

## GERMINATION ET POTENTIALITES ORGANOGENES DES EMBRYONS D'ARGANIER (*Argania spinosa* L. Skeel) CULTIVES IN VITRO

Reçu le 04/09/2000 – Accepté le 16/07/2002

### Résumé

Les embryons d'argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) isolés de la graine et mis sur milieu de culture de Gamborg (B5) contenant des substances de croissance ANA/KIN et ANA/BAP peuvent évoluer en plants parfaitement constitués.

Des pousses feuillées apparaissent après un mois de culture de microboutures constituées de bourgeons axillaires prélevées sur des vitroplants de la provenance de Mostaganem ou sur des plants élevés en pépinière pour la provenance de Tindouf sur milieu de culture de Gamborg (B5/2) additionné de deux équilibres hormonaux ANA/KIN et ANA/BAP aux concentrations de 0.5/0.5 mg L<sup>-1</sup> pour les deux combinaisons.

L'induction des racines sur les pousses nouvellement formées est possible mais difficile sur l'écotype de Tindouf en présence d'ANA, alors que sur l'écotype de Mostaganem, elle est pratiquement impossible. A la base des boutures se développent des cals qui donneront parfois des racines sur l'écotype de Tindouf. Le pourcentage de survie après acclimatation est nul.

**Mots clés:** *Argania spinosa* (L.) Skeels, culture in vitro, embryon, germination des graines, microboutures.

### Abstract

The Argan embryos (*Argania spinosa* (L.) Skeels) isolated from the seed and cultivated on Gamborg (B5) medium supplemented with growth substances ANA/KIN et ANA/BAP, can evolve on entire plant.

One month after subculture the microcuttings with axillary buds removed from vitoplants (Mostaganem ecotype) or from in vivo plant grown on tree nursery (Tindouf ecotype) take on leaves on (B5/2) medium supplemented with ANA/KIN et ANA/BAP (0.5/0.5 mg L<sup>-1</sup>).

Induction of roots on vitroplant is possible but with difficult on Tindouf ecotype with ANA, however this is impossible on Mostaganem ecotype. In rooting medium, cal grow at the basal of microcutting. The survival plants after acclimatation is impossible.

**Key words :** *Argania spinosa* (L.) Skeels, germination of seeds, embryos, microcuttings.

**Abréviations:** ANA : Acide naphthyl-acétique, BAP : Benzylaminopurine, KIN : Kinétine.

### B. LOTMANI

Laboratoire Amélioration des Plantes  
Département d'Agronomie  
Faculté des Sciences  
Université de Mostaganem  
Mostaganem, Algérie

### M. CHOUJEB

### M. BOUDJEMA

Laboratoire de Foresterie  
Département d'Agronomie  
Faculté des Sciences  
Université de Mostaganem  
Mostaganem, Algérie

### ملخص

المفصولة عن البذرة و الموضوعة (*Argania spinosa* (L.) Skeels) إن أجنة نبات ANA/BAP و ANA/KIN المحتوي على هرمونات النمو B5 Gamborg في وسط غذائي المسمى تستطيع النمو والتحول إلى نبات كامل التركيب.

ومضاف إليه (B5/2) Gamborg النمو الورقي يظهر بعد شهرين من زرع العقل المصغرة في وسط غذائي والمكونة من براعم جانبية المأخوذة من 0.5/0.5mgL<sup>-1</sup> بتركيز ANA/BAP و ANA/KIN نباتات منتجة من قبل بواسطة الزراعة الزجاجية صنف مستغانم أو من نباتات صنف تندوف المحصل عليها في المشاتل.

تكون الجذور على هذه النباتات ممكن لكنه صعب الحصول عليه عند النوع النباتي تندوف في وجود هرمون في حين عند النوع النباتي صنف مستغانم فان تكون الجذور منعدم.

عند قاعدة العقلة يتكون نسيج الكال الذي يعطي نمو جذور عند النوع النباتي تندوف التي تموت فيما بعد. نسبة النجاح فيما بعد التأقلم تكون منعدمة.

**الكلمات المفتاحية:** *Argania spinosa* (L.) Skeels، أجنة، النمو الورقي، الزراعة الزجاجية.

L'Arganier, *Argania spinosa* (L.) Skeels est une espèce de la famille des Sapotacées, un arbre endémique en Algérie et au Maroc. En Algérie, l'Arganier se trouve très dispersé dans les lits d'Oueds dans la région de Tindouf.

Boudy [1] décrit l'Arganier comme étant l'essence la plus originale et la plus remarquable de l'Afrique du Nord, tant par son intérêt botanique que par sa valeur sociale. Pelletier [2] met l'accent sur l'importance économique de cette essence par sa parfaite adaptation au sol et au climat aride ou semi-aride de la région. Il joue un rôle dans la lutte contre la désertification.

Il peut permettre une production agricole, non négligeable, dans les conditions édaphiques et climatiques défavorables. La production de noix obtenue est destinée à la fabrication d'une huile de grande vertu tant nutritive, que pharmaceutique et cosmétique.

En Algérie, l'arganier pourrait constituer une essence forestière très intéressante pour le reboisement des zones très fragilisées sujettes au phénomène de désertification étant donné sa facilité d'adaptation, si certains problèmes de multiplication et de transplantation étaient résolus.

Des études 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 [3].

Le taux de germination est d'autant plus élevé que les graines sont grosses et de récolte récente, et qu'on procède à une légère désinfection qui évite les contaminations responsables des fontes de semis [4,5,6,13]. La technique de trempage des graines dans l'eau est tout à fait suffisante pour obtenir une bonne germination [5].

Même si la production de plants en pépinière a été améliorée, il reste cependant le problème de transplantation qui cause encore l'échec quasi-total de la plantation.

L'arganier peut être mycorhysé par des endomycorhizes à arbuscules [7]. Il est très dépendant de la symbiose mycorhizienne [8,9]. L'Indice de Dépendance Mycorhizienne Relative atteint 80 %, valeur la plus élevée connue pour un arbre. L'amélioration de la reprise des plantules peut certainement se faire par une bonne gestion des symbioses racinaires.

La multiplication *in-vitro* de plusieurs clones montre que l'effet clone est très important. Certains clones sont difficiles à multiplier et l'enracinement est totalement absent chez d'autres [10,6].

Dans cette étude, nous avons essayé de contribuer à l'amélioration de la production des plants, voire l'amélioration de la germination par l'utilisation de divers procédés et traitements de la graine et étudier la capacité ou les potentialités des écotypes algériens à se multiplier *in vitro*.

## MATERIEL ET METHODES

### Matériel végétal

Deux provenances d'arganier ont été utilisées, l'une provient de la région de Tindouf et l'autre de Mostaganem (forêt de *Stidia*).

Les graines récoltées dans la région de Tindouf ont été semées en pépinière à Mostaganem. Les plants obtenus peuvent éventuellement constituer une source de tissus disponibles à tout moment pour l'expérimentation *in vitro*.

### Germination des graines

Les graines sont mises en germination à l'obscurité à la température de 30°C après l'application des traitements suivants :

- Trempage des graines entières pendant 72 heures dans l'eau, méthode préconisée par Nouaim [6] puis mise en germination.
- Elimination des téguments puis mise en germination.

### Désinfection des graines

Les graines sont débarrassées de leurs téguments durs puis lavées à l'eau courante, stérilisées ensuite à l'alcool 70° pendant 1 à 2 mn puis avec une solution d'hypochlorite de sodium à 2% durant 20 mn; elles sont rincées finalement dans trois bains d'eau stérile.

### Extraction des embryons

Les graines sont cassées pour extraire l'amande. Les deux parties de l'amande (cotylédons) sont séparées pour faire apparaître l'embryon. Après élimination des cotylédons par simple incision au bistouri, la pointe embryonnaire est détachée puis mise en culture.

### Mise en culture des embryons

252 pointes embryonnaires isolées sont ensemencées dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu Gamborg B5 [11] entier ou modifié (diluée 2 fois ou 10 fois) auxquelles sont ajoutées les substances de croissance suivantes : ANA/ BAP (0,5/0,5 ; 0,5/0,1 ;1/0,1) et ANA/KIN (0,5/0,5 ; 0,5/0,1 ;1/0,1), ou ANA seul (2 ou 5 mg/l). Le milieu est solidifié avec Bacto agar à 8%.

## Mise en culture des boutures

### - Développement des boutures

212 microboutures (de 0,5 à 1cm) constituées de bourgeons terminaux ou axillaires et d'une portion de tige, prélevées sur des vitrosemis âgés de 1 mois (provenance de Mostaganem) et 212 sur des plants élevés en pépinière (provenance de Tindouf), sont mises en culture sur les mêmes milieux que précédemment, additionnés de substances de croissance suivantes : ANA/KIN (0.5 mg.L<sup>-1</sup>/ 0.5 ou 0.1 mg.L<sup>-1</sup>) et ANA/BAP (0.5 mg.L<sup>-1</sup>/0.5 mg.L<sup>-1</sup>), en milieu solide. Le nombre de répétitions par traitement est de 24.

Pour déterminer une combinaison hormonale optimum, nous avons réalisé un essai en mettant en culture des microboutures provenance de Tindouf sur milieu de B5/2 solide avec les variations des en substances de croissance suivantes : ANA/KIN (0.5/0.5 ; 0.5/0.1 ; 0.1/0.5 et 0.1/0.1 mg.L<sup>-1</sup>) ou ANA/BAP (0.5/0.5 ; 0.5/0.1 ; 0.1/0.5 et 0.1/0.1 mg.L<sup>-1</sup>). Le nombre de répétitions par traitement est de 12.

Puis, pour optimiser le milieu de culture de base, nous avons analysé la croissance des pousses en cultivant sur différentes dilutions (B5, B5/2 et B5/10) avec les combinaisons en substances de croissance suivantes: ANA/KIN (0.5/0.5 ; 0.5/0.1) et ANA/BAP (0.5/0.5 ). Le nombre de répétition par traitement est de 12.

### Initiation des racines ou Rhizogénèse

Après trois semaines de culture, les boutures ayant développé des pousses sont remises en culture sur le meilleur milieu de base (B5/2), additionné cette fois-ci avec de l'ANA seul aux concentrations de 2 ou 5 mg.L<sup>-1</sup>.

Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 110°C pendant 20 min. Le pH des milieux est ajusté à 5.6 (par HCl ou NaOH).

### Conditions de culture

Les cultures sont incubées dans une chambre thermostatée où la température est maintenue constante à 25±1°C. L'éclairage au niveau des cultures de 2500 lux est assuré par des tubes à néon avec une photopériode de 16h.

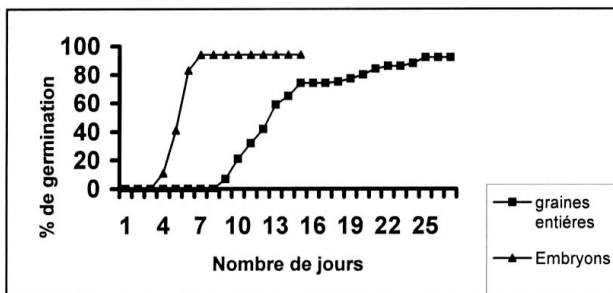
## RESULTATS ET DISCUSSION

### Germination des gaines

L'enlèvement des téguments permet à la graine de réaliser plus facilement sa germination (Fig.1). La suppression de cette barrière mécanique conduit à un taux de germination légèrement plus élevé (+2 à +4%), mais surtout un gain de temps appréciable, soit 16 jours pour obtenir le même taux de germination (90%). En outre, cette méthode représente un autre avantage qui est la stérilisation plus efficace des embryons.

### Culture d'embryons isolés des graines

Dès le quatrième jour de culture, plus de 90% (Tab. 1) des embryons manifestent un début d'évolution par l'apparition des premières feuilles et l'allongement des racines sur pratiquement tous les traitements (photo 1) et (Photo 2). Par comparaison aux autres méthodes de germination (voir plus haut), il y a lieu de souligner que cette technique de culture d'embryons est plus avantageuse car on obtient un taux de reprise plus important et plus rapide.



**Figure 1 :** Evolution de la germination des graines et des embryons d'arganier provenance de Mostaganem en fonction du temps.

**Photo 2:** Plant parfaitement constitué obtenu à partir de la culture des pointes d'embryons.



TRAITEMENTS			NOMBRE D'EMBRYONS MIS EN CULTURE	DEVELOPPEMENT EN POUSES	
Variation du milieu	Hormones	(mg/l)		Nombre	%
B5	ANA/KIN	0,5/0,5	12	10	83,3
		0,5/0,1	12	12	100
		1/0,1	12	12	100
	ANA/BAP	0,5/0,5	12	9	75
		0,5/0,1	12	12	100
		0,1/0,1	12	7	58,3
	ANA	2	12	12	100
5		12	9	75	
B5/2	ANA/KIN	0,5/0,5	12	8	66,6
		0,5/0,1	12	11	91,6
		1/0,1	12	11	91,6
	ANA/BAP	0,5/0,5	12	11	91,6
		0,5/0,1	12	12	100
		0,1/0,1	12	5	41,6
	ANA	2	12	12	100
5		12	12	100	
B5/10	ANA/KIN	0,5/0,5	12	11	91,6
		0,5/0,1	12	12	100
		1/0,1	12	10	83,3
	ANA/BAP	0,5/0,5	12	12	100
		0,5/0,1	12	8	63,6
		0,1/0,1	12	4	33,3
	ANA	2	12	9	100
5		12	12	75	

**Tableau 1 :** Effet de la variation du milieu de culture et des substances de croissance sur la germination des embryons après 4 jours de culture.



**Photo 3a:** Développement de cals à la base des pointes d'embryons cultivées sur milieu contenant l'ANA seul (2-5 mg.L<sup>-1</sup>).



**Photo1:** Développement de la pointe de l'embryon en plantule.



**Photo 3b:** Développement de cals à la base des plantules issus de pointes d'embryons.

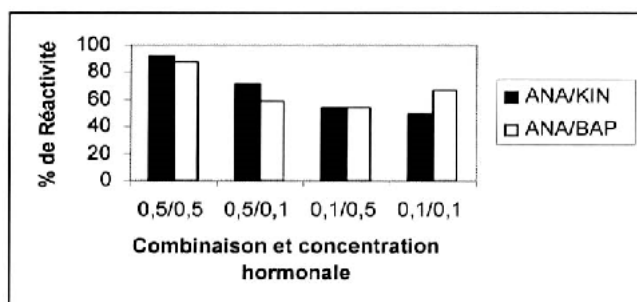
On note la formation de cals sur les milieux contenant de l'ANA seul, qui se développent à la base ou au sommet de l'embryon (photos 3a et 3b).

Les travaux analogues de Khélifi [13,14] sur l'Arganier de provenance de Tindouf ont montré que la germination est fortement améliorée en cultivant directement l'embryon entier excisé sur un milieu KNOP.

### Microbouturage

Les microboutures mises en culture appartiennent aux deux provenances: les microboutures de Mostaganem sont prélevées sur les pousses obtenues *in vitro* à partir des embryons isolés, alors que les microboutures de Tindouf sont prélevés sur des plants se développant en pépinière.

L'étude de la combinaison et des concentrations hormonales pour le développement des microboutures a montré que ANA/KIN et ANA/BAP aux concentrations de 0.5/0.5 mg.L<sup>-1</sup> réagissent plus favorablement (Fig. 2).



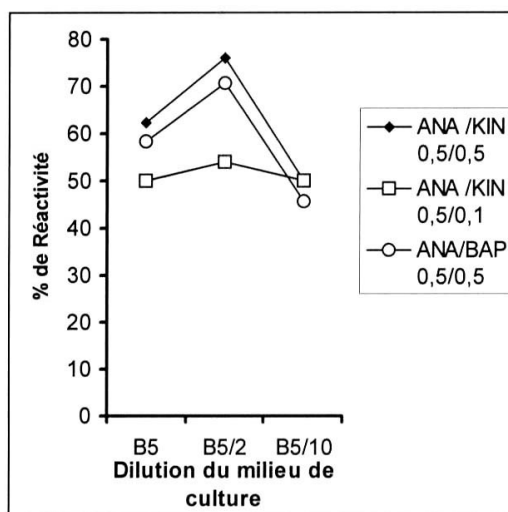
**Figure 2:** Variation du pourcentage de réactivité des microboutures de la provenance de Tindouf en fonction des combinaisons et concentrations hormonales.

Les microboutures des deux provenances réagissent plus rapidement sur milieu B5/2 en présence d'ANA/BAP (0,5/0,5) avec un taux de développement plus important (Fig. 3 et 4). L'analyse de la croissance des pousses a été faite en mesurant leur longueur après environ un mois de culture. Les jeunes pousses obtenues sur le milieu B5/2 avec les concentrations hormonales ANA/KIN (0.5/0.5 mg.L<sup>-1</sup>) présentent une longueur plus importante que celles des pousses obtenues avec les autres traitements (Fig. 5). Il apparaît donc que la concentration ionique réduite de moitié du milieu B5 est plus favorable à la croissance des pousses.

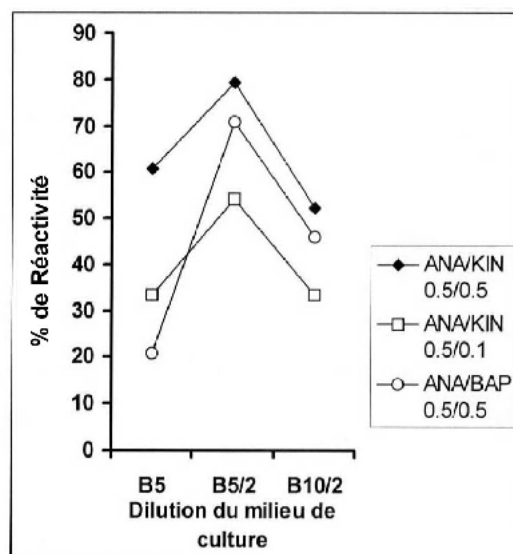
Plusieurs auteurs ont souligné l'effet kinétine sur le développement des pousses. Yagoub-Bougdal [12] a montré que le développement des bourgeons d'olivier était plus important en présence de kinétine comparé à la BAP.

Des travaux de microbouturage *in vitro* d'Arganier ont permis de montrer que le milieu MS dilué était également plus favorable à la croissance [14] et que la BAP avait une action très marquée sur le développement des bourgeons axillaires.

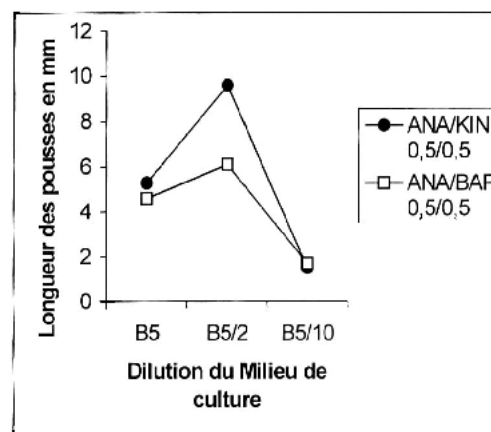
Après 4 à 5 semaines, tous les plants développent des cals à la base de la bouture lorsqu'ils sont placés en milieu rhizogène contenant de l'ANA à 2-5 mg.L<sup>-1</sup> (photo 4 : provenance de Tindouf et 05 : provenance de Mostaganem). A partir de ces cals se développent des ébauches racinaires, qui n'évolueront pas et finissent par mourir, même après deux à trois repiquages successifs. Il apparaît, cependant, que la provenance de Tindouf est potentiellement plus apte à la rhizogénèse que la provenance de Mostaganem (Photo 6). Cette aptitude à la rhizogénèse a été déjà évoquée par Nouaim *et al.* [10, 9], comme étant spécifique à chaque clone lorsqu'ils ont étudié la micropropagation *in vitro* des différents clones du Maroc. L'ANA est considéré comme étant la plus favorable pour la rhizogénèse adventive.



**Figure 3:** Variation du % de réactivité des microboutures de la provenance de Mostaganem en fonction du milieu de culture.



**Figure 4:** Variation du % de réactivité des microboutures de la provenance de Tindouf en fonction du milieu de culture.



**Figure 5:** Variation de longueur des pousses issues des microboutures de la provenance de Tindouf en fonction de la dilution du milieu de culture et les différentes combinaisons hormonales, après 30 jours de culture.



**Photo 4:** Culture de microboutures d'arganier de provenance de Tindouf.



**Photo 5:** Culture de microboutures d'arganier de provenance de Mostaganem.



**Photo 6:** Développement de racines adventives sur bouture d'arganier de provenance de Tindouf.

### Acclimatation des plants

Les vitroplants obtenus après 45 à 60 jours sont transférés en pots sur tourbe désinfectée et sont placés dans des mini-serres à l'intérieur desquelles l'humidité de l'air est maintenue à saturation afin d'éviter leur dessèchement.

Après plus de 2 mois d'acclimatation, les plants n'ont pas évolué. Bien que cette étape d'acclimatation soit délicate, le problème de reprise de l'arganier est plutôt lié aux conditions édapho-symbiotiques auxquelles il est adapté et qu'il ne trouve pas dans notre expérimentation. La difficulté de reprise des plants d'arganier a été observée même chez les plants obtenus par semis. Ce problème rencontré également par Nouaïm [10] lors de ses travaux sur la multiplication des clones du Maroc peut éventuellement avoir une explication à sa grande exigence en matière de mycorhizes. Nouaïm et Chaussod [7] ont montré dans leurs travaux que l'arganier porte des endomycorhizes à arbuscules. Plus tard, on a montré qu'il est très dépendant de cette symbiose mycorhizienne [8,9,10].

### CONCLUSION

Il est possible d'améliorer la germination des graines et d'obtenir des plants d'arganier parfaitement décontaminés

en cultivant directement des embryons ou parties d'embryons isolés de graines. Il reste cependant à optimiser les milieux de culture en essayant de diminuer au mieux les charges trop élevées de la technique.

Il est aussi possible de bouturer des vitroplants d'arganier algérien et de pouvoir ainsi les multiplier en plusieurs exemplaires si les problèmes d'enracinement et de reprise en plein champ étaient résolus.

Ces techniques de culture se poursuivent dans notre laboratoire grâce à un financement PNR/ANDRU piloté par le CDTA, dont l'objectif est l'amélioration de la production de plants maraîchers et arboricoles par les techniques de culture de tissus.

### REFERENCES

- [1]- Boudy P., "Description forestière du Maroc", Ed. Larousse, Paris, (1958), 366 p.
- [2]- Pelletier J.P., "Les séries de l'Arganeraie steppique dans le sous Maroc", *Ecologia mediterranea*, 9, (1983); pp. 77- 88.
- [3]- El Mazzoudi H. et Errafia M., "Contribution à l'étude de la germination des noix d'argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) par des traitements chimiques", *Annales de la recherche forestière au Maroc*, 17, (1977), pp. 59-66.
- [4]- Nouaïm R., "La biologie de l'Arganier", In: Colloque International "L'Arganier, recherches et perspectives", Agadir (Maroc), 11-15 mars (1991).
- [5]- Chaussod R. et Nouaïm R. "Avantages et inconvénients des différents modes de multiplication de l'arganier", In: Journées de l'Arbre, Marrakech, Avril (1994), 4 p.
- [6]- Nouaïm R., Mangin G., Mussillon P. et Chaussod R. "Multiplication de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeel) par semis de graines, bouturage et culture *in-vitro*", Soumis à *Annales des Sciences Forestières au Maroc* (1995).
- [7]- Nouaïm R. et Chaussod R., "Les mycorhizes de l'Arganier", In: Colloque International "L'Arganier, recherches et perspectives", Agadir (Maroc), 11-15 mars (1991).
- [8]- Nouaïm R. et Chaussod R., "Apport de la mycorrhization pour la croissance et le développement de l'arganier", In: Journées de l'Arbre, Marrakech, Avril (1994), 4p.
- [9]- Nouaïm R., Lineres M., Esvan J.M. and Chaussod R., "Mycorrhizal dependency of two clones of micropropagated Argan tree (*Argania spinosa*): II) Mineral nutrition", *Agroforestry Systems*, 27, (1994), pp. 67-77.
- [10]- Nouaïm R., Mangin G. et Chaussod R., "*In-vitro* propagation of the Argan tree (*Argania spinosa*) and V.A. Mycorrhization", In: Joint meeting COST 87 & COST 8.10 on "Micropropagation, root regeneration and mycorrhizas", Dijon (France), 20-23 May (1992.)
- [11]- Gamborg O.L., Miller R.A., et Ojima K., "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells", *Exp. cell. Res.*, 50, (1968), pp. 151-158.
- [12]- Yacoub-Bougdal S., Hamlat M. et Bonaly J., "Potentialités organogènes des embryons d'olivier (*Olea europea* L., var. Chemlal) cultivés *in vitro*", *Sciences et technologie*, Univ. Mentouri, n°9, (1998), pp. 89-92.
- [13]- Khelifi L., Morsli A., et Khelifi-Slaoui M., "Premiers résultats sur l'obtention *in vitro* de germination d'Arganier *Argania spinosa* (L.) Skeel", *Annales Agronomiques INA*, vol 17, n° 1et 2, (1996). pp. 120-126.
- [14]- Khelifi L., Slaoui M. et Morsli A., "Mise au point d'une méthode de micropropagation pour l'arganier (*Argania spinosa* Skeels). Conférence sur l'utilisation des biotechnologies dans le domaine agricole", S'Fax, organisée par l'Union des conseils scientifiques de la recherche des pays arabes, Tunisie, 5-7 avril (1999). □

