieu d'allongement

Milieu	Concentrations de GA3 mg/l
Ma0	0
Ma1	0,5
Ma2	1
Ma3	1,5

3. Mise en culture

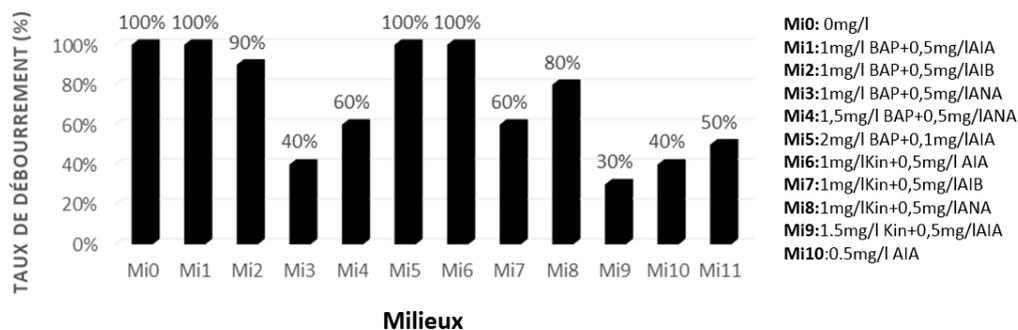
Des explants (de 0.5 à 1cm) obtenus des vitro-semis âgés de 28 jours sont utilisés pour l'initiation de microbouturage dans des tubes à essais puis transférés dans des bocaux contenant 100 ml de milieu de culture à raison de 10 microboutures par bocal. Ils sont placés ensuite dans une chambre de culture à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sous une photopériode de 16/8h.

RÉSULTATS

1. Etape de débourement

1.1. Taux de débourement

Les résultats obtenus, après 80 jours de mise en culture, montrent que les milieux Mi0, Mi1, Mi5 et Mi6 donnent les meilleurs taux de débourement des bourgeons (100%) (Fig. 1).

Figure 1: Taux de débourement des bourgeons chez *Argania spinosa* (L.)

1.2. Développement des microboutures

1.2.1. Longueur

L'analyse de la variance a révélé une différence très hautement significative ($p < 0,000001$) du facteur milieu de culture sur la longueur des microboutures. En effet, le

milieu Mi6 (1mg/l Kin+0.5mg/lAIA) a un effet considérable sur l'élongation des microboutures, elle est d'ordre de 1,96 cm (Fig. 2). Le test post hoc (Newman-Keuls) au seuil $\alpha=5\%$ fait ressortir 4 groupes homogènes (Tableau 3)

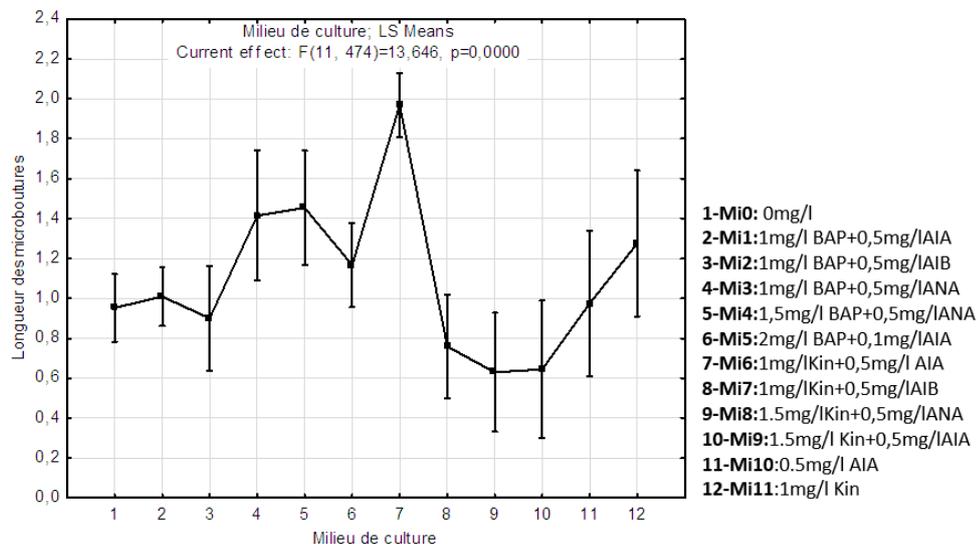


Figure 2 : Effet de l'équilibre hormonal sur la longueur des microboutures

Tableau 3 : Effet du milieu sur la longueur des microboutures (Test Newman-Keuls)

Cell No.	Milieu de culture	Longueur des microboutures Mean	1	2	3	4
9	9	0,6291	****			
10	10	0,6444	****			
8	8	0,7593	****		****	
3	3	0,9000	****	****	****	
1	1	0,9527	****	****	****	
11	11	0,9750	****	****	****	
2	2	1,0091	****	****	****	
6	6	1,1666	****	****	****	
12	12	1,2750		****	****	
4	4	1,4150		****		
5	5	1,4538		****		
7	7	1,9698				****

1.2.2. Nombre de bourgeons

L'analyse de la variance montre qu'il y a une différence très hautement significative de l'effet du milieu de débourrement sur le nombre moyen des bourgeons néoformés des

microboutures (Fig. 3). Le test de Newman-Keuls, fait ressortir trois groupes homogènes (Tableau 4). Le milieu Mi7 (1mg /l Kin+0,5mg /l AIA) est le plus favorable pour la néoformation des bourgeons.

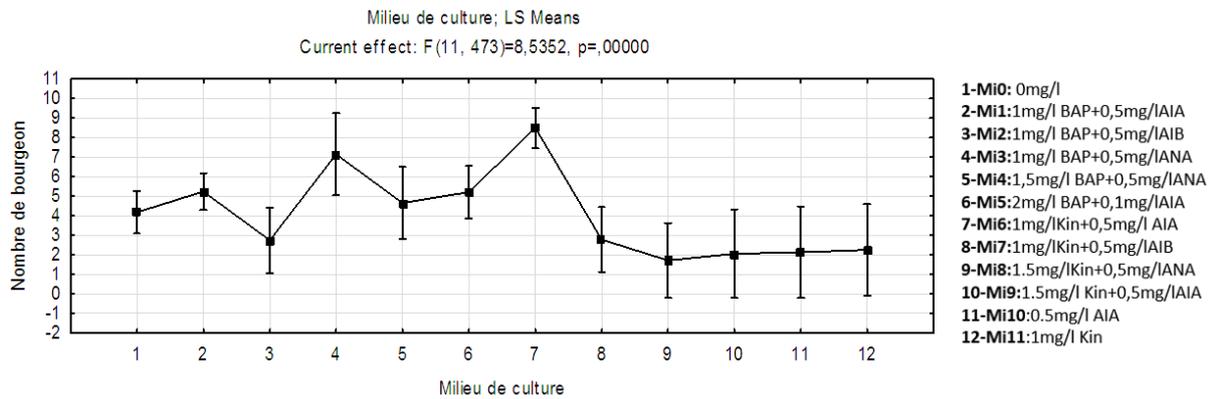


Figure 3 : Effet de l'équilibre hormonal sur le nombre de bourgeon par microbouture

Tableau 4 : Effet du milieu sur le nombre des bourgeons (Test Newman-Keuls)

Cell No.	Milieu de culture	Nombre de bourgeon Mean	1	2	3
9	9	1,7083	****		
10	10	2,0588	****		
11	11	2,1250	****		
12	12	2,2500	****		
3	3	2,7419	****		
8	8	2,7812	****		
1	1	4,1756	****	****	
5	5	4,6538	****	****	
6	6	5,2083	****	****	****
2	2	5,2346	****	****	****
4	4	7,1500		****	****
7	7	8,4939			****

1.2.3. Nombre de feuilles

L'analyse de la variance révèle une différence très hautement significative ($p < 0,000001$) du facteur milieu de culture sur le nombre des feuilles néoformées par microbouture (Fig. 4). Le test de Newman-Keuls fait ressortir quatre

groupes homogènes (Tableau 5) le milieu Mi7 (1mg/l Kin+0,5mg/l AIA) est le plus favorable pour la néoformation des feuilles avec un nombre moyen des feuilles néoformées d'ordre de 16 feuilles.

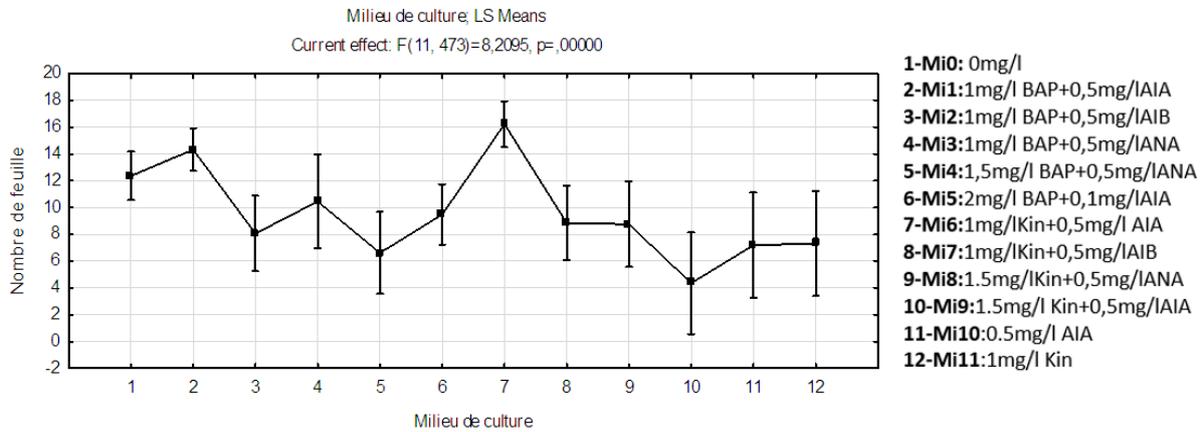


Figure 4 : Effet de l'équilibre hormonal sur le nombre des feuilles néoformées

Tableau 5 : Effet du milieu sur le nombre de feuilles (Test Newman-Keuls)

Cell No.	Milieu de culture	Nombre de feuilles Mean	1	2	3	4
10	10	4,3529	****			
5	5	6,6153	****	****		
11	11	7,1875	****	****		
12	12	7,3125	****	****		
3	3	8,0645	****	****	****	
9	9	8,7500	****	****	****	
8	8	8,8437	****	****	****	
6	6	9,4791	****	****	****	
4	4	10,4500	****	****	****	
1	1	12,3648		****	****	****
2	2	14,3265			****	****
7	7	16,2289				****

1.3. Morphologie des microboutures

Les résultats font remarquer que l'aspect morphologique de microboutures obtenues, après quatre subcultures donne de l'avantage aux microboutures évoluant sur le milieu de culture (Mi6), qui est conforme à celui de la plante mère (Fig. 5). Les feuilles sont alternées

lancéolées, de couleur vert sombre à la face supérieure, plus claire en dessous, conformes à celles de la plante mère. En revanche, les mêmes résultats signalent l'absence des épines sur ces microboutures en les comparant avec la plante mère.

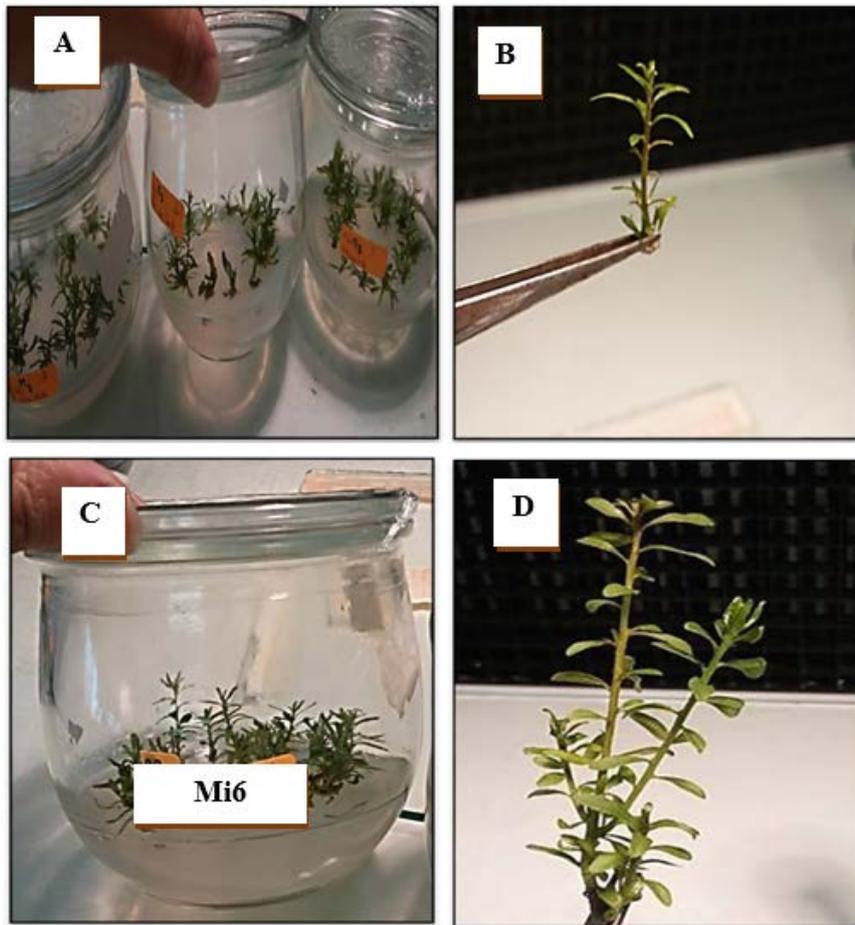


Figure 5: Aspect des microboutures d'*Argania spinosa* L.

A et B : Aspect des microboutures sur milieu Mi6 à la 1^{ère} subculture. C : Aspect des microboutures sur milieu Mi6 à la 3^{ème} subculture. D : Aspect des microboutures sur milieu Mi6 à la 4^{ème} subculture

2. Etape d'allongement

L'analyse de variance montre un effet très hautement significative de milieu d'allongement sur l'élongation des microboutures (Fig. 6 et 7).

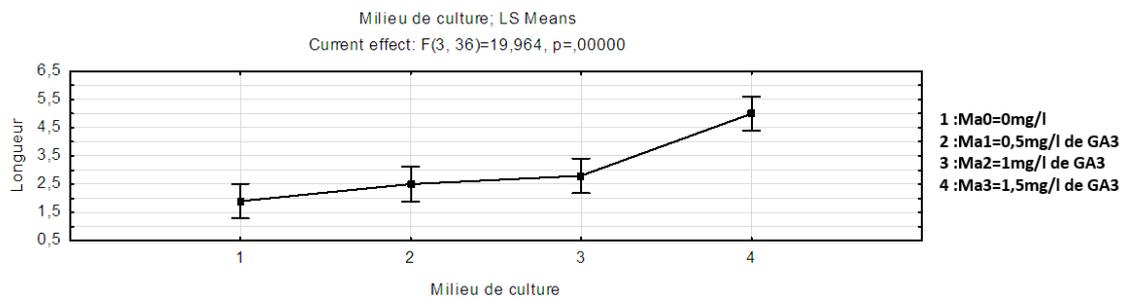


Figure 6 : Effet de GA3 sur l'allongement caulinaire des microboutures

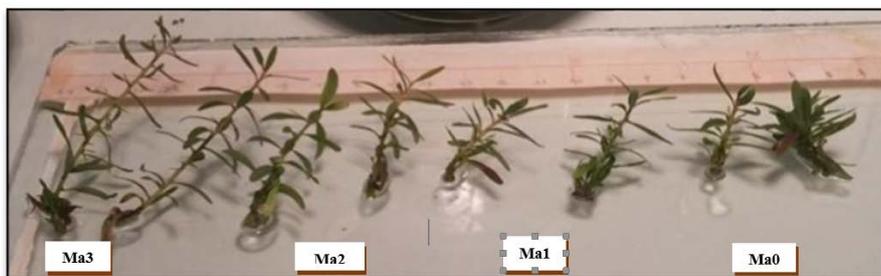


Figure 7 : Aspect des microboutures sur les milieux d'allongement

Le test de Newman-Keuls fait ressortir deux groupes homogènes (Tableau 6), le milieu Ma3 (1.5mg/l GA3) est le plus favorable pour l'allongement des microboutures avec une hauteur moyenne de 5cm.

Tableau 6 : Effet du milieu sur la longueur des microboutures (Test Newman-Keuls)

Cell No.	Milieu de culture	Longueur Mean	1	2
1	1	1,9000	****	
2	2	2,5000	****	
3	3	2,8000	****	
4	4	5,0000		****

DISCUSSION

Le milieu Mi0 (témoin) a présenté un taux de débourrement de (100%) ceci peut s'expliquer par l'existence de l'apport interne des régulateurs de croissance qui sont utilisés par l'explant, pour se développer sur le milieu MS qui est aussi caractérisé principalement par une très forte teneur en azote dont le tiers est apporté sous forme réduite (ions NH_4^+) et une concentration élevée en potassium (K^+). Ces deux composants, interviennent fortement dans le développement des plantes. En outre, l'azote est l'élément minéral qui favorise le développement végétatif, tandis que le potassium favorise la division cellulaire [7]. Par contre à partir de la deuxième subculture, nous avons noté une baisse de la capacité de développement des microboutures.

Les microboutures dans les milieux Mi1 (1mg/l BAP+0,5mg/lAIA), Mi5 (2mg/l BAP+0,1mg/lAIA) et Mi6 (1mg/l Kin ; 0,5mg/l AIA) ont présenté un taux de débourrement des bourgeons très important (100%). En revanche, parmi ces trois milieux, c'est le milieu Mi6 (1mg/l Kin ; 0,5mg/l AIA) qui a fourni des vitro-plants vigoureux d'une longueur moyenne de 1.96 cm, 8 bourgeons et 16 feuilles néoformées. Selon Margara [7], les cytokinines associées aux auxines, favorisent généralement la prolifération *in vitro* des méristèmes préexistants ce qui explique le meilleur taux de débourrement des bourgeons, obtenu lors d'utilisation de cytokinines associées aux auxines. Selon Mdarhri Alaoui [8], l'apport de cytokinine à des valeurs comprises entre 0.5mg/l et 1mg/l pendant la phase d'initiation, s'avère efficace pour le débourrement des bourgeons d'arganier. De plus plusieurs auteurs ont souligné l'effet positif de kinétine sur le développement des pousses. Yagoub-Bougdal [9] a montré que le

développement des bourgeons d'olivier était plus important en présence de kinétine comparé à la BAP.

Le meilleur allongement caulinaire avec une moyenne de 5 cm est obtenu sur le milieu Ma3 avec 1,5mg/l de GA3. Chlyah et Demarly [10], signalent que la phase d'allongement préalable à l'enracinement peut être indispensable. Au cours de cette phase l'acide gibbérellique peut être un activateur de l'enracinement notamment chez *le Prunus myrobolan* et chez *le Pinus mugho*.

CONCLUSION

Le débourrement des bourgeons axillaires ainsi que l'allongement caulinaire a été testé avec plusieurs combinaisons de phytohormones. Les résultats montrent que l'utilisation de milieu de culture Murashige et Skoog (1962), avec adjonction de, 0.1g/l d'acide ascorbique, du saccharose à raison de 30 g/l et de l'agar à 7 g/l, le pH = 5,7 avec la combinaison de Mi6 (1mg/l Kin ; 0,5mg/l AIA) donne les meilleurs taux (100%) de débourrement des bourgeons et des microboutures vigoureux. Le milieu d'allongement caulinaire Ma3 (1,5mg/l GA3) est favorable pour l'élongation des microboutures d'arganier où la longueur moyenne de la tige atteint 5 cm. La phase d'induction racinaire et d'acclimatation est en cours d'expérimentation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Loussert R. (1989). *Les agrumes, production*. Ed sci. Vol 2, Liban, 280p.
- [2]. Jaccard P (1926) L'Arganier, Sapotaceae oléagineuse du Maroc, *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 203–209.
- [3]. Wagret P (1962) L'Arganeraie du sud Marocain relique du tertiaire et providence des populations. *Nature Science Progrès*, 390–393.

- [4]. **Charrouf Z (1999)** Valorisation des produits de l'arganier pour une gestion durable des zones arides du sud-ouest marocain. Actes du 4^{ème} Colloque Produits naturels d'origine végétale, laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Québec, 195-209
- [5]. **Benkheira, A. (Juin 2009)**, "L'arganeraie algérienne". Conservation de la biodiversité et gestion durable des ressources naturelles, publication du projet ALG/00/G35, Numéro spécial, n°9, 15p.
- [6]. **Haicour, Robert, (2002)**, Biotechnologie végétale, techniques de laboratoire Tec & Doc. Lavoisier 305p 23-24.
- [7]. **Boulay, M, (1979)**, "Multiplication et clonage rapide du *Sequoia sempervirens* par la culture *in vitro*". Etu.et Rech. A.F.O.C.E.L. V.6, n°12 49-55.
- [8]. **Mdarhri Alaoui, M., Boukmou, J. et Bouzoubaa, Z. (2011)**, " Application de la biotechnologie pour la sauvegarde de l'arganeraie " : étude de la multiplication *in vitro*. Actes du Premier Congrès International de l'Arganier, Agadir, 119-123.
- [9]- **Yacoub-Bougdal S., Hamlat M. et Bonaly J, (1998)**. "Potentialités organogènes des embryons d'olivier (*Olea europea* L., var. Chemlal) cultivés *in vitro*", Sciences et technologie, Univ. Mentouri, n°9, , pp. 89-92.
- [10]. **Tsogas, M., Bouriquet, R.**, "Propagation de l'épicea par culture *in vitro* d'embryons et de plantules". Etu. et Rech. A.F.O.C.E.L. V.9, n°22, (1982), 346-367.