

## RHIZOGENESE DES MICROBOUTURES DE L'OLIVIER (*Olea europea* L., var. Chemlal)

Reçu le 21/11/1998 – Accepté le 21/06/2000

### Résumé

Des boutures herbacées, issues de plants mères de l'Olivier (*Olea europea* L.) var. Chemlal, sont prélevées dans les régions médianes des rameaux, et découpées en microboutures de 1 cm. Ce matériel végétal a été choisi sur la phase adulte pour obtenir des copies conformes aux pieds mères sélectionnés. Ces microboutures sont cultivées sur différents milieux de base pour déterminer le milieu le plus adéquat. Des bourgeons sont obtenus après deux semaines de culture sur le milieu M.S additionné de BAP (0.8 mg.l<sup>-1</sup>) et d'ANA (0.01 mg.l<sup>-1</sup>).

Des pousses feuillées apparaissent sur le milieu M.S additionné de BAP (2 mg.l<sup>-1</sup>) après trois semaines de culture, avec un taux de réussite de 90%. Par contre, ce taux chute à 80% sur le milieu M.S additionné de Kinétine à 2 mg.l<sup>-1</sup>. L'induction racinaire des pousses feuillées sur le milieu M.S dilué de moitié additionné d'ANA à 4 mg.l<sup>-1</sup> et 6 mg.l<sup>-1</sup> permet d'obtenir, après deux semaines de culture, des cals pourvus de racines. La présence du charbon actif à 7 mg.l<sup>-1</sup> a provoqué une croissance importante des racines. Ces trois étapes ont permis l'obtention d'un enracinement important chez les vitro-plants grâce à ces biotechnologies.

**Mots clés:** *Olea europea* L., microboutures, caulogénèse, rhizogénèse, substances de croissance.

### Abstract

We studied reconstitution of vitroplants in different mediums using herbaceous cuttings stemmed from mother sets of olive tree *Olea europaea* L., Chemlal variety. The plant material was taken from adult trees in order to get exact copies of the selected individuals. Cuttings were taken from median parts of annual boughs, and cut out into 1 cm microsliips. They were first placed in basic mediums in order to selected the most adequate one. MS proved the medium that enabled the best reconstitution of vitroplants. We added then growth hormones, BAP, ANA and Kinetine, at different concentrations. Buds developed after two weeks in an M.S medium containing 0.8 mg.l<sup>-1</sup> of BAP and 0.01 mg.l<sup>-1</sup> of ANA.

Leafed shoots developed in an M.S medium containing 2 mg.l<sup>-1</sup> of BAP after three weeks, with a success rate of 90%. In an M.S medium containing 2 mg of kinetine the success rate was only 80%. Root induction of the leafed shoots in a half dilute M.S medium (M.S/2) containing 4 mg.l<sup>-1</sup> of ANA enabled rooted callus to form after 2 weeks. Active coal at 7 mg.l<sup>-1</sup> leads to an important growth of roots. These three stages enabled an important budding and rooting in the vitroplants thanks to these biotechnologies.

**Key Words:** *Olea europea* L., cytokinins, auxins, roots, shoots, organogenesis.

S. YAKOUB-BOUGDAL  
A. SEMADI  
M. HAMLAT  
A. LOUERGUIOUI  
Laboratoire de Physiologie  
Végétale  
Unité de Recherche  
Institut de Biologie  
Université de Tizi-Ouzou  
Algérie

J. BONALY  
Laboratoire de Biologie  
Cellulaire  
Faculté de Pharmacie  
Chatenay-Malabry  
France

### ملخص

أخذت فساتل منحدرية من شتائل أم اللزيتون (*Olea europea*) صنف شمال من المنطقة الوسطية للأغصان و تم تقطيعها إلى فساتل دقيقة بطول 1 سم. ولقد اختير هذه العينات النباتية في الطور البالغ للحصول على نسخ مطابقة للنبات الأم المنتخب. ثم زرع هذه الفساتل الدقيقة على أوساط غذائية أساسية متعددة لتحديد الوسط الغذائي الأمثل للنمو. لقد تم الحصول على براعم بعد أسبوعين من الزراعة في الوسط الغذائي (MS) المضاف إليه 6 بنزيرل أميلوبورين (BAP) (0.8 ملغ/ل) وحمض نفتالين خليك (ANA) (0.01 ملغ/ل).

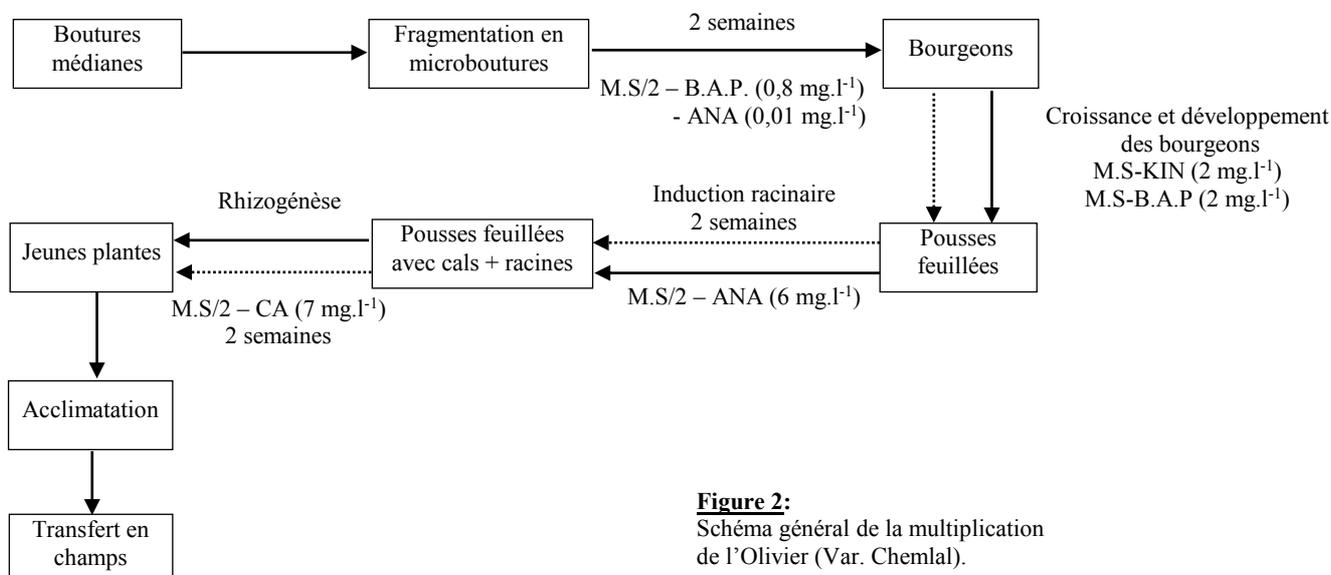
تظهر نباتات مورقة في وسط (BAP+MS) (2 ملغ/ل) بعد ثلاثة أسابيع من الزراعة بنسبة نجاح تصل إلى 90% بينما في حالة MS المضاف إليه الكينيتين (Kin) (2 ملغ/ل) وصلت النسبة إلى 80%. تبرز النباتات المورقة جذورا بعد أسبوعين من الزراعة في وسط (MS) مخفف إلى النصف (MS/2) عندما تضاف إليه ANA بـ 4 ملغ/ل و 6 ملغ/ل. كما تسمح بالحصول على كالوسات متجدرة. إن وجود الفحم النشط بـ 7 ملغ/ل يحدث نموا هاما للجذور. سمحت هذه المراحل الثلاثة بالحصول على جذر هام لدى نباتات الأنابيب بفضل علم التكنولوجيا الحيوية.

**مفتاح الكلمات:** الزيتون، صنف: شمال.

L'Olivier (*Olea europea* L.) est une espèce qui occupe une place importante dans l'arboriculture fruitière méditerranéenne et prédomine par la surface qu'il occupe, environ 47% de la surface arboricole en Algérie. Jusqu'à présent, la variété Chemlal est multipliée par des méthodes traditionnelles: par semis de noyaux suivi de greffage ou par bouturage; cependant, le nombre de greffons ou de boutures est insuffisant pour réaliser une propagation importante et ces méthodes sont longues. En Kabylie, la Chemlal est une variété locale; de par sa vigueur, elle colonise les sols accidentés caractéristiques du relief de la région.

Notre choix s'est fixé sur la Chemlal car elle produit une huile d'excellente qualité et de plus, dans le cas du bouturage, Caballero [1] a estimé son taux d'enracinement à 19%. Sachant que la reconstitution d'une plante entière et viable est tributaire d'un bon enracinement, des expériences ont été menées par le biais de nouvelles méthodes, plus rapides.

Ainsi, notre étude s'inscrit dans le cadre de l'intensification de la production et du rajeunissement des plants du verger oléicole par les techniques de la culture *in-vitro*.



**Figure 2:**  
Schéma général de la multiplication de l'Olivier (Var. Chemlal).

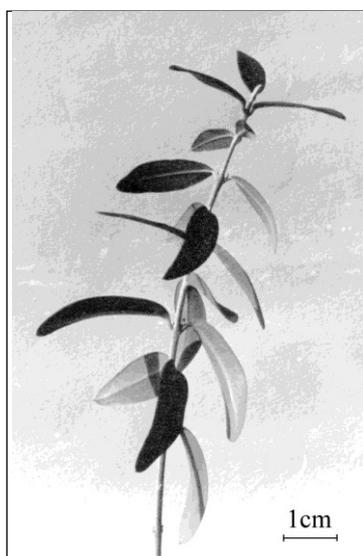
## MATERIEL ET METHODES

### Matériel végétal

Des plants d'Olivier *Olea europea* L. (var. Chemlal) âgés de trois mois, issus du bouturage herbacé, et provenant de la station oléicole de Cap-Djinet, sont acclimatées à la température ambiante du laboratoire. Lors du bouturage herbacé, des essais ont été réalisés, en automne, selon le gradient morphogénétique avec des boutures apicales, médianes et basales.

### Stérilisation des boutures

Des boutures de 12 à 15 cm de longueur (Fig.1) sont prélevées des pieds mères, en automne, et leurs extrémités sont obturées avec de la paraffine. Les boutures sont lavées au mercryl laurylé puis rincées à l'eau courante. Après un passage rapide dans de l'alcool 70°, elles sont désinfectées avec une solution de chlorure mercurique à une concentration de 0,5 mg.l<sup>-1</sup> pendant 5 minutes, puis rincées trois fois à l'eau distillée stérile.



**Figure 1:**  
Bouture de l'Olivier var. Chemlal.  
Longueur: 12 à 15cm.

### Ensemencement des microboutures

Les boutures stériles sont découpées en microboutures de 1 cm de longueur, avec la présence de deux bourgeons axillaires. L'ensemencement est réalisé dans des tubes à essai contenant 25 ml des différents milieux de culture: MS (Murashige et Skoog, 1962), MI (Miller, 1967), MO (Monnier, 1973), LP (Lepoivre, 1977) et GA (Gamborg, 1968). Le pH est ajusté à 5.5. Les milieux sont solidifiés avec 8 g.l<sup>-1</sup> d'agar et autoclavés à 110°C pendant 20 minutes. Ces cultures sont placées dans une chambre thermostatée à 22°C et une photopériode de 16 heures. L'objectif est de déterminer le milieu le plus adéquat pour la culture des microboutures. Nous avons ajouté à ces cinq milieux de la 6-benzylamino-purine (BAP) à 0.8 mg.l<sup>-1</sup> et de l'acide naphthalène acétique (ANA) à 0.01 mg.l<sup>-1</sup>.

Dans un premier temps, nous avons induit la caulogénèse avec l'addition de la BAP (2 mg.l<sup>-1</sup>) ou de la Kin. (2 mg.l<sup>-1</sup>). Dans un deuxième temps, nous avons isolé les bourgeons de ces plants que nous avons ensemencés sur le même milieu contenant de la BAP ou de la Kin. à 2 mg.l<sup>-1</sup>. Dans un troisième temps, nous avons provoqué la rhizogénèse des plants obtenus en utilisant la méthode du choc auxinique préconisée par Rancillac et *al.* [2], Gaspar [3], et Margara [4], qui consiste à mettre les vitro-plants sur un milieu inductif. Ce milieu est composé du M.S dilué de moitié auquel est ajoutée une auxine (ANA) aux concentrations de 4 mg.l<sup>-1</sup> et 6 mg.l<sup>-1</sup>. Après trois semaines de culture, les vitro-plants enracinés sont repiqués sur un milieu de transfert, constitué de MS/2 additionné de charbon actif à 7 mg.l<sup>-1</sup>. Les plants enracinés sont ensuite acclimatés dans une mini-serre. Pour l'acclimatation, deux types de substrats sont utilisés: la tourbe et la perlite. Pour cette étude, trois essais reproductibles sont effectués dans une chambre de culture thermostatée, avec les conditions suivantes:

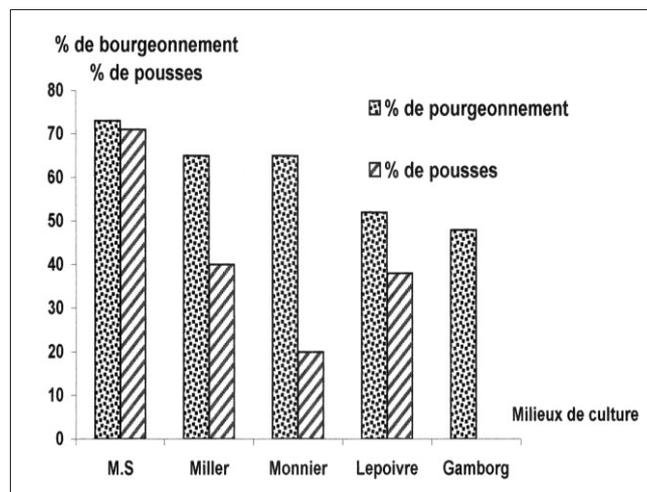
- La lumière fournit un éclairage au niveau des cultures de  $2500.10^7 \text{ erg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  pendant 16 heures.
- La température est maintenue constante à 22°C.

Le schéma général (Fig.2) indique les étapes suivies.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Phase de caulogénèse

L'analyse de l'histogramme (Fig.3) ainsi que le tableau 1 montrent que les taux les plus élevés de bourgeons débouffés et du développement des bourgeons en pousses sont obtenus avec le milieu M.S, ce qui signifie que ces réponses nécessitent le milieu le plus riche en sels minéraux. Des cals sont obtenus sur le milieu MI. Les milieux proposés diffèrent essentiellement par leur concentration en sels. Gaspar [3] le confirme également sur les plantes supérieures.



**Figure 3:** Pourcentage de bourgeonnement et de pousses en fonction des différents milieux utilisés.

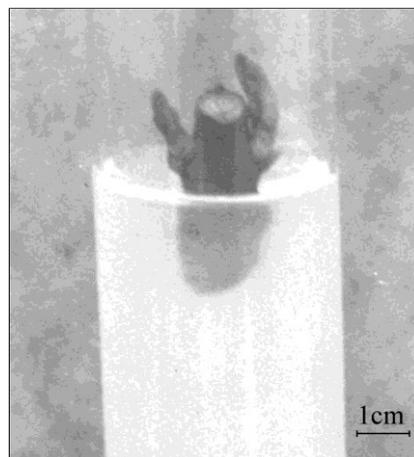
Milieux	Explants mis en culture	Bourgeons débouffés		Cals formés		Bourgeons développés en pousses	
		Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
M.S	48	35	72.9	0	0	22	62.8
MI	40	26	65.0	5	12.5	9	34.6
MO	42	27	64.3	0	0	5	18.5
LP	40	21	52.5	0	0	7	33.3
GA	40	19	47.5	0	0	0	0

**Tableau 1:** Action du milieu de culture sur le bourgeonnement et sur le développement des pousses.

Au cours de la deuxième semaine, les bourgeons axillaires gonflent légèrement (Fig.4), sur le milieu M.S additionné de BAP ( $0.8 \text{ mg.l}^{-1}$ ) et ANA ( $0.01 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Dès la troisième semaine, ils se développent en jeunes pousses feuillées sur M.S additionné de Kin. ( $2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) (Fig.5) ou M.S additionné de BAP ( $2 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Cependant, le milieu contenant la kinétine présente un avantage par rapport à celui avec la BAP: deux bourgeons se forment au niveau d'un seul nœud (Fig.6).

Canas *et al.* [5] ont obtenu les mêmes résultats sur la variété Ascolana. Les travaux de Rugini [6] rapportent le développement d'une seule pousse par bourgeon axillaire.

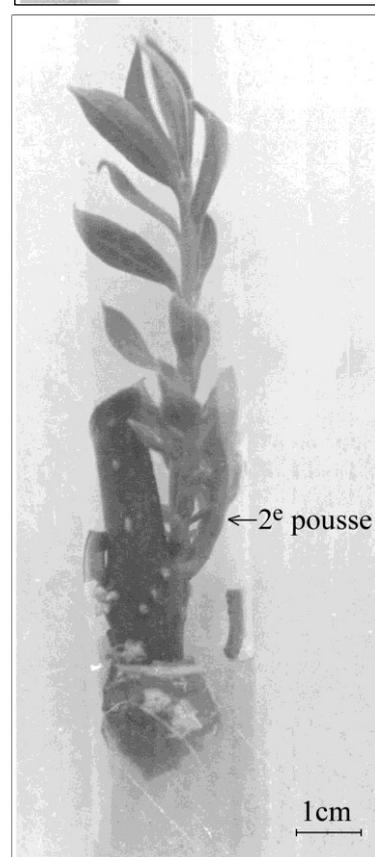
La position des microboutures sur la bouture mère détermine le taux de bourgeonnement. En effet, chez la



**Figure 4:** Microbouture sur milieu MS+BAP ( $0.8 \text{ mg/l}$ ): gonflement des axillaires à 2 semaines de culture.



**Figure 5:** Formation de pousses feuillées sur MS+KIN. ( $2 \text{ mg/l}$ ) après 3 semaines de culture.



**Figure 6:** Formation de deux pousses à la base d'un axillaire sur MS+KIN. ( $2 \text{ mg/l}$ ) à 6 semaines de culture.

variété Chemlal, les microboutures issues de la partie médiane présentent plus de réactivation et un taux élevé par rapport à celles issues des parties apicales ou basales. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Rugini [7] sur différentes variétés d'Olivier, Abousalim et *al.* [8] sur la variété Picholine, et ceux de Seyham-Ozzambak [9] sur différents cultivars de l'Olivier. Le prélèvement des microboutures pendant les saisons d'automne et de printemps aboutissent à de très bons résultats: Boulay [10], Fontanazza et Jacobin (1975) in Caballero [1]. Toutefois, les explants prélevés en automne sont plus efficaces que ceux prélevés au printemps, probablement à cause de la teneur élevée en hydrates de carbone accumulés pendant l'automne [11] et de l'effet négatif du processus de floraison sur la multiplication végétative pendant le printemps [8].

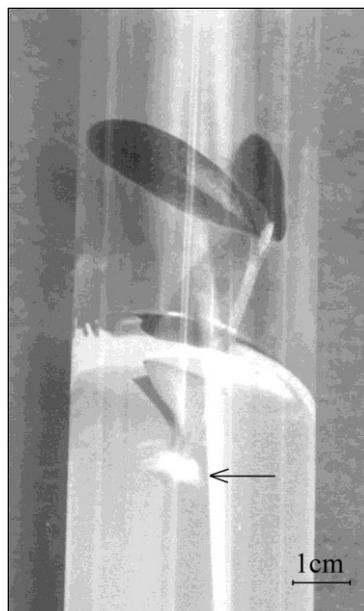
### Phase de rhizogénèse

Cette étape doit permettre l'induction d'un système racinaire sur les pousses obtenues au cours des étapes précédentes.

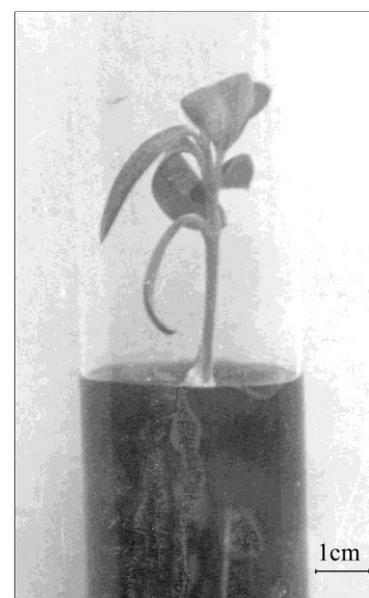
Milieu inductif	Explants de départ	Milieu de transfert	Nombre de pousses enracinées	Nombre de racines par pousses
M.S/2 ANA (4mg/1)	48	M.S/2	5	1
	48	M.S/2+CA (7g/1)	38	1 à 3
M.S/2 ANA (6mg/1)	48	M.S/2	13	1
	48	M.S/2+CA (7g/1)	44	3 à 5

**Tableau 2:** Action des différents traitements sur l'enracinement des pousses feuillées issues des microboutures médianes.

Le tableau 2 regroupe les différents traitements pour l'enracinement des pousses feuillées issues des microboutures médianes: on observe sur le milieu MS dilué de moitié, additionné de doses élevées d'ANA (4 mg.l<sup>-1</sup>, 6 mg.l<sup>-1</sup>), la formation d'une racine par pousse. Lorsque les pousses sont transférées sur le milieu MS dilué de moitié, contenant du charbon actif (7 g.l<sup>-1</sup>) avec de l'ANA à 4 mg.l<sup>-1</sup>, on observe une à trois racines par pousse; si l'on augmente la concentration d'ANA (6 mg.l<sup>-1</sup>), avec la même dose de charbon actif, le nombre de racines par pousse varie de 3 à 5. Les racines formées sont très vigoureuses. Nos expériences montrent que les pousses feuillées issues de microboutures médianes réagissent rapidement au traitement inductif. En effet, des calcs se forment sur le milieu MS dilué de moitié, additionné de l'ANA (4 et 6 mg.l<sup>-1</sup>) au bout de deux semaines avec l'apparition d'une racine vigoureuse (Fig.7). La figure 8 représente une pousse feuillée cultivée sur le milieu MS/2 et ANA (6 mg.l<sup>-1</sup>) après deux semaines de culture. Le taux d'enracinement est élevé avec l'ANA, ce qui rejoint les travaux de Jacoboni [12] sur l'Olivier où les racines se différencient mieux avec l'ANA qu'avec l'AIA ou l'AIB. Selon Boulay [10], Tsogas et Bouriquet [13], Dumanois et *al.* [14], Altamura [15], Druart [16], la rhizogénèse *in-vitro* des ligneux est souvent difficile à réaliser; pour cela, ce sont les jeunes rameaux



**Figure 7:** Formation de cal rhizogène à la base de la pousse feuillée sur MS/2+ANA (6 mg/1) après 2 semaines de culture.



**Figure 8:** Pousse feuillée sur milieu de transfert avec du charbon actif (7 g/1). Croissance rapide de la racine après 2 semaines de culture.

d'une année, en cours de lignification, qui ont servi au départ. Selon Del Rio et Caballero [17], la formation de calcs est essentielle pour l'enracinement. Daoud et *al.* [18], Ozkaya et Celik [19] montrent que la formation d'une ou plusieurs racines est différente selon les cultivars de l'Olivier, et dépend également de leurs potentialités. Caballero [1] a noté un faible pouvoir rhizogène chez l'Olivier, soit 19% par la méthode traditionnelle: le bouturage herbacé. Ainsi, grâce à la méthode moderne, *in-vitro*, l'enracinement obtenu est important pour les vitroplants issus de la phase adulte. Ces résultats sont tout à fait nouveaux pour la variété Chemlal.

### CONCLUSION

A partir de microboutures, il est possible de simuler le développement des bourgeons axillaires, de les séparer, de les enraciner et de les acclimater par le biais de la culture

*in-vitro*. Cependant, certains facteurs liés à la plante mère jouent un rôle important tel que l'état physiologique de la bouture. Les explants prélevés en période d'activité végétative prolifèrent beaucoup plus rapidement que ceux mis en période de repos cambial [20]. D'après Del Rio et al. [11], durant l'automne, la teneur en hydrates de carbone est élevée, ce qui entraîne une meilleure réactivation des explants.

En suivant le gradient morphogénétique des boutures, la position médiane sur le rameau a été déterminante dans l'obtention des résultats. Les racines se différencient mieux avec l'ANA (6 mg.l<sup>-1</sup>) sur le MS/2 et le charbon actif à 7 g.l<sup>-1</sup>. L'avantage du microbouturage issu de la phase adulte est celui d'obtenir des copies conformes à l'arbre sélectionné. Comme perspectives, il serait intéressant d'étudier les aspects suivants:

- pourquoi les boutures médianes donnent-elles de bons résultats?
- une meilleure distribution des hormones équivaut-elle à une concentration optimale dans ces zones ?
- l'état physiologique des cellules est en faveur d'une meilleure distribution des hormones et aux molécules impliquées. Est-ce à cause d'une meilleure perméabilité des parois cellulaires?

#### Remerciements

Nous tenons à remercier M. Halouane et M. Redaoui, pour avoir mis à notre disposition le matériel végétal, et pour nous avoir permis l'accès à la station arboricole, ainsi que M. Boudjeniba, M.K. Salhi, F. Ait-Ramdane, K. Khidas, Skoric-Liliana et le Prof. J.P. Barque (CNRS-France).

#### REFERENCES

- [1]- Caballero M., "Reproduction de l'olivier par bouturage semi-ligneux sous nébulisation", In "la multiplication de l'olivier", I.N.I.A., Espagne, (1983), pp. 129-176.
- [2]- Rancillac M., Faye M. and David A., "In-vitro rooting of cloned shoots in *Pinus pinaster*", *Physiol. Plant.*, 56, (1982), 97-101.
- [3]- Gaspar T., "Multiplication végétative des plantes supérieures par culture *in-vitro*", in "Cultures de cellules, tissus et organes végétaux, fondements théoriques et utilisations pratiques", *Press. Poly. Rom.*, T. 69, (1988), pp. 31-50.
- [4]- Margara J., "Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse", I.N.R.A., Versailles, (1989), p. 262.
- [5]- Canas L.A., Carramolino L. and Vicente M., "Use of embryonis for the *in-vitro* culture of the olive tree", *Communication personnelle* (1987).
- [6]- Rugini E., "In-vitro propagation of some olive (*Olea europea L.*) cultivars with different root-ability and medium development using analytical data from developing shoots and embryos", *Sci. Hort.*, 24, (1984), pp. 123-124.
- [7]- Rugini E., "In vitro of the olive on overview of the present Scientific status", *Acta Hort.*, 286, (1990), Olive growing.
- [8]- Abousalim A., Walali D.M. et Slaoui K., "Effet du stade phénologique sur l'enracinement des boutures semi-ligneuses de l'olivier en tablettes chauffantes", *Olivea*, 46, (1993), pp. 30-37.
- [9]- Seyham-Ozzamback, "Shoot multiplication of some olive (*Olea europea L.*) cultivars", *Acta horticulturae*, 356, (1994), Olive growing II.
- [10]- Boulay M., "Multiplication et clonage rapide du *Sequoia sempervirens* par la culture *in-vitro*", *Etu. et Rech. A.F.O.C.E.L.*, 6, 12, (1979), pp. 49-55.
- [11]- Del Rio C., Rallo L. and Caballero J.M., "Effets of carbohydrate content on the seasonal rooting of vegetative and reproductive cuttings of olive", *J. Hort. Sci.*, 66(3), (1991), pp. 301-309.
- [12]- Jacoboni A., "Culture *in-vitro*", *Olivea*, 25 (1989), pp. 31-34.
- [13]- Tsogas M. et Bouriquet R., "Propagation de l'épicéa par culture *in-vitro* d'embryons et de plantules", *Etu. et Rech. A.F.O.C.E.L.*, 9, 22, (1982), pp. 346-367.
- [14]- Dumanois C., Braut-Boucher F., Cosson L. et Paris M., "Multiplication végétative *in-vitro* du chanvre (*Canabis sativa L.*). Application à la conservation des clones sélectionnés", *Revue d'Agronomie*, 5, (1986), pp. 487-495.
- [15]- Altamura, "Root histogenesis in herbaceous and woody explants cultured *in-vitro*. A critical review", *Agronomie*, 16, (1996), pp. 589-602.
- [16]- Druart Ph., Optimisation of culture media for *in-vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan *Biologia Plantarum*, 38 (10), (1996), p. 30.
- [17]- Del Rio C. et Caballero R., "Bases anatomiques et physiologiques de la formation des racines adventives de l'olivier", I.N.I.A., Espagne (1983), pp. 53-75.
- [18]- Daoud D.A., Agha J.T., Abu-Lebdak H. et Al-Khaiat M.S., "Incidence de l'AIB sur l'enracinement des boutures feuillées de l'olivier", *Olivea*, 27, (1989), pp. 28-30.
- [19]- Ozkaya M.T. and Celik M., "The effect of rooting environment and combination of auxin polyamine on the rooting ability of turkish olive Gemlit and Domat", *Acta Hort.*, 356, (1995), pp. 31-34.
- [20]- Favreau J., "Aspects pratiques de la multiplication des ligneux par bouturage sous abris", in "Multiplication végétative des plantes supérieures", Ed. Gauthier Villars, (1980), pp. 259-276. □