

## REPONSE A LA CULTURE *IN VITRO* DE TROIS VARIETES DE L'OLIVIER (*Olea europaea* L.)

Reçu le 10/11/2005 - Accepté le 03/05/2007

### Résumé

L'expérimentation entreprise dans le Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (LGBBV) de la Faculté des Sciences de l'Université Mentouri (Constantine) avait pour objectif l'étude de la réponse de trois variétés d'olivier (*Olea europaea* L.) à deux milieux de base de la culture *in vitro* additionné de différentes concentrations hormonales. Les boutures des variétés Chemlal, Sigoise et Grosse de Hama ont été collectées de la Ferme Pilote Erkani sise à Hama Bouziane. Après asepsie complète, des micro-boutures de 1 cm de long portant des bourgeons axillaires sont ensemencées sur milieux MS et B5 additionnés des régulateurs de croissance. Le milieu B5 s'est révélé le plus intéressant pour la multiplication *in vitro* des variétés étudiées. Sur la base du suivi de l'émission foliaire, la croissance en hauteur et l'accumulation de la matière fraîche des explants, Chemlal réagit nettement mieux à la conduite *in vitro*. La rhizogenèse a été induite après formation de cals chez Chemlal sur milieu MS dilué de moitié (MS/2) additionné de 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de Kinétine + 0.5 mg.l<sup>-1</sup> d'ANA et sur milieu B5 additionné de 0.4 mg.l<sup>-1</sup> de BAP + 1.33 mg.l<sup>-1</sup> d'AIB, et chez Sigoise sur milieu (MS/2) additionné de 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de Kinitine + 1 mg.l<sup>-1</sup> d'ANA. Les pousses feuillées enracinées de ces deux variétés ont subi la phase d'acclimatation avec succès et se sont adaptées à la croissance sous serre.

**Mots clés** – *Olea europaea* L. – culture *in vitro* – milieu de base - régulateurs de croissance.

### Abstract

The experiment conducted in the Laboratory of Genetic, Biochemistry and plant Biotechnology (LGBBV), Faculty of Sciences, Mentouri University (Constantine) aimed to study the response of three olive cultivars (*Olea europaea* L.) response to two basic tissue culture media complemented with different concentrations of growth regulators. Cuttings of Chemlal, Sigoise and Grosse de Hama cultivars were collected from the Erkani Pilot Farm located at Hama Bouziane. Under complete aseptic conditions explants 1cm long holding lateral buds were subcultured in MS and B5 media complemented with growth regulators. B5 medium emerged as the best for tissue culture of the studied cultivars. Based on leaf proliferation, stem extension and accumulated fresh matter measurements, Chemlal showed a good response to *in vitro* culture. Root proliferation was induced after callus formation for Chemlal in the 1/2 diluted MS medium complemented with 0.5 mg.l<sup>-1</sup> Kinetine + 0.5 mg.l<sup>-1</sup> ANA and in B5 medium complemented with 0.4 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 1.33 mg.l<sup>-1</sup> AIB. And for Sigoise in the 1/2 diluted MS medium complemented with 0.5mg.l<sup>-1</sup> Kinetine + 1 mg.l<sup>-1</sup> ANA. Leafed and rooted explants from the two cultivars have passed successfully the acclimation phase and fully adapted to grow under glasshouse conditions.

**Key words** : *Olea europaea* L. – *in vitro* culture – Basic medium – growth regulators.

L. BENDERRADJI<sup>1</sup>  
H. BOUZERZOUR<sup>2</sup>  
N. YKHLEF<sup>1</sup>  
A. DJEKOUN<sup>1</sup>  
K. KELLOU<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LGBBV Faculté SNV. Université Mentouri Constantine. Algérie.

<sup>2</sup> Dépt. Biologie. Faculté Sciences. Université Ferhat Abbas. Sétif. Algérie.

### ملخص

تزايدت أهمية زراعة الأنسجة في الزجاج ، قبل عدة سنوات ، فبواسطة هذه التقنية يمكن إنتاج النباتات التي تتكاثر خضريا بسرعة ، وتكمن الأهمية الكبرى لهذه الطريقة المستحدثة في تكاثر النباتات ، أنها تتم في ظروف معقمة، كما أنها تتيح إمكانية إبقاء هذه النباتات في شكل مصغر ( في أنابيب زجاجية ) . فبغرض التحكم أكثر في هذه التقنية واستعمالاتها لإكثار النباتات وخاصة الأشجار المثمرة ذات الأهمية الاقتصادية الكبرى كما هو الحال عند نبات الزيتون ، قمنا بأخذ فسائل من شتائل أم للزيتون (*Olea europaea* L.) تنتمي لعدة أصناف هي : شمال ، سيقواز ، قلب الثور. من مناطق مختلفة من الأغصان بحيث تم تقطيعها إلى فسيالات دقيقة بطول 1 سم . زرعت هذه الفسيالات في وسطين غذائيين أساسيين هما : MS و B5 ، وذلك بهدف تحديد الوسط الغذائي الأمثل للنمو . إن استعمال منظمات النمو أو ما يطلق عليها اسم الهرمونات النباتية (السيبتوكينات و الأوكسينات) بتركيز مختلفة ، يهدف إلى تحديد التوازن الهرموني الأمثل والأحسن للنمو . إن الحصول على كالوسات و نباتات مورقة تم بالنسبة للأصناف الثلاثة المدروسة. بينما بروز الجذور كان عند الصنفين شمال و سيقواز باستعمال الوسط الغذائي MS/2 (MS مخفف إلى النصف) مع 0.5 ملغ.ل<sup>-1</sup> kiné + 0.5 ملغ.ل<sup>-1</sup> ANA و الوسط B5 مع 0.4 ملغ.ل<sup>-1</sup> BAP + 1.33 ملغ.ل<sup>-1</sup> AIB بالنسبة للصنف شمال و الوسط MS/2 مع 0.5 ملغ.ل<sup>-1</sup> kiné + 1 ملغ.ل<sup>-1</sup> ANA بالنسبة للصنف سيقواز.

**كلمات مفتاحية** : الزيتون (*Olea europaea* L.)، زراعة الأنسجة في الزجاج، وسط غذائي، سيبتوكينات، أوكسينات.

L'olivier constitue à l'échelle nationale une des principales essences fruitières. Le verger oléicole occupe 164.10<sup>3</sup> ha et produit près de 20.10<sup>3</sup> tonnes d'huile. La consommation moyenne nationale est de 13 kg/hab./an dont 12 kg sous forme de graines et 1 kg sous forme d'huile. L'oléiculture procure 11 millions de journées de travail, soit l'équivalent de 55 000 emplois permanents [1]. Le profil variétal est constitué essentiellement de deux variétés très répandues Chemlal et Sigoise. Cette faible diversité variétale contraste avec celle des milieux de production. Il existe des variétés populations très rustiques et très adaptées aux conditions pédo-climatiques de leur milieu d'implantation mais qui ne sont pas multipliées.

Une prise de conscience s'est opérée récemment à ce sujet pour améliorer la conduite du verger, réfléchir à son extension et sur des terres où l'intensification de la production est possible. Ce regain d'intérêt pour l'arboriculture, d'une manière générale et pour l'oléiculture de façon particulière, risque d'être remis en cause par manque de plants sains, issus de variétés adaptées et productives. Les nouvelles techniques de reproduction ou de multiplication, si elles sont maîtrisées peuvent rendre de grands services dans ce domaine.

Le micro bouturage permet de multiplier des espèces difficiles à reproduire naturellement, avoir des vitro plants facilement transportables sans risques sanitaires et reboiser très rapidement avec une diminution du coût de production.

La présente étude est une contribution à la maîtrise de la culture *in vitro* pour l'amélioration agronomique de l'olivier (*Olea europaea* L.), et d'étudier l'influence de plusieurs facteurs dont la composition minérale (Bartolini et al. 1989) [2], Berenguer et al. 1989) [3] et hormonale (Leva et al. 1992) [4] des milieux de culture, le génotype (Leva et al. 1992) [4] (Rugini et al. 1984) [5] et l'âge de l'explant (Porlongis et al. 1976) [6], Rugini, 1986) [7]

### Matériel et méthodes

L'étude a été menée dans le Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (LGBBV) de l'Université Mentouri, Constantine, le protocole expérimental mis en place est constitué de trois facteurs dans un dispositif en bloc avec trois répétitions, à savoir, la variété avec trois modalités (Chemlal, Sigoise et Gosse de Hama), le milieu de culture avec deux modalités (Murashigue et Skoog "MS" et Gamborg" B5") et les concentrations hormonales avec 5 modalités codées de C1 à

(FII), l'estimation de la croissance en hauteur (Ht, mm) de l'explant, faite à l'aide d'une réglette millimétrée, mesures prises de l'extérieur du tube ensemencé et la matière fraîche (MF) accumulée par l'explant qui est déterminée par la formule suivante:

$$MF = PF_{75} - PF_0, \text{ d'où}$$

MF = matière fraîche de l'explant (g),  
 PF<sub>75</sub> = poids frais de l'explant après (75) jours de l'ensemencement (g)  
 PF<sub>0</sub> = poids frais de l'explant au début de l'ensemencement (g)

L'origine du matériel végétal est la Ferme Pilote Erkani de l'ITAF (Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière) située à Hama Bouziane (Constantine) où des boutures longues de 25 cm ont été collectées au mois de juillet, elles sont prélevées des régions médianes des rameaux des pieds-mères et portent plusieurs bourgeons axillaires. Les extrémités des boutures ont été obturées avec de la paraffine avant de les transporter au laboratoire où elles ont été essuyées avec du Cotton imbibé de Tween 20 et lavées pendant quelques minutes sous l'eau courante puis trois fois avec de l'hypochlorite de sodium 6 % pendant cinq minutes chaque fois avant d'être rincées abondamment à l'eau distillée stérile (Najiba. B et al.) [8]. Après chaque lavage, on rince avec de l'eau distillée pour assurer une meilleure désinfection, les boutures sont ensuite passées rapidement dans l'alcool à 70° et stockées sous la hotte pour une découpe en micro-boutures de 2 cm de long portant chacune deux bourgeons axillaires

L'ensemencement des explants est fait sous conditions d'asepsie. Les microboutures, mises dans une boîte de pétri contenant une solution filtrée d'antioxydant, sont élaguées de leurs extrémités noircies. Cette opération est réalisée sous bec bunsen dans les tubes de cultures contenant chacun 10 ml de milieu de base. Les tubes sont mis en place dans une chambre de culture à une température variant entre 22 et 25C°, une photopériode de 16heures sous une intensité lumineuse de 60 μ Mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

Les explants qui présentent un bon développement végétatif sur milieu de culture sont acclimatés avant leur transfert sous serre vitrée. Ces explants sont transplantés dans un sol reconstitué de sable, de tourbe et de terre à part égale (1:1:1 volume). Le substrat sol reconstitué est stérilisé dans une étuve portée à 200°C pendant 30 minutes.

**Tableau 1** : Les concentrations en Kinétine et AIB codées de C1 à C5 additionnées au milieu de culture MS et B5

Milieu	Code	Kinétine (mg.l <sup>-1</sup> )	AIB (mg.l <sup>-1</sup> )	Milieu	Code	Kinétine (mg.l <sup>-1</sup> )	AIB (mg.l <sup>-1</sup> )
MS	C1	5	1	B5	C1	1	0.25
	C2	4	2		C2	2	1
	C3	3	3		C3	3	2
	C4	2	4		C4	4	3
	C5	1	5		C5	5	4

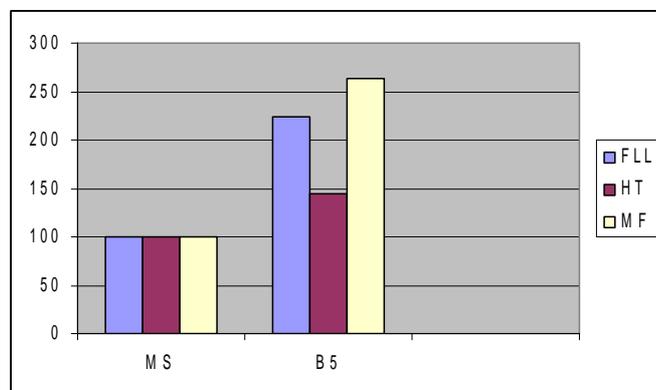
sol reconstitué est faite sous hotte. L'explant est retiré de son tube avec une pince stérilisée. On lave les racines avec de l'eau distillée stérilisée, et on élague les feuilles les plus âgées. On mouille le substrat sol avec de l'eau stérilisée et on transplante l'explant dans le pot. On irrigue avec une solution nutritive constituée de 5 ml de macro plus 2.5 micro-éléments dans 200 ml d'eau distillée. Les pots, ainsi traités, sont mis sous un dessiccateur nettoyé à l'eau de Javel, et remis dans la chambre de culture. Le transfert des explants dans des pots de dimensions plus grandes est fait 3 semaines plus tard. Après ce temps, on retire le dessiccateur pour les laisser à l'air ambiant de la salle de culture pendant trois autres semaines au bout desquelles les explants sont transférés sous serre et irrigués avec l'eau ordinaire.

## Résultats et discussion

Effet milieu, variété et combinaison hormonale sur l'expression de l'explant

Globalement il y a eu un bon développement de tous les explants ensemencés avec un taux de contamination qui est resté dans les limites acceptables, variant entre 6.6 et 20%. A titre de comparaison Sadler [9] rapporte des taux de contamination allant jusqu'à 45% en culture *in vitro* de l'olivier. Ignorant l'effet variété, le milieu B5 se révèle comme étant celui qui satisfait le plus la demande nutritionnelle des explants ensemencés. Il convient mieux à l'initiation foliaire, au développement en hauteur et à l'accumulation de la matière fraîche des explants (Tableau 2)

L'augmentation relative permise par le milieu B5 comparativement au milieu MS, est de 223.3% pour l'émission des feuilles, 143.9% pour l'expression de la hauteur et 263.8% pour la matière fraîche accumulée par les micro-boutures au bout de 75 jours après ensemencement (Figure 1)



**Figure 1:** Effet de la nature du milieu sur l'expression des variables mesurées sur les micro boutures (valeurs du MS prises comme indice 100).

Les variétés ne diffèrent pas significativement pour les variables feuillage et hauteur des explants (Tableau 2). Ignorant l'effet milieu de base, la variété Chemlal se démarque, par contre, par une meilleure capacité intrinsèque de production de la matière fraîche comparativement à la variété Sigoise alors que Grosse de Hama est intermédiaire pour cette caractéristique.

**Tableau 2 :** Moyennes du nombre de feuilles (fll), de la hauteur (ht) et de la matière fraîche (mf) des explants exprimés au cours de l'expérience, sous l'effet des différents traitements.

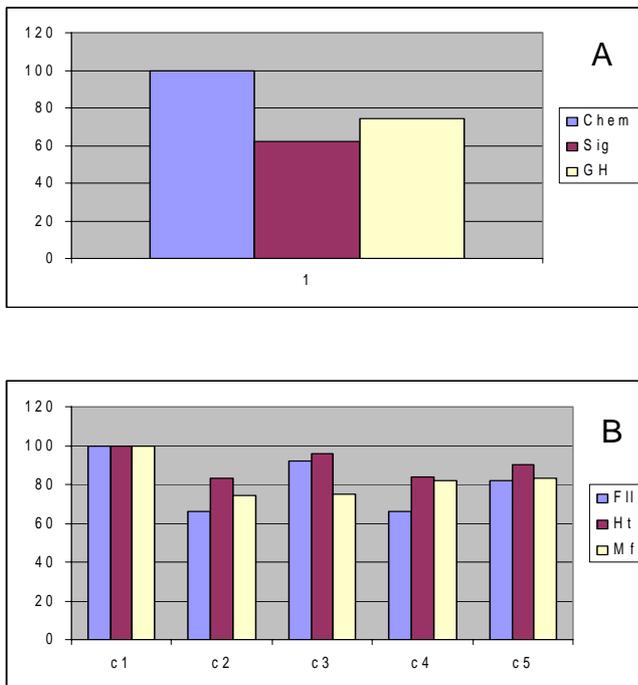
Facteurs	Variables mesurées		
	Fll	Ht	Mf
Effet moyen milieu			
MS	6.04 <sup>b</sup>	12.52 <sup>b</sup>	125.34 <sup>b</sup>
B5	13.49 <sup>a</sup>	18.02 <sup>a</sup>	330.75 <sup>a</sup>
Effet moyen variété			
Chemlal	9.93 <sup>a</sup>	16.40 <sup>a</sup>	291.26 <sup>a</sup>
Sigoise	10.47 <sup>a</sup>	14.77 <sup>a</sup>	180.36 <sup>c</sup>
G. de H	8.90 <sup>a</sup>	14.80 <sup>a</sup>	214.02 <sup>b</sup>
Effet moyen hormone			
C1	12.06 <sup>a</sup>	16.89 <sup>a</sup>	276.13 <sup>a</sup>
C2	8.06 <sup>b</sup>	14.00 <sup>b</sup>	204.06 <sup>c</sup>
C3	11.00 <sup>a</sup>	16.22 <sup>a</sup>	207.59 <sup>c</sup>
C4	7.89 <sup>c</sup>	14.28 <sup>b</sup>	225.83 <sup>b</sup>
C5	9.83 <sup>b</sup>	15.22 <sup>b</sup>	229.14 <sup>b</sup>

\*\* Moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes significativement selon le test NK'S

Sigoise a une forte capacité d'accumulation de la matière fraîche équivalente 62% celle de Chemlal et Grosse de Hama a un équivalent de 73.5% (Tableau 2, Figure2)

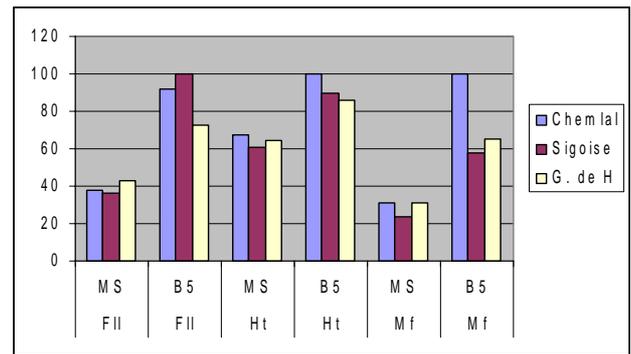
Les différentes combinaisons de kinétine+AIB affectent différemment les caractères mesurés. La combinaison C1 (1 mg.L<sup>-1</sup> Kin + 0.25 mg.L<sup>-1</sup> AIB) est, en moyenne des effets variété et milieu de base, favorable à l'expression des variables mesurées. La combinaison C2 est défavorable à l'expression du feuillage au même titre que la C4, alors que la C3 vient en seconde position pour l'expression du feuillage et de l'élongation en hauteur des micro- boutures (Tableau 1, Figure 2.b). Certaines combinaisons ont un effet spécifique.

Les combinaisons C3 et C5 favorisent nettement mieux l'expression du feuillage sur milieu MS. La combinaison C3 est plus avantageuse à l'expression de la hauteur des explants sur milieu MS. Alors que les combinaisons C4 et C5 le sont pour la matière fraîche sur B5 et MS respectivement (Figure 2, B).



**Figure 2 :** (A et B) : Effet variété et combinaison hormonale sur l'accumulation de la matière fraîche sur les trois variables mesurées (valeur en % du maximum observé par variable).

Chemlal et Grosse de Hama émettent plus de feuilles que la Sigoise sur milieu B5 (Figure 3), les microboutures de Chemlal sont plus hautes que celle de Sigoise et Grosse de Hama sur milieu B5. Sur milieu MS, par contre, l'ordre est, Grosse de Hama, chemlal et puis Sigoise (Figure3) Pour la matière fraîche accumulée, la chemlal accumule plus sur milieu B5, suivie de grosse de hamma et puis Sigoise. Sur milieu MS, c'est Grosse de Hama qui est plus apte à accumuler plus de matière fraîche suivie de Chemlal et enfin de Sigoise (Figure 3)

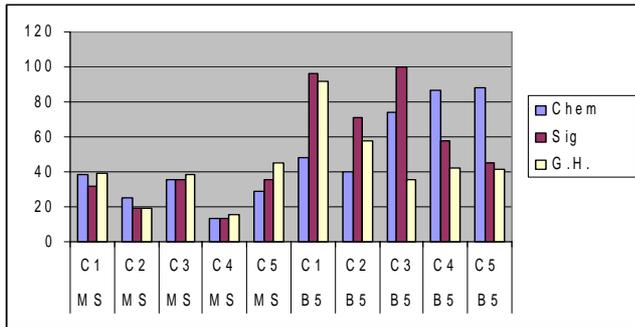


**Figure 3 :** Variation des valeurs moyennes des trois variables mesurées en fonction de la variété et la nature du milieu de culture (valeurs en % du maximum observé par variable).

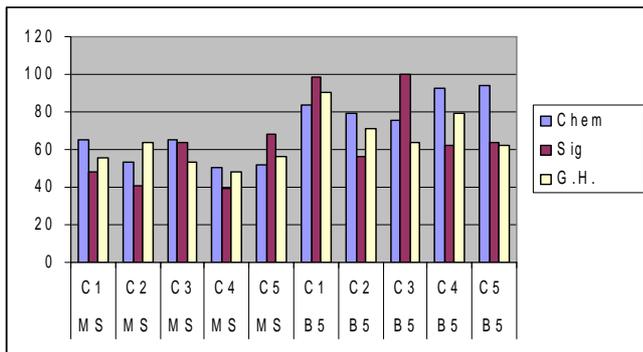
Ces résultats indiquent que globalement le milieu B5 est plus approprié pour la culture *in vitro* de l'olivier. Cependant des différences très marquées apparaissent entre les variétés selon la variable mesurée pour évaluer la réponse des micro-boutures. Ainsi si la réponse des micro-boutures est évaluée de par l'émission foliaire, la combinaison la plus intéressante est Chemlal cultivée sur milieu B5. Cette combinaison est suivie par la Sigoise sur milieu B5. Par contre si l'évaluation est faite sur la matière fraîche accumulée, la combinaison la plus intéressante est la chemlal sur milieu B5. (Figure3)

L'interaction des trois facteurs indique que la variété Chemlal produit plus de feuillage sur milieu B5 additionné de la combinaison hormonale C4 ou C5. La Sigoise montre un meilleur comportement sur milieu B5 mais additionné des combinaisons hormonales C1 ou C3. Grosse de Hama, produit des feuilles plus longues sur milieu B5 auquel on ajoute les combinaisons hormonales C1 et C3 (Figure 4, a). Pour la variable croissance en hauteur des micro-boutures, la variété Chemlal présente une meilleure expression sur le milieu B5 additionné de la combinaison hormonale C4 ou C5. La Sigoise accroît plus vite et mieux sur milieu B5 plus la combinaison hormonale C1 et aussi C3. Pour la variété Grosse de Hama, la meilleure hauteur est observée sur le milieu B5 additionné des combinaisons hormonales C1 ou C4 (Figure 4, b)

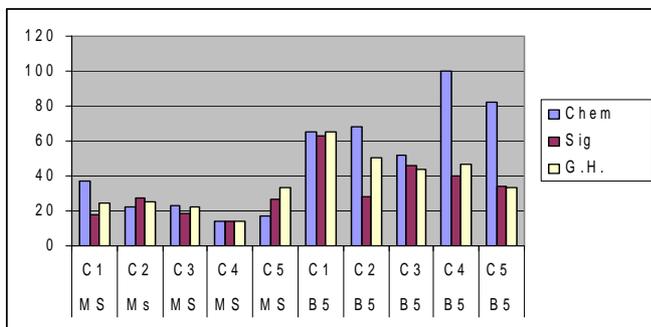
Chemlal produit plus de matière fraîche sur milieu B5 plus la combinaison hormonale C4 et C5. La Sigoise fait mieux sur milieu B5 additionné de la combinaison hormonale C1. Grosse de Hama s'accommode mieux au milieu B5 plus la combinaison hormonale C1 (Figure4, c). Ces résultats indiquent qu'en ce qui concerne la partie aérienne, le milieu le plus intéressant pour la multiplication *in vitro* de l'olivier représenté par trois variétés très différentes est le B5.



**Figure 4a:** Variation du feuillage des explants en fonction des variétés, milieux et combinaisons hormonales



**Figure 4b:** Variation de la hauteur en fonction des variétés, milieux et combinaisons Hormonales



**Figure 4c:** Variation de la matière fraîche accumulée en fonction des variétés, milieux et combinaisons hormonales.

Ces résultats sont conformes à ceux rapportés dans la littérature pour ce qui est des réponses différentes des variétés au type de milieu de culture et aux hormones. Rokba *et al.* [10] rapportent des réponses variétales très différentes aux milieux de culture utilisés ainsi qu'aux différentes concentrations des hormones. Ils mentionnent que la variabilité des réponses des variétés est aussi liée au stade végétatif de récolte des boutures à ensemercer.

Dans la présente étude le matériel végétal collecté au cours de la période qui s'étend de juin à août répondait le mieux à la conduite *in vitro*. Ceci s'explique par le fait qu'en été les oliviers sont en pleine période de croissance active. Les tissus végétaux collectés au cours de cette période contiennent plus de réserves facilement utilisables

et que mettent à profit les bourgeons pour se développer, une fois mis dans les conditions adéquates comme celles qu'ils trouvent *in vitro*. Sadler [2] rapporte aussi des différences de comportement des microboutures issues de différentes parties de la plante. Il explique le bon comportement des boutures issues de la collecte de l'été par le fait qu'elles contiennent plus de réserves nutritives qui permettent aux explants de s'adapter peu à peu aux conditions de la culture *in vitro*.

### Induction racinaire et acclimatation

Une fois la relation entre le type de milieu, la variété et la combinaison hormonale est précisée pour le développement des pousses feuillées des micro boutures, l'induction racinaire a été recherchée pour assurer le transfert des plantules en plein champs, après leur acclimatation progressive dans la chambre de culture puis sous serre. Le développement racinaire a été induit chez la variété Chemlal sur milieu MS/2 additionné de 0.5 mg.l<sup>-1</sup> Kiné+ 0.5 mg.l<sup>-1</sup> d'ANA et aussi sur milieu B5 additionné de 0.4 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 1.33 mg.l<sup>-1</sup> AIB et chez la variété Sigoise sur le milieu MS/2 additionné de 0.5 mg.l<sup>-1</sup> Kiné +1mg.l<sup>-1</sup> ANA.

La dilution de moitié du milieu MS est souvent avantageuse pour induire la formation des racines. En effet selon Kulchetschi *et al.* [11], Un faible concentration ionique du milieu de base stimule mieux la formation des bourgeons et la prolifération des tiges chez l'explant. Elle conduit aussi à une plus grande capacité de formation des racines chez les tiges (rootable explants). Une faible prolifération racinaire peut avoir comme origine, la production par l'explant ; ou la présence dans le milieu de base, des substances chimiques inhibitrices de la morphogenèse. Ce phénomène est réduit par ajout du charbon actif qui exerce son effet par l'absorption des substances toxiques produites et rejetées par l'explant dans le milieu.

La production de telles substances a été démontrée dans la culture *in vitro* de *Allium* et *Daucus* [12]. Un second effet est que le charbon absorbe les substances nocives associées aux minéraux entrant dans la composition du milieu.

Sanchez *et al.* [13] rapportent que l'ajout du charbon actif était bénéfique pour le développement du système racinaire et de l'organogenèse. L'effet du charbon est similaire à celui de l'obscurité car ce dernier noircit le milieu. Les effets stimulateurs du charbon actif, en culture *in vitro*, ont été rapportés par Rugini *et al.* [14] pour l'olivier et par Rugini *et al.* [15] pour l'amandier et le noyer. Saborio *et al.* [16] mentionnent que la concentration de l'azote dans le milieu est un autre facteur qui peut être à l'origine des différences de prolifération de la morphogenèse des explants ensemençés dans différents milieux. Le rapport entre les différents éléments intervient aussi comme facteurs pouvant promouvoir ou réduire la réponse de l'organogenèse. La formation des cals est un préalable à l'induction de la rhizogenèse. Les racines sont,

en effet, développées uniquement chez la variété Chemlal et Sigoise où la caulogénèse s'est initiée. La nécessité du passage par la phase de caulogénèse pour avoir un développement racinaire est mentionnée par Rama et Pontikis [17]. Sur blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Rashid et Quraishi [18] mentionnent que l'induction des cals est dépendante du génotype et qu'elle est favorisée par l'addition du 2,4-D au milieu basal. Ils rapportent aussi que la présence de l'IAA dirige la morphogénèse vers un excès de prolifération racinaire. Selon Bouharmont et Desseyrs [19], chez le riz (*Oriza sativa* L.), 1 mg.l<sup>-1</sup> d'AIA ajouté au milieu de base (LS), induit la rhizogénèse après une incubation de 10 jours à l'obscurité.

La variété Chemlal a développée des racines sur MS/2 additionné de 0.5 mg.l<sup>-1</sup> Kiné + 0.5 mg.l<sup>-1</sup> ANA. Le développement racinaire a été noté aussi pour la même variété sur milieu B5 additionné de 0.4 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 1.33 mg.l<sup>-1</sup> d'AIB. Sigoise développe des racines sur milieu B5 additionné de 0.5 mg.l<sup>-1</sup> Kiné + 1 mg.l<sup>-1</sup> ANA. Les explants des variétés Chemlal et Sigoise développant des racines, se sont facilement acclimatés et ont été transférés sous serre où leur croissance s'est maintenue.

## Conclusion

La réponse des variétés étudiées de par les mesures faites sur l'élongation foliaire, la croissance en hauteur et la matière fraîche accumulée par les explants indique que le milieu B5 est nettement meilleur comparativement au milieu MS pour l'expression des variables mesurées sur la partie feuillée des explants ensemencés. Sur ce même milieu les trois variétés diffèrent peu pour l'expression du feuillage et de la croissance en hauteur des microboutures mais elles diffèrent significativement pour la matière fraîche accumulée. Chemlal a la meilleure capacité d'accumulation de la matière fraîche. Les différentes combinaisons de l'association kinétine + AIB affectent différemment les variables mesurées. La combinaison 0.25 mg.l<sup>-1</sup> Kiné + 1 mg.l<sup>-1</sup> AIB est relativement plus favorable à l'expression des caractères étudiés. La rhizogénèse des variétés Chemlal et Sigoise a été initiée après caulogénèse induite par la kinétine et l'AIB. Les explants ayant développés des racines ont subi l'acclimatation avec succès et ont été transférés à la serre.

## REFERENCES

- [1]- MA. "Conférence nationale de la consultation sur l'agriculture". Document Technique du Ministère de l'Agriculture (1992), pp 192.
- [2]- Bartolini G., Leva AR., Bonelli A. "Advances *in vitro* culture of olive : propagation of CV. Maurino". *Acta Hort.* 286 (1989), pp 41-44.
- [3]- Berenguer B., Gonzalez G. "Ressources génétiques. Actes du séminaire international sur les innovations scientifiques et leur application en oleiculture et oleitechnie" Cité par cimmato 10-12 Mars (1999). Florence Italie : *Conseil international* (1989), pp1-30.
- [4]- Leva AR., Petrucci R. Goretti., Paniccuci M. "Ruolo di alcuni microelementi carboidrati nella proliferazione *in vitro* di CV Di olivo (*Olea europaea* L.), in Atti quattita olio extravergine di oliva", Firenze, 1-3 Décembre, (1992), p 333.
- [5]- Rugini E. " *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea* L.) Cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoot and embryo". *Sci Hort.* 24 (1984), pp 123-134.
- [6]- Porlongis IC., Theoris I., "Rooting response of juvenile and adult leafy olive cutting to various factors". *J.Hort.Sci.* 51(1) (1976), pp 31-39.
- [7]- Rugini E., "Olive (*Olea europaea* L.) In Bajaj YPS. (Ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*". Trees I Berlin, Springer-verlag, 5 (1986), pp253-267.
- [8]- Najiba B., Abdelhadi A., Dou Elmacane W L., Doha B. "Effet du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europaea* L.) CV.Picholine Marocaine". *Biotechnol.Agron.Soc.Environ*, 7 (3-4) (2003), pp 177-182.
- [9]- Sadder MT. " *In vitro* establishment of olive (*Olea europaea* L.) Using still liquid medium and callus culture". *Dirasat Agricultural Sciences*, 35 (2002), pp 19-24.
- [10]- Rokba ZA., Loxou VK., Lionakis SM. "Regeneration of olive (*Olea europaea* L.) *In vitro*." In *Proc first meeting on biotechnology*, Geisenheim, Germany (2000), pp 25-26.
- [11]- Kulchetschi L., Harry LS. Yeung EC., Thorpe TA. " *In vitro* regeneration of pacific silver fir (*Abies amabilis*) plantlets and histological analysis of shoot formation". *Tree physiology*, 15. (1995), pp 727-739.
- [12]- Grant NJ., Hammatt H. "Increasing root and shoot production during micropropagation of cherry and apple rootstocks: Effect of subculture frequency". *Tree physiology*, 19 (1999), pp 899-903.
- [13]- Sanchez MC., San-Jose MC., Ballester A., Vietz AM. "Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Quercus rubra* shoots derived from mature trees". *Tree physiology*, 16 (1996) pp 672- 680.
- [14]- Rugini E., Jacobini A., Bazzoffia A. "A simple *in vitro* method to avoid initial dark period and to increase rooting in fruit trees". *Acta Hort*, 227 (1988), pp 438-440.
- [15]- Rugini E., Jacobini A., Lappino M. "Role of basal darkening and exogenous putrescine treatments on *in vitro* rooting and on endogenous polyamine changes in difficult to root woody species". *Sci. Hort*, 51 (1993), pp 66-72.
- [16]- Saborio F., Dvorak W., Donahue JK., Thorpe TA. " *In vitro* regeneration of plantlets from mature embryos of *Pinus ayacahuite*". *Tree physiology*, 17 (1997), pp 787-796.
- [17]- Rama P., Pontikis C. " *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea* L.) Variety Kalamon". *Journal of Horticultural Science*, 65 (1990), pp 347 - 353.
- [18]- Rashid HA., Quarashi RJ. "High frequency embryogenic calls induction and its regeneration in three wheat cultivars". In *Review of advances in plant biotechnology Mujeeb Kazi and ED Smith editors, Cimmyt- Irri Editions* (1989), pp 205 – 215.
- [19]- Bouharmont JA, Dekeyser FD. " *In vitro* selection for cold and salt tolerance in rice". In *Review of advances in plant biotechnology Mujeeb Kazi and ED Smith editors, Cimmyt- Irri Editions* (1989), pp 307 - 313.