



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Hassiba Benbouali de Chlef
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Agronomiques et Biotechnologiques

THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

Filière : **Sciences agronomiques**

Par HADDAD Benalia

Thème :

**Amélioration de la micropropagation de plusieurs variétés d'olivier
Algériennes (*Olea Europaea* L.)**

Soutenue le 10/04/ 2019 devant le jury composé de :

- | | | |
|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| - Mr SETTI B. | Professeur | Président, UHB de Chlef |
| - Mr ADDA A. | Professeur | Examinateur, UIK de Tiaret |
| - Mr BOUDJENIBA M. | Professeur | Examinateur, ENS de kouba |
| - Mme CHAOUIA C. | Maître de Conférences | Examinatrice, USD de Blida |
| - Mme MEZIANE M. | Maître de Conférences | Examinatrice, UHB de Chlef |
| - Mr SAADI A. | Professeur | Directeur de Thèse, UHB de Chlef |
| - Mme CARRA A. | PHD | Codirectrice de Thèse, CNR Italie |

Résumé

L'olivier (*Olea europaea* L.) compte parmi les espèces fruitières les plus importantes dans la région méditerranéenne (Loumou et Giourga, 2003). Environ 98 % des oliviers mondiales sont concentrés dans cette région, produisant plus de 90 % de la production mondiale (FAO, 2008). En Algérie, l'olivier constitue par la superficie qu'il occupe, le principal groupe d'espèce fruitière (MADR, 2016). Sa culture a suscité ces dernières années un intérêt particulier grâce aux rôles multiples qu'elle joue à la fois sur le plan socio-économique, environnemental, et aussi sur le plan qualités sanitaires et nutritionnelles des huiles d'olive.

La présente étude consiste à tester les aptitudes de régénéralité *in vitro* de l'olivier (*Olea europaea* L.) via le microbouturage. Nous avons envisagé surtout lors de cette étude de parvenir à établir un protocole expérimental efficace permettant d'optimiser le taux de régénéralité via le microbouturage, en modulant trois principaux facteurs connus pour leurs influences sur ce processus morphogénétique à savoir : la composition du milieu de base, la composition hormonale des milieux et le génotype.

L'étude a été menée avec deux sous espèces d'olivier (*Olea europaea* L.) à savoir : la subsp *laperinei* (avec deux écotype, une diploïde et l'autre triploïde) et la subsp *sativa* (avec les variétés cultivées : Chemlal, Sigoise, Ferkani et Blanquette de Guelma).

Les résultats obtenus, relatifs à la micropropagation, sont très encourageants puisque nous sommes parvenus à trouver des milieux de culture très performants à la fois sur le développement des pousses mais aussi des racines. Le milieu MSM, comme milieu de base, s'est révélé très efficace surtout lorsqu'il est supplémenté de la ZEA (9,2 μ M). Les milieux $\frac{1}{2}$ MSM additionnés (5,4 μ M) d'ANA, comme source d'auxine, sont très favorables à l'enracinement des pousses régénérées des variétés autochtones de la sous espèce *sativa* et (4.8 μ M) d'AIB pour l'olive de Laperrine (61,7 %). En outre, les résultats nous ont permis aussi de mettre en évidence, un effet génotypique très prononcé sur le microbouturage. La variété Sigoise s'est montrée plus performante en enregistrant le meilleur taux d'enracinement (75,33 %) suivie de la variété Ferkani (70 %) puis la Chemlal (60,33 %) et en dernier la Blanquette de Guelma (60 %).

L'étude de la fidélité génétique testée par l'application des marqueurs ISSRs et la cytofluorométrie n'ont révélé aucune différence entre les plantes régénérées et leurs pieds mères correspondants.

Mots-clés : *Olea europaea* L., micropropagation, SSRs, ISSRs, olivier de Laperrine

ملخص

شجرة الزيتون (*Olea europaea* L.) هي واحدة من أهم أنواع الفاكهة في منطقة البحر الأبيض المتوسط (Loumou et Giourga, 2003) تتركز حوالي 98% من أشجار الزيتون في هذه المنطقة، وتنتج أكثر من 90% من الإنتاج العالمي (FAO, 2008) في الجزائر، شجرة الزيتون هي المجموعة الرئيسية (MADR, 2016) في السنوات الأخيرة، وهو مزيج من العوامل الاجتماعية والاقتصادية والبيئية، وكذلك من الصفات الصحية والغذائية لزيتون الزيتون.

تتكون الدراسة الحالية من اختبار التجديد المعتمد لشجرة الزيتون (*Olea europaea* L.) عن طريق microbouturage. في هذه الدراسة، حاولنا بالفعل وضع بروتوكول فعال لتحسين التجديد عن طريق العقل الجزئي، من خلال تعديل ثلاثة عوامل رئيسية معروفة لتأثيرها على هذه العملية المورفولوجية، وهي: تكوين وسط القاعدة، التكوين الهرموني للوسط الغذائي والنمط الجيني.

أجريت الدراسة باستخدام نوعين من الزيتون هما: (*Olea europaea* L. subsp *laperinei*) مع اثنين من الأنماط البرية (*subsp laperinei*)، و احد diploid والآخر triploid مع الأصناف المزروعة: شمال، سيجواز، فركاني، بلونكات قالمة.

النتائج التي تم الحصول عليها، بالنسبة إلى التكاثر الدقيق، مهمة جداً، لأننا استطعنا إيجاد أوساط غذائية للنمو فعالة للغاية حيث أن وسط MSM كان فعال جداً خاصة عندما تم الإضافة له ($9.2 \mu\text{M}$) ZEA وذلك بالنسبة لمرحلة الانبات والنمو الخضري أوساط النمو $\frac{1}{2}$ MSM مشبعة ($5.4 \mu\text{M}$) من ANA، وكالمصدر هرمون تجذير لتجذير الأصناف المحلية، و AIB ($4.8 \mu\text{M}$) للنوع البري: (*subsp laperinei*)، (61.7%). بالإضافة إلى ذلك، فإن نتائج المحصل عليها تبين بوضوح تأثير العامل الجيني على microbouturage واضحة للغاية. كانت سيغما أكثر نجاحاً في تسجيل أفضل معدل تجذير سيجواز (75.33%) يليه مجموعة الفركاني (70%)، ثم شمال (60.33%) وأخيراً بلونكات من قالمة (60%).

كشفت دراسة الإخلاص الوراثي باستعمال طريقتين ISSRs و cytofluorometrie أنه لا فرق بين التجديد النباتات الأمهات والنتائج الاكثار المقابلة لها.

كلمات البحث: *Olea europaea* L.، الإكثار الدقيق، SSRs,ISSRs، شجرة الزيتون، Olivier de Laperrine

Summary

The olive tree (*Olea europaea* L.) is one of the most important fruit species in the Mediterranean region (Loumou and Giourga 2003). About 98% of the world's olive trees are concentrated in this region, producing more than 90% of world production (FAO, 2008). In Algeria, the olive tree is the main group of fruit species by area it occupies (MADR, 2016). In recent years, its culture has been of particular interest thanks to the multiple roles it plays both in terms of socio-economic (*europaea* L.) via microbouturing. In this study, we have mainly tried to establish an effective

experimental protocol to optimize the rate of regeneration via the micro-cuttings, by modulating three main factors known for their influence on this morphogenetic process, namely: the composition of the medium of base, the hormonal composition of the media and the genotype.

The study was carried out on two olive subspecies (*Olea europaea* L.), namely: laperinei subsp. (With two ecotypes, one diploid and the other triploid) and subsp sativa (with cultivated varieties: Chemlal, Sigoise, Ferkani and Blanquette of Guelma).

The results obtained, relative to the micropropagation, are very encouraging since we managed to find culture media that perform well on both the development of the shoots and the roots. The MSM medium, as a basic medium, was very effective especially when it was supplemented with ZEA (9.2 μM). The $\frac{1}{2}$ MSM media added (5.4 μM) of NAA, as auxin source, are very favorable for the rooting of regenerated shoots of native varieties of the subspecies sativa and (4.8 μM) of IAB for the Laperrine olive (61.7%). In addition, the results also allowed us to highlight a very pronounced genotypic effect on microbouturing. The Sigoise variety was more successful in recording the best rooting rate (75.33%) followed by the Ferkani variety (70%), then the Chemlal (60.33%) and lastly the Blanquette de Guelma (60%).

The genetic fidelity study tested by the application of ISSRs markers and cytofluorometry revealed no difference between the regenerates and their corresponding parent plants.

Keywords: *Olea europaea* L., micropropagation, SSRs and iSSRs, olive tree, Laperrine olive tree

REMERCIEMENTS

Tout d'abord mes remerciements infinis sont adressés à « Dieu le tout puissant » de m'avoir donné le courage, la volonté et l'énergie de réaliser ce travail.

En premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde et sincère gratitude, ma vive reconnaissance au Pr. SAADI Abdelkader, qui a bien voulu diriger ce travail avec beaucoup de

compétence et d'efficacité, et pour m'avoir guidé avec une grande patience tout au long de ce travail. Je le remercie vivement pour sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et scientifiques ainsi que ses précieux conseils portés pour mon sujet de recherche

J'adresse un grand remerciement à ma co-promotrice Dr. CARRA Angela pour toutes les aides qu'elle m'a apporté, sa disponibilité et ses qualités humaines et scientifiques. Qu'elle trouve ici l'expression de ma plus haute considération.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur SETTI Benali, Professeur à l'UHB de Chlef de m'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de présider le jury de ce travail.

Je tiens à remercier également Mme CHAOUIA Chérifa, Maitre de conférences «A» à USD de Blida, d'avoir accepté, malgré ses préoccupations et ses tâches administratives, d'examiner et de juger ce travail. Qu'elle trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Mes remerciements les plus chaleureux et fraternels vont à Mme MEZIANE Malika, Maitre de conférences «A» à l'UHB de Chlef d'avoir accepté de juger et d'examiner ce travail

Mes remerciements vont aussi à Mr BOUDJENIBA Mohamed, Professeur à l'ENS de Kouba d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je suis particulièrement reconnaissant et honoré par sa participation au jury de cette thèse.

Je tiens également à exprimer ma gratitude au Professeur ADDA Abdelkader qui trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail.

Mes remerciements vont également au Dr. Carimi Francesco, Directeur du laboratoire IBBR, CNR de Palerme, Italie pour son accueil au sein de son laboratoire de recherche et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens pour la réalisation de la partie moléculaire de ce modeste travail.

Mes sentiments les plus profonds et remerciements infinis à mes collègues et amis du IBBR, pour les relations amicales, conviviales, fraternelles et professionnelles qu'ils ont eu tissé en dehors et au sein du laboratoire, comme je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Dr Alessandro Sylvestre Gristina.

Un grand remerciement va aussi au Directeur Général de l'ITAF Mr MENDIL Mahmoud pour sa collaboration et sa contribution dans la réalisation de ce travail, ainsi, à tout le personnel qu'il dirige et plus particulièrement les collègues (Mme BOUKHALFA, Mme TAIBI, Mme GHAZELI, Mr AGOUNI.), sans oublier Mme AITER chef de service du laboratoire de culture *in vitro* pour son aide, ses encouragements et son soutien moral. Ainsi, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

DEDICACE

A la mémoire de mon père et de ma soeur, à la bougie de ma vie ;

*«Très chère maman, jamais je ne saurais m'exprimer quant
aux sacrifices que vous avez consacrés, à mon éducation*

*et mes études Puisse Dieu vous exaucer de santé,
de prospérité et de bien-être et vous octroyer une
longue vie».*

*Ainsi, je dédie ce mémoire à ma petite famille ;
« Ma chère femme Bien aimée NASSIMA, ses sacrifices,
son soutien moral et matériel, sa gentillesse sans égal,
son profond attachement m'ont permis
de réussir mes études».*

« Mes trois chères enfants YACINE MANEL et YASSER»

*« Mon chère frère AHMED et mes chères sœurs AMINA,
BAKHTA, HADDA, DAHBIA, SAMIRA et NACERA»*

« Mes chères neveux et nièces »

*« Mon beau père Hadj ISMAIL et Ma belle-mère MESSOUDA,
mes beaux frères et mes belles sœurs »*

A tous ceux qui me sont chers.

Haddad

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION.....	1
II : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4

CHAPITRE 1. Généralités sur l’Olivier.....	4
1.1. Origine et distribution géographique de l’olivier.....	4
1.2. Caractéristiques botaniques et classification de l’olivier.....	6
1. 3. Importance de l’oléiculture.....	7
1.3.1. Dans le monde.....	7
1.3.2. En Algérie.....	9
1.3.2.1. Production nationale d’olivier	10
1.3.2.2. Répartition géographique de l’oléiculture Algérienne.....	13
1.3.2.3. Production de plants.....	13
1.3.2.4. Biodiversité de l’olivier.....	14
1.3.2.5. Variétés cultivées.....	15
1.4. Principales contraintes de l’oléiculture Algérienne.....	18
CHAPITRE 2. Multiplication de l’olivier.....	19
2.1. Techniques de multiplication traditionnelles.....	19
2.1. 1. Semis.....	19
2.1.2. Bouturage du bois de taille (ligneux)	20
2.1.3. Bouturage par éclats de souches ou souquets.....	20
2.1.4. Bouturage en garrote.....	21
2.1.5. Greffage.....	21
2.2. Techniques de multiplication modernes	21
2.2.1. Bouturage semi-ligneux sous Mist-system.....	21
2.2.2. Culture <i>in vitro</i> et micropropagation.....	23
2.2.2.1. Microbouturage	25
2.2.2.2. Embryogenèse somatique.....	32
CHAPITRE 3. Principaux types de marqueurs et leur utilisation dans l'identification .	36
3.1. Marqueurs pomologiques.....	37
3.2. Marqueurs biochimiques : iso-enzymes.....	38
3.3. Marqueurs moléculaires.....	39
3.3.1. RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism").....	40
3.3.2. RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA").....	40
3.3.3. AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism ").....	42

3.3.4. SCARs ("Sequence Characterized Amplified Region").....	43
3.3.5. SSRs ("Simple Sequence Repeats").....	43
3.3.6. ISSR ("Inter Simple Sequence Repeats»).....	45
3.3.7. SNPs ("Single Nucleotide Polymorphisms").....	46
3.3.8. DARts («Diversity Array Technology»).....	46
CHAPITRE 4. Conformité génétique des vitro-plants d'olivier.....	47
MATERIEL ET METHODES.....	48
1. Micropropagation de l'olivier	48
1.1. Objectif du travail	48
1.2. Matériel végétal.....	48
1.2.1. Conditions d'obtention et de culture des plantes mères.....	48
1.2.2. Préparation et mise en culture du matériel végétal.....	49
1.2.3. Techniques de culture.....	50
1.2.3.1. Phase d'établissement de la culture	51
1.2.3.2. Phase de multiplication et élongation.....	52
1.2.3.3. Phase d'enracinement.....	53
1.2.3.4. Phase d'acclimatation.....	54
1.2.4. Conditions et suivis des cultures	54
1.2.5. Expressions des résultats et analyse des données.....	58
2. Analyse Moléculaire.....	60
2.1. Objectif du travail.....	60
2.2. Evaluation de la stabilité génétique des vitro-plants	60
2.2.1. Utilisation des marqueurs ISSRs.....	60
2.2.1.1. Extraction de l'ADN et purification.....	60
2.2.1.2. Quantification et visualisation de l'ADN extraite.....	62
2.2.1.3. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de l'ADN de l'olivier	63
2.2.1.4. Électrophorèse	64
2.2.1.5. Analyses moléculaires (ISSRs).....	64
2.2.1.6. Analyse statistique des résultats de l'amplification	65
2.2.2. Utilisation de la Cytométrie en flux.....	65
2.3. Evaluation du niveau de ploïdie chez les pieds mère de l'olive de Laperrine (<i>Olea europaea</i> subsp <i>laperrinei</i>).....	68

2.3.1. Extraction de l'ADN total.....	68
2.3.2. Evaluation quantitative et qualitative de l'ADN	68
2.3.3. Analyses moléculaires (nuSSRs).....	68
IV. RESULTATS	71
1 : Microbouturage.....	71
1.1. Résultats des essais préliminaires conduits avec la variété Chemlal.....	72
1.1.1. Phase d'établissement de la culture et de multiplication	72
1.1.1.1. Taux de débourrement des explants (%)	72
1.1.1.2. Phase de multiplication.....	74
1.1.2. Phase d'enracinement et d'acclimatation.....	79
1.2. Aptitude à la micropropagation de variétés cultivées d'olivier et de l'olive de Laperrine (<i>Olea europaea</i> L.) subsp <i>laperinei</i>	83
1.2.1. Aptitudes des variétés cultivées au microbouturage	83
1.2.1.1. Phase d'établissement de la culture et de multiplication	83
1.2.1.2. Phase d'enracinement et d'acclimatation.....	91
1.2.2. Aptitudes de l'olive de Laperrine (<i>Olea europaea</i> L.) subsp <i>Laperinei</i> au microbouturage.....	98
1.2.2.1. Phase d'établissement de la culture et de multiplication.....	98
1.2.2.2. Phase d'enracinement et d'acclimatation.....	105
2. Analyse moléculaire et cytofluorométrique.....	109
2.1. Evaluation du niveau de ploïdie chez les pieds-mères de l'olive de Laperrine (<i>Olea europaea</i> subsp <i>laperrinei</i>).....	109
2.2. Evaluation de la stabilité génétique des vitro-plants.....	110
2.2.1. Evaluation de la stabilité génétique des vitro-plants par ISSRs	110
2.2.1.1. Chez l'olive de Laperrine (<i>Olea europaea</i> L. subsp. <i>Laperrinei</i>).....	110
2.2.1.2. Chez les variétés autochtones	112
2.2.2. Utilisation de la cytofluorométrie.....	113
2.2.2.1. Analyse cytométrique en flux de l'olive de Laperrine.....	113
2.2.2.2. Analyse cytométrique en flux des variétés autochtones.....	114
V. DISCUSSION GENERALE.....	116

VI. CONCLUSION	125
-----------------------------	------------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Liste des abréviations

COI : Conseil Oléicole International

FAO : Food and Agriculture Organization

OMC : Organisation Mondiale du Commerce

DSA : Direction des Services Agricoles

MADR : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rurale et de la pêche

ITAFV : Institut Technique des Arbres Fruitiers et de la Vigne
PNDA : Plan National de Développement Agricole
FNRDA : Fond National de Régularisation et de Développement Agricole
INRAA : Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie
IBBR-CNR: Institute of Biosciences and BioResources, National Research Council of Palermo,
Italy
CIDES : Centre d'Information et de Développement Expérimental en Serriculture
Ha : Hectare
Pb : Paire de base
rpm : Rotation par minute
th : Température d'hybridation
Hl : Hectolitre
Lux : Lux
OM : Milieu Olivier
QL : Quoiron et Lepoivre
MS : Murashige et Skoog
MSM : Murashige et Skoog Modifié
ppm : partie par million
AIB : Acide Indole Butyrique
ANA : Acide 1-NaphtalèneAcétique
ZEA : Zéatine
BA : 6-benzylaminopurine
KN : Kénitine , 6 furfurylaminopurine
TDZ : Thidiazuron
RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA
AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism
SCAR : Sequence Characterized Amplified Region
SSRs : Simple Sequence Repeats
ISSRs : Inter Simple Sequence Repeats
SNPs : Single Nucleotide Polymorphisms
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
DArTs : Diversity Array Technology.
SAM : Sélection Assistée par Marqueurs
CTAB : Bromure de Cétyle-Triméthyl-Ammonium

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase
ARNas : Enzyme digérant l'ARN
dNTP: Désoxyribonucleide triphosphate
Taq : Thermus aquaticus
EDTA : Ethyl Diamine Tétra acétyle
TBE : Tampon Tris - Borate- EDTA
TE : Tris – EDTA
BT: Bromure d'Ethidium
ARN:Acide Ribonucléique

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Origine et expansion de l'olivier	5
Figure 2. Aire de culture de l'olivier.....	5
Figure 3. Carte oléicole mondiale	7
Figure 4. Marché mondiale de l'huile d'olive.....	9

Figure 5. Marché mondiale de l'olive de table.....	9
Figure 6. Evolutions des surfaces cultivées, de la production et des rendements d'olive en Algérie (2006/2015).	10
Figure 7. Répartition des zones oléicoles algérienne	13
Figure 8. Les principales voies de la micropropagation	24
Figure 9. Forçage des plants d'olivier : (A) Variétés autochtones et (B) Olive de Laperrine	50
Figure 10. Désinfection du matériel végétal : (A) Prélèvement de pousses, (B) Mise en sachet, (C) Feuille découpées à environ 3 mm du pétiole, (D) Lavage des pousses, (E) Pousses immergées dans de l'eau distillée stérile, (F) Désinfection des pousses sous hotte à flux laminaire horizontale..	52
Figure 11. Multiplication des pousses : (A) Explants débouffrés après 30j de culture, (B) Subculture contenant cinq explants débouffrés	53
Figure 12. Acclimatation et élevage des plantules	54
Figure 13. Etablissement de la culture : (A) Deux boutures désinfectées, (B) Dix explants contenant chacun deux bourgeons axillaires, (C) Mise en culture des dix explants dans le milieu de culture, (D) Dépôt des boîtes de Pétri dans la chambre de culture.....	55
Figure 14. Elongation des pousses : (A) Flacon contenant cinq explants débouffrés, (B) Dépôt des flacons dans la chambre de culture	56
Figure 15. Enracinement des pousses : (A) Pousse avant la phase d'enracinement, (B) Mise en tubes des pousses au stade I, (C) Dépôt des tubes au stade II dans la chambre de culture.....	57
Figure 16. Acclimatation des plantules après 1 mois	58
Figure 17. Préparation et broyage des feuilles d'olivier en vue d'extraction de l'ADN total	61
Figure 18. Evaluation qualitative de l'ADN des échantillons de la variété Chemlal (CH) sur gel agarose à 1% du pieds-mère MP et ses régénérées (PS1, PS2, PS3)	62
Figure 19. Processus de l'analyse cytométrique des pieds-mères et leurs progénés de l'olivier suivant : (A) Découpage des échantillons de feuilles fraîches d'olivier, (B) 50 mg de feuilles hachées, dans 400 µl tampons d'extraction de noyaux (solution Partec CyStain® UV Precise P, 250 tests) pendant 30 à 60 s, (C) Filtration de la suspension de noyaux (30 µm Cell-Trics Partec),	

ajouté 1,4 ml de colorant (4,6-diamidino-2-phénylindole), (D) Histogrammes de mesure d'ADN générés à l'aide du logiciel Partec (FloMax®)	67
Figure 20. Aspect des explants de la variété Chemlal : (A) Au moment de la mise en culture et (B) Après un mois de culture sur milieu MSM enrichi de 9.2 uM de ZEA.....	74
Figure 21. Effet de la composition hormonale et minérale des milieux après 3 mois de culture sur la prolifération des pousses	78
Figure 22. Aspect des pousses obtenues après 3 mois d'élongation sur les milieux : (A) MSM, (B) OM et (C) MSM, additionnés de 9,2 µM ZEA	78
Figure 23. Aspect du système racinaire de la variété Chemlal après 1 mois de culture en fonction de la concentration de l'ANA utilisé : (A) 9,7 ; (B) 4,8 et (C) 2,4 µM	81
Figure 24. Aspect des plantules acclimatées de la variété Chemlal : (A) après 1 mois, (B) 3 mois de transplantation	81
Figure 25. Effet de la concentration de l'ANA sur la prolifération des racines. Résultats sont exprimés en fonction de l'efficacité d'élongation des racines (REE) qui représente la longueur moyenne totale (cm) de la masse racinaire produite <i>in vitro</i> par explant	82
Figure 26. Débourrement des explants des variétés après 1 mois de culture : (A) BG, (B) CH, (C) FK et (D) SG	85
Figure 27. Effet de l'interaction (Génotype x Concentration de ZEA) sur le débourrement des bourgeons axillaires des explants après 30 jours de culture.....	85
Figure 28. Effet de l'interaction (Génotype x Concentration de ZEA) sur la prolifération des pousses. Résultats sont exprimés en fonction de l'efficacité d'élongation des pousses (SEE) qui représente la longueur moyenne totale (cm) de la végétation produite <i>in vitro</i> par explant.....	89
Figure 29. A, B, C et D. Pousses axillaires des variétés algériennes respectivement BG, FK, CH, et SG régénérées à partir d'explants nodaux cultivés sur milieu MSM additionné de 9,2 µM ZEA après 2 mois d'élongation.....	90
Figure 30. A, B, C et D Vitro plants des variétés algériennes, SG, FK, BG et CH enracinés après 5 jours sur milieu ½ MSM additionné de 2,3 µM ZEA.....	93

Figure 31. Effet de l'interaction (Génotype x Concentration d'ANA) sur la prolifération des racines. Résultats sont exprimés en fonction de l'efficacité d'élongation des racines (REE) qui représente la longueur moyenne totale (cm) des racines produites <i>in vitro</i> par pousse	95
Figure 32. Aspect des plantules des variétés cultivées après 1 mois d'acclimatation : (A) BG, (B) FK, (C) SG et (D) CH	96
Figure 33. Aspect des plantules des variétés cultivées après 3 mois d'acclimatation : (A) SG, (B) BG, (C) CH et (D) FK	97
Figure 34. Phase de débourrement des explants de l'olive de Laperrine : A) Mise en culture sur MSM, OM et MS enrichi de 18,4 μ M ZEA ; B) Après 1mois sur MS ; C) Après 1mois sur OM et D) après 1mois sur MSM.....	99
Figure 35. Effet de la composition minérale et hormonale sur le taux de débourrement des explants de l'olive de Laperrine après un mois de culture.....	99
Figure 36. Effet des différents régulateurs de croissance sur la prolifération des pousses. Résultats sont exprimés en fonction de l'efficacité d'élongation des pousses (SEE) qui représente la longueur moyenne totale (cm) de la végétation produite <i>in vitro</i> par explant.....	104
Figure 37. Aspect des pousses régénérées après 30 (A, B et C) et 60 jours (D, E et F) de culture respectivement sur les milieux MS, OM et MSM	104
Figure 38. Effet de la concentration de l'ANA sur la prolifération des racines. Résultats sont exprimés en fonction de l'efficacité d'élongation des racines (REE) qui représente la longueur moyenne totale (cm) des racines produites <i>in vitro</i> par explant.....	107
Figure 39. Enracinement des pousses adventives dans $\frac{1}{2}$ MSM supplémenté de 9.8 μ M d'AIB : (A) après 5jours d'obscurité, (B) Pousses enracinées après 15 jours sur milieu $\frac{1}{2}$ MSM supplémenté de 2.3 μ M ZEA, (C) Elongation des racines après 30 jours dans le milieu d'enracinement.....	108
Figure 40. Aspect des plantules après : (A) 1, (B) 3 et (C) 6 mois d'acclimatation.....	108

Figure 41. Mise en évidence du niveau de ploïdie des trois pieds-mères de l'olive de Laperrine, avec en (A) Profil diploïde (34-V13P1) et en (B) Profil triploïde (38- V14P2 et 42-V15P3) obtenu par l'utilisation de GAPU71B.....	110
Figure 42. Profils d'ISSRs de pieds-mères de l'olive de Laperrine et leurs plantes régénérées, pour vérifier la stabilité génétique (M= pieds-mères, R= plantes régénérées, (A) ENEA12 (B) ENEA14).....	111
Figure 43. Relations génétiques entre les génotypes analysés (les pieds-mères et les plantes régénérées) développé avec le coefficient de Nei (Nei1983) et UPGMA analyse de cluster.....	111
Figure 44. Profils d'ISSRs des pieds-mères de BG, CH et FE et SG et leurs plantes régénérées pour vérifier la stabilité génétique (MP = pieds-mères; MS1 = plantes régénérées. (A) ENEA12, (B) ENEA14	112
Figure 45. Histogramme d'intensité relative de fluorescence obtenu, après analyse simultanée de noyaux isolés, à partir de feuilles de pieds-mères triploïdes et de plantes régénérées de la sous espèce de Laperrine	114
Figure 46. Histogrammes des intensités relatives de fluorescence obtenus, après analyse simultanée des noyaux isolés, à partir de feuilles de pieds-mères et leurs plantes régénérées : (A) CH, (B) FR, (C) BG et (D) SG	115

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Evolution de la production oléicole en Algérie (2006-2015).....	12
Tableau 2. Principales variétés d'olivier cultivées en Algérie.....	17
Tableau 3. Composition des trois milieux de culture MS (1962), OM (1984), MSM (1995).	28

Tableau 4. Composition minérale du milieu nutritif de KNOP.....	50
Tableau 5. ISSRs utilisé pour l'évaluation de la fidélité génétique des vitro-plants de l'olive de Laperrine.....	65
Tableau 6. Evaluation de la stabilité génétique du processus de régénération d' <i>O. europaea</i> L. utilisant la cytométrie en flux	66
Tableau 7. Différents marqueurs nucléotides (NuSSRs) utilisés	70
Tableau 8. Effet de la composition minérale et hormonale sur le débourrement, la prolifération et le développement des pousses de la variété Chemlal respectivement après 1 et 3 mois de culture	77
Tableau 9. Effet des traitements sur la formation des racines de l' <i>Olea europaea</i> variété Chemlal	82
Tableau 10. Effet de la composition minérale et hormonale sur la prolifération et le développement des pousses des quatre variétés (CH, BG, FK et SG) après 3 mois de culture	88
Tableau 11. Effet des traitements sur la formation des racines de l' <i>Olea europaea</i> variétés cultivées (SG, FK, BG, et CH)	94
Tableau 12. Effet de la composition minérale et hormonale des milieux sur la prolifération des pousses diploïdes et triploïdes des explants de Laperrine après 3 mois de culture	102
Tableau 13. Effet de la composition minérale et hormonale des milieux sur la prolifération des pousses et le développement des explants diploïdes et triploïdes de l'olive de Laperrine après 90 jours	103
Tableau 14. Effet des traitements sur la formation des racines de l' <i>Olea europaea</i> subsp <i>Laperrinei</i>	107
Tableau 15. Efficacité des marqueurs ISSRs dans la détection des polymorphismes des plantes régénérées des variétés d'olivier cultivées (SG, FK, BG, et CH)	113

I. INTRODUCTION

L'olivier (*Olea europaea* L.) est l'une des espèces fruitières les plus importantes de la région méditerranéenne (**Loumou et Giourga, 2003**). Elle est considérée comme symbole du bassin méditerranéen, environ 98 % des oliviers mondiale sont concentrés dans cette région (**Wiesman, 2009**), ce qui représente plus de 90 % de la production mondiale (**FAO, 2008**).

En Algérie l'olivier (*Olea europaea* L.) constitue, par les superficies qu'il occupe, le principal groupe d'espèces fruitières (**MADR, 2016**). Il a suscité un intérêt particulier ces dernières années non seulement au niveau des principales régions oléicoles traditionnelles à l'échelle nationale, mais aussi au niveau d'autres régions considérées comme réfractaires à son expansion grâce à sa rusticité, sa capacité d'adaptation aux différents types de sols et aux conditions climatiques (**Mendil et Sebail, 2006**). Ce regain d'intérêt est dû, en plus à l'intérêt socio-économique et environnemental de cette espèce et aux qualités sanitaires et nutritionnelles de l'huile d'olive. Les taxons sauvages sont également importants en tant que ressources génétiques pour améliorer l'adaptation à la sécheresse des cultivars (**Hannachi et al., 2009**) et à utiliser comme porte-greffe dans les zones arides (**Baali-Cherif et Besnard, 2005**). De plus, les taxons sauvages sont principalement formés par des individus issus de graines et constituent la source la plus élevée de gènes de résistance contre les agents pathogènes de l'olivier.

Le patrimoine génétique oléicole national est très riche en variétés d'olivier (*Olea europaea* L.) cultivées et spontanées, richesse souvent peu connue dans les détails, que cache la dominance de quelques ensembles génétiques répondant aux exigences des agriculteurs. En effet, un certain nombre de variétés sont multipliées en Algérie parmi lesquelles, les variétés Chemlal et Sigoise qui recouvrent à elles seules près de 60 % de verger oléicole national (**Mendil et Sebail, 2006**).

La propagation de l'olivier en Algérie se fait principalement par le semis de noyaux suivi de greffage comparant au bouturage sous mist système (2,1 %) (**Yvon, 2006**). La première technique est très lente, 3 à 4 ans pour l'obtention d'un plant greffé, avec un très faible pourcentage de germination pour la variété Chemlal (5 à 20 %) (**Ouksili, 1983**).

Le potentiel d'expansion de l'olive de Laperrine est affecté par l'absence de la reproduction sexuelle (**Honnay et Bossuyt, 2005**), un taux de germination faible de moins de 28 % (**Benamar et Bouguedoura, 2000**) et une croissance très lente des semis (**Besnard et al., 2009**). Ce taxon sauvage présente des individus triploïdes, malheureusement, ces derniers sont stériles et ne peuvent pas être propagés par des semences (**Besnard et Baali-Cherif, 2009**). Pour ces raisons,

l'olive de Laperrine est considérée comme vulnérable à l'extinction et les programmes de conservation sont nécessaires pour préserver cette ressource génétique unique.

Aujourd'hui, l'oléiculture est considérée comme un secteur stratégique pour l'économie algérienne c'est pour cette raison, le Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (MADR) a récemment mis en place une stratégie pour l'expansion de la culture des oliviers dans différentes régions, visant à atteindre un million d'hectares à l'horizon 2019, en utilisant les ressources génétiques locales. Par conséquent, l'identification et la caractérisation du germoplasme local est une étape clé pour la certification des plants d'olivier, la sélection des cultivars pour les nouvelles plantations et la conservation de la biodiversité algérienne de l'olive contre le risque d'érosion génétique due au croisement avec des cultivars étrangers introduits, comme s'est produit lors de la colonisation française (INRAA, 2006). Néanmoins, des études antérieures ont rapporté l'existence en Algérie de plus de 150 variétés (Hauville, 1953), selon l'ITAF, 36 principales variétés sont officiellement reconnues et cultivées dans la ferme de démonstration de l'ITAF, Takarietz, Bejaia.

Les techniques *in vitro* fournissent des outils efficaces pour la propagation des plantes de qualité et la conservation des plantes recalcitrantes et peuvent également être utilisées pour la multiplication et la préservation des plantes menacées (Santos et al., 2003 ; Kozlowsky et al., 2012).

Cependant, la micropropagation est une technique à haute valeur commerciale, si elle assure le respect morphologique, productive et moléculaire des plantes produites, par rapport à la plante mère (Caruso et al., 2011). En outre, l'utilisation des techniques moléculaires telles que les ISSRs, SSRs et la cytophymétrie pour l'évaluation de la conformité génétique des plants d'olivier constitue des outils fiables pour l'étude phénologique des plantes obtenues par la technique *in vitro*. En effet, de nombreux auteurs montrent à travers des études moléculaires (ISSRs) l'efficacité de la micropropagation (via le microbouturage) quant au maintien de la conformité génétique des plants régénérés (García-Ferriz et al., 2003 ; Leva et Petruccelli, 2002 ; Leva et Petruccelli, 2012).

Le développement de l'oléiculture est tributaire de la mise en place des techniques de production en masse de plants de qualité, permettant la diffusion de clones sélectionnés et de génotypes performants nouvellement obtenus. Aujourd'hui, la multiplication *in vitro* de l'olivier est encore en cours et les techniques de micropropagation ont été très utiles pour la production de

cultivars d'oliviers (**Zuccherelli et Zuccherelli, 2002 ; Zacchini et De Agazio, 2004 ; Sghir et al., 2005 ; Yakoub-bougdal, 2007 ; Mendoza-de Gyves et al., 2008 ; Peyvandi et al., 2009 ; Ansar et al., 2009 ; Leva et al., 2012**). Les progrès en matière de la micropagation sur de nombreuses espèces fruitières comme procédé industriel de multiplication intensive sont réalisés, pour l'olivier bien que modestes, sont promoteurs. Plusieurs études ont illustré les difficultés inhérentes à l'application d'un schéma de multiplication universel et soulignant l'hétérogénéité des réponses obtenues (**Rugini et Fontanazza, 1981 ; Rugini, 1984 ; Bartolini et al., 1990 ; Leva et al., 1992 ; Garcia Ferriz et al., 2002 ; Sghir et al., 2005**).

Cette étude vise à atteindre les objectifs suivants:

- Le premier est de parvenir à élaborer un protocole de micropropagation expérimental efficient de régénération *in vitro* via le microbouturage, de plusieurs variétés autochtones d'olivier (*Olea europaea* L.) appartenant à deux sous espèces : la *subsp sativa* (Chemlal, Sigoise, Ferkani et Blanquette de Guelma) et la *subsp laperinei* (diploïde et triploïde). Toutes les variétés testées sont connues comme étant rétives à la régénération par microbouturage.
- Le second, est d'évaluer, dans un premier temps, le niveau de ploïdie de trois plantes-mères de l'olive de Laperrine (*Olea europaea subsp laperrinei*). Dans un deuxième temps, nous avons procédé à l'analyse de la conformité génétique des plants régénérés par microbouturage par rapport aux pieds-mères.

II : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Généralités sur l'olivier

1.1. Origine et distribution géographique de l'olivier

L'olivier est d'origine très ancienne, il existe plusieurs théories, mais l'une des plus largement acceptée est celle de Vavilov (1949-1950), qui a établi le centre d'origine de l'olivier cultivé en Syrie et en Iran. **Loukas et Krimbas (1983)** rapportent que la culture de l'olivier a pris naissance avec celle de cuivre, soit environ 4000 ou 3000 ans avant J.C. Des analyses de pollen et de charbon réalisés dans certains gisements beromaurusiens, attestent la présence de l'olivier depuis le paléolithique (5000 à 3000 ans avant J.C) (**Loussert et Brousse, 1978**). Par ailleurs, **Zohary et Hopf (1994)** suggèrent que la domestication a eu lieu entre 5500 et 5700 ans avant J.C. Cependant, sa culture pour la production d'huile d'olive a commencé, plus primitivement 4000-3500 avant J.C suite à la découverte des moulins dans le sud de la Jordanie (**Ben-Thot, 1992**). Ainsi, on croit que les restes de l'endocarpe trouvés avec les grains de céréales, les légumineuses et les dates dans les fouilles de ces moulins primitifs, correspondent aux oliviers cultivés en tant que preuve de la présence de plus de fruits que les olives sauvages (**Zohary et Sepiegel-Roy, 1975**). Bien qu'avant 2500 ans avant J.C, des écrits d'huile d'olive ont été trouvés en Crète.

La culture de l'olivier a été développée il y a environ 5000 ans dans la méditerranée orientale (Chypre et vers l'Anatolie ou l'île de Crète vers l'Égypte), se diffuse ensuite dans la Méditerranée occidentale par les Phéniciens, les Grecs et les Romains (**Breton et al., 2006**), cette hypothèse est soutenue par des preuves archéologiques et historiques (**Besnard et al., 2013**). Par ailleurs, **Kaniewski et al. (2012)** ; **Zohary et al. (2012)** ont démontré que presque 90% des cultivars actuels sont caractérisés par les mêmes haplotypes, suggérant une diffusion par les peuples de la méditerranée occidentale. Par conséquent, les civilisations de la méditerranée, comme les Phéniciens, les Grecs et les Romains, ont répandu la culture d'olivier dans tout le bassin méditerranéen depuis 1200 ans avant J.C. Les Grecs ont introduit l'olivier en Italie, et plus tard l'expansion de l'Empire romain favorisé la diffusion de l'olivier autour du bassin méditerranéen (**Vossen, 2007**). La croissance démographique dans ce bassin a conduit à l'établissement de nombreuses colonies en Afrique du Nord (Carthage) et le développement d'un grand nombre de variétés d'olivier (**Loussert et Brousse, 1978**). Aujourd'hui l'olivier a franchi les frontières de la méditerranée pour se répandre sur tous les continents. En effet, depuis le XVe siècle, et la

découverte de nouveau monde, l'aire de la culture de l'olivier s'étendu au continent Américain, récemment, l'olivier a été introduit dans de nouvelles zones comme l'Australie et que la production mondiale d'huile d'olive ne cesse d'augmenter depuis 1990 (Barranco et al., 2008).

Dans l'hémisphère Nord, l'aire de culture de l'olivier se situe entre 30° et 45° de latitude Nord, et entre 30° et 45° de latitude Sud (Civantos, 1998) (figure 1 et 2).

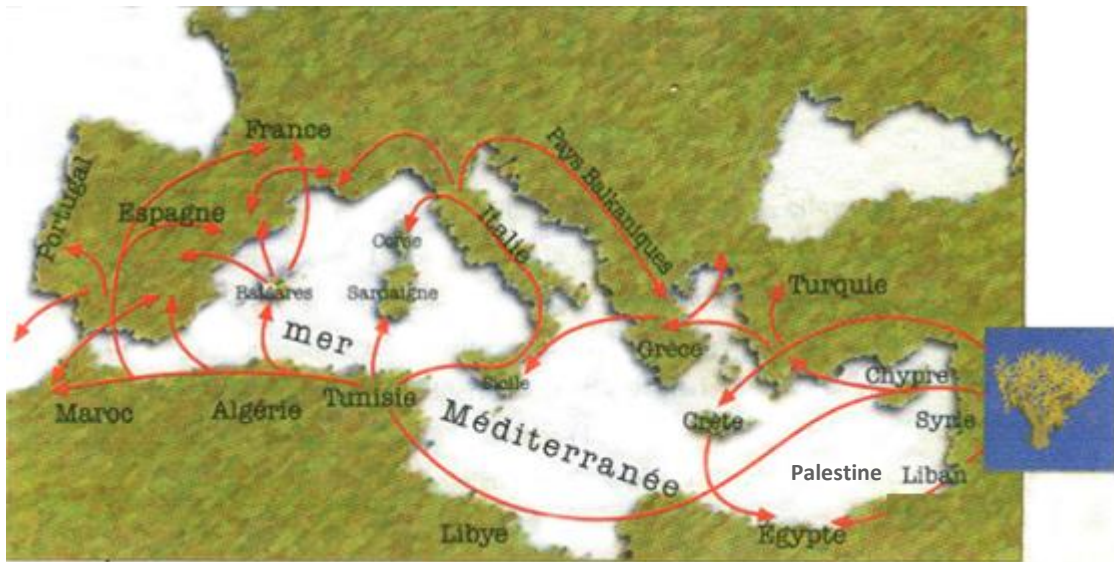


Figure 1. Origine et expansion de l'olivier (Civantos, 1998)

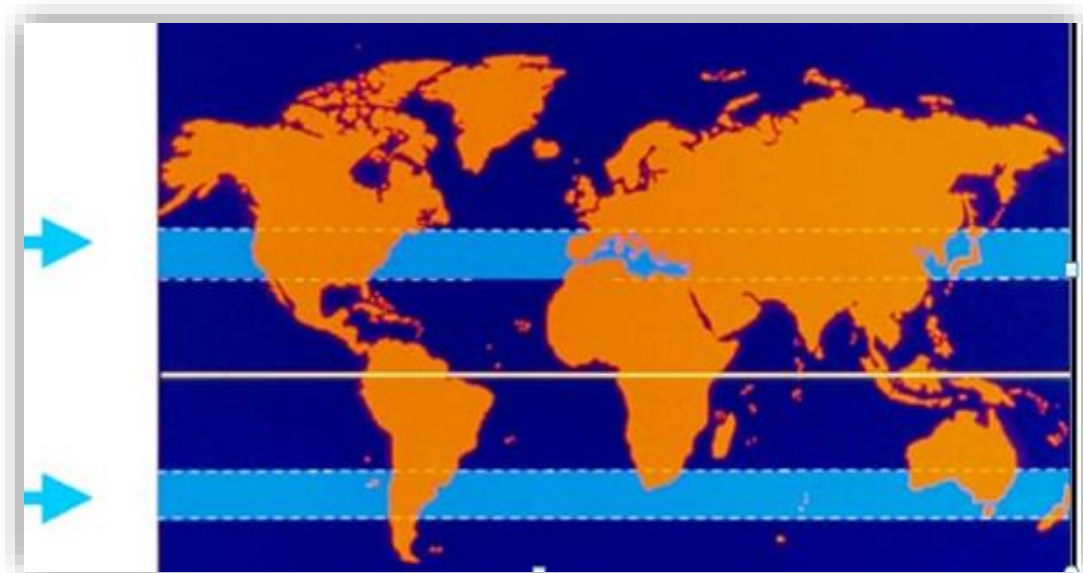


Figure 2. Aire de culture de l'olivier (Civantos, 1998)

1.2. Caractéristiques botaniques et classification de l'olivier

L'olivier appartient à la famille des Oléacées comprenant 24 genres avec 600 différentes espèces dont le nombre de chromosomes est de $2n=46$ (Wallander et Albert, 2000). Certains genres de cette famille, ont un intérêt soit économique ou horticole comme le jasmin, le troène, la vinette et le lilas (Heywood, 1978).

Dans cette famille, l'olivier fait partie du genre *Olea*, composé de 33 espèces différenciées par des critères morphologiques (Green, 2002) et moléculaires (Besnard et al., 2009) réparties dans le monde entier, parmi lesquelles on trouve l'espèce *Olea europea* L. Elle est la seule espèce donnant des fruits comestibles (Rapoport, 2008), composée de six sous-espèces (Green, 2002):

- *Olea europea* subsp *europaea* (Bassin méditerranéen) ;
- *Olea europaea* subsp *laperrinei* (Massifs du Hoggar en Algérie (Batt. et Trab.) ;
- *Olea europaea* subsp *cuspidata* (Afrique du Sud, l'Egypte, l'Australie, Hawaii, l'Arabie, l'Inde et la Chine) ;
- *Olea europea* subsp *guanchica* (Îles Canaries, Espagne) ;
- *Olea europaea* subsp *maroccana* (Olivier sauvage de l'atlas marocain (Loussert et Brousse, 1999) ;
- *Olea europea* subsp *cerasiformis* (Madeira, Portugal) (Webb et Berth).

Selon Civantos (2004), au sein de la sous-espèce *Olea europaea* subsp *europaea*, on a deux séries :

- *Olea europaea* subsp *europaea* var. *europaea*, olivier cultivé, constitué par un grand nombre de variétés améliorées, multipliées par bouturage ou par greffage et non connues à l'état sauvage (Loussert et Brousse, 1978).
- *Olea europaea* subsp *europaea* var. *sylvestris*, qui appartiennent à l'olivier sauvage. Il se présente sous forme d'un buisson épineux à fruits généralement petits, utilisé comme porte-greffe (Besnard et al., 2009).

Par conséquent, il y a deux grandes populations d'*Olea europea* subsp *europaea* : les populations sauvages qui ont une grande diversité génétique et celles constituées de variétés domestiques, dont le polymorphisme est beaucoup plus faible, malgré que le nombre d'individus est très important (Breton et al., 2006). Actuellement, il y'a plus de 2000 variétés d'oliviers recensées dans le monde et chaque pays se concentre sur les cultivars différenciés par leur port, la

phénologie et la morphologie des feuilles et des fruits (Breton et al., 2006) comme pour l'intérêt économique (Van der Vossen et al., 2007).

1.3. Importance de l'oléiculture

1.3.1. Dans le monde

Le bassin méditerranéen constitue indiscutablement la principale région de cette espèce au terme de superficie comme en production, le patrimoine oléicole mondial s'estime à 950 millions d'arbres, occupant environ 11 millions d'hectares (COI, 2014).

Les pays méditerranéens, restent prédominants avec plus de 95 % de la production d'huile d'olive et avec environ 76 % de sa consommation (COI, 2015). Dans la figure 3 ci-après, sont représentées les zones de production oléicoles mondiales.



Figure 3. Carte oléicole mondiale (COI, 2014).

Avec ses trois pays oléicoles traditionnels (Espagne, Italie et Grèce), l'Union européenne est considérée à la fois comme le premier producteur et exportateur de l'huile d'olive et olive de table. En effet, selon les moyennes annuelles du Conseil Oléicole International (COI, 2015), l'Union européenne couvre plus que les trois quart de la production mondiale d'huile d'olive soit 76,32 %

et contribue avec seulement 29,84 % de la production d'olive de table avec des volumes d'exportation de l'ordre de 44,45 % (figure 4 et 5) (COI, 2015).

L'Espagne est le leader mondiale du marché de l'olive et ses dérivés. En effet, il contribue avec plus de la moitié de la production mondiale d'huile d'olive (54,77 %) et produit le 1/5 de la production d'olive de table (21,51 %) (figure5). En 2015, ses exportations ont atteint les 36,88 % en huile d'olive et les 30,6 % en olive de table. L'Italie est classée, en seconde position, parmi les grands producteurs d'huile d'olive (14,26 %) et en tête, des pays consommateurs de ce produit (COI, 2015).

D'après le COI, l'Algérie occupe la 9^{ème} place, après le Portugal et parmi les pays producteurs d'huile d'olive, avec une moyenne de production annuelle de 44 000 T, soit 1,35 % de la production mondiale. Avec cette production, l'Algérie arrive, plus ou moins, à couvrir ses besoins en ce produit (COI, 2015).

La production nationale d'olive de table a pu atteindre en (2015) les 208 000 T, soit 7,8 % de la production mondiale, ce qui lui a permis d'occuper le 4^{ème} rang au niveau mondial après l'Egypte. Malgré ses bonnes performances en terme de production, l'Algérie n'arrive toujours pas à couvrir ses besoins en ce produit et fait recours aux importations qui ont atteint en (2015) les 8 500 T (COI, 2015).

Pour le marché des olives de table, l'Espagne, le Maroc, l'Egypte, la Turquie et la Grèce sont respectivement les premiers pays exportateurs et garantissent plus que les trois quart (75.04 %) du marché mondial.

Les figures 4 et 5 représentent la production, l'exportation et la consommation des pays oléicoles dans le secteur d'huile d'olive et de l'olive de table respectivement.

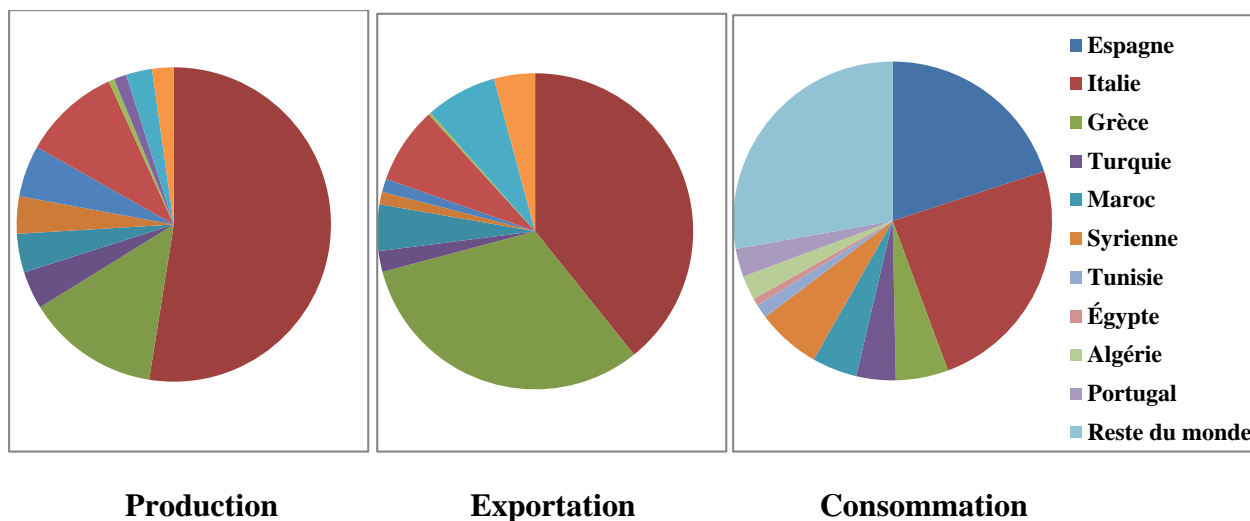


Figure 4. Marché mondiale de l'huile d'olive (COI, 2015)

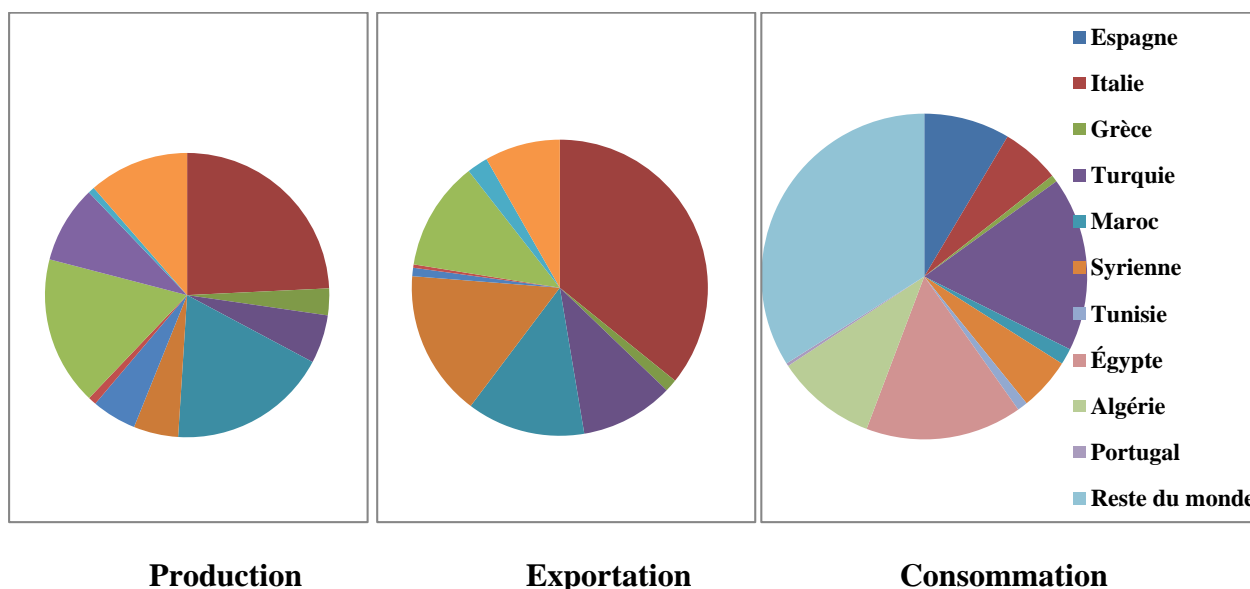


Figure 5. Marché mondiale de l'olive de table (COI, 2015)

1.3.2. En Algérie

L'oléiculture constitue la principale essence fruitière avec près de 39 % de la superficie arboricole et viticole (38,7 %), soit une superficie de 407 181 Ha (MADR, 2015). Elle est représentée par 56 421 262 d'arbres à travers le territoire national dont 50 110 289 d'oliviers en masse et 6 310 973 d'oliviers en isolés (MADR, 2015). De ce fait, elle occupe une place de choix dans le processus de la relance économique dans notre pays, occupant ainsi, la première place à l'échelle nationale avant les agrumes et la vigne.

Selon **Yvon (2006)**, on distingue deux types d'oléiculture :

- Une implantation récente, de densité homogène et régulière, localisée à l'Ouest du pays et dans les zones steppiques spécialisées dans la production de l'olive de table.
- L'autre, est séculaire, couvre plus de 90 % du verger oléicole, destinée pour la production de l'huile, localisée en régions montagneuses avec des reliefs accidentés et sur des terres pauvres, située en majeure partie dans le centre et l'Est algérien.

1.3.2.1. Production nationale d'olivier

Au cours de la dernière décennie 2006/2015 la production moyenne oléicole est de 423 429,5 T (**MADR, 2015**) alors qu'elle était de 190 500 T durant la décennie 1999/2009, soit une augmentation de plus de 100 % (**MADR, 2009**).

L'évolution des surfaces cultivées, productions et des rendements sont représentés dans la figure 6 ci-après :

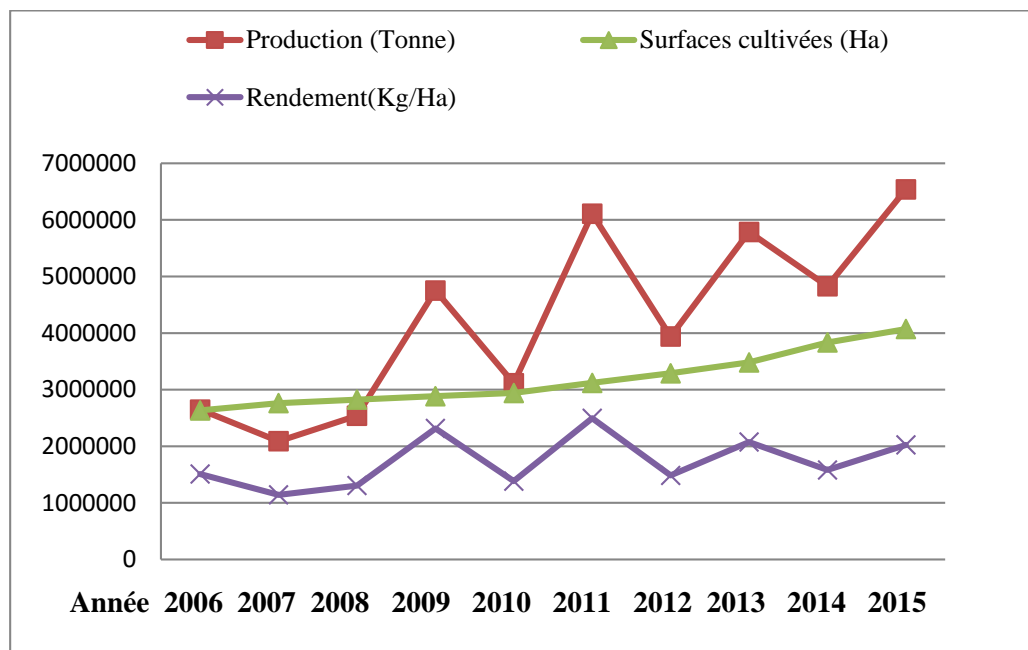


Figure 6. Evolutions des surfaces cultivées, de la production et des rendements d'olive en Algérie (2006/2015) (**MADR, 2015**).

D'après la figure 6, la production, les rendements à l'hectare et la superficie oléicole en Algérie ont enregistré une évolution assez remarquable :

- On constate que le niveau de la production a varié d'une façon très marquée, d'une année à l'autre, conditionné par les aléas climatiques. Il a atteint à peine 208 952 T en 2007 et a accroit à 653 893,9 T en 2015. Toutefois, la tendance annuelle de la production oléicole est à la hausse depuis 2006. Le rendement à l'hectare en Algérie a connaît lui aussi de grandes variations et a suit également la même tendance que la production oléicole. Il a atteint 11,41 qx/Ha en 2007 et a plafonné à 24,95 qx/Ha en 2011.
- Ces fluctuations sont dues aux conditions climatiques principalement d'ordre hydrique d'un climat méditerranéen caractérisé par de faibles pluies qui sont mal réparties au cours de l'année et souvent absentes durant les périodes critiques (Juin-Juillet) qui induit, le phénomène de chute des fruits, au phénomène de l'alternance et aux techniques culturales, notamment au moment de la récolte effectuée principalement par gaulage qui occasionne la blessure des jeunes pousses futures productions de fruits.
- La surface consacrée à l'oléiculture est en continuelle augmentation depuis 2006. Elle a été de 263 352 Ha en 2006 pour arriver à 407 181,31 Ha en 2015, soit une augmentation de 64,67 % (**MADR, 2015**). Cette augmentation serait le résultat de la relance du plan national de développement agricole (PNDA) en 2000, au financement de la filière par le fond national de régularisation et de développement agricole (FNRDA) et récemment grâce au lancement du projet de plantation d'un million d'Ha (**MADR, 2010**).

Le tableau 1 comporte les données statistiques de la production oléicole nationale de 2006 à 2015 (**MADR, 2015**).

Tableau 1. Evolution de la production oléicole en Algérie (2006/2015) (MADR, 2015).

Année	Production d'olive			Rendement d'olive	Production d'huile	Rendement d'huile
	Pour la conserve (T)	Pour l'huile (T)	Prod. Totale Olive (T)	Kg/arbre	(Hl)	L/qx
2006	68 475	196 258	264 733	15,1	349 920	17,8
2007	81 778	127 174	208 952	11,4	238 170	19
2008	91 099	162 968	254 067	13,1	261 260	16,0
2009	98 250,5	376 931,5	475 182	23,2	669 765	17,8
2010	135 936,8	175 315,2	311 252	13,8	288 860	16,5
2011	192 785	417 990,5	610 775,5	25	728 050	17,4
2012	145 826	248 014	393 840	14,9	429 980	17,3
2013	174 934,5	403 805,5	578 740	20,8	715 970	17,7
2014	208 350,7	274 509,3	482 860	15,8	479 700	17,5
2015	233 462,6	420 431,4	653 801	20,2	740 780	17,8

D'après le tableau 1, la production oléicole en Algérie a enregistré une évolution conditionnée par les aléas climatiques:

- En 2006 la production oléicole est évaluée à 196 258 T pour l'huile d'olive et 68 475 T pour l'olive de table.
- En 2015 la production était de 420 431,4 T d'olives destinées à la production de l'huile, et de 233 462,6 T d'olives de table soit une augmentation de 214 % pour l'olive à huile et de 341 % pour l'olive de table.
- On constate, d'une année à une autre une fluctuation de la production oléicole. Ces fluctuations sont souvent bisannuelles, elles sont dues d'une part au phénomène d'alternance de production de l'olivier et d'autre part aux aléas climatiques principalement, d'ordre hydrique qui se répercutent directement sur le rendement en olives.
- La production d'olive de table se localise essentiellement dans les wilayas de l'Ouest algérien (Mascara, Relizane, Tlemcen, et Mostaganem) qui se caractérisent par un climat semi-aride.

1.3.2.2 Répartition géographique de l'oléiculture Algérienne

L'oléiculture algérienne est concentrée exclusivement au niveau de 12 principales Wilayas réparties dans les régions centre, et Ouest du pays dont six se trouvant au centre-est enregistrant donc un pourcentage de 75,3 % du total national : Bejaia, Tizi-Ouzou, Bouira, Sétif, Bordj Bou Arreridj et Jijel (figure 7). Ces six wilayas représentent, à elles seules, plus des 2/3 de l'oléiculture algérienne avec des superficies respectives de 50 918 ; 33 105 ; 26 337 ; 21 544 ; 15 781 et 12 416 Ha. Le reste est représenté par les wilayas de Mascara avec 12 481 Ha et de Skikda avec 9 679 Ha. La figure 7 ci-après illustre la répartition des zones oléicoles algérienne.

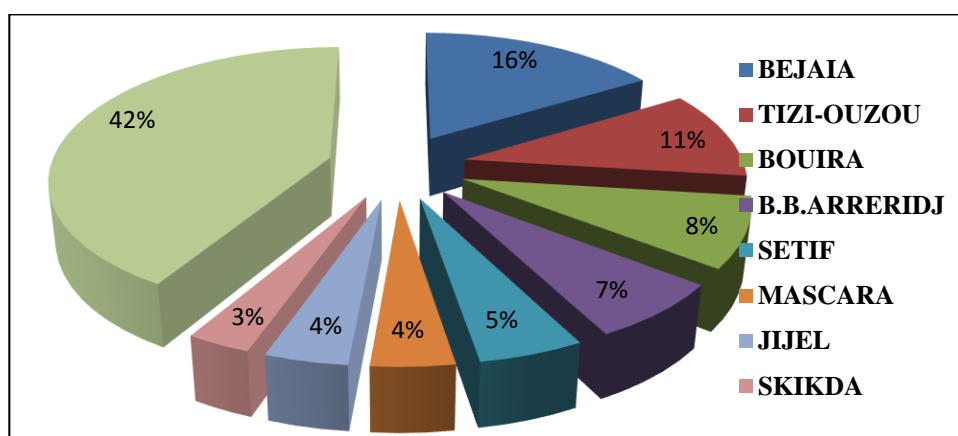


Figure7. Répartition des zones oléicoles algérienne (MADR, 2015)

1.3.2.3. Production de plants

Durant la campagne 2006/2007, la production de plants d'olivier était de 2 738 000 (MADR, 2006), répartis comme suit : 34,7 % greffés en place, 61,8 % en semis greffées et le reste sont produit par bouturage soit 95 000 plants (boutures ligneuses ou herbacées) ce qui représente 3,5 % de la quantité totale de plants produits pour la même période. Les principales variétés multipliées par bouturage sont: Sigoise, Manzanilla et Azeradj.

Les deux principales variétés multipliées par greffage sont la Chemlal pour l'huile (44 %) et la Sigoise pour l'olive de table (53,6 %). Par contre, le reste des variétés est très insignifiant car ces variétés ne sont pas connues par les oléiculteurs (Azeradj, Limli, Bouchouk, Rougette de Mitidja, Blanquette de Guelma et Sévillane).

1.3.2.4. Biodiversité de l'olivier

L'olivier comprend plus de 1 275 cultivars d'intérêt commercial dans le bassin méditerranéen et progressivement en train de disparaître en raison de l'abandon des plantations avec une faible fécondité et l'urbanisation ou le remplacement par des cultivars modernes (**Bartolini et al., 1998**). Cette variabilité peut être réduite une fois que le problème de synonyme et homonyme de l'environnement est résolu.

Il y a un grand besoin en certification génétique de l'olivier, les nouvelles techniques de biotechnologie peuvent sauver les génotypes présentant des caractéristiques particulières en utilisant l'identification génétique, en les protégeant contre les virus et les conserver grâce à des techniques non conventionnelles (**Rugini, 2002**). Les programmes visant à recueillir et conserver ces précieuses ressources génétiques sont en cours, avec le soutien du Conseil Oléicole International (**C.O.I**) et l'Union européenne (**Van der Vossen et al., 2007**).

Actuellement, les variétés d'oliviers cultivés en Algérie, comme dans le reste du monde a considérablement réduit en faveur de certaines variétés de haute réputation. Pour limiter ce phénomène d'érosion génétique, le dépistage génétique doit être effectué sur les souches dont les caractéristiques correspondent aux attentes des producteurs en identifiant dans les parcelles des pieds les plus âgés, les ou les écotypes, à multiplier *in vitro* pour la conservation des ressources génétiques (**Lavee, 1990**) et la production de masse de matériel exempt de virus (**Santos et al., 2003**).

Le taxon *Olea* comprend en plus de cultivars d'intérêt commercial (**Bartolini et al., 1998**), des sous-espèces sauvages importantes comme sources génétiques à l'amélioration de cultivars à des fins de conservation et environnementale (**Hannachi et al., 2009**).

L'olivier *Olea europaea* L. subsp *laperrinei*, est une sous-espèce endémique des régions montagneuses du Sahara central vivant à haute altitude (1400-2700 m) où la pluviométrie moyenne est entre 20 et 200 mm par an (**Quezel, 1965 ; Medail et al., 2001**). Cet olivier sauvage présente des caractéristiques d'intérêt pour l'amélioration de cultivars d'oliviers, il pourrait être d'une importante source génétique pour l'adaptation à la sécheresse et comme porte-greffe dans les zones arides (**Baali-Cherif et Besnard, 2005**).

Les populations d'*Olea europaea* subsp *laperrinei* sont situés dans trois principaux zones du Sahara central correspondant aux montagnes d'El Hoggar dans le Sud de l'Algérie, l'air dans le Nord du Niger, et dans l'Ouest du Darfour dans le nord-ouest du Soudan (**Anthelme et al., 2008**).

L'olive de Laperrine porte rarement des fruits dans son habitat naturel et sa régénération est très faible (**Maire, 1933 ; Quézel, 1965 ; Baali-Cherif et Besnard, 2005**). Son potentiel d'évolution peut être affecté par l'absence de la reproduction sexuée (**Honnay et Bossuyt, 2005**), un faible taux de germination inférieur à 28 % (**Benamara et Bougdroua, 2000**) et une croissance très lente de semis (**Besnard et al., 2009**).

Les populations de l'olivier de Laperrine sont actuellement fragmentées de petite taille (N<100 individus) comprenant parfois même un individu isolé (**Wickens, 1976 ; Ouezel, 1978**). Son aptitude naturelle pour la propagation végétative, pourrait être une solution évolutive pour éviter la limitation de pollen et de la dépression de consanguinité dans la petite population isolée (**Wang et al., 1999 ; Baali-Cherif et Besnard, 2005 ; Besnard et Baali-Cherif, 2009**), et pour favoriser la régénération des individus pendant de longues périodes défavorables (**Besnard et Baali-Cherif, 2009**). En outre les populations naturelles algériennes sont affectées par le pâturage intensif par les animaux sauvages et domestiques (**Baali-Cherif et Besnard, 2005**). En conséquence, la croissance clonale est favorisée, ce qui permet le maintien des sujets très âgés (**Baali-Cherif et Besnard, 2005 ; Besnard et al., 2009**).

1.3.2.5. Variétés cultivées

La description des variétés d'olive cultivées en Algérie ayant déjà fait l'objet de nombreuses études, est souvent restée au stade préliminaire. Selon **Mendil et Sebai (2006)**, les principales variétés cultivées en Algérie sont représentées dans le tableau 2.

- **Variété Chemlal**

C'est la variété la plus dominante en Kabylie, elle s'étend de l'Atlas Blidéen jusqu'au Bibans et Guergour. Elle est la plus répandue soit, plus de 44 % des surfaces oléicoles nationales, caractérisée par des arbres vigoureux et productifs produisant une huile de qualité. C'est l'une des variétés les plus estimées pour la production de l'huile, avec un fruit de 2,5 g en moyenne et une teneur en huile de 18 à 22 %.

- **Variétés Azeradj et Bouchouk**

Elles accompagnent généralement les peuplements de Chemlal dont Azeradj est utilisée comme pollinisateur. Ces variétés sont utilisées à doubles fins : huile et conserverie. Leur teneur en huile varie entre 22 et 28 %.

- **Variété Blanquette de Guelma**

Cette variété à huile se trouve en mélange avec d'autres variétés dans les régions de l'Est du pays, sa teneur moyenne en l'huile est d'environ 15 %.

- **Variété Sigoise**

Cette variété est la plus répandue dans la région de l'Oranie. Elle est appréciée pour sa qualité d'olive de table, localisée au niveau des plaines de l'ouest, et en particulier la plaine de Sig. C'est une variété à doubles fins, mais la majeure partie est destinée pour la conserverie.

- **Variété Sévillane et Gordal**

Elles sont originaires d'Espagne, variétés à gros fruits, localisées dans la pleine du sub-littoral oranaise. Elles sont utilisées uniquement pour la production d'olives vertes de table.

Tableau 2. Principales variétés d'olivier cultivées en Algérie (Mendil et Sebai, 2006).

Variétés	Origine	Diffusion	Utilisation	Taux d'enracinement	Rendement en huile	Autres
Chemlal	Kabylie.	Plus 40 % du verger oléicole algérien	Huile	Faible < 19 %	18 à 22 %	-Rustique, tardive -Autostérile, productivité élevée. - Peu alternante, sensible à la tuberculose et la teigne.
Sigoise	Plaine de Sig (Mascara)	25 % du verger oléicole algérien	Double aptitude (huile et olive de table)	Moyen	18 à 22 %	- Saison, tolérante aux eaux salées -Productivité moyenne et alternante
Blanquette de Guelma	Guelma	limitées aux Aurès	Huile	52,30 % Elevé	15 %	-Précoces - Résistantes au froid et à la sécheresse - bonne productivité et alternante
Azeradj	Seddouk	Locale 10 % du verger oléicole algérien	Double aptitude (huile et olive de table)	Faible	24 à 28 %	-Tardive et rustique -Auto fertile - Variété pollinisatrice et alternante
Bouchouk	Hamam Guergour	Restreinte	Double aptitude (huile et olive de table)	Faible	22 à 26 %	-Rustique de saison -Productivité faible et alternante
Gordal	Espagne	Plaine sublitorale Oranie	Double aptitude (huile et olive de table)	Faible	16 à 20 %	-Rustique de saison -Productivité faible et alternante
Sévillane	Espagne	Plaine sublitorale Oranie	Huile	Faible	14 à 18 %	-Précoce - Résistante au froid et sécheresse - Autostérile / Sigoise

1.4. Principales contraintes de l'oléiculture algérienne

Selon **Mammou (2007)**, l'oléiculture algérienne connaît de nombreux problèmes :

1. Insuffisance du potentiel de production

La production et la consommation par habitant restent faibles 1,1 kg par rapport à la consommation moyenne mondiale qui est selon l'OMC de 5,5 kg /an/habitant. L'Espagne occupe la première place avec 16 kg, suivie de la Tunisie avec 7 kg /an/ habitant.

2. Perte de production due principalement à :

- Non disponibilité des ressources en eau en quantité suffisante pour irriguer l'olivier destiné à l'olive de table dont les pertes sont estimées à 20 qx/ha.
- Moyens de récolte modernes peu utilisés induisant la perte d'olives en moyenne de 2 kg/arbre en zone de montagne.
- Problèmes phytosanitaires.

3. Non maîtrise du processus de transformation

- Perte d'huile en moyenne de 1,25 l/qx transformé, soit 10 000 T d'huile/an
- Dépréciation de la qualité, environ 60 % de l'huile d'olive nécessite un raffinage (acide supérieur à 3,3 %).
- Perte d'olive de table due aux conditions d'hygiène non adéquates.
- Contrôle de qualité des produits oléicoles insuffisant.

4. Conditions de stockage inadéquates et faible capacité de conditionnement

- Perte de la qualité au niveau du stockage lié aux matériaux utilisés (absence de cuves en acier inoxydable).
- Faible capacité de conditionnement (20 Unités de conditionnements, soit 10% de la production nationale).

5. Non valorisation des sous-produits de la transformation

La transformation dégage 14 000 T de margines et 100 000 T de grignons équivalent de 600 000 000 DA (**Mammou, 2007**). Selon le même auteur, il faut signaler l'absence des unités de stockage et de distribution des margines et grignons en tant qu'aliment de bétail et/ou fertilisants.

6. Circuit de commercialisation défaillant

- Mélange d'huile d'olive et d'huile de table.
- Utilisation de conteneurs (emballage) ne répondant pas aux normes des marchés.
- Non-respect de la réglementation en vigueur

Chapitre 2. Multiplication de l'olivier

L'olivier peut être multiplié par plusieurs techniques regroupées selon leur origine en deux à savoir : les techniques traditionnelles et les techniques modernes.

2.1. Techniques de multiplication traditionnelles

2.1.1 Semis

Toutes les variétés d'olivier qui existent à l'échelle mondiale sont le résultat de la domestication par voie sexuelle de l'olivier sous la pression sélective de l'utilisation humaine. Une plante issue de la germination d'un noyau a ses propres caractéristiques et uniques, même si elle est obtenue par autofécondation. Un noyau d'olive d'une variété cultivée ne donne pas obligatoirement une variété identique ou intéressante par conséquent, la conformité génétique n'est pas garantie, même si les fleurs menant à ce noyau ont été fécondées par le pollen de la même variété (**Breton et al., 2006**).

Selon **Argenson (1999)**, les olives sont récoltées avant leur maturité en octobre juste après le stade véraison soit avant qu'elles deviennent noires, afin de pallier à la germination difficile spécifique de cette méthode de reproduction, puis le noyau est stratifié pour atteindre un taux de germination le plus élevé. Par ailleurs si, les olives sont physiologiquement matures, en janvier, la germination des semences sera réduite (**Martin, 1996**).

Le semis direct d'un noyau d'olive pour l'obtention d'un franc de semis est une méthode risquée, car les noyaux sont très durs et ils doivent être divisés ou affaiblis pour qu'ils puissent germer, ceci explique, les traitements de pré-germination conçus pour surmonter la dormance tégumentaire (**Francllet, 1979**). Cependant, la scarification mécanique ou chimique est utilisée pour traiter la dormance mécanique, les noyaux peuvent être trempés dans de l'acide sulfurique concentré afin d'adoucir l'endocarpe, suivie d'un rinçage à l'eau pendant 1 à 2 heures, ensuite, ils peuvent être semés directement (**Crisosto et Sutter, 1985**). Par ailleurs, selon **Martin (1996)**, la stratification représente le traitement le plus commode à l'échelle commerciale. En effet, les noyaux sont scarifiés puis trempés dans l'eau à la température ambiante pendant 24 heures, par la suite, les noyaux sont mélangés avec du sable humide, placés à l'obscurité, dans un environnement contrôlé à une température constante de 15° C pendant 30 jours. De même, selon le même auteur, la stratification a été mise en place pour réduire l'effet inhibiteur de l'acide abscisique sur la germination de l'embryon. De ce fait, la propagation à partir de semences peut être recommandée pour la production de portes greffes

(Vidoy-Mercado *et al.*, 2012), comme pour l'évaluation de progénitures en programme d'amélioration génétique (Acebedo *et al.*, 1997).

1.2. Bouturage du bois de taille (ligneux)

D'après Loussert et Brousse (1978), ce mode de multiplication se pratique en pépinière, pour la production de jeunes plants à partir de pieds-mères sélectionnés pour leur qualité et leur état sanitaire. Ainsi, les boutures utilisées ont un diamètre de 2 à 3 cm et une longueur de 20 à 30 cm, récoltées à partir de rameaux pendant le repos végétatif (automne-hiver), ces boutures sont prélevées au moment de la taille, puis mises en stratification dans du sable humide ensuite, plantées verticalement ou horizontalement de février à avril (Fabbri *et al.*, 2004).

La technique de bois de taille nécessite l'utilisation de grandes quantités de bois qui est malheureusement souvent difficile de le trouver sur verger. Cela explique ses limites pour une application à l'échelle commerciale (Loussert et Brousse, 1978).

Par ailleurs, on note que l'aptitude à l'enracinement des boutures d'olivier est directement proportionnelle à leur âge. Cependant, l'utilisation des portions de rameaux âgés de 4 à 5 ans au maximum est conseillée (Jacobont, 1987). Selon le même auteur, cette technique présente certains inconvénients comme :

- Utilisation de bois de taille comme source de boutures limite le temps de propagation avec le risque de multiplier des variétés indésirables.
- Nécessité d'une grande quantité de matériel végétal, qui a une incidence négative sur la qualité des plants d'oliviers.
- Récolte des plants de pépinière à racines nues, laisse sur la partie du plancher des racines formées, ce qui donne un déséquilibre du système racinaire sous l'effet de l'air avec un retard consécutif à la croissance ultérieure.
- Rempotage dans le sac, limite la croissance des racines des plants d'oliviers, de sorte quand doit continuer à former son système racinaire qui induit une croissance limitée constatée au cours de la première année.
- Tendance naturelle est accentuée comme arbuste, qui nécessite un élagage coûteux.

1.3. Bouturage par éclats de souches ou souchet

Selon Argenson (1999), le souchet est considéré comme une grosse bouture ligneuse obtenue lors du recepage d'un vieil arbre qui peut être utilisé pour la mise en place de

nouvelles plantations. Il est obtenu durant les mois de mars et avril par la séparation d'un jeune plant des pieds mère. Ce mode de multiplication est surtout préconisé dans les zones arides et semi-arides. Le vieil olivier sur lequel le prélèvement est effectué peut être soit entièrement déterré, soit il reste en place si on utilise qu'une partie de ces protubérances, en général deux à cinq souchets par arbre-mère peuvent être prélevé sans trop compromettre sa vitalité (**Loussert et Brousse, 1978**).

Selon **Argenson (1999)**, les souchets peuvent être plantés directement ou placés en jauge durant 2 ans. De même, ces auteurs précisent que la rapidité de l'enracinement du souchet dépend de sa grosseur (2 à 5 kg), de sa qualité et de son état sanitaire. Ce mode de multiplication convient aux plantations en terrains pauvres ou sous climats sec, il ne permet d'obtenir la variété désirée que si elle est franche de pied (**Argenson, 1999**).

1.4. Bouturage en garrote

Les garrotes sont des boutures ligneuses de 0,6 à 1 m de longueur et de 4 à 5 cm de diamètre, elles sont mises en place et assemblées par trois ou quatre dans le même trou de plantation, tandis que la partie supérieure s'incline vers l'extérieur (**Fabbri et al., 2004**).

1.5. Greffage

La prolifération de l'olivier pourrait aussi être réalisée par greffage, sauf dans des cas particuliers comme celui des boutures et souchets (**Miouline, 2002**).

Les pourettes âgées d'un an issues du semis, peuvent être utilisées pour propager les cultivars qui sont difficiles à s'autoenraciner (**Sibbett et al., 1994**). Pour ce fait, certaines techniques peuvent être envisagées. Dans le cas des semis ou des plantules d'une variété différente, le greffage en fente peut être utilisé (**Loussert et Brousse, 1978**). Par Contre, pour les arbres plus âgés, on préconise le greffage par placage ou le greffage à la couronne sous l'écorce (**Denninger et al., 1993**). Par ailleurs, le greffage par placage qui est fortement recommandé, nécessite une ligature très serré au-dessus de la greffe.

II.2. Techniques de multiplication modernes

2.1. Bouturage semi-ligneux sous Mist-system

Cette méthode de multiplication a été mise au point aux Etats-Unis par Hartman à la fin des années 50, puis diffusée dans le monde entier sous le nom de Mist-propagation ou nébulisation. C'est la plus importante méthode utilisée pour la multiplication de l'olivier (**Van**

der Vossen et al., 2007). Elle utilise des pousses prises à partir d'un rameau d'une année en cours de lignification qui ne produisent pas de fruits (**Fabbri et al., 2004**). Selon **Hartmann et al. (1990)**, les pousses tendres douces ne sont pas souhaitables, vue leur flétrissement et leur dessèchement avant l'enracinement. Les pousses peuvent être divisées en portions de 10 à 15 cm de longueur et de 4-6 mm de diamètre composées de 4 à 6 nœuds, les 4 feuilles d'extrémité distale sont conservées ou réduites selon leur dimension, tandis que les 2 à 3 nœuds basales sont dépourvus de feuilles. Ces boutures sont façonnées et préparées pour un traitement hormonal avec une auxine de croissance qui doit être effectué dans les 20 à 40 minutes qui suivent (**Denisen, 1979**).

Comme la majorité des plantes ligneuses, l'Acide Indole Butyrique (AIB) représente l'hormone d'enracinement la plus largement utilisée pour les boutures d'olivier. La méthode consiste à tremper rapidement la base des boutures pendant 3-5 secondes dans une solution d'AIB à 3000 ppm (**Van der Vossen et al., 2007**). L'efficacité de l'auxine sur l'initiation des racines dépend de son niveau critique de concentration, alors que celles supérieures à ce niveau peuvent inhiber la croissance des racines et le développement des bourgeons (**Janick, 1986**). Par ailleurs, les concentrations efficaces d'AIB sont comprises entre 2000 et 4000 ppm dissoutes dans les solutions hydro alcooliques. La concentration de 2000 ppm est largement suffisante lorsque les niveaux d'hormones d'enracinement naturel sont élevés. En revanche, une concentration de 4000 ppm est convenable lorsque les niveaux d'hormones d'enracinement naturel sont faibles au cours de la période de repos ou pendant la floraison (**Fabbri et al., 2004**).

Selon les mêmes auteurs, l'introduction de la technique de brumisation représente une alternative valable aux anciennes techniques utilisées avec une meilleure maîtrise des conditions de milieu à savoir :

- La température optimale pour le milieu d'enracinement doit être comprise entre 18 et 21°C tandis que, la température ambiante optimale peut aller de 21 à 26°C.
- L'humidité relative est primordiale pour les boutures, par le maintien de celle-ci proche de la saturation soit > 80 % jusqu'au développement des racines.
- L'éclairage recommandé varie de 5.000 à 10.000 lux.
- La lumière agit par son intensité, sa durée et sur la qualité photosynthétique des feuilles ainsi la synthèse des promoteurs d'enracinement.

La production annuelle de plants d'oliviers est autour de 40 millions dans les principaux pays oléicoles, 32 millions dans le bassin méditerranéen et 8 millions dans le reste du monde

(C.O.I, 2000). La technique de bouturage semis ligneux sous mist-système est la méthode de propagation la plus fréquente avec 28 millions de plants, suivie de greffage (7 millions) et 5 millions par les techniques traditionnelles (semis, coupe des rameaux) (Fabbri et al., 2004).

2.2. Culture *in vitro* et micropropagation

La technique de culture *in vitro*, est un mode de multiplication végétatif artificiel des plantes. Elle repose sur le principe de totipotence cellulaire mise en évidence en 1902 par Haberlandt qui affirme qu'il est possible de régénérer une plante entière à partir de n'importe quelle cellule vivante d'une plante donneuse (Zryd, 1988). Les techniques de culture *in vitro* végétales sont donc des cultures qui permettent la croissance et le développement de plantes à partir d'explants (graines, organes, tissus, cellules, etc...), sur un milieu nutritif synthétique, sous des conditions stériles (aseptiques), dans un espace réduit et à environnement contrôlé (Zryd, 1988 ; Auge et al., 1989).

La multiplication végétative *in vitro* présente de nombreux avantages comparativement aux techniques de multiplication classiques. Elle permet de régénérer facilement des espèces chez lesquelles les semences sont rares, ou présentant des difficultés de germination et/ou dont les techniques de bouturage ou de greffage sont inapplicables, ce qui a conduit à une plus grande diversité des plantes commercialisées (Caruso et al., 2011).

La technique *in vitro* fournit des outils efficaces, alternatives aux méthodes classiques, pour la propagation des plantes (Santos et al., 2003 ; Kozlowsky et al., 2011). Les objectifs de la culture *in vitro* sont nombreux et variés ; la différenciation et la production de plantes identiques (micropropagation), l'assainissement ou guérison (culture de méristèmes et micro greffage), amélioration (culture d'anthers) et la sélection de mutants (INRAA, 1997).

Une attention particulière a été accordée au cours de ces vingt dernières années aux méthodes de micropropagation comme des alternatives viables pour la multiplication de masse, de qualité, d'homogénéité génétique et des plantes indemnes de maladies de nombreuses cultures commerciales (Zuccherelli et Zuccherelli, 2000).

La micropropagation est utilisée dans un but de multiplication en masse, puisqu'elle permet, en partant d'un seul individu (plant), l'obtention d'un nombre considérable de plantes génétiquement identiques à la plante mère. Les plantes régénérées peuvent être conformes aux plantes mères mais peuvent présenter aussi une variabilité génétique. Cela dépend de la voie de multiplication choisie par l'expérimentateur.

D'une manière générale, selon **George Sherrington (1984)**, la technique de micropropagation emprunte deux principales voies de multiplication (figure 8) :

- La première, dite « voie de propagation conforme » utilise des tissus méristématiques (méristème, apex ou bourgeons axillaires) potentiellement capables de donner suite, au développement normal, un individu conforme à la plante mère. La culture de méristème ou le microbouturage, font partie de cette voie. L'obtention d'un plant entier passe généralement par deux phases successives, d'abord le développement de la tige puis production de pousses, ensuite son enracinement.
- La seconde voie, dite « propagation non conforme » est celle utilisant toute sorte de tissus différenciés (fragments de tige, de racines, de pétiole, de feuilles, d'embryons matures et immatures, d'hypocotyles, cotylédons, etc...) pour aboutir à la néoformation soit de bourgeons ou de racines, c'est l'organogenèse, soit de structures ressemblant aux embryons zygotiques, c'est l'embryogenèse somatique.

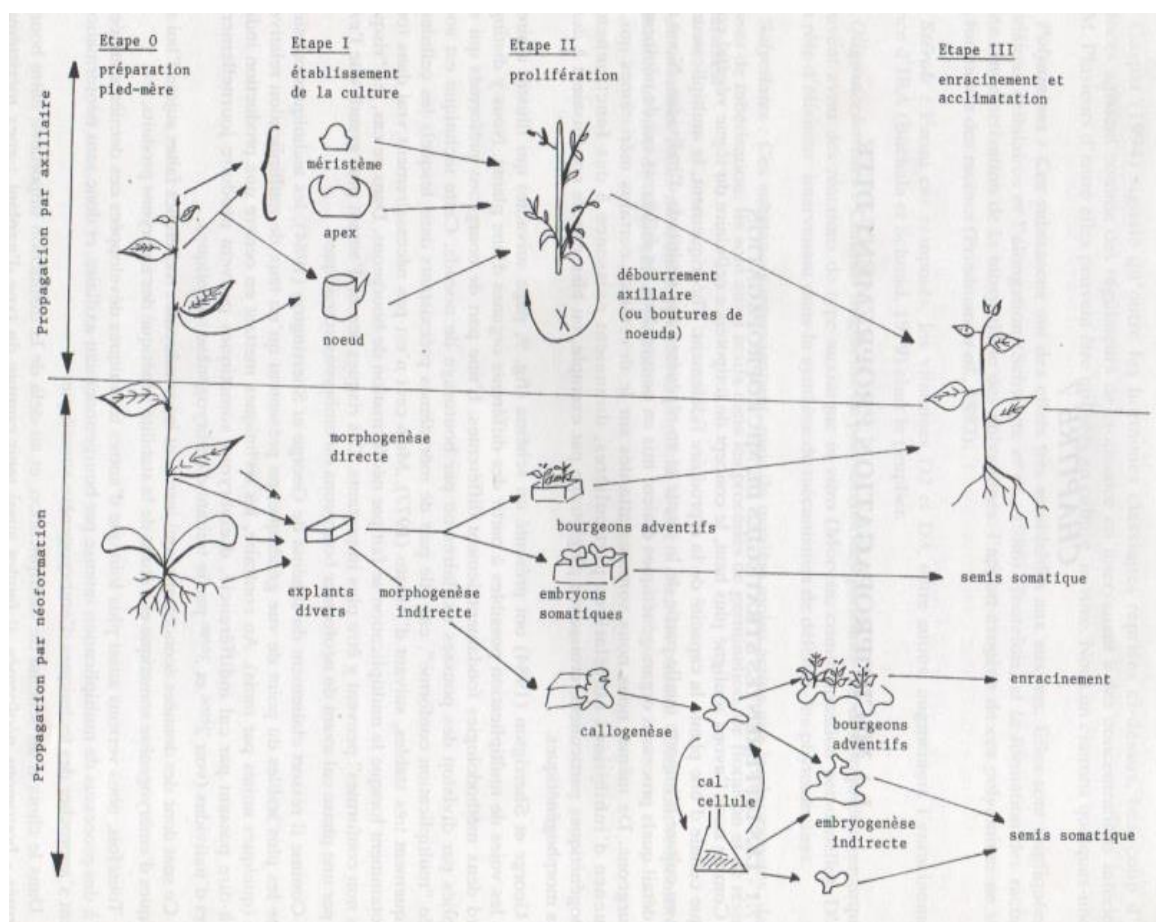


Figure 8. Les principales voies de la micropropagation (**George et Sherrington, 1984**)

2.2.1 Microbouturage

La multiplication de l'olivier a progressivement intégré les techniques de culture *in vitro* principalement le microbouturage. La dite technique offre de nouveaux chemins pour la production en masse, de matériel sélectionné. Elle ne se limite pas au seul coefficient de rapidité de la multiplication, mais elle s'est avérée que les plantes auto-enracinées *in vitro* sont plus vigoureuses et plus résistantes aux maladies (**Cimato, 1999**). De même, elle présente certains avantages tels que : l'utilisation de petits proportions de végétal, peut-être programmé indépendamment des saisons et la manipulation de grandes quantités de matériel végétal dans un espace confiné (**INRA, 1997**). Cette technique représente donc sans contexte un outil puissant aux perspectives industrielles et économiques importantes (**Margara, 1982 ; Boxus, 1995**).

Selon (**Walali, 1993**), pour maintenir la conformité génétique des clones, la mise en culture des microboutures, puis la stimulation des bourgeons axillaires et leur prolifération, constituent la méthode la plus généralement appliquée en micropropagation des ligneux. La première étude sur le microbouturage de l'olivier a été rapportée par **Rugini (1984)**. Le même auteur a développé une formulation de milieu spécifique en analysant des éléments minéraux à partir de noyaux matures. Celui-ci a été utilisé pour la production végétale à l'échelle commerciale en Italie pour plus de 50 cultivars d'oliviers avec des résultats dans la production de plantes de haute qualité et à croissance rapide (**Rugini et al., 2006**).

Selon (**George, 2008**), le microbouturage d'une plante passe par plusieurs phases :

a. Phase de conditionnement et préparation des plantes mères.

La phase de conditionnement et préparation des plantes mères constitue une étape primordiale et contribue de manière effective dans la réussite des phases ultérieures de la micropropagation. Cette phase consiste à garantir l'état nutritionnel et sanitaire des plantes mères, qui devraient être dépourvues de carence en minéraux et sans aucun stress hydrique (**CIDES, 1999**).

Lors de cette phase, les plantes mères devraient de préférence être cultivées en conteneurs dans un environnement contrôlé, sous serre ou dans une chambre de culture, irriguées, fertilisées et traitées de façon appropriée pour le contrôle des principaux insectes et agents pathogènes à savoir les champignons et les bactéries (**Caruso et al., 2011**). Des pertes considérables de matériel végétal, ont été observées dans les premiers stades de la propagation

en raison de la contamination bactérienne et fongique des explants, prises à partir de plantes mères en mauvaise santé ou non préalablement traités avec des fongicides et des bactéricides.

L'établissement d'une culture *in vitro* à partir d'explants provenant de plantes juvéniles ne pose pas beaucoup de difficultés. Ce sont les fragments de rameaux prélevés d'arbres adultes qui présentent des nombreux problèmes tels : les problèmes d'oxydations, de pollution et le manque de réactivité (**Rugini et Baldoni, 2005**). Cependant, on peut surmonter ces problèmes par l'application de différentes techniques de rajeunissement, *in vivo* ou *in vitro*, qui peuvent être établies par :

- Forçage de la croissance obtenue à partir de boutures plantées dans de la vermiculite ou la perlite (**Rama et Pontikis, 1990**) ;
- Greffage sur les jeunes plants obtenus par semis (**García-Férriz et al., 2001**) ;
- Enracinement des boutures de pieds mère (**Grigoriadou et al., 2002**) ;
- Taille sévère des plants mère (**Roussos et Pontikis, 2002** ; **Peixe et al., 2007**) ;
- Microgreffage *in vitro* (**Revilla et al., 1996**).

Toujours concernant l'effet des plantes mères sur la réussite des cultures *in vitro*, **Roussos et Pontikis (2002)** rapportent que les explants de plantes élevées sous serre ont montré des taux de survie plus élevés et de faibles concentrations de composés phénoliques que celles des plantes cultivées en plein champs.

b. Phase d'initiation et de mise en place

C'est la phase la plus critique au cours de laquelle les cultures doivent surmonter un certain nombre de problèmes : la contamination fongique et bactérienne (**CIDES, 1999**), l'oxydation des explants et accumulation des composés phénoliques (**Cañas et al., 1992** ; **Roussos et Pontikis, 2002**) dans les milieux de culture et la prolifération des bourgeons des explants employés dans lequel la composition hormonale particulièrement le rapport auxine/cytokinine joue un rôle crucial (**Zuccherelli et Zuckerrelli, 2002**).

La culture *in vitro* de l'olivier est sous la dépendance de nombreux facteurs comme la composition des milieux de culture utilisés (milieu de base, composition hormonale, nature de la source carbonée etc.), le facteur génotypique et la nature de l'explant.

A titre d'exemple, les milieux de culture les plus utilisés en micropropagation de l'olivier, sont élaborés à partir du milieu de base **Murashige et Skoog (1962)** et du milieu dit

OM spécifique olivier (**Rugini, 1984**). Ces milieux de base sont enrichis en vitamines et régulateurs de croissance (**Sakunasingh et al., 2004**).

L'explant utilisé peut être soit un bourgeon axillaire ou apical (**Zryd, 1988**). Ces bourgeons sont introduits et cultivés dans un milieu contenant divers composants pour assurer sa prolifération. Certains milieux stimulent les processus du développement *in vitro*, par contre, d'autres ont peu d'influence sur le débourrement (**Thorpe, 1980 ; Rugini, 1986 ; Rugini et Caricato, 1995 ; Grigoriadou et al., 2002 ; Brhadda et al., 2003**).

L'efficacité du milieu de culture dépend fortement du génotype, ce qui nécessite l'adaptation de la composition minérale du milieu au cultivar à multiplier. Cette différence serait liée à des exigences nutritionnelles variables liées à celui-ci. En effet, le milieu OM semble être plus bénéfique, selon certains auteurs que le milieu MS pour le microbouturage de cultivar d'olivier "Picual" (**Berenguer et Gonzalez, 1989**) ou de la "Picholine Marocaine" (**Brhadda et al., 2003**).

De nombreux autres auteurs confirment la supériorité du milieu OM aux restes des milieux de base quant au microbouturage de plusieurs cultivars d'oliviers (**Cimato, 1999 ; Brhadda et al., 2003 ; González-Padilla et al., 2009**).

Dans d'autres travaux, c'est plutôt le milieu MS qui paraît plus efficace que le milieu OM pour la propagation de plusieurs cultivars tels le "Maurino" (**Bartolini et al., 1989**), la "Chemlali de Sfax" et le "Chetoui" (**Chaari-Rkhis et al., 1999**). Certains auteurs trouvent plus intéressant d'employer d'autres milieux de base tels : le milieu WPM (**Grigoriadou et al., 2002**), le milieu QL (**Quoiron et Lepoivre, 1977**) et le milieu DWK (**Roussos et Pontikis, 2002**).

Les milieux de base les plus employés en phase d'établissement dans les cultures d'olivier sont le milieu OM (**Rugini, 1984**) et le milieu MS (**Murashige et Skoog, 1962**) (tableau 3).

Pour la phase d'enracinement, le milieu de base utilisé est le MS, dilué de moitié pour les macroéléments et le mannitol (½ MS).

Tableau 3. Composition des trois milieux de culture MS (1962), OM (1984) et MSM (1995) pour la culture de l'olivier

Composées	MS (1962)	OM (1984)	MSM modifié (1995)
Macroéléments (mg/L)			
NH ₄ NO ₃	1650	412	825
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440	477
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O		416,92	
KCl		500	
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	370	1500	185
KNO ₃	1900	1100	950
KH ₂ PO ₄	170	340	85
Microéléments (mg/L)			
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.3	22.3	22.3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.25	0.1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	14.3	13
H ₃ BO ₃	6,2	12.40	16.7
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0.025	0.025
KI	0.83	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0.25	0.25	0.25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	27.8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.2	37.25	37.2
Hormones (mg/L)			
ZEA			
NAA			
Vitamines et les acides aminés (mg/l)			
Myo-Inositol	100	100	100
Biotine		0.05	
Ac.Folique		0.50	
Glicine	2.0	1	
Ac.nicotinique	0,5	0,5	1
Tiammine.	0,1	0.5	10
Piridoxine	0.5	0.5	1
Acideascorbique			10
Glutamine		2190	
	(g/l)	(g/l)	(g/l)
Glutationréduit			0.2
Putrescine			
Mannitol			36
Sacharose	30	30	
Agar-Agar	7	7	7
pH	5,8	5,8	5.7

La nature de la source carbonée influence aussi les réponses au microbouturage de l'olivier. Les hydrates de carbone les plus employés sont à la fois le mannitol et le saccharose, bien que leurs effets dépendent du cultivar (**Leva et al., 1994**). Parfois c'est le glucose qui représente la source carbonée (**Chaari-Rkhis et al., 2002**).

La source carbonée influence à la fois, par sa nature et par sa concentration avec laquelle, elle est apportée dans le milieu de culture. **Leva et al. (2012)** ont constaté que la croissance *in vitro* des explants de cultivar "Maurino" dépendait de la concentration de saccharose, un optimum de 3,9 cm de longueur des pousses a été obtenu avec 34 g/l, mais l'utilisation du mannitol à la même concentration, a donné lieu à un allongement supérieur à 4,6 cm. Aussi les même auteurs ont rapporté que l'utilisation du saccharose à des concentrations élevées pendant 4 subcultures réduit le métabolisme des tissus, alors que le mannitol, donne à long terme, d'importants taux de prolifération de qualité et d'uniformité des explants. Cependant, pour le cultivar "Meski," **Chaari-Rkhis et al. (2002)** ont obtenu 9,08 pousses/explant avec une longueur moyenne de 11,97 cm lorsqu'il est utilisé avec le milieu OM enrichi par 30 g/l de glucose.

La composition hormonale, elle aussi apporte sa part d'influence sur le microbouturage. En effet, c'est la zéatine, qui semble être largement acceptée comme la seule cytokinine capable d'induire une croissance satisfaisante des explants d'oliviers (**Rugini, 1984**). Pour des fins commerciaux la zéatine a été remplacée par le Thidiazuran (**Grigoriadou et al., 2002**), la 6-benzylaminopurine (**García-Ferriz et al., 2002**), la Kénitine (**Rugini, 1990 ; Chaari-Rkhis et al., 1999 ; Benderradji et al., 2007**) et la 2-Isopentenyl (**Cañas et Benbadis, 1988**). Toutefois, ces régulateurs de croissance synthétiques induisent la formation de courtes pousses avec de grands calls à la base de celles-ci (**Rugini, 1990**).

La zéatine a été apportée à des concentration qui varient entre 9,2 et 92 $\mu\text{M/l}$ (**Rugini et Fontanazza, 1981 ; Leva et al., 1994 ; Roussos et Pontikis, 2002 ; Brhadha et al., 2003 ; Chaari-Rkhis et al., 2011 ; Leva et al., 2012**). En effet l'utilisation de cette cytokinine naturelle, économiquement chère largement introduite dans les processus de micropropagation de l'olivier, de sorte que la tendance a été, soit réduire sa concentration ou la compléter avec d'autres régulateurs de croissance dont les tentatives de son remplacement ont été variables selon le cultivar testé.

c. Phase de multiplication

Cette étape consiste à transplanter des pousses obtenues à partir de la phase d'initiation. Au cours de laquelle, l'augmentation du nombre de plants est recherchée.

Ainsi chez les ligneux, le taux de multiplication doit être de 4 à 5, pour chaque cycle (CIDES, 1999), qui représente le critère économique majeur pour une propagation commerciale envisagée (Zryd, 1988). Par ailleurs, l'olivier est caractérisé par une forte dominance apicale (Rugini et Panalli, 1993), avec une faible prolifération de bourgeons axillaires qui limite le potentiel de micropropagation. Pour surmonter, ce problème certains auteurs (Rugini et Pannelli, 1993 ; Zacchini et De Agazio, 2004), préconisent le pincement du bourgeon apical pour forcer le débourrement des bourgeons latéraux. Ce micro élagage se traduit par une amélioration remarquable *in vitro* de la prolifération des pousses d'olivier. En effet, Zacchini et Agazio (2004) ont observé chez le cultivar "Nebiara", que le pincement des bourgeons apicaux des explants avant chaque subculture, a produit une augmentation significative des taux de prolifération ainsi que la longueur des bourgeons développés.

Le milieu utilisé est souvent identique à la première phase, bien que quelques différences mineures puissent avoir lieu dans la balance hormonale notamment l'équilibre (auxines cytokinines) (Zuccherrelli et Zuccherrelli, 2003). À la phase de multiplication, les cytokinines sont généralement rajoutées dans le milieu de culture avec des concentrations plus élevées que celles des auxines. Cela peut être expliqué de point de vue physiologique par le fait que les cytokinines opposent à la dominance apicale stimulant ainsi la croissance des nouvelles pousses (Cevie, 1997).

Au cours de cette phase, plusieurs milieux ont été testés avec succès sur l'olivier donnant des résultats significatifs avec des meilleurs taux de multiplication : Murashige et Skoog (MS, 1962 ; Fiorino et Leva, 1986 ; Leva *et al.*, 1995 ; Ferreira *et al.*, 2003), les milieux de l'olivier OM (Rugini, 1984) et DKW (Driver et Kuniyuki, 1984) et WPM (Santos *et al.*, 2003 ; Abousalim *et al.*, 2004).

d. Phase d'enracinement

Cette étape consiste à induire l'émergence de racines sur tiges effeuillées obtenue lors de la phase de multiplication (CIDES, 1999). Parfois, les espèces ligneuses ont un système racinaire plus ou moins important durant cette phase. Habituellement, les milieux d'enracinement sont modifiés, comparativement aux milieux des étapes précédentes, en réduisant la concentration de moitié des macros éléments et de la source de carbone.

Les milieux de base les plus couramment utilisés au cours de cette étape, sont très diversifiés et souvent réduits de moitié tels que : les macro-éléments de KNOP, les micro-éléments de Heller (**Rugini, 1984**) ; le milieu DKW (**Revilla et al., 1996**) ; le milieu OM (**Chaari-Rkhis et al., 2002**) ; le milieu WPM (**Roussos et Pontikis, 2002**) et le milieu MS (**Zucherelli et Zucherelli, 2002**).

La source d'hydrates de carbone la plus largement utilisée est le saccharose, avec des concentrations allant de 15 jusqu'à à 30 g/l (**Grigoriadou et al., 2002 ; Rugini, 1984**). Le mannitol, a été utilisé à des concentrations allant de 18 à 36 g/l (**Roussos et Pontikis, 2002 ; Vidoy et al., 2012**) .

Le milieu d'enracinement se différencie par rapport aux milieux des phases précédentes par sa composition hormonale. Souvent, les transferts de pousses sur des milieux pourvus principalement d'auxines rajoutées au milieu conjointement ou individuellement, à des concentrations comprises entre 0,7 et 1 mg (**INRA, 1997**), induisent l'enracinement. Dans le cas de l'olivier les auxines les plus utilisées avec efficacité sont l'AIB et l'ANA (**Chaari-Rkhis et al., 2006**). Parfois, sur des pousses très bien effeuillées dotées de bourgeons, l'auto enracinement se fait dans un environnement totalement dépourvu de régulateurs de croissance (**Augé et al., 1989**).

Pour améliorer le taux d'enracinement du matériel végétal, plusieurs stratégies ont été proposées comme :

- L'exposition des explants apicaux (avec 3-5 nœuds) pendant 6 à 7 jours à l'obscurité (**Rugini et al., 1987**) ;

- L'ajout en milieu de culture de substances telles que la putrescine (**Rugini et Fedeli, 1990**) ou l'extrait d'huile d'olive obtenu à partir de sphéroplastest est combiné aux auxines (**Rama et Pontikis, 1990 ; Roussos et Pontikis, 2002**) ;

- L'immersion de la partie basale des explants dans une solution stérile d'AIB pendant 10 secondes (**Rugini, 1990**) ;

- L'infection artificielle *in vitro* des explants par des bactéries (*Agrobacterium*, *Pseudomonas*) (**Peyvandi et al., 2010**).

e. Phase d'acclimatation

C'est la phase la plus importante car les plantules obtenues présentent une cuticule plus fine, faible densité de stomates et une seule couche de parenchyme (Cozza et al., 1997). Ceci implique le passage obligatoire de ces plantules par une étape d'adaptation sous conditions de haute humidité relative, pour obtenir une plante avec des racines à chevelue racinaire dense. Cette phase est très délicate du moment qu'un nombre élevé de plantules ne peuvent pas résister au transfert.

Une fois, les vitro-plants micropropagés émettent des racines, Ils seront débarrassés des résidus du milieu, puis lavés doucement avec de l'eau courante. Ensuite, les vitro-plants seront transplantés dans des petits conteneurs, renfermant un substrat nutritif composé d'un mélange de compost de terre ou de tourbe, de perlite (4 : 1), ou un mélange de vermiculite et perlite (3: 1) (Peixe et al., 2007).

Les parties aériennes de plantules auto-enracinées sont recouvertes d'un sac en polyéthylène transparent du faite que les stomates des jeunes feuilles cultivées *in vitro* restent constamment couverts en raison du risque élevé de déshydratation afin de les maintenir dans une humidité relative élevée de l'ordre de 100 % (CIDES, 1999). Par la suite, Les plantules sont placées dans une serre d'élevage, où l'humidité est progressivement réduite durant les 20-30 jours en retirant le sac pour les adapter de plus en plus jusqu'à la pleine acclimatation. Au cours de cette phase, les plantules peuvent être irriguées en utilisant des solutions nutritives (Caruso et al., 2011).

2.2.2.2. Embryogenèse somatique

L'embryon est défini comme étant une plante se trouvant au stade initial de son développement. Il s'agit en fait d'une structure bipolaire (munie de deux méristèmes : l'un caulinaire et l'autre racinaire) qui, suite au processus de germination, donne naissance à une nouvelle plante. Quant à l'embryon somatique, on peut le définir comme étant une structure bipolaire ressemblant à un embryon zygotique, obtenue à partir de tissus ou de cellules somatiques, sur un milieu nutritif *in vitro*.

L'embryogenèse somatique est un processus par lequel les cellules somatiques se développent en plantes à travers une série ordonnée d'étapes embryologiques caractéristiques sans fusion de gamètes (Jiménez et al., 2001). Elle a été induite pour la première fois sur la carotte *Dacus carotta* en 1958 par Reinert, et depuis lors, elle est obtenue chez un grand

nombre d'espèces. Cette technique fournit une multitude de plantes qui peuvent être génétiquement identiques à la plante donneuse d'explants (**Techniver, 2007**).

L'embryogenèse somatique est souvent obtenue sur un milieu de culture dit d'induction, connu pour sa richesse en auxines. Une fois l'induction faite, les cellules embryogènes se divisent et se développent en cals nommés « embryogènes » qui donnent, lieu à des embryons somatiques (**CIDES, 1999**).

L'embryogenèse somatique est un outil puissant, non seulement pour la propagation *in vitro*, mais aussi pour faire de l'amélioration génétique (**Abousalim et al., 2008**). En effet, l'embryogenèse somatique obtenue en passant par la phase cal peut conduire à l'obtention de variants (**Auge et al., 1989**).

La synthèse des études faites sur la micropropagation via l'embryogenèse de l'olivier montre clairement que les travaux réalisés restent encore limités (**Cimato, 1999**). Les résultats obtenus chez l'olivier jusqu'à présent sont intéressants surtout envers certains cultivars comme : “Canino” (**Rugini et al., 1995**). “Dolce agogia”, “Leccino”, “Frantoio” et “Moraiolo” (**Rugini, 1988**), Cependant, il reste à développer certains aspects, en particulier les besoins nutritifs et hormonaux de l'embryon, de même que les conditions de survie et de développement des plantules issues de ces embryons.

La régénération de l'olivier via l'embryogenèse est rapportée par de nombreux travaux de recherche. La première induction de l'embryogenèse somatique de l'olivier a été obtenue en blessant les racines encore attachées à la plantule. Les cals produits, au niveau des zones de blessures, ont permis l'obtention d'embryons et la régénération de plantes entières (**Rugini et Tarini, 1986**).

C'est surtout l'emploi d'embryons zygotiques immatures comme explants qui semble présenter de bonnes aptitudes embryogènes chez l'olivier (**Rugini, 1988**). Selon ce même auteur, l'emploi d'embryons immatures de 70 jours, chez certains cultivars d'olivier, permet la production d'embryons somatiques sans le passage par la phase cal à hauteur de 70 % (pourcentage d'explants embryogènes) tandis que le reste induit la formation de cals embryogénique. Le succès de l'embryogenèse somatique par l'emploi d'embryons zygotiques est aussi rapporté par d'autres auteurs (**Orinos et Mitrakos, 1991 ; Mitrakos et al., 1992**).

Même l'usage d'embryons zygotiques murs, présente de potentialités embryogènes. Plusieurs auteurs comme **Leva et Petruccelli (1995) ; Leitao et Fevereiro (1998)** ont utilisé avec succès des embryons matures comme explants. Aussi Même, les tissus des semis et les

fragments de feuilles, de pétioles ou de racines, de certains cultivars ont donné des réponses favorables à l'embryogenèse somatique (**Rugini, 1988 ; Shibli et al., 2001**). L'emploi de cotylédons et d'hypocotyles de graines germées *in vitro* ont également permis une embryogenèse somatique (**Pritsa et Voyiatzis, 1999**).

Le nombre d'embryon produit par explant reste tributaire de l'origine de l'explant (proximale, moyenne et distale de la partie de l'embryon) et de la durée de culture sur milieu d'induction de cal (**Rugini et Caricato, 1995**).

Malgré les succès obtenus avec certains cultivars, l'embryogenèse somatique reste difficile à obtenir ou à généraliser sur l'ensemble des cultivars d'olivier qui demeurent très récalcitrants à ce processus morphogénétique.

Il existe cependant des tentatives pour améliorer l'embryogenèse de l'olivier. C'est l'exemple de la stratégie nommée «système de régénération à double» développée par **Rugini et Muganu (1998)** qui consiste à régénérer les premiers bourgeons adventifs de pétioles des feuilles de pousses *in vitro* en croissance, puis le repiquage des petites folioles dans un milieu approprié jusqu'à ce que les masses pro-embryonnaires apparaissent. De même, à partir des embryons somatiques primaires, il a été facile d'obtenir des embryons somatiques secondaires à partir de l'épiderme ou de la couche sous épidermique (**Lambardi et al., 1999**). Lorsque les embryons ont été obtenus de cette manière, le cycle de l'embryogenèse somatique peut être maintenu indéfiniment sur un milieu dépourvu d'hormones (**Benelli et al., 2001 ; Rugini et al., 2005**).

Par ailleurs, il y a lieu de signaler que les embryons somatiques produits ne sont pas toujours de qualité souhaitable. En effet, parfois les embryons somatiques obtenus présentent des malformations morphologiques (embryons monocotylés, polycotylés et parfois une masse sans forme distincte) qui ont des répercussions sur leur faculté germinative ou sur leur conversion en plantule. En effet, les embryons se différencient principalement de la surface de l'épiderme avec un origine principalement unicellulaire (**Lambardi et al., 1999**). La production en continu de cycles à long terme des embryons à partir de cellules de l'épiderme peut être un avantage important dans la régénération de plantes à partir des cellules transgéniques, parce qu'elle évite la formation de cals qui pourrait être une large source de variabilité génétique indésirable. Les plantes dérivées d'embryons somatiques produisent des fleurs 2-3 ans plus tard que les plantes micropropagées par stimulation des bourgeons axillaires.

En ce qui concerne la composition hormonale des milieux de culture, l'utilisation des auxines et des cytokinines dans l'induction de l'embryogenèse somatique semble variée en fonction de la nature des explants employés. Certains auteurs comme **Canas et Benbadis (1988)** ; **Cerezo et al. (2011)** ; **Orinos et Mitrakos (1991)** ont utilisé le milieu OM supplémenté avec 5 mg/l d'AIB et 0,6 mg/l de 2iP pour l'induction de cals embryogéniques à partir d'explant d'olivier. D'autres auteurs comme **Rugini et Tarini (1986)** rapportent l'obtention d'embryons somatiques à partir de racines et d'embryons immatures sur milieu MS avec 0,1mg /l d'ANA additionnée à 0,1 mg/l de BA.

Le saccharose est souvent apporté dans les milieux de culture induisant l'embryogenèse. Selon **Orinos et Mitrakos (1991)** ; **Mitrakos et al. (1992)** ; **Shiblî et al. (2001)**, les meilleurs résultats sont ceux obtenus avec l'addition de 36 g/l de saccharose suite à l'étude de l'effet de la nature des sucres sur l'induction embryogénique.

Chapitre 3. Principaux types de marqueurs génétiques et leur utilisation dans l'identification

L'olivier (*Olea europaea* L.) présente une variabilité génétique élevée avec plus de 2 600 cultivars décrits (Rugini et Lavée, 1992), bien que beaucoup d'entre eux pourrait être des synonymes et des homonymes (Ouazzani et al., 1996 ; Barranco et al., 2000). En outre le catalogue variétal mondial de d'olivier cultivé compte plus de 1 200 variétés (*Olea europaea* L.) (Bartolini et al., 1998). La pollinisation chez l'olivier est anémophile, induit facilement des croisements entre cultivars qui donnent lieu à une forte variabilité génétique (Zohary, 1994 ; Ouazzani et al., 1996 ; Mekuria et al., 1999).

Au fil des siècles, les oliviers ont été propagés, principalement par voie végétative, et sélectionnés sur la base de caractères quantitatifs et qualitatifs d'olive. Toutefois, cette procédure n'a pas empêché le croisement naturel entre les cultivars nouvellement introduits avec le matériel génétique local et l'apparition des mutations somatiques, qui ont contribué d'une manière considérable dans l'augmentation de la variabilité génétique (Belaj et al., 2006 ; Cordeiro et al., 2008 ; Martins-Lopes et al., 2009). En outre, le nombre élevé de cultivars d'olivier représente un défi énorme dans la gestion des collections de matériel génétique.

La certification à la fois du matériel végétal produit en pépinière et des huiles d'olive produites exigent une authenticité génétique et une traçabilité connue (Cipriani et al., 2002).

Toutefois, la diversité d'olivier sollicite de plus en plus d'intérêt notamment dans le domaine de l'agronomie, l'amélioration génétique, l'industrie agro-alimentaire et l'exploitation du génome de cette espèce (Caruso et al., 2011).

Traditionnellement, l'identification des variétés d'olivier a été réalisée par des descripteurs pomologiques fondés sur l'utilisation d'une série de marqueurs agronomiques et morphologiques. Cependant, l'identification des variétés en fonction des caractères morphologiques et agronomiques peut conduire à un degré d'erreur en raison de leur faible héritabilité (Hernandez et al., 2001 ; Mehri et Mehri-Kamoun, 2007 ; Hannachi et al., 2008). En outre, la reconnaissance des cultivars d'olivier basée sur ces caractères phénotypiques présente des insuffisances, en particulier pendant l'âge juvénile de l'arbre. De même, elle induit un faible polymorphisme qui est souvent lié à l'environnement et au stade de croissance de l'arbre (Tanksley et Orton, 1983 ; Mohan et al., 1997).

En raison, du niveau de diversité génétique observé dans le matériel génétique d'olivier et la présence d'homonymes et synonymes, ces approches ont été appuyées par des méthodes moléculaires qui ont été développées à la fin du 20^e siècle. En effet, la technique d'ADN fingerprinting basée sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR) représente une alternative aux descripteurs morphologiques utilisés pour l'identification variétale, puisque elle est indépendante de l'environnement et du stade de croissance et de développement de la plante (**Martins-lopez et al., 2009**).

De même, en raison de leur niveau de polymorphisme élevé et le pouvoir de discernement, les marqueurs moléculaires ont été utilisés comme un outil puissant pour la caractérisation des variétés d'olivier. Ces marqueurs moléculaires ont joué un rôle crucial pour la distinction, l'identification, la caractérisation et l'étude de l'origine de la diversité génétique chez l'olivier. En effet, différents marqueurs moléculaires ont été appliqués pour l'évaluation de la diversité génétique de l'olivier, comme les marqueurs « dominant par amplification aléatoire » de l'ADN (RAPDs) (**Trujillo et al., 1995 ; Belaj et al., 2003 ; Martins-Lopes et al., 2009**) et les marqueurs (ISSRs) « répétition inter simple séquence » (**Essadki et al., 2006 ; Martins-Lopes et al., 2009**). Les marqueurs co-dominants comme les microsatellites (SSRs) (**Rallo, 2001 ; Belaj et al., 2003 ; Sarri et al., 2006 ; Fendri et al., 2010 ; Dominguez-Garcia et al., 2012 ; Abdessemeda et al., 2015 ; Boucheffa et al., 2016**) et le (AFLP) « longueur des fragments amplifiés polymorphisme » (**Angiolillo et al., 1999 ; Montemurro et al., 2005 ; Grati-Kamoun et al., 2006 ; Ercisli et al., 2009**) ont été utilisés pour la caractérisation du matériel génétique de l'olivier.

Actuellement les marqueurs pomologiques et moléculaires sont utilisés conjointement pour établir une caractérisation complète et efficace des variétés d'olivier (**Trujillo et al., 2005**).

3.1. Marqueurs pomologiques

La caractérisation et l'identification des variétés d'intérêt agronomique comme pour l'olivier ont été basées traditionnellement sur l'utilisation de descripteurs pomologiques en utilisant un nombre considérable de caractères morphologiques et agronomiques (**Barranco et Rallo, 1984**).

Dans un premier temps, avant le début de l'utilisation systématique des marqueurs moléculaires pour l'identification et la caractérisation de l'olivier, **Pitton de Tournefort** fut le premier à mettre en évidence le classement de l'olivier en 1719. Par la suite, 18 différents

systèmes ont été proposés pour l'identification et la classification de l'olivier (**Barranco et Rallo, 1984 ; Prevost et al., 1993 ; Tous et Romero, 1993 ; Cantini et al., 1999 ; Barranco et al., 2000 ; Leva et Petruccelli, 2011**). Ces marqueurs sont sous l'influence de l'environnements donc leur utilisation adéquate nécessite un nombre élevé de répétitions dans l'espace et dans le temps (**Barranco et al., 2005**).

Par ailleurs, la caractérisation morphologique de l'olivier se base généralement sur des marqueurs avec une capacité de discrimination élevée et une faible dépendance des conditions environnementaux de l'année (**Rallo, 2005**). En effet, la technique de caractérisation devrait être à la fois rapide et économique, mais les méthodes d'identification utilisées pour la caractérisation morphologique des variétés d'olivier emploient un grand nombre de caractères de l'arbre, du rameau, de la feuille, des inflorescences, de fruit et de l'endocarpe (**Barranco et Rallo, 1984 ; Barranco et al., 2000**).

Actuellement, le Conseil Oléicole International (C.O.I.) utilise le système de classification variétale, décrit par **Barranco et Rallo (1984)**, qui renferme 28 caractères de l'arbre, feuilles, fruits et endocarpe. En outre, les marqueurs pomologiques sont acceptés par le IPGRI (www.ipgri.cgiar.org/index.htm), mais ils sont souvent renforcés par l'utilisation de marqueurs moléculaires (**Fendri et al., 2010 ; Belaj et al., 2011**). En effet, de nombreuses études ont été faites avec ces marqueurs (**Barranco et Rallo, 1984 ; Mendil et Sebil, 2006**).

Par ailleurs, un certain nombre d'auteurs préconisent l'utilisation des marqueurs pomologiques ou morphologiques pour mener à bien les travaux de prospection (**Barranco et Rallo, 1985 ; Cimato et al., 1993 ; Barranco et al., 2005**).

3.2. Marqueurs biochimiques (iso-enzymes)

La caractérisation par marqueurs iso-enzymatiques consiste à distinguer par électrophorèse les différentes formes d'une enzyme codée par différents allèles du même gène (**Soltis et Soltis, 1989**). Bien que le polymorphisme des peptides est connu par Allison depuis 1954, son application sur les végétaux n'a été mise en évidence que 35 ans après par **Torres (1989)** et **Weeden (1989)**.

L'électrophorèse des iso-enzymes, permet d'étudier les produits primaires de gènes de structure. En outre, la méthodologie pour le développement et l'utilisation de ce type de marqueurs est relativement simple, rapide et peu coûteuse (**Trujillo et al., 1995**).

Cette technique est particulièrement adaptée à l'identification variétale des espèces fruitières (**Torres, 1989 ; Weeden, 1989**). Ces marqueurs biochimiques sont les plus largement utilisés dans l'amélioration des plantes (**Bednorz et al., 2004**). De même, les iso-enzymes ont été largement utilisés pour l'identification variétale de l'olivier en raison du haut degré de polymorphisme, utilisant à la fois le pollen (**Rovira et Tous, 1995 ; Martin et Rallo, 2005 ; Trujillo et al., 2005**) et les feuilles (**Ouazzani et al., 1995 ; Seker et al., 2008**).

Cependant cette technique est soumise à certaines limites, notamment la difficulté de détecter certaines mutations et la nécessité d'utiliser un nombre élevé de marqueurs pour l'identification de clones ou de variétés apparentés (**Cheliak et Pitel, 1984 ; Liu et Furnier, 1993**). Ils sont considérés comme des marqueurs co-dominants permettant de distinguer les individus homozygotes et hétérozygotes. En outre, les iso-enzymes sont considérés comme des produits primaires de gènes et donc leurs motifs sont reproductibles et très peu affectés par les conditions environnementales (**Fendri, 2010**).

De tels marqueurs sont des produits de gènes, qui diffèrent phénotypiquement, peuvent avoir une expression différentielle en fonction des facteurs environnementaux et le type de tissus employés. Il a été démontré que de nombreuses espèces ont des systèmes d'iso-enzymes monomorphes, ce qui rend leurs applications impossible dans les programmes de sélection (**Domínguez-García, 2012**).

3.3. Marqueurs moléculaires

L'étude de la variabilité, qui existe au niveau des acides nucléiques dans les régions codantes ou non codantes, a permis de mettre en évidence les différences qui existent entre les génotypes (**Karp et Edwar, 1997**). En effet, l'emploi des marqueurs moléculaires (marqueurs à ADN) a donné la possibilité à l'utilisateur d'identifier avec certitude les variétés d'olivier sans recours à l'étude pomologique des autres caractères par l'emploi d'une petite quantité d'ADN, obtenue à partir d'un petit échantillon généralement de tissu de feuilles, indépendamment de l'âge, du stade de croissance de la plante et des conditions environnementales de l'année. Ces marqueurs ont démontré une grande utilité dans l'étude de la diversité génétique au niveau intra-spécifique et inter-spécifique (**Karp et Edwar, 1997**).

Plusieurs techniques existent actuellement pour réaliser une caractérisation moléculaire. Parmi ces techniques nous citons : **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism), **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA), **AFLP** (Fragment Length Polymorphism Amplified), **SCARs** (Sequence Caractérisé Amplified Region) ; **SSRs** (Séquence simple

Répète); **ISSR** (Inter Simple Sequences Répétitions), **SNPs** (Single Nucleotide Polymorphism) et **DArTs** (Array diversité Technology).

3.3.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Les marqueurs RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) fut les premiers marqueurs d'ADN utilisés à partir des années 80 qui ont permis de détecter des différences par l'intermédiaire de l'utilisation des enzymes de restriction. Ces enzymes agissent en coupant l'ADN et par la suite l'hybridation avec des sondes spécifiques qui permet d'obtenir une disposition particulière pour chaque génotype après migration sur gel (**Mohan et al., 1997**).

Plusieurs auteurs rapportent l'application de cette méthode avec succès pour évaluer la variabilité génétique sur l'olivier en utilisant de l'ADN de différentes origines. Bien que, la première application de ces marqueurs sur cette espèce fut signalée par (**Amane et al., 1999**). Ces auteurs ont pu évaluer la variation génétique et la relation entre 89 vieux arbres d'olivier et 101 oléastres, cultivés autour du bassin méditerranéen, en utilisant l'ADN cytoplasmique.

Une approche similaire a été utilisé au Maroc pour étudier la variation de l'ADN des chloroplastes dans l'olivier sauvage et cultivé qui a révélé la présence de quatre chlorotypes distincts (**Amane et al., 1999**). Certains auteurs comme **Besnar et al. (2001)** ont utilisé de l'ADN ribosomale pour distinguer entre les variétés cultivés et l'olivier sauvage ainsi, que la détermination de l'époque de divergence génétique entre les différents taxons de l'espèce *Olea europaea* L.

Par ailleurs, les types de RFLPs les plus utilisés sont les mitochondriales (**Besnar et al., 2007**). Bien que ces marqueurs ont l'avantage d'être co-dominant mais présentent certaines contraintes qui limitent leur utilisation à savoir : un faible polymorphisme, un nombre limité d'allèles par locus, un important temps, des réactifs radioactifs ou toxiques, une grande quantité d'ADN génomique de haute qualité et des informations préalables sur la séquence de l'amorce avant la génération de la sonde, ce qui induit une complexité ou difficulté dans l'application de cette technique (**Agarwal et al., 2008**).

3.3.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Les RAPDs ont été les premiers marqueurs à base d'ADN développés simultanément dans deux laboratoires différents à la fois en 1990 par **Williams et al. (1990)** et **Welsh et McClelland (1990)**. Ces marqueurs basés sur l'amplification par PCR de segments d'ADN

aléatoires, en utilisant des amorces uniques de la séquence nucléotidique arbitraire ou semi arbitraire de 10 paires de base (**Williams et al., 1990 ; Paran et Michelmore, 1993**). Les fragments d'ADN amplifiés, se sont révélés très utiles pour la construction de cartes génétiques. En outre, les polymorphismes présents sont détectés par électrophorèse des différents fragments d'ADN. Ces derniers sont générés lorsque les amorces utilisés habituellement avec de multiples sites analogues dans différentes régions du génome, produisant de multiples produits amplifiés, qui contiennent souvent des séquences d'ADN répétitives (**Paran et Michelmore, 1993**).

Selon **Agarwal et al. (2008)**, cette méthode présente certains avantages comme : la non nécessité d'une connaissance préalable de la séquence d'ADN ; la simplicité de la méthode qui utilise un nombre limité d'amorces avec une faible quantité d'ADN (nano grammes), comme elle est non coûteuse. Cependant, comme les marqueurs dominants, elle présente quelques contraintes tels qu'une faible reproductibilité entre les laboratoires. Ce type de marqueurs a été appliqué dans l'étude des ressources génétique d'un nombre important d'espèces d'intérêt agronomique (**Hormanza, 1996**).

La première étude ayant utilisée les RAPDs pour évaluer le polymorphisme génétique de l'olivier a été rapportée par (**Bogani et al., 1994**). Plusieurs auteurs, confirment l'efficacité de cette technique dans la détection d'un haut degré de variabilité génétique au sein des différents cultivars étudiés (**Fabbri et al., 1995 ; Belaj et al., (2002, 2004, 2006) ; Martins-Lopes et al., 2007 ; Cordeiro et al., 2008**).

Les variétés d'olivier sont des variétés de population présentant une diversité intra-variétale ou clonale. L'application des marqueurs RAPDs a permis la détection de cette diversité clonale par la révélation de l'existence de polymorphisme intra-variétale sur trois variétés portugaises (**Gemas et al., 2000**). La même technique a permis de caractériser et de sélectionner sur une variété turque, six importants clones d'olivier à l'huile (**Kockar et Ilkci, 2003**). De plus, des études similaires ont été réalisées sur deux autres variétés d'olivier portugaises, 'Verdeal-Transmontana' (**Gomes et al., 2008**) et 'Cobrançosa' (**Martins-Lopes et al., 2009**).

Par ailleurs, ces marqueurs ont été utilisés pour les études de conformité génétique ou phyllogénétique (**Hess et al., 2000 ; Bronzini de Caraffa et al., 2002 ; Leva et al., 2006**). **Bottalico et al. (2009)** et **Leva et Petruccelli (2012)**, en utilisant la technique de RAPD ont confirmé l'absence de variation somaclonale au sein de plantes micropropagées du cultivar "Maurino", obtenues suite à un cycle de 12 repiquages de prolifération d'une durée de 45

jours sur milieu MSM. De même, ces marqueurs ont été utilisés pour l'élaboration des premières cartes de linkage (**De la Rosa et al., 2003**).

3.3.3. AFLP (Fragment Length Polymorphism Amplified)

Le principe de l'AFLP est basé sur l'amplification sélective de fragments obtenus dans la digestion de l'ADN génomique avec des enzymes de restriction (**Zabeau et Vos, 1993**). Cette technique, comprend trois étapes (**Vos et al., 1995**) : préparation du modèle, amplification de fragment et analyse de gel.

Les modèles d'empreintes sont obtenus par détection de fragments de restriction génomiques amplifiés par PCR. Cette technique est plus complexe que la technique de RAPDs, du fait qu'il est nécessaire d'effectuer la digestion de l'ADN génomique totale, en utilisant deux enzymes de restriction. Par la suite, plusieurs bandes sont générées correspondant à des fragments de différentes origines de génome déterminé par les enzymes de restriction utilisés, qui peuvent être séparés par des gels d'acrylamide dans des conditions de dénaturation ou par électrophorèse capillaire.

Pour générer ces marqueurs, la connaissance préalable de l'amorce n'est pas nécessaire, ils sont dominants et ne sont pas transférables, comme dans le cas de RAPDs, mais ils permettent la génération d'un grand nombre de marqueurs avec quelques réactions (**Agarwal et al., 2008**).

Les marqueurs AFLPs présentent un grand polymorphisme, ils sont capables de discriminer les individus avec beaucoup de similitude génétique. Cependant, il existe un nombre illimité d'AFLPs. En outre, ces marqueurs dominants présentent certains inconvénients tels, ils génèrent des coûts élevés de l'analyse et l'ADN doit être en plus grande quantité et de pureté très élevée.

L'AFLPs a été largement utilisée pour sa fiabilité et son efficacité dans les études de la diversité génétique (**Ercisli et al., 2009**). Ce type de marqueur a été utilisé pour étudier la variation intra-variétale pour deux variétés espagnoles "Arbequina" et "Manzanilla de Seville" (**Belaj et al., 2004**). De même, des travaux similaires pour l'étude de la variation inter et intra variétale d'olivier espagnole ont été effectués par **Martin et Rallo (2005)**, ainsi que pour l'évaluation des relations génétiques entre les cultivés dans la Méditerranée orientale (**Owen et al., 2005**). En outre, ils ont été utilisés pour l'identification variétale à travers le monde (**Angillillo et al., 2006 ; Grati-Kamoun et al., 2006**), en effet, 47 variétés espagnoles ont été identifiées.

3.3.4. SCARs (Sequence Caractérisé Amplified Region)

Cette technique a été introduite par **Michelmore et Parân (1993)**. Elle se base sur l'amplification d'une séquence connue à l'aide d'amorces plus longues (20 bases). Bien qu'ils puissent provenir d'un fragment obtenu par RFLPs, RAPDs ou AFLPs lesquelles ils ont été clonés et séquencés précédemment et qu'ils vont concevoir des amorces hautement spécifiques.

Contrairement aux RAPDs les marqueurs SCARs ont l'avantage d'être hérité d'une façon co-dominante (**Mohan et al., 1997**). Ce type de marqueurs a été appliqué pour l'évaluation du matériel génétique d'olivier et dans la cartographie (**Bautista et al., 2003 ; Busconi et al., 2006**). Ces marqueurs ont été largement utilisés également pour la sélection assistée par marqueurs des plantes à intérêt agronomique telles que le blé (**Hernández et al., 1999**), la vigne (**Vidal et al., 2000**), le poirier (**Lee et al., 2004 ; Marieschi et al., 2011**) et l'olivier (**Mekuria et al., 2002**). En effet, les même auteurs, ont révélé des relations entre ces marqueurs et les caractéristiques du fruit ainsi que l'association avec la résistance à certains champignons pathogènes (**Hernandez et al., 2001**).

Dans les processus de certification des vergers et des régions, cruciales pour la dénomination d'origine protégée (AOP), il y a un besoin urgent de méthodes précoces et efficaces capables de discriminer et identifier les cultivars d'olivier. En outre, ces marqueurs spécifiques peuvent également être utiles dans l'industrie d'olive afin d'éviter l'huile d'olive fraudée (adultération) qui affecte la qualité de l'huile et garantir sa traçabilité (**Pafundo et al., 2007 ; Marieschi et al., 2011**).

3.3.5. SSRs (Séquence simple Répète)

Les séquences simples répétitives (SSRs) sont des motifs répétés en tandem le long de l'ADN (**Hamada et al., 1982**). Ce sont des segments d'ADN composés d'un à six paires de bases (**Jeffreus et al., 1985**) répétés plusieurs fois, et sont présents dans les génomes de plusieurs organismes supérieurs (**Wu et Tanksley, 1993**). Ces séquences peuvent entraîner, un polymorphisme entre les individus afin de modifier le nombre de répétitions et générer des fragments amplifiés de différentes longueurs.

Le développement de ces marqueurs moléculaires nécessite une connaissance préalable de la séquence d'ADN particulière dans la région flanquante. Normalement, les microsatellites sont non-codants et jouent un rôle dans la régulation de gènes (**Hamada et al., 1982**) ou

agissent en tant que signaux dans le processus de conversion génique et la recombinaison (**Jeffreus et al., 1985**).

Les SSRs peuvent être des motifs de di-, tri-, tétra ou penta-nucléotide, et peuvent même être plus complexe (**Powell et al., 1996**). Toutefois, ces marqueurs de di-nucléotides sont plus abondants dans le génome (comme ex le motif AG/CT), mais ils sont difficiles à interpréter, par conséquent, ils ont besoin d'un système de réparation efficace de leur allèles pour éviter une identification erronée (**Amos et al., 2007**).

Comparativement aux marqueurs RAPDs ou AFLPs, les SSRs ont l'avantage d'être co-dominant. Toutefois, le principal inconvénient de ces derniers réside dans le travail qui est très coûteux et la nécessité de développer des amorces. Cependant, ces marqueurs sont largement utilisés dans les études génétiques de l'olivier, car ils sont polymorphiques avec une reproductivité très élevée.

La technique SSR est considérée comme un outil de confiance pour l'identification et la caractérisation variétale de l'olivier. En effet, des locus de microsatellites ont été isolés à partir d'olivier (**Sefc et al., 2000 ; Carriero et al., 2002 ; Cipriani et al., 2002 ; Diaz et al., 2006**) et sont utilisés soit seul soit en combinaison avec d'autres marqueurs moléculaires pour la caractérisation des variétés de cette espèce.

Les SSRs, ont montré leur efficacité dans les études de caractérisation de divers collections de germoplasmes d'olivier (**Rallo et al., 2000 ; Khadari et al., 2003 ; Belaj et al., 2004 ; Montemorru et al., 2005 ; Baldouni et al., 2006 ; Khadari et al., 2008 ; Dominguez-Garcia et al., 2012 ; Abdessemed et al., 2015 ; Boucheffa et al., 2016**).

Pour cette espèce, ces marqueurs ont été utilisés pour d'autres fins, tels que : la discrimination des cultivars (**Sarriet et al., 2006 ; Fendri et al., 2010**), l'étude de la génétique de population (**Breton et al., 2008**), l'étude des relations génétiques entre olive cultivée et sauvage (**Breton et al., 2006 ; Belaj et al., 2010**), la construction de cartes de liaison (**De la Rosa et al., 2003 ; Khadari et al., 2010**), l'étude de paternité (**De la Rosa et al., 2004 ; Diaz et al., 2007**), l'identification de la composition d'huile de variétés (**Montemorru et al., 2005**), la sélection assistée par marqueurs des études d'empreintes digitales (**Cipriani et al., 2002 ; De la Rosa et al., 2004 ; Rallo et al., 2002**) et l'analyse de la variabilité génétique du processus d'induction de l'embryogenèse somatique (**Lopes et al., 2009**).

Suite aux différentes études réalisées sur l'olivier, une base de données contenant une liste consensuelle des profils SSRs pour le génotypage d'olivier a été construite. Cette plate

forme permettra la comparaison des résultats entre les laboratoires, afin d'établir une base de données commune (**Baldoni et al., 2009**). Ce travail a permis de recommander 11 SSRs sélectionnés pour l'utilisation dans un système universel d'identification et de caractérisation variétale de l'olivier.

Des auteurs comme **Mariotti et al. (2011)** et **Carimi et al. (2011)** ont identifié des régions de SSR chloroplastidiales sur olivier qui peuvent être utilisés comme marqueurs capable de faire une discrimination entre les variétés.

3.3.6. ISSR (Inter Simple Sequences Répétitions)

Cette technique a été introduite par **Zietkiewicz et al. (1994)**. Elle est basée sur l'amplification des régions 200-2000 paires de bases conçues à partir des microsatellites rapprochées orientées inversement, entre 10 et 60 fragments, sont séparés sur un gel d'électrophorèse. Les ISSRs ont été développés pour pallier à certains inconvénients associés aux différents marqueurs cités au-dessus, comme la faible reproductibilité des RAPDs, le coût élevé de AFLPs, et la nécessité de connaître les séquences adjacentes des amorces développées pour SSRs (**Zietkiewicz et al., 1994 ; Terzopoulos et al., 2005**). En effet, ces marqueurs montrent la spécificité des microsatellites, mais ils n'ont besoin d'aucune information de séquence pour la synthèse de l'amorce.

Les ISSRs seuls ou en combinaison avec d'autres systèmes de marqueurs, ont été largement utilisés pour analyser la variation clonale et la variabilité génétique des cultivars d'olivier (**Gemas et al., 2004 ; Gomes et al., 2008 ; Martins Lopes et al., (2007, 2009) ; Terzopoulos et al., 2005**).

Par ailleurs, des études ultérieures, ont conclu que les marqueurs ISSRs sont efficaces dans l'évaluation des relations génétiques de l'espèce *Olea europaea*. L (**Hess et al., 2000 ; Vargas et al., 2001 ; Gemas et al., 2004**). En outre, ces marqueurs ont été utilisés pour distinguer 10 variétés italiennes à partir de l'ADN extraite de fruit d'olivier (**Pasqualone et al., 2001**) et d'étudier la variabilité intra-variétale de 201 accessions de 11 cultivars portugais (**Gemas et al., 2004**). Toutefois, l'utilisation simultanée des ISSRs avec d'autres marqueurs tels que RAPDs a rendu possible la discrimination entre 30 cultivars portugais et 8 cultivars d'olivier étrangères (**Martins-Lopes et al., 2007**) et des études phénologiques des plantes obtenus par la technique *in vitro* (**Leva et al., 2002 ; García-Ferriz et al., 2003 ; Leva et al., 2006 ; Bottalico et al., 2009 ; Caruso et al., 2011 ; Leva et Petrucci, 2012**).

3.3.7. SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)

Les polymorphismes nucléotidiques simples ce sont des marqueurs provoqués par des variations de nucléotide unique de la séquence d'ADN. Ces variations peuvent être des insertions ou délétions affectant une seule paire de base comme, ils peuvent être également des substitutions d'un nucléotide par un autre différent. En effet, la détection de ces variations au niveau d'une base nucléotidique unique dans le génome permet de différencier les individus. De telles, variations sont présentes en abondance dans les génomes des organismes supérieurs (**Agarwal et al., 2008**). En raison de son abondance le long du génome, ainsi que la nécessité de développer des marqueurs de haute performance, il peut être l'un des systèmes d'identification utilisés.

Les SNPs ont été utilisés dans de nombreuses espèces végétales, contrairement chez l'olivier et en raison du génome inconnu de cette espèce, cette technique n'a pas été largement appliquée. La première application de SNPs sur olivier a été rapportée par **Reale et al. (2006)**, pour 65 génotypes d'olivier d'origine Européen et d'autres d'Australie, ont permet de mettre en évidence une nette discrimination pour 77 % des cultivars employés. Par la suite, d'autres études avec de nouveaux SNPs ont été réalisés (**Muleo et al., 2009 ; Santos Macedo et al., 2009 ; Hakim et al., 2010**).

3.3.8. DArTs (Array diversity Technology)

C'est un procédé d'analyse de polymorphisme de l'ADN fut appliqué pour la première fois par **Jaccoud et al. (2001)** sur le riz, bien qu'il a été appliqué à plus de 60 espèces (www.diversityarrays.com).

Généralement, ce type de marqueurs, présente certains avantages pour l'analyse génétique comparant aux autres marqueurs cités précédemment. Il offre un faible coût, une haute performance et un système robuste de référence (**Jaccoud et al., 2001**).

Les marqueurs DArTs n'ont pas besoin d'avoir une connaissance préalable de la séquence ADN, offrant donc une alternative intéressante pour l'olivier. En effet, cette technologie a été appliquée avec succès dans différentes espèces à intérêt agronomique telles que l'avoine (**Tinker et al., 2009**), la banane (**Risterucci et al., 2009**), le seigle (**Bolibok-Bragoszewska et al., 2009**), le soja (**Mace et al., 2008**). Cette technique a été appliquée avec succès sur les espèces ligneuses afin d'étudier la variabilité génétique, la cartographie, la détection de gènes et la sélection assistée par marqueurs chez l'Eucalyptus (**Sansaloni et al., 2010**).

Chapitre 4. Conformité génétique des vitro-plants d'olivier

La micropropagation ne peut être une technique à haute valeur commerciale que si elle assure le respect morphologique, productive et moléculaire des plantes produites, par rapport à la plante mère originale (**Caruso et al., 2011**). Lorsque cette condition est satisfaite, la micropropagation permet d'augmenter la productivité, la durabilité et la compétitivité internationale de ce système par rapport aux autres techniques de multiplication appliquées par les pépiniéristes oléicoles. Cependant, selon ce même auteur, la micropropagation ou plus généralement la culture *in vitro* de tissus, comme largement rapporté dans la littérature, peut produire des plantes indésirables ou variants, qui ne sont pas identiques à la plante mère d'origine. Ces variants peuvent parfois présenter des caractères intéressants susceptibles d'être utilisés et exploités en amélioration génétique.

La diversité entre les plantes produites par rapport à la plante mère, peut être le résultat de variations génomiques qui sont établies au cours de la culture *in vitro*, ce qui donne naissance à des plantes "hors-types", généralement appelées variation "soma-clonale".

Il existe plusieurs facteurs qui contribuent à la régénération des variantes soma clonales parmi les plus étudiées sont : la sélection des explants initiaux ; le nombre excessif de subcultures menées pour maximiser le niveau de la production de plantes ; la présence de doses élevées de régulateurs de croissance... etc.

D'une manière générale les plantes micropropagées, via le microbouturage, présentent rarement des variations somaclonales. En effet, selon l'étude menée par **Bottalico et al. (2009)** ; **Leva et Petruccelli (2012)** dans le but de fournir une réponse claire sur la fidélité des plantes micropropagées du cultivar Maurino obtenu par un cycle de 12 repiquages de la prolifération d'une durée de 45 jours sur milieu MSM (**Leva et al., 1995**) cultivées sur le terrain et par rapport aux plantes du même cultivar, multiplié par bouturage. La comparaison des deux groupes de plantes (celles issues de microbouturage et du bouturage) ne montre aucune différence pour les 23 caractères végétatifs et productifs.

L'utilisation des techniques moléculaires telles les RAPDs ; RFLPs ; ISSRs et SSRs pour l'évaluation de la conformité génétique des plants d'olivier constitue des outils fiables pour l'étude phénologique des plantes obtenues par la technique *in vitro*. En effet, de nombreux auteurs montrent à travers des études moléculaires (RAPDs ; ISSRs) l'efficacité de la micropropagation (via le microbouturage) quant au maintien de la conformité génétiques des plants régénérés (**García-Ferriz et al., 2003** ; **Leva et Petruccelli, 2002** ; **Leva et Petruccelli, 2012**).

III.. MATERIEL ET METHODES

1. Micropropagation de l'olivier

1.1. Objectif du travail

L'objectif global visé par la présente étude consiste à tester les aptitudes de régénération *in vitro* de l'olivier (*Olea europaea* L.) via le microbouturage. Nous envisageons surtout lors de cette étude de parvenir à établir un protocole expérimental efficace permettant d'optimiser le taux de régénération par la technique de microbouturage, en combinant trois principaux facteurs connus pour leurs influences sur ce processus morphogénétique à savoir : la composition du milieu de base, la composition hormonale des milieux et l'effet du génotype.

L'étude a été menée avec deux sous espèces d'olivier (*Olea europaea* L.) à savoir : la subsp *laperinei* (avec deux génotypes, une diploïde et l'autre triploïde) et la subsp *sativa* (comportant les variétés cultivées : Chemlal, Sigoise, Ferkani et Blanquette de Guelma).

L'essentiel des expériences ont été réalisées au sein du laboratoire central de l'institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne (ITAFV) à Tessala El Merdja (Alger), durant la période de 2010 à 2012 et poursuivie par la suite, dans le laboratoire de l'université Hassiba Ben Bouali de Chlef.

Les essais préliminaires ont été conduits principalement sur la variété Chemlal puis élargi aux autres variétés. L'olive de Laperrine a été étudiée séparément.

1.2. Matériel végétal

1.2.1. Conditions d'obtention et de culture des plantes mères

Les plantes mères ayant servi au prélèvement du matériel végétal utilisé, lors de cette étude, appartiennent à deux sous espèces distinctes d'olivier (*Olea europaea* L.) à savoir : la subsp *sativa* représentée par quatre variétés autochtones cultivées (la Chemlal, la Sigoise, la Ferkani et la Blanquette de Guelma) et la subsp *laperinei* représenté par deux génotypes un diploïde et un autre triploïde. Toutes les plantes mères sont âgées de 3 à 4 ans.

Les quatre variétés autochtones sont cultivées en hors sol, multipliées à partir de la collection oléicole nationale de la Ferme de démonstration de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAF) de Takreitz à Sidi Aich (Béjaia), maintenues

sous serre au sein du laboratoire central de Tessala El Merdja. Les pieds mères, élevées en serre, sont cultivées dans des conteneurs de capacité de 10 litres sur un substrat constitué de tourbe (1/3), de terre franche (1/3) et (1/3) de sable et de marc de raisin, fertilisé par un engrais NPK de type 15, 15, 15. Les plants ont été maintenus sous une photopériode constante de 16/8h, la lumière est assurée grâce à un éclairage de 10 W/m². La température minimale a été de 18 ± 2 °C tandis que la maximale été de 30 ± 2°C.

Les plantes mères de l'olive de Laperrine sont cultivées dans la même ferme de l'ITAF sous les mêmes conditions seulement les pieds mères, élevés en serre, sont cultivés en conteneurs de capacité de 25 litres, provenant de la région de Tanaouatine, du nord-est de Tamanrasset, du parc national d'El Ahaggar. C'est suite à une sortie d'étude et de prospection à Tamanrasset effectuée par le personnel technique de l'ITAF, que des rameaux ligneux des arbres d'olivier de Laperrine ont été récoltés, découpés à environ 10-15 cm de longueur avec deux feuilles et ensuite transplantés sous mit-système pendant 3 mois afin de produire des pieds-mères utilisés pour l'établissement de la culture *in vitro*.

1.2.2. Préparation et mise en culture du matériel végétal:

Selon les recommandations de nombreux auteurs **Boulouha (1981) ; Margara (1989) ; Zryd (1988) ; Vidalis et al. (1989)**, le choix de l'emploi d'un matériel végétal juvénile, comme explant, lors des manipulations relevant de la micropropagation, est plus que souhaitable à cause des bonnes performances qu'il présente, à cause des faibles quantités de composés phénoliques qui stoppe ou ralentit la croissance.

Pour l'obtention d'un matériel végétal jeune et performant nous étions amenés à pratiquer une taille sévère sur notre matériel végétal de base (plantes-mères). Cette taille est appelée aussi taille de rajeunissement *in vivo*, préconisée par **Roussos et Pontikis (2002)** et **Peixe et al. (2007)**, permet d'obtenir des rejets ou des pousses juvéniles herbacées nouvellement formées. Les plantes mères taillées sont cultivées en pots dans un environnement contrôlé sous serre, irrigués, fertilisés et traités de façon appropriée pour le contrôle des principaux insectes et agents pathogènes. Pour accélérer le débourrement de nouveaux bourgeons axillaires et la formation de nouvelles pousses, nous avons forcé les plants en les arrosant par une solution nutritive (KNOP) (tableau 4) à raison d'une fois par semaine et cela pendant trois mois avant la phase d'établissement de la culture *in vitro* (figure 9).



Figure 9. Forçage des plants d'olivier : (A) Variétés autochtone(Chemlal, Sigoise ,
Blanquette de Guelma et Ferkani , (B) Olive de Laperrine avec 2genotypes

Tableau 4.Composition minérale du milieu nutritif de KNOP

Sels minéraux	Formule chimique	Quantité/litre
Nitrate de calcium	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,00 g
Nitrate de potassium	KNO_3	0,25 g
Sulfate de magnésium	MgSO_4	0,25 g
Phosphate mono potassique (dihydrogénophosphate de potassium)	KH_2PO_4	0,25 g
Sulfate ferrique (sulfate de fer (III))	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	1,00 mg
Eau distillée	H_2O	1000 ml

1.2.3. Techniques de culture

Lors de cette étude, la régénération par microbouturage du matériel végétal utilisé nécessite le passage par quatre phases de culture *in vitro* à savoir :

- Phase d'établissement de la culture,
- Phase de multiplication et élongation,
- Phase d'enracinement
- Phase d'acclimatation ou d'accoutumance.

Aux cours de cette étude, les premiers essais ont été menés uniquement sur la variété Chemlal concernant les variétés cultivées

1.2.3.1. Phase d'établissement de la culture

Un essai préliminaire a été effectué uniquement sur la variété Chemlal en testant trois différents milieux de culture de base : milieu d'olivier OM (**Rugini, 1984**) ; MS (**Murashige et Skoog, 1962**) et MSM (Murashige et Skoog modifié par **Leva et al., 1995**) (tableau 3). Durant cette phase ces trois milieux de base ont été additionnés à quatre types de cytokinines ; la Zéatine (ZEA), 6-benzyladénine (BA), 6 furfurylaminopurine (KN) et le Thidiazuron (TDZ), avec quatre niveaux de concentration de ZEA et BA (2,3 ; 4,6 ; 9,2 et 18,4 μM) de KN (3,49 ; 6,98 ; 13,96 et 27,92 μM) et de TDZ (0,45 ; 0,9 ; 1,8 et 3,6 μM).

Un deuxième essai a été élargi sur les trois autres variétés Sigoise, Ferkani et Blanquette de Guelma, en testant le milieu qui a présenté les meilleurs résultats chez la variété Chemlal à base de MSM additionné de la ZEA.

Un troisième essai a été mené séparément sur l'olive de Laperrine, en testant les mêmes milieux additionnés à deux cytokinines BA et ZEA avec les mêmes niveaux de concentrations utilisées dans l'essai préliminaire.

Tous les milieux testés ont été additionnés avec 36 g l⁻¹ de mannitol et 7 g l⁻¹ d'agar, le pH a été ajusté à 5,8 avec une solution de NaOH (1N), stérilisés par autoclavage à une température de 121°C et une pression de 1 bar pendant 20 minutes. Après autoclavage, les milieux ont été complétés avec les différentes cytokinines stérilisées par filtration. Les milieux sans hormones servent comme témoins.

Les milieux stérilisés sont ensuite distribués sous hotte à flux laminaire horizontale en fraction de 20 ml dans des boîtes de Pétri stériles pour la phase d'établissement de la culture.

Des boutures herbacées de 10 à 15 cm des cinq géotypes étudiés sont prélevées à partir des pieds-mères à l'aide d'un ciseau stérile, sont mises après dans un sachet en plastique transparent.

Pour l'établissement de la culture *in vitro*, ces boutures herbacées (figure 10) sont rincées pendant 5 minutes à l'eau courante. Découpées en portions de 3 à 4 cm, mises dans des bocaux, lavées avec de l'eau distillée contenant deux gouttes de Tween 20 et de l'eau javel (12°) pendant 5 minutes, lavées trois fois avec de l'eau distillée pendant 15 min et trempées dans de l'eau distillée stérile pendant 30 min.



Figure 10. Désinfection du matériel végétal : (A) Prélèvement de pousses, (B) Mise en sachet, (C) Feuilles découpées à environ 3 mm du pétiole, (D) Lavage des pousses, (E) Pousses immergées dans de l'eau distillée stérile, (F) Désinfection des pousses sous hotte à flux laminaire horizontale.

Les portions de tiges ont été désinfectées sous hotte à flux laminaire horizontale avec du chlorure de mercure (HgCl_2) à raison de $0,667\text{g l}^{-1}$ (Rugini, 1984) pendant 3 min suivie de cinq rinçages avec de l'eau distillée stérile pendant 15 minutes.

1.2.3.2. Phase de multiplication et élongation

Au bout de 30 jours, les explants ayant survécu à la phase d'établissement de la culture sont maintenus dans les mêmes conditions de culture mais transférés dans des flacons en verre de 250 ml contenant 50 ml des milieux de culture correspondant à raison de 5 explants par flacon. Ces milieux sont soit additionnés aux hormones de croissance correspondantes ou non (figure 11). Les mêmes milieux de la phase de multiplication ont été testés pour la phase d'élongation pendant 30 jours



Figure 11. Multiplication des pousses : (A) Explants débourrés après 30j de culture,
(B) Subculture contenant cinq explants débourrés.

1.2.3.3. Phase d'enracinement

Des vitro-plants en phase d'élongation provenant des explants cultivés pendant au moins trois mois de culture sur MSM supplémenté avec $9,2 \mu\text{M}$ de ZEA ont été excisés individuellement et utilisées pour l'enracinement *in vitro*. En effet, des pousses individuelles ont été excisées ainsi que l'élimination des deux feuilles basales, ont été mises dans des tubes à essais contenant 20 ml de milieu de culture $\frac{1}{2}$ MSM, 20 g l^{-1} de saccharose et 2,7 ; 5,4 ; 10,7 ou $21,5 \mu\text{M}$ de l'Acide 1-Naphtalène Acétique (ANA) ou l'Acide Indole-3-Butyrique (AIB) à 2,4 ; 4,8 ; 9,8 ou $19,7 \mu\text{M}$ stérilisés de la même manière que celle de la phase d'élongation pendant cinq jours dans l'obscurité (Rugini et al., 1987), puis transféré à la lumière sur le même milieu complété par $2,3 \mu\text{M}$ de ZEA (Rugini et Baldoni, 2005). Les explants ont été cultivés dans des tubes à essais et incubés dans les mêmes conditions décrites ci-dessus

La phase d'enracinement est une étape de culture qui permet l'initiation et le développement des racines sur les pousses nouvellement régénérées. Les milieux de culture employés, lors de cette phase, se composent du milieu de base MSM, dilué de moitié, et supplémenté des trois régulateurs de croissance suivants : de la ZEA (apportée uniquement à la dose de $2,3 \mu\text{M}$), de l'AIB et de l'ANA, auxines apportées respectivement aux doses de (2.4 ; 4.8 ; 9.8 ; $19.7 \mu\text{M}$) et de (2.7 ; 5.4 ; 10.7 ; $21.5 \mu\text{M}$).

1.2.3. 4. Phase d'acclimatation

Les vitro-plants enracinés sont acclimatés au minimum deux mois après la phase d'enracinement, débarrassés de la gélose, lavés avec de l'eau du robinet et repotés en pots en plastique de 70 x 70 mm contenant un mélange de substrat de 2/3 de tourbe et 1/3 de perlite, stérilisé à 180° C pendant 2 heures (figure 12).



Figure 12. Pré acclimatation et élevage des plantules (phytotron)

1.2.4. Conditions et suivis des cultures

Au cours de la phase d'établissement de la culture *in vitro*, la mise en culture se déroule dans des conditions d'asepsie totale sous hotte à flux laminaire horizontale. Tous les instruments utilisés sont préalablement stérilisés à sec à 180° C pendant 2 heures. Après désinfection de toute la surface de travail à l'alcool 70°, les restes de feuilles sont éliminés et les pousses sont découpées en segments de 1 à 1,5 cm contenant deux bourgeons axillaires symétriques. Les explants bi-nodaux sont cultivées dans des boîtes de Pétri (90 mm) contenant 15 ml des trois milieux de base (figure13).

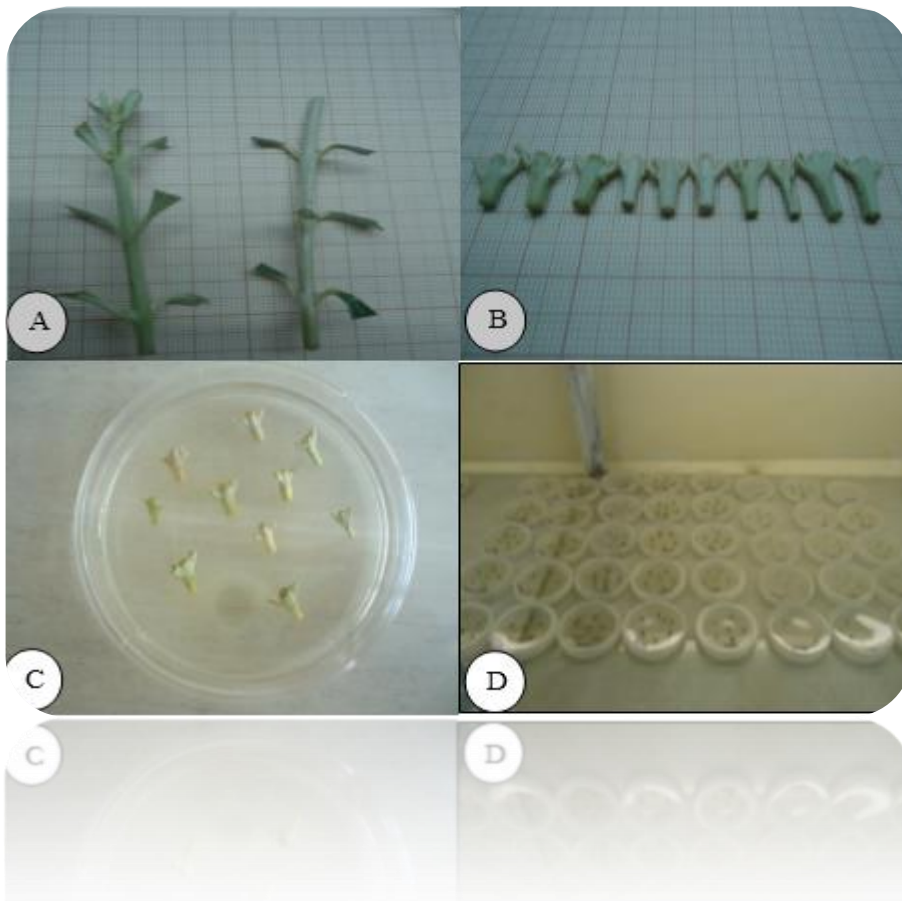


Figure 13. Etablissement de la culture : (A) Deux boutures désinfectées, (B) Dix explants contenant chacun deux bourgeons axillaires, (C) Mise en culture des dix explants dans le milieu de culture, (D) Dépôt des boîtes de pétri dans la chambre de culture.

Après la mise en place des explants, les boîtes de Pétri sont scellées avec du parafilm et déposées dans la chambre de culture à une température de 25 ± 2 °C et à une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. L'éclairage de $60 \text{ umol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ est fourni par des tubes fluorescents de 18 W Osram blanc froid.

Au bout de 30 jours, les explants débouffés non contaminés sont transférés dans des bocaux en verre de 250 ml contenant 50 ml des milieux de culture correspondants à raison de 5 explants par flacon, maintenus dans les mêmes conditions de culture contrôlées citées précédemment (figure 14).

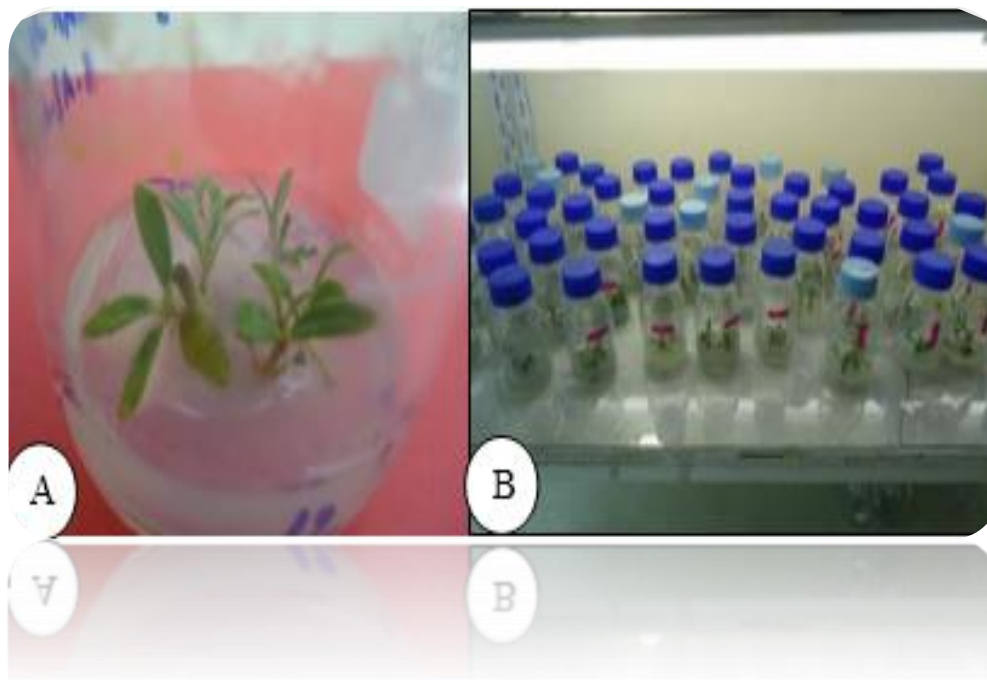


Figure 14. Elongation des pousses : (A) Flacon contenant cinq explants débourés, (B) Dépôt des flacons dans la chambre de culture.

Les pousses à croissance active provenant d'explants cultivés pendant au moins trois cycles de multiplication sur MSM additionnés de $9,2 \mu\text{M}$ de ZEA ont été excisées 90 jours après l'initiation de la culture et utilisées pour l'enracinement *in vitro*. Les individus ont été excisés et cultivés sur du milieu MSM dilué de moitié pour les macro-éléments, 20 g l^{-1} de saccharose et d'ANA ou de l'AIB à des concentrations variables. Les cultures ont été incubées dans les mêmes conditions contrôlées décrites précédemment pour l'établissement de la culture. Chaque traitement consistait 20 tubes essais de 20 ml contenant 1 explant chacun donnant un total de 20 explants. Durant la phase d'enracinement, la technique utilisée pour obtenir un pourcentage d'enracinement satisfaisant comprenait deux étapes :

- Etape I, les pousses excisées, après élimination des deux feuilles basales, ont été mises dans des tubes contenant 20 ml de milieu de base $\frac{1}{2}$ MSM ensuite incubées à l'obscurité pendant cinq jours. Le milieu a été complété ou non d'auxine (ANA et AIB).
- Etape II, les pousses sont transférées dans un milieu frais dépourvu d'auxines pour favoriser le développement racinaire (**Aboussalim et al., 2005**), additionné de $2,3 \mu\text{M}$ de ZEA (**Rugini et Baldoni, 2005**), sous des conditions d'éclairage et de température identiques que celles assurées dans les deux phases précédentes de culture (établissement et élongation) (figure 15).



Figure 15. Préparation des pousses pour l'enracinement des pousses : (A) Pousse avant la phase d'enracinement, (B) Mise en tubes des pousses au stade I, (C) Dépôt des tubes au stade II dans la chambre de culture.

Lors de la phase d'acclimatation, le substrat est irrigué avec une solution minérale de KNOP, placé durant le premier mois dans une chambre de préacclimatation à une humidité relative d'environ 90 % et une température de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. Les plantules sont couvertes avec des sacs en polyéthylène transparents pour maintenir la température et l'humidité élevée. Après 30 jours les plantules sont transférées en serre d'acclimatation et celles qui ont développées des nouvelles pousses, sont soumises à une réduction progressive de l'humidité. Après 30 jours, les plantules sont exposées aux conditions normales de température et d'humidité et transférées par la suite dans des conteneurs de 5 Kg pour élevage (figure16).



Figure 16. Acclimatation des plantules après 1 mois

1.2.5. Expressions des résultats et analyse des données

Les expériences ont été réalisées dans un dispositif en randomisation totale, les données ont été évaluées par une analyse de variance. Les différences au sein et entre les traitements ont été estimées par une analyse de la moyenne de séparation, en utilisant le test de différence le moins significatif (LSD) avec un risque de niveau de signification de 0,05 %. Chaque traitement se compose de 100 explants uniformes également répartis en 10 boîtes de Pétri.

Le pourcentage des réponses des explants dans la phase d'établissement de la culture a été sensiblement évalué pour étudier l'effet des différents milieux sur le taux de débourrement des bourgeons.

Pour déterminer le nombre moyen de pousses axillaires ainsi que leur longueur, les sections nodales nécrotiques ou contaminées n'ont pas été prises en compte. En tout 20 explants uniformes ont été sélectionnés pour chaque traitement (5 flacons, contenant chacun 4 explants) pour l'analyse statistique des paramètres suivants : taux des explants ayant produit des pousses, longueur moyenne de pousses nouvellement régénérées exprimée en cm, nombre moyen de pousses régénérées par explant et le nombre moyen de feuilles par pousse.

L'aptitude à l'enracinement de nos pousses a été évaluée après un mois du transfert sur les milieux dits d'enracinement. Les paramètres évalués au cours de cette phase sont : le pourcentage d'enracinement, la longueur moyenne des racines et le nombre moyen de racines par pousse.

Le pourcentage de plantes acclimatées avec succès a également été enregistré à un mois après repotage dans le substrat d'acclimatation. Avant l'analyse, les données en pourcentage, ont été transformées en arc sin-racine carrée.

Analyses statistiques

Les effets des différents traitements sont étudiés par l'analyse de la variance ($\alpha = 5\%$), suivie par un test de comparaison des moyennes (test LSD 5%). Les analyses sont réalisées à l'aide du logiciel STATISTICA version 6. Dans toutes les expériences, différentes lettres indiquent des différences significatives ($P \geq 0,05$).

2. Analyse Moléculaire

2.1. Objectif du travail

Cette présente étude vise à évaluer la stabilité génétique du matériel multiplié par culture *in vitro* de deux sous espèces d'olivier (*Olea europaea* L.) à savoir : la subsp *laperrinei* (avec deux sous espèce, une diploïde et l'autre triploïde) et la subsp *sativa* (avec les variétés cultivées : Chemlal, Sigoise, Ferkani et Blanquette de Guelma) avec l'emploi des marqueurs dominants, Inter Simple Sequence Repeat (ISSRs) et la technique de la cytométrie. Comme elle vise à évaluer le niveau de ploïdie chez les pieds-mères de l'olivier de Laperrine (*Olea europaea* subsp *laperrinei*) avec l'emploi des marqueurs co-dominants, Simple Sequence Repeat (SSRs).

Nos études ont été réalisées dans les laboratoires IBBR de CNR, Palerme d'Italie sous la direction du Dr Francesco Carimi, Dr Angela Carra et Dr Francesco Merkti.

2.2. Evaluation de la stabilité génétique des vitro-plants

2.2.1. Utilisation des marqueurs ISSRs

Pour étudier l'ADN de ce matériel végétal olivier, un total de dix amorces ont été choisis comme marqueurs ISSRs afin d'évaluer la stabilité génétique du matériel régénéré *in vitro* (tableau 5). Tout les vitro-plants des cultivars Chemlal, Sigoise, Ferkani et Blanquette de Guelma acclimatées ont été analysés au niveau génétique pour exclure les variations possibles dans le rajeunissement *in vitro*. Au total, 12 plants et 4 plantes mère adultes à partir de laquelle les microboutures ont été régénérées ont été testés. L'ADN génomique total a été extrait à partir de 0,1 g de feuilles fraîches de différents génotypes d'olivier suivant la méthode de Bromure de Cétyle-Triméthyl-Ammonium (CTAB) (Doyle et Doyle, 1987), largement utilisée sur l'espèce olivier ainsi des échantillons de feuilles de dite variétés ont été prélevés comme cités au-dessus.

2.2.1.1 L'extraction d'ADN et purification

La méthode d'extraction est basée sur le protocole de Doyle et Doyle (1987) modifié, par le laboratoire en question. Des échantillons de jeunes feuilles (figure17) ont été récoltés. Postérieurement, les feuilles furent transportées au laboratoire de biologie moléculaire (IBBR Palermo) dans des sacs en plastique scellés hermétiquement pour effectuer l'extraction de l'ADN sur un matériel frais. Ainsi, l'ADN génomique total a été extrait à partir de 0,1 g de feuilles fraîches des cinq génotypes (Chemlal, Sigoise, Ferkani, Blanquette de Guelma et

l'Olive de Laperrine) suivant la méthode de Bromure de Cétyl-Triméthyl-Ammonium (CTAB) de **Doyle et Doyle (1987)** modifiée, largement utilisée sur l'olivier par le laboratoire IBBR de Palerme.



Figure 17. Préparation et broyage des feuilles d'olivier en vue d'extraction de l'ADN total

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir de 0,1 g de feuilles fraîches, finement découpées puis broyées en présence de l'azote liquide (-196 °C). La poudre obtenue est transférée dans un tube Eppendorf de 2 ml. On y ajoute 700 µl de tampon d'extraction composé de CTAB à 2 % (d'hexadé Cyltrimé Thyl-Ammonium Bromure, Sigma H-5882), de 1,4 M NaCl, de 20 mM d'EDTA, de 100 Mm de Tris-HCl pH 8 et de 0,2 % de β-mercaptoéthanol qu'on additionne après un préchauffage à 60 °C. Les tubes sont ensuite incubés dans un bain Marie à 60°C pendant 40 min. Après refroidissement, le broyat est soumis à un traitement de déprotéinisation (deux lavages avec un volume (v/v) de chloroforme/alcool-isoamylique (24/1)) qui permet la neutralisation ou l'élimination, par le

chloroforme, de toutes traces de phénol naturellement présent dans les feuilles. Chaque étape de lavage est suivie d'une centrifugation à 6 000 rpm pendant 15 min à température ambiante. Dans le tube où le dernier surnageant est récupéré, deux volumes d'éthanol pur froid (-20°C) sont additionnés puis incubé à -20°C pendant 30 min ou toute la nuit. Deux centrifugations à 10 000 rpm, pendant 15 min à 4°C, permet d'obtenir un culot d'acides nucléiques qu'on lave dans 500 µl d'éthanol à 70%. Une autre centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 min à 4°C, puis séché sous hotte. Après séchage, le culot est ré-suspendu dans 100 µl d'eau et laissé toute une nuit à 4 °C. Enfin on y ajoute à l'extrait 2 µl d'ARNase (10 mg/ml) (Roche Diagnostics, Germany) afin d'éliminer les ARNs contaminants (2 heures à température ambiante). Les extraits peuvent être stockés à - 20 °C.

2.2.1.2. Quantification et la visualisation de l'ADN extraite.

La détermination de la quantité d'ADN/échantillon, a été quantifiée en mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm et le rapport 260/280, avec un spectrophotomètre Nanodrop (ND1000, Thermo Scientific). L'ADN des échantillons ont été soumis à une électrophorèse dans un tampon 1 x TBE pendant 4 heure à 80 V, 5 ul de l'ADN génomique isolé a été chargé sur un gel d'agarose à 1 % coloré au bromure d'éthidium avec de l'ADN pour vérifier la qualité sur une lumière UV transilluminateur (BioRad-Segrate, Milan, Italie) ajusté à un système d'analyse d'image (Quantity One) (**Hormaza, 2002**) (figure 18).

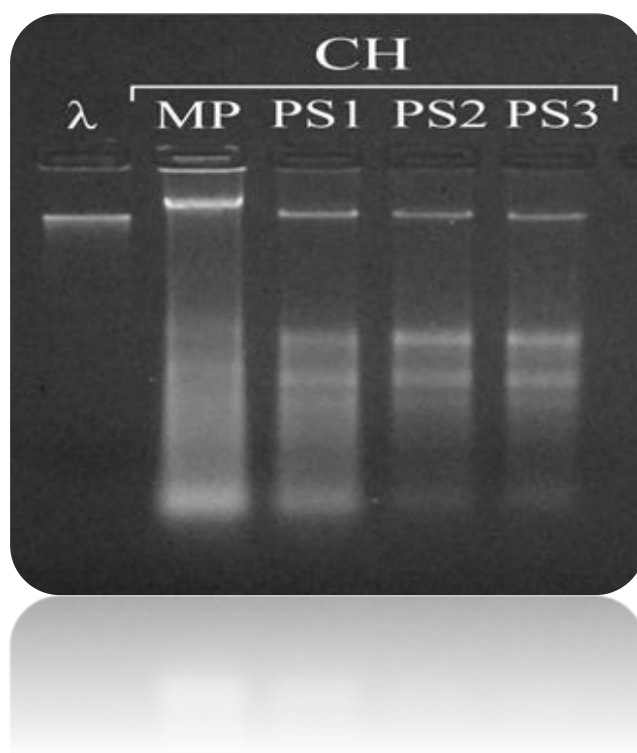


Figure. 18 Evaluation qualitative de l'ADN des échantillons de la variété Chemlal (CH) sur gel agarose à 1 %, pieds-mer (MP) et ses régénérées (PS1, PS2, PS3).

2.2.1.3. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de l'ADN de l'olivier

Le mélange réactionnel ainsi que la réaction PCR doivent être en fonction de chaque technique moléculaire, adaptés à l'espèce végétale. Dans le cas de nos échantillons d'olivier nous avons appliqué celle décrite par (Baysal *et al.*, 2011).

a. Mise au point de la réaction PCR/ISSRs

Cette technique est basée sur la réaction PCR qui utilise des amorces à simple séquence répétée.

b. Mélange réactionnel

La composition de ce mélange est celle décrite par Baysal *et al.* (2011). Le volume final nécessaire pour la réaction PCR est fixé à 15 ou 25 µl composé de :

- 2,5 µl de tampon 10X
- 2,5 µl de MgCl₂ (1,5 mM)
- 2,5 µl de dNTPs (mélange à 200 µM des 4 désoxynucléotides)
- 2,5 µl d'une Taq polymérase ADN thermostable (1U)
- 2,5 µl de chaque amorce 100 mM
- 2,5 µl d'ADN extrait (50 ng/µl)

À noter que la réaction PCR pour amplifier l'ADN de l'olivier extrait est menée dans un volume de 25 µl complété par de l'eau distillé pure.

c. Amplification d'ADN de l'olivier

Les tests de réaction PCR, utilisant certaines amorces ISSRs, ont été conduits fidèlement selon le programme du cycle thermique (Baysal *et al.*, 2011) suivant :

- 1- 5 min de dénaturation initiale à 94°C
- 2- Dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 1min
- 3- Hybridation des amorces sur la matrice pendant 1 min à une température spécifique (T_a) (cette température peut varier selon la taille et la teneur en GC des amorces)
- 4- Extension de l'amorce pendant 2 min à 72°C
- 5- Cycle à partir de l'étape 2 pendant 35 fois
- 6- Elongation finale pendant 7 min à 72°C.

L'amplification par PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Eppendorf Master cycler Pro S)

2.2.1.4. Électrophorèse

Les produits d'amplification ont été électrophorésés sur gel d'agarose 1,5 % migrant dans des gels d'agarose en fonction de la taille des fragments, les acides nucléiques sont visualisés grâce à l'ajout dans l'agarose fondu de de GelRed (10 µl/100 ml gel), un intercalant qui fluoresce aux UV fondu dans du TBE, laisser courir les échantillons déposés sur le gel qui sont au préalable mélangés à 2 µl d'un bleu de charge (bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol 0,25 %, glycérol 30 % et EDTA 50 mmol/l) environ 25 µl du produit de la réaction a été chargé sur les puits de gels, la migration s'effectue dans des bacs d'électrophorèse contenant du TBE 0,5 X à environ 110 V pendant 4h. Un marqueur de poids moléculaire est également déposé pour estimer la taille des fragments (1kb DNA ladder) (Qiagen).

2.2.1.5. Analyses moléculaires (ISSRs)

Un total de dix amorces ISSRs (Inter Simple Sequence Repeat) (tableau 5) ont été utilisés pour l'évaluation de la stabilité génétique des plants d'olivier micro propagées *in vitro*, des échantillons de feuilles de l'olive de Laperrine et des variétés autochtones Chemlal, Sigoise, Ferkani et Blanquette de Guelma ont été prélevés comme cités au-dessus. La technique ISSR basée sur la réaction PCR, utilise des amorces à simple séquence répétée pour amplifier les régions ou nucléotides présents dans les espaces inter-microsatellites (Zietkiewicz *et al.*, 1994 ; Kahl, 2001).

Les réactions d'amplification multiplexes ont été effectuées dans 25 µl de mélange réactionnel d'un volume final comme décrit par Baysalet *al.* (2011). Les amplifiants PCR ont été réalisées avec un thermo-cycleur Gene Amp 2700 (Applied Biosystems) à des températures de réduction différentes (Ta) (tableau 5).

Les réactions de PCR ont été réalisées dans des volumes réactionnels de 25 µl contenant 50 ng d'ADN génomique. Les réactions ont été réalisées selon le protocole cité précédemment. Les produits d'amplification ont été vérifiés et quantifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5 %) à faible échelle d'ADN de masse (Invitrogen).

Par la suite, les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse capillaire et analysé par l'Analyseur génétique, Applied Biosystems (ABI PRISM 3500). Les électrophérogrammes ont été vérifiés visuellement en utilisant la version Gene Mapper 4.1 analyse software. L'amplification par ISSRs a été répétée trois fois afin de vérifier son reproductibilité.

Le mélange réactionnel ainsi que la réaction PCR doivent être en fonction de chaque technique moléculaire, adaptés à l'espèce végétale. Dans le cas de nos échantillons d'olivier nous avons appliqué celle décrite par (**Baysal et al., 2011**).

Tableau 5. ISSRs utilisés pour l'évaluation de la fidélité génétique des vitro-plants de l'olive de Laperrine

Marqueurs ISSRs utilisés	Sequence	Température de recuit (T _a)
ENEA12	CCAT(GT) ₇	52
ENEA13	GCA(AC) ₇	52
ENEA14	GGG(AC) ₇	54
ENEA21	GG (GA) ₈	54
ENEA34	CC (ACC) ₆	56
ENEA45	AA(CT) ₈	52
ENEA47	AG(CA) ₈	52
ISSR1-6	RG (CA) ₈	52
ISSR2+2b	YG (AC) ₈	52
ISSR10+10b	RY (TCC) ₅	56

2.2.1.6 Analyse statistique des résultats de l'amplification

Les amplifiés de la PCR à partir de chaque amorce étaient représentés en bandes (1) pour les présents et (0) pour les absents. Seuls les groupes qui ont été systématiquement amplifiés ont été considérés, les bandes barbouillées et faibles ont été écartés de l'analyse. Enfin, les distances génétiques appariées entre les génotypes analysés ont été estimés en utilisant le coefficient de **Nei et al (1983)**.

L'analyse typologique a été réalisé selon UPGMA (méthode non pondérée Pair-Groupe avec Moyennes arithmétiques) Algorithme, un dendrogramme a été généré en utilisant le programme Power Marker v. 3.25 (**Liu et Muse, 2005**). Un arbre de consensus a été créé au format nexus pour la visualisation à Mesquite (**Maddison et Maddison, 2011**), en soutenant les nœuds par l'analyse de boot strap (1000 répliques).

2.2.2. Utilisation de la Cytométrie

La cytométrie en flux (FCM) a été utilisée pour évaluer la stabilité de la ploïdie pendant la régénération des plantes, les suspensions nucléaires obtenues à partir de matières végétales fraîches ont été analysées par FCM (tableau 6).

Tableau 6. Evaluation de la stabilité génétique du processus de régénération d' *O. europaea* L. en utilisant la cytométrie en flux.

Variétés	Code des régénérées	Pieds mères
Blanquette de Guelma	BG	5PMGB
1	PS1	
2	PS2	
3	PS3	
4	PS4	
Sigoise	GS	PMGS1
1	PS1	
2	PS2	
Chemlal	CH	CH-PM 2
1	PS1	
2	PS2	
3	PS3	
Ferkani	FK	FK-PM 1
1	PS1	
2	PS2	
3	PS3	
Olive de Laperrine	P	PM
1	P1	PM- P1
2	P2	PM-P2
3	P3	PM-P3
4	P4	PM-P4
5	P5	PM-P5
6	P6	PM-P6
7	P7	PM-P7
8	P8	PM-P8
9	P9	PM-P9
10	P10	PM-P10
11	P11	PM-P11

Les niveaux de ploïdies ont été vérifiés en comparant les teneurs en ADN de la plante mère et les régénérées. Un total de vingt trois régénérées (11 olive de Laperrine, 4 Blanquette de Guelma, 3 Chemlal, 3 Ferkani et 2 Sigoise), ont été analysés et il a été possible d'isoler une bonne quantité de noyaux de tous les échantillons testés.

L'analyse a été effectuée avec le cytomètre de flux Partec PAS (**Partec**, <http://www.partec.de/>), équipé d'une lampe à mercure HBO 100-W et d'un miroir dichroïque (TK420).

Environ 50 mg de matière foliaire ont été hachés, dans des tampons d'extraction de noyaux de 400 µl (solution Partec CyStain® UV Precise P, 250 tests) pendant 30 à 60 s. La suspension de noyaux a ensuite été filtrée à travers un filtre jetable de nylon de 30 µm Cell-Trics Partec, on a ajouté 1,4 ml de solution de coloration contenant le colorant 4,6-diamidino-2-phénylindole. Sur une base régulière, 3 000 à 4 000 noyaux ont été mesurés par échantillon et des histogrammes de contenu d'ADN ont été générés à l'aide du logiciel Partec (FloMax®) (figure19).

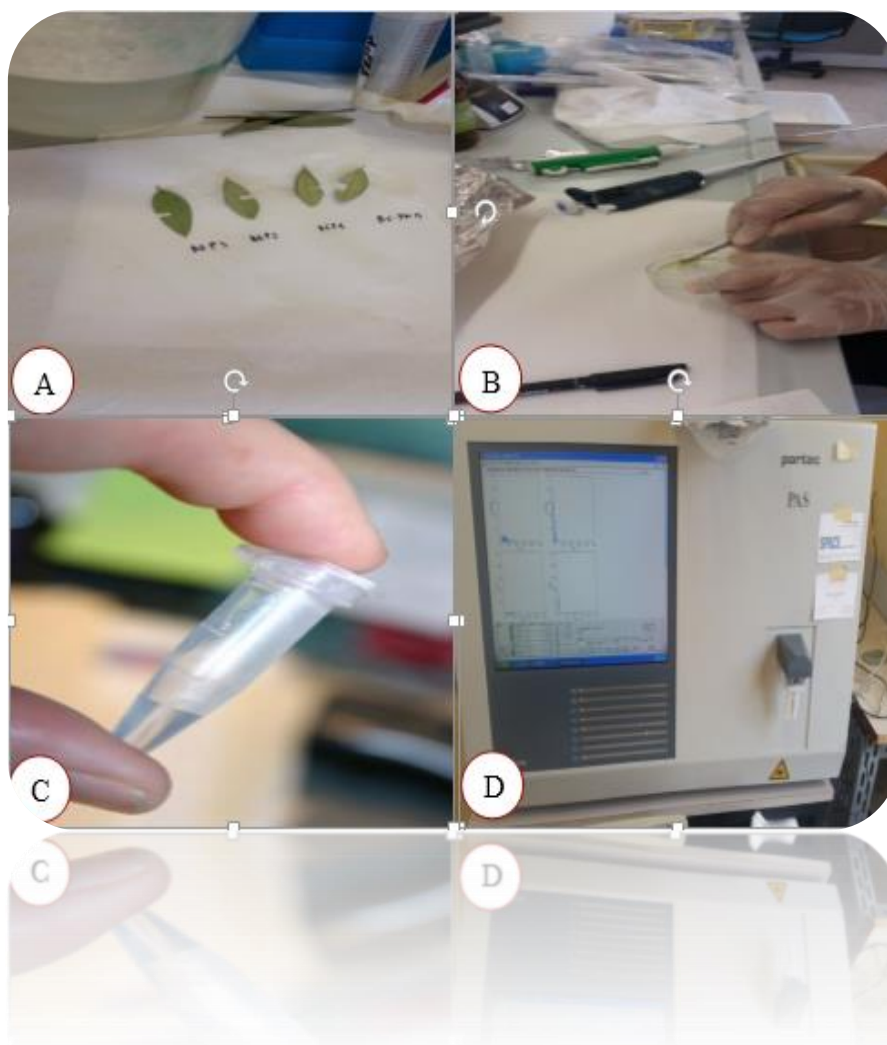


Figure 19. Processus de l'analyse cytométrique des pieds-mères et leurs progénés de l'olivier suivant : (A) Découpage des échantillons de feuilles fraîche d'olivier, (B) 50 mg de feuilles hachées,dans 400 µl tampons d'extraction de noyaux (solution Partec CyStain® UV Precise P,250 tests) pendant 30 à 60 s, (C) Filtration de la suspension de noyaux (30 µm Cell-Trics Partec),ajouté 1,4 ml de colorant (4,6-diamidino-2-phénylindole), (D) Histogrammes de mesure d'ADN générés à l'aide du logiciel Partec (FloMax®).

2.3. Evaluation du niveau de ploïdie chez les pieds mère de l'olivier de Laperrine (*Olea europaea* subsp *laperrinei*)

Pour étudier l'ADN de ce matériel végétal 12 Co-dominants Simple Répétition de Séquence (SSRs) choisi parmi ceux rapportés dans la littérature (tableau 7) : quatre SSRs (GAPU47, GAPU59, GAPU71A et GAPU71B) cités par **Carriero et al. (2002)**, l'un (UDO03) rapporté par **Cipriani et al. (2002)**, et sept (DCA3, DCA5, DCA7, DCA11, DCA13, DCA15 et DCA18) par **Sefc et al. (2000)**, ont été utilisés pour l'évaluation du niveau de ploïdie, Des échantillons de feuilles d'olivier de Laperrine prélevés à partir de trois plantes mères auto-enracinées (34 V13P1, 38-V14P2, 42-V15P3) obtenus par multiplication sous Mist-système. En effet, des échantillons de feuilles de l'olive de Laperrine ont été prélevés comme suit:

2.3.1. Extraction de l'ADN total

L'ADN génomique total a été extrait à partir de 0,1g de feuilles fraîches de l'olive de Laperrine suivant la méthode de Bromure de Cétyle-Triméthyle-Ammonium (CTAB) **Doyle et Doyle (1987)** modifié, au niveau du laboratoire IBBR de Palerme comme cité précédemment.

2.3.2. Evaluation de la qualité et de la quantité d'ADN

La qualité d'ADN extrait a été d'abord vérifiée sur gel d'agarose (1 à 1,5%) puis, par mesure de la densité optique (Do) pour (230/260 et 260/280). Sa concentration a été vérifiée par NanoDrop spectrophotomètre (Thermo Scientific-Waltham, Massachusetts). Comme déjà cité dans la partie évaluation de la confirmité génétique

2.3.3. Analyses moléculaires (nuSSRs)

Un nombre total de 12 co-dominants Simple Répétition de Séquence (SSRs) choisi parmi ceux rapportés dans la littérature (tableau 7): quatre SSRs (GAPU47, GAPU59, GAPU71A et GAPU71B) cités par **Carriero et al. (2002)**, l'un (UDO03) rapporté par **Cipriani et al. (2002)**, et sept (DCA3, DCA5, DCA7, DCA11, DCA13, DCA15 et DCA18) par **Sefc et al. (2000)**, ont été utilisés pour l'évaluation du niveau de ploïdie (tableau7). Les réactions d'amplification multiplexes ont été effectuées dans 15 µl de mélange réactionnel d'un volume final comme décrit par **Carimi et al. (2011)**.

Le programme utilisé pour amplifier l'ADN des trois, échantillons de pieds-mères de l'olive de Laperrine (en simple et en multiplex) est le suivant :

- 1) 5min de dénaturation initiale à 94°C ;
- 2) Dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 30s ;
- 3) Hybridation des amorces sur la matrice pendant 1 min et 30 s à une température spécifique (Ta) (cette température peut varier selon la taille et la teneur en GC des amorces) ;
- 4) Extension de l'amorce pendant 1min à 72°C ;
- 5) Cycle à partir de l'étape 2 pendant 40 fois ;
- 6) Elongation finale pendant 5 min à 72°C.

Les amplifiants PCR ont été réalisées avec un thermocycleur Gene Amp 2 700 (Applied Biosystems) à des températures de réduction différentes (Ta) (Table 11), en fonction des couples d'amorces. L'une de chaque paire a été marquée par fluorescence (FAM, JOE ou TAMRA). Les réactions de PCR ont été réalisées dans des volumes réactionnels de 15 µl contenant 20 ng d'ADN génomique et 0,2 mM chacune des amorces directe et inverse, dans un multiplex 2 x Qiagen Master Mix (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne). Les réactions ont été réalisées selon le protocole cité précédemment. Les produits d'amplification ont été vérifiés et quantifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (2,5 %) à faible échelle d'ADN de masse (Invitrogen).

Par la suite, les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse capillaire et analysé par l'Analyseur génétique, Applied Biosystems (ABI PRISM 3 500). Les électrophérogrammes ont été vérifiées visuellement en utilisant la version Gene Mapper 4.1 analyse software. L'amplification par SSRs a été répétée deux fois afin de vérifier son reproductibilité.

Tableau7. Différents marqueurs nucléotides (NuSSRs) utilisés.

Marqueurs	Type	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Reference
DCA03	nuSSR	CCCAAGCGGAGGTG TATATTGTTAC	TGCTTTTGTCTGTGTT TGAGATGTTG	Sefc et al., 2000
DCA05	nuSSR	AACAAATCCCATAC GAACTGCC	CGTGTTGCTGTGAA GAAAATCG	Sefc et al., 2000
DCA7	nuSSR	GGACATAAAACATA GAGTGCTGGGG	AGGGTAGTCCAAC GCTAATAGACG	Sefc et al., 2000
DCA11	nuSSR	GATCAAACACTGCA CGAGAGAG	TTGTCTCAGTGAAC CCTTAAACC	Sefc et al., 2000
DCA13	nuSSR	GATCAGATTAATGA AGATTTGGG	AACTGAACCTGTGT ATCTTGCATCC	Sefc et al., 2000
DCA15	nuSSR	GATCTTGTCTGTATA TCCACAC	TATACCTTTTCCAT CTTGACGC	Sefc et al., 2000
DCA18	nuSSR	AAGAAAGAAAAAGG CAGAATTAAGC	GTTTTCGTCTCTCTA CATAAGTGAC	Sefc et al., 2000
GAPU47	nuSSR	GATCAGCTTAGTCTC ATATTCTCTCTC	CCTCGACTGATTTA CACACCA	Carriero et al., 2002
GAPU59	nuSSR	CCCTGCTTTGGTCTT GCTAA	CAAAGGTGCACTTT CTCTCG	Carriero et al., 2002
GAPU71A	nuSSR	GATCATTTAAAATAT TAGAGAGAGAGA	TCCATCCATGCTGA ACTT	Carriero et al., 2002
GAPU71B	nuSSR	GATCAAAGGAAGAA GGGATAAA	ACAACAAATCCGTA CGCTTG	Carriero et al., 2002
UDO043	nuSSR	TCGGCTTTACAACCC ATT	TGCCAATTATGGGG CTAACT	Carriero et al., 2002

IV. RESULTATS

1. Microbouturage

L'objectif visé par la présente partie de l'étude, est de parvenir à élaborer un protocole expérimental efficient de régénération *in vitro* via le microbouturage, de plusieurs variétés autochtones d'olivier (*Olea europaea* L.) appartenant à deux sous espèces : la subsp *sativa* (Chemlal, Sigoise, Ferkani et Blanquette de Guelma) et la subsp *laperinei* (diploïde et triploïde). Toutes les variétés testées sont connues comme étant récalcitrantes à la régénération par microbouturage.

Le microbouturage a été réalisé en utilisant des segments de nœuds comme explants. Ils sont récoltés à partir des pieds-mères (voir chapitre : matériels et méthodes).

Les facteurs qui influencent le microbouturage sont très nombreux. Lors de cette étude, deux principaux facteurs, liés au milieu de culture et connus pour leurs influences sur le micro-bouturage de l'olivier, ont été testés. Il s'agit notamment de la composition hormonale des milieux de culture (au cours des phases de multiplication et d'enracinement) et la composition minérale des milieux (appelés communément milieux de base). Pour les régulateurs de croissance testés, nous avons modulés surtout la nature et la concentration des cytokinines dans les milieux, notamment : la Zéatine (ZEA), 6-benzyladénine (BA), la Kinétine (KN) (6-furfuryl-aminopurine), et le Thidiazuron (TDZ). Quant aux milieux de base, ce sont les milieux de MS (**Murashige et Skoog, 1962**), de OM (**Rugini, 1984**) et de MSM (**Leva et al., 1995**).

Lors de cette étude, le facteur génotypique, facteur lié à la plante et connu aussi pour son influence sur le microbouturage, a été également testé. En tout, 4 variétés autochtones cultivées et deux génotypes de Laperrine (diploïdes et triploïdes) feront l'objet de ses tests.

La démarche scientifique que nous avons adoptée, lors de cette étude, est d'entreprendre d'abord, des essais préliminaires, sur les effets de la composition hormonale et les milieux de base, en se servant d'une variété modèle « la variété Chemlal » appartenant à l'espèce (*Olea europaea* L.), connue pour ses bonnes potentialités agronomiques et son importance socio-économique. Puis, partant des résultats des essais préliminaires, les milieux dont la composition minérale et hormonale se révélant très favorables au microbouturage de la variété Chemlal, seront testés, à leur tour, sur les trois autres variétés autochtones et sur l'olive de Laperrine.

1.1. Résultats des essais préliminaires conduits avec la variété Chemlal

Cette variété est connue pour ses bonnes performances agronomiques et son importance socio-économique en Algérie. Seule, elle occupe plus de 40 % du patrimoine oléicole national et produit des huiles d'excellente qualité (**Mendil et Sebai, 2006**). Cependant, cette variété présente quelques inconvénients, elle est réputée comme étant très rétive aux techniques de culture *in vitro* et même aux techniques de multiplication classique (**Caballero, 1983 ; Mendil et Sebai, 2006 ; Khelifi et al., 2007 ; Haddad, 2009**).

Les essais préliminaires visent comme objectif l'évaluation de l'impact que peut avoir la variation de la composition hormonale (en qualité et en quantité) ainsi que les milieux de base sur l'amélioration et l'optimisation des principales phases de culture à savoir : la phase d'initiation et d'établissement, la phase de multiplication et la phase d'enracinement.

1.1.1 Phase d'établissement de la culture et de multiplication

C'est la phase la plus critique de la micropropagation au cours de laquelle les cultures doivent surmonter un certain nombre de problèmes, la contamination fongique et bactérienne (**CIDES, 1999**), l'oxydation des explants et accumulation de composés phénolique (**Cañas et al., 1992 ; Roussos et Pontikis, 2001**).

Au total, 100 microboutures par traitement ont été mises sur les différents milieux testés. Ces milieux de culture diffèrent à la fois par leur composition minérale de base et aussi par leur composition hormonale. Plusieurs milieux de culture, issus de la combinaison entre trois milieux de base (MS, MSM et OM) et quatre cytokinines (Zéatine, Benzyladénine, Kinétine et Thidiazuron) apportées à diverses doses, ont été testés.

Après 5 jours de leur ensemencement sur les différents milieux de culture, les bourgeons axillaires ont commencé à débourrer. Aucune contamination, qu'elle soit d'origine bactérienne ou fongique n'a été observée durant cette phase.

1.1.1.1 Taux de débourrement des explants

Le débourrement est le moment de l'épanouissement des bourgeons, c'est à dire, le moment où les écailles protectrices qui recouvrent le bourgeon s'écartent, laissant apparaître la bourre. C'est une étape clé, qui marque la fin de la dormance des bourgeons et le début de l'apparition de feuilles et la croissance des rameaux et des feuilles (**Margara, 1989**).

Le premier paramètre que nous avons évalué, lors de cette étude, est le taux de débourrement des explants (microboutures) obtenu, selon la composition hormonale et minérale des différents milieux testés. D'après nos observations, les premiers débourrements des bourgeons apparaissent, souvent, après cinq jours de la mise en culture des explants sur milieux d'induction.

Les résultats obtenus, représentés dans le tableau 8, montrent que le taux de débourrement des explants varie en fonction de la composition hormonale et minérale des milieux d'induction testés. Aussi, pour un même milieu, ce taux varie en fonction du temps autrement dit de la durée d'exposition des explants sur milieu de culture.

En effet, les milieux d'induction testés ont significativement affecté le débourrement ($p= 0,000000^*$; annexe 1) (figure 20). Ce sont surtout les milieux MSM, MS et OM, enrichis de 9,2 et de 18,4 μM de ZEA qui se montrent les plus favorables au débourrement avec, respectivement des taux de l'ordre de 100 % et 95 % (tableau 8). Les milieux pourvus de BA, aux doses de 9,2 et de 18,4 μM donnent des taux de débourrement appréciables avoisinant les 90 %.

Nous avons constaté aussi que les taux de débourrement varient en fonction de la concentration des cytokinines (KN, ZEA, BA et TDZ) appliquées. Plus les concentrations des milieux augmentent plus les taux de débourrement augmentent. Parfois, l'usage de fortes doses, comme c'est le cas du TDZ, peuvent avoir des effets défavorables sur le débourrement (tableau 8).

Lors de cette expérience, en analysant l'effet interaction entre les milieux de base et les régulateurs de croissance, ce sont les milieux MSM combinés aux concentrations de 9,2 et 18,4 μM de ZEA, qui ont donnés les meilleurs taux de débourrement, suivi des milieux MSM contenant de la BA aux concentrations de 9,2 et 18,4 μM .

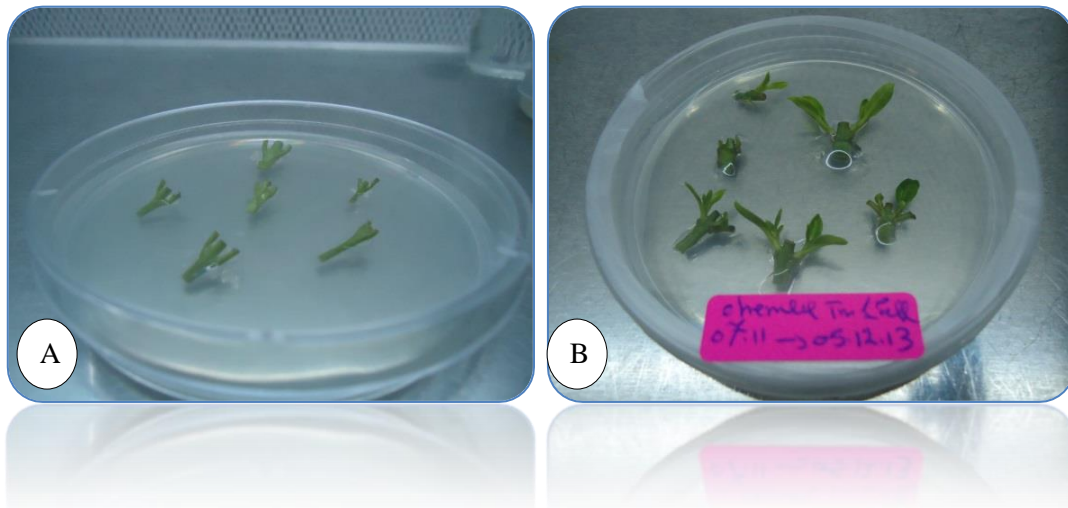


Figure 20. Aspect des explants de la variété Chemlal : (A) Au moment de la mise en culture, (B) Après 1 mois de culture, sur milieu MSM enrichi de 9.2 μ M de ZEA.

1.1.1.2. Phase de multiplication

Après une durée d'exposition d'un mois sur les milieux dits « d'induction et de débourement » (ou la phase d'établissement de la culture), les explants ayant débouillé ont été transférés sur des milieux de culture frais, de même composition hormonale que les milieux initiaux, pour permettre aux bourgeons de poursuivre leur développement et assurer l'élongation des pousses. Les explants sont répartis sur les différents milieux de culture à raison de vingt explants par traitement. Deux subcultures ont été effectuées soit une par mois.

Les principaux paramètres mesurés sont : le taux des explants ayant produit des pousses, la longueur moyenne de pousses nouvellement régénérées exprimée en cm, le nombre moyen de pousses régénérées par explant et le nombre moyen de feuilles par pousse. L'effet de chaque traitement, sur ces paramètres, a été évalué après 3 mois de culture.

Les trois premiers paramètres nous ont permis de calculer l'efficacité de l'élongation des pousses afin d'évaluer la performance de croissance de la variété Chemlal cultivée sous conditions *in vitro*. L'efficacité de l'élongation des pousses (Shoot Elongation Efficiency, SEE) a été décrite par **Carra et al. (2012)**. Ce paramètre représente la longueur totale moyenne, exprimée en centimètre, de la masse végétative produite *in vitro* à partir d'un explant, calculé selon la formule suivante :

$$\text{SEE} = (\text{Taux d'explants ayant produit des pousses} \times \text{Nombre de pousses par explant} \times \text{Longueur moyenne de pousse}) / 100$$

Les résultats de la multiplication *in vitro* dans nos conditions varient selon la composition minérale et hormonale des milieux de culture testés, à l'exception du témoin (milieu sans hormone). Les bourgeons ayant débourré, commencent ensuite une étape de croissance. En effet, les jeunes feuilles qui étaient, presque sous formes d'ébauches, commencent par s'allonger lentement (tableau 8). On a assisté d'abord à une augmentation de la taille des jeunes feuilles suivie par un allongement des deux pousses issues des bourgeons axillaires.

D'après les résultats du tableau 8, la composition minérale ainsi que la composition hormonale des milieux, influencent de manière significative ($p=0,001579$; annexe 2) le pourcentage de pousses régénérées. Les réponses varient de 23% (sur milieu MS à 3,49 μM de KN) à 83% (sur milieu MSM à 18,4 μM de ZEA). On a constaté que l'augmentation des doses en cytokinines, indépendamment du milieu de culture, a entraîné une augmentation du pourcentage de pousses régénérées par explant.

Pour la longueur moyenne de pousses, les compositions minérales et hormonales ont aussi affecté significativement ($p=0,000000^*$; annexe 3) le processus d'élongation des pousses régénérées. Les résultats, présentés dans le tableau 8, révèlent la supériorité du MSM additionné de 4,6 ; 9,2 et 18,4 μM de ZEA en donnant des élongations respectives de l'ordre de 3,7 ; 3,6 et 3,3 cm. La présence de ZEA favorise toujours l'élongation des pousses, comparativement aux autres cytokinines testées et cela quel que soit le milieu de base testé. Cependant, nous avons remarqué que l'emploi de doses inférieures au seuil de 4,6 μM de ZEA réduit légèrement l'élongation des pousses.

C'est avec le milieu MS enrichi de 3,49 μM de KN que les plus faibles allongements (0.7 cm) ont été enregistrés.

La composition minérale et hormonale des milieux de culture, n'a pas eu un effet significatif ($p=0,288776$; annexe 4) sur le nombre de pousses régénérées par explant (tableau 8). Généralement, les meilleurs rendements (en termes du nombre de pousses régénérées) ont atteint les 2 pousses par explant, dans le milieu MS en présence des quatre cytokinines ZEA (18,4 μM), BA (2,3 μM), KN (13,96 μM) et TDZ (1,8 et 3,6 μM). De même, les milieux OM et MSM en présence de TDZ (1,8 et 3,6 μM) contre 1,5 pousses par explant dans les

milieux MS et MSM respectivement supplémentés de TDZ (1,8 μM) et de KN (3,49 μM) (tableau 8).

Le SEE a montré clairement que la ZEA a été très performante sur la multiplication des pousses par rapport aux autres cytokinines (figure 21). Les trois meilleurs longueurs moyennes (SEE) (4,21 ; 4,1 et 3,95 cm) sont celles obtenus avec les milieux MSM au ZEA (apportée aux doses de 9,2 ; 18,4 et 4,6 μM). Le milieu MSM a donné les meilleurs résultats de croissance, caractérisé par des explants vigoureux, de pousses ramifiées ainsi que l'émergence de nouvelles pousses à la base des explants. Le milieu OM a montré des résultats intermédiaires, alors que le milieu MS a induit la plus faible performance d'allongement de pousses (tableau 8).

Par ailleurs, pour le nombre de feuilles par pousse régénérée, les résultats, présentés dans le tableau 8, révèlent la supériorité du MSM additionné de ZEA et ce quelque soit sa concentration. La composition minérale et hormonale du milieu a influencé fortement le processus de production des feuilles des pousses régénérées. Par conséquent, le nombre moyen de feuilles a été significativement ($p=0,000007$; annexe 5) plus élevé 5,3 dans le milieu MSM additionné de 9,2 μM de ZEA.

La performance de la ZEA, apportée à 9,2 μM , ne s'est pas traduite uniquement sur le taux de reprise des pousses ou sur l'élongation, mais aussi sur le nombre moyen de feuilles par pousse. C'est au niveau de ce dernier paramètre où nous avons noté de différences notables entre les quatre cytokinines. Généralement, les meilleurs rendements ont atteint chez les trois milieux, les 5,3 feuilles par pousse, en présence de 9,2 μM de ZEA contre 2 feuilles pour la KN et TDZ (tableau 8).

On a noté par ailleurs, des différences dans l'aspect physiologique des plantes, le milieu OM présente des nœuds très courts et des feuilles de couleur vert clair. Tandis que, celles développées sur le milieu MSM présentent de plus grandes feuilles, de couleur plus chlorophyllienne et des entre-nœuds plus longs (figure 22).

Tableau 8. Effet de la composition minérale et hormonale sur le débourrement, la prolifération et le développement des pousses de la variété Chemlal respectivement après 1 et 3 mois de culture

Milieu	Cytokinines (μM)	Taux de débourrement	Taux des explants ayant produit des pousses	Longueur moyenne de pousses (cm)	Nombre moyen de pousses /explant	Nombre moyen de feuilles /pousse
Témoin	0	30 \pm 1,15o	0 \pm v	//	//	//
OM	ZEA2,3	68 \pm 1,15hij	52 \pm 1.2J	2.3 \pm 0.04e	1.8 \pm 0.1a	3.2 \pm 0.1c
	ZEA4,6	90 \pm 0,58c	65 \pm 2.9h	2.7 \pm 0.04ab	1.6 \pm 0.1 a	4.1 \pm 0.2b
	ZEA9,2	95 \pm 2,89b	71 \pm 0.6cde	2.9 \pm 0.1ab	1.9 \pm 0.1 a	4.9 \pm 0.2a
	ZEA18,4	95 \pm 1,15b	79 \pm 0.6b	2.4 \pm 0.04cg	1.8 \pm 0.1 a	4.0 \pm 0,0b
MS	ZEA2,3	67 \pm 1,55ij	46 \pm 0.6kl	1.3 \pm 0.04f	1.9 \pm 0.03a	1.6 \pm 0.1d
	ZEA4,6	85 \pm 0,58d	61 \pm 0.6hi	1.7 \pm 0.10e	1.9 \pm 0.03a	2.2 \pm 0.1e
	ZEA9,2	95 \pm 2,89b	69 \pm 0.6fg	1.9 \pm 0.02d	1.9 \pm 0.03a	2.6 \pm 0.1cd
	ZEA18,4	95 \pm 2,89b	73 \pm 1.7cde	1.6 \pm 0.03e	2.0 \pm 0,0 a	2.1 \pm 0.1d
MSM	ZEA2,3	75 \pm 0,58g	58 \pm 0.9i	2.9 \pm 0.1ab	1.6 \pm 0.1°	4.4 \pm 0.2b
	ZEA4,6	95 \pm 1,15b	67 \pm 0.6gh	3.7 \pm 0.10a	1.8 \pm 0.1 a	5.1 \pm 0.1a
	ZEA9,2	100 \pm 0,0a	74 \pm 0.6c	3.6 \pm 0.10a	1.7 \pm 0.1 a	5.3 \pm 0.1a
	ZEA18,4	100 \pm 0,0 a	83 \pm 0.6a	3.3 \pm 0.20a	1.7 \pm 0.02a	4.7 \pm 0.2ab
OM	BA 2,3	75 \pm 1,15g	43 \pm 1.7lm	1.4 \pm 0.20f	1.8 \pm 0.1a	1.8 \pm 0.5cd
	BA 4,6	80 \pm 1,15ef	49 \pm 0.6jk	1.7 \pm 0.10e	1.6 \pm 0.2 a	2.4 \pm 0.2cd
	BA 9,2	90 \pm 1,15c	64 \pm 2.3hi	2.0 \pm 0.03d	1.9 \pm 0.1 a	3,0 \pm 0,0c
	BA 18,4	85 \pm 2,89d	70 \pm 1.2cde	1.6 \pm 0.02e	1.7 \pm 0.2 a	3,0 \pm 0.1c
MS	BA 2,3	50 \pm 0,58n	34 \pm 2.1qr	1,4 \pm 0.20f	2,0 \pm 0,0 a	1.5 \pm 0.2d
	BA 4,6	75 \pm 0,58g	45 \pm 2.9klm	1.7 \pm 0.10e	1.7 \pm 0.1 a	2.2 \pm 0.2cd
	BA 9,2	90 \pm 0,58c	65 \pm 2.9h	1.7 \pm 0.10e	1.9 \pm 0.1 a	2.7 \pm 0.1cd
	BA 18,4	85 \pm 0,58d	69 \pm 1.2fg	1.6 \pm 0.02e	1.9 \pm 0.2 a	2.1 \pm 0.1cd
MSM	BA 2,3	60 \pm 1,15k	51 \pm 0.6j	1.3 \pm 0.03f	1.7 \pm 0.1 a	1.7 \pm 0.1e
	BA 4,6	85 \pm 1,15d	61 \pm 0.6hi	1.7 \pm 0.10e	1.8 \pm 0.2 a	2.2 \pm 0.1e
	BA 9,2	90 \pm 0,58c	67 \pm 0.6gh	2.0 \pm 0.02d	1.7 \pm 0.2 a	2.6 \pm 0.1de
	BA 18,4	90 \pm 1,15c	73 \pm 0.6cde	1.6 \pm 0.02e	1.8 \pm 0.1 a	2.1 \pm 0.1e
OM	KI3,49	45 \pm 1,15l	26 \pm 1.2tu	1.0 \pm 0.10g	1.9 \pm 0.2 a	1.2 \pm 0.1e
	KI6,98	65 \pm 2,89j	43 \pm 1.2lm	1.1 \pm 0.10g	1.8 \pm 0.1 a	1.3 \pm 0.2e
	KI13,96	70 \pm 1,15hi	46 \pm 1.2kl	1.3 \pm 0.03f	1.9 \pm 0.1a	1.7 \pm 0.2de
	KI27,92	71 \pm 0,58kj	49 \pm 0.6jk	1.2 \pm 0.01f	1.9 \pm 0.1a	1.5 \pm 0.2e
MS	KI3,49	50 \pm 0,58n	23 \pm 1.2u	0.7 \pm 0.10g	1.9 \pm 0.2a	1.1 \pm 0.1e
	KI6,98	60 \pm 0,58k	42 \pm 1.2mn	1.1 \pm 0.04g	1.8 \pm 0.1a	1.0 \pm 0.0e
	KI13,96	65 \pm 0,58j	43 \pm 1.2lm	1.2 \pm 0.10g	2.0 \pm 0.1a	1.3 \pm 0.2e
	KI27,92	30 \pm 1,55o	46 \pm 0.9klm	1.1 \pm 0.04g	1,9 \pm 0.1a	1.0 \pm 0.0e
MSM	KI 3,49	65 \pm 1,73j	31 \pm 1.7rs	0.8 \pm 0.02h	1.5 \pm 0.2a	1.0 \pm 0.0e
	KI 6,98	65 \pm 0,58j	46 \pm 3.5kl	1.0 \pm 0.10g	1.6 \pm 0.1a	1.3 \pm 0.2e
	KI13,96	70 \pm 0,58hi	49 \pm 0.6jk	1.1 \pm 0.03g	1.6 \pm 0.2a	1.1 \pm 0.1e
	KI27,92	80 \pm 0,58ef	52 \pm 0.57J	1.1 \pm 0.01g	1.6 \pm 0.2a	1.1 \pm 0.1e
OM	TDZ 0,45	65 \pm 1,15j	27 \pm 1.1t	0.8 \pm 0.04h	1.9 \pm 0.1a	1.0 \pm 0.0e
	TDZ 0,9	80 \pm 1,15ef	35 \pm 1.1opq	1.2 \pm 0.02g	1.8 \pm 0.1a	1.6 \pm 0.1d
	TDZ 1,8	70 \pm 0,58h	35,7 \pm 0.2h	1.2 \pm 0.02g	2.0 \pm 0.1a	1.5 \pm 0.1e
	TDZ 3,6	60 \pm 1,15k	38 \pm 1.15op	1.1 \pm 0.10g	1.9 \pm 0.1a	1.6 \pm 0.3d
MS	TDZ 0,45	55 \pm 2,89m	25 \pm 2.30tu	0.8 \pm 0.02h	1.8 \pm 0.1a	1.0 \pm 0.0e
	TDZ 0,9	80 \pm 1,55ef	33 \pm 1.73qr	1.3 \pm 0.04f	1.9 \pm 0.2a	1.6 \pm 0.1d
	TDZ 1,8	60 \pm 0,58k	38 \pm 4.61op	1.2 \pm 0.20g	1,5 \pm 0.2a	1.4 \pm 0.2e
	TDZ 3,6	55 \pm 2,9m	40 \pm 0.00op	1.2 \pm 0.10g	1.6 \pm 0.2a	1.5 \pm 0.3d
MSM	TDZ 0,45	65 \pm 1,55j	28 \pm 0.57st	0.9 \pm 0.03h	1.9 \pm 0.1a	1.0 \pm 0.0e
	TDZ 0,9	82 \pm 1,55de	39 \pm 0.57no	1.2 \pm 0.02g	1.9 \pm 0.2a	1.5 \pm 0.1d
	TDZ 1,8	78 \pm 0,58fg	42 \pm 1.15mn	1.1 \pm 0.03g	1.9 \pm 0.2a	1.4 \pm 0.1d
	TDZ 3,6	75 \pm 0,58g	43 \pm 1.15lm	1.2 \pm 0.03g	2.0 \pm 0.1a	1.3 \pm 0.1de

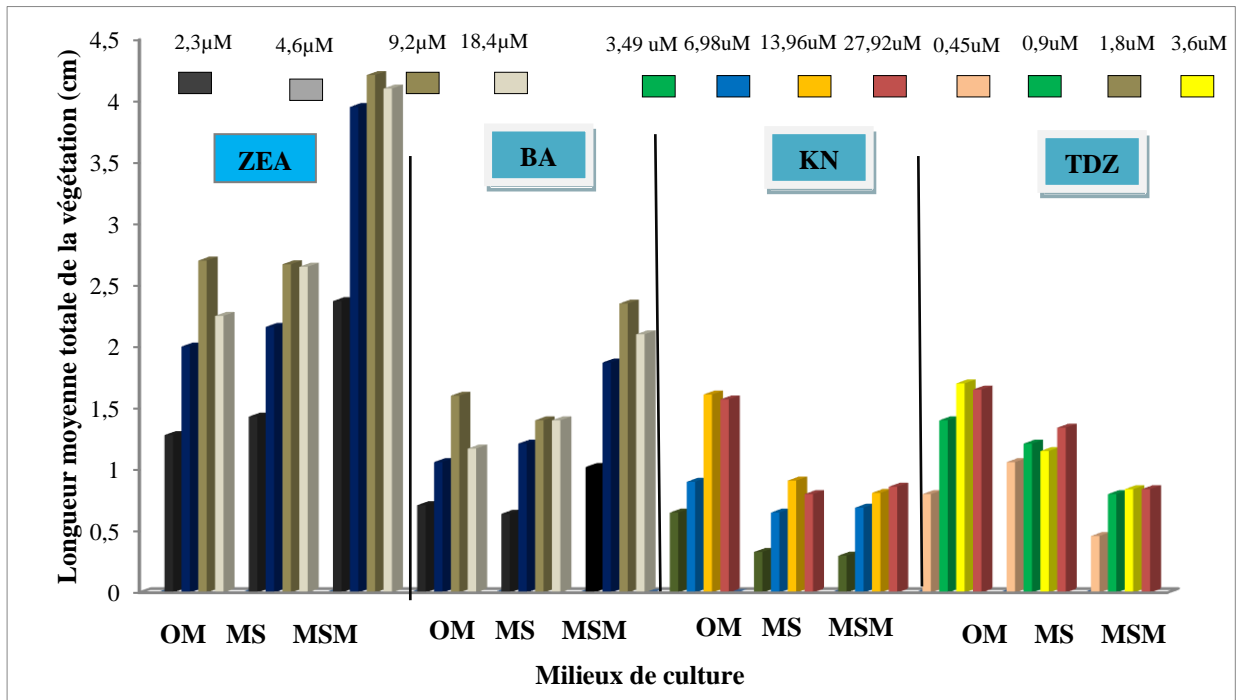


Figure 21. Effet de la composition minérale et hormonale des milieux après 3 mois de culture sur la prolifération des pousses.



Figure 22. Aspect des pousses obtenues après 2 mois d'élongation sur les milieux : (A) MSM, (B) OM et (C) MSM, additionnés de 9,2 μM de ZEA

1.1.2. Phase d'enracinement et d'acclimatation

L'enracinement est une étape essentielle de la micropropagation *in vitro* chez les plantes ligneuses. C'est une phase morphogénétique très difficile à réussir surtout avec ce type de plantes, qui sont qualifiées de récalcitrantes. Le processus d'enracinement passe par trois phases distinctes : l'induction, l'activité cellulaire et l'organisation des primordiaux et expression racinaire (Walali, 1993).

Lors de cette étude, la réalisation de la phase d'enracinement, conduite avec des pousses bien développées, obtenues lors de la phase d'élongation, s'est déroulée en deux phases: induction et phase de développement.

La phase d'induction, a été réalisée sur milieu ½ MSM (dont les macro-éléments et le mannitol sont réduits de moitié) pourvu de deux auxines : l'AIB et l'ANA employées seules aux doses de (2,4 ; 4,8 ; 9,8 et 19,7 µM) et (2,7 ; 5,4 ; 10,7 et 21,5 µM) respectivement. Cette phase d'induction s'est déroulée en obscurité durant 5 jours (Rugini et Fedeli, 1990 ; Zacchini et De Agazio, 2004). Une fois l'induction racinaire s'est produite, les pousses seront transférées sur des milieux de même composition minérale (que les milieux d'initiation) sans auxine et pourvus seulement de 2,3 µM de ZEA, comme le recommandent Rugini et Baldoni (2005).

Souvent, les premières ébauches racinaires font leurs apparitions au bout du 10^{ème} jour suivant l'ensemencement. Elles prennent toujours naissance au niveau des zones de blessures (figure 23). L'effet de chaque traitement a été évalué en calculant le pourcentage d'enracinement, la longueur moyenne des racines, le nombre moyen de racines par pousse et l'efficacité de l'élongation des racines (REE). Ce dernier paramètre représente la longueur totale moyenne, exprimée en centimètre, de la masse racinaire produite *in vitro* à partir d'une pousse régénérée par explant, calculé selon la formule suivante :

$$\text{REE} = (\text{Taux de pousses ayant produit de racines} \times \text{Nombre moyen de racines par pousse} \times \text{Longueur moyenne des racines}) / 100$$

Les résultats de l'enracinement, obtenus dans nos conditions, montrent que les réponses varient, selon la nature et la concentration des auxines testées (tableau 9). Contrairement à l'AIB qui s'est montrée sans aucun effet sur l'induction de racines, l'emploi de l'ANA se révèle très efficace vis à vis de l'enracinement des pousses transférées, quelle que soit la dose

employée. En effet, les doses croissantes d'ANA ont agi significativement ($p=0,000004$; annexe 6) sur le processus d'induction racinaire (tableau 9), et varie entre 8,66 et 60 %. Le taux d'enracinement le plus élevé a atteint 60 % avec l'emploi de 21,5 μM , suivi de 35 % pour 10,7 μM d'ANA.

De même, ces vitro-plants enracinés présentent un nombre de racines par vitro-plant qui varie en fonction de la concentration de l'auxine. En effet, l'augmentation de la concentration d'ANA dans le milieu de culture a fait augmenter significativement ce paramètre ($p=0,000000^*$; annexe 7). Le taux d'enracinement le plus élevé en termes de nombre de racines par explant (3,43) a été atteint en présence de 10,7 μM d'ANA. Par ailleurs, la concentration de 2,7 μM d'ANA a donné les plus faibles résultats (tableau 9).

La longueur moyenne des racines ainsi formées était de 2,57 cm seulement et dans certains cas 4,35 cm (tableau 9). La concentration de l'auxine ANA a significativement influencé la longueur des racines néoformées à la base des pousses (figure 23) ($p=0,000000^*$; annexe 8). On a également constaté que l'augmentation de la concentration d'ANA dans le milieu de culture a fait diminuer la longueur moyenne des racines par pousse, la concentration N1 (2,7 μM) a donné les meilleures performances (4,35 cm). Tandis que, la concentration N3 (10,7 μM) a donné les plus faibles résultats (2,57 cm).

Les résultats du REE (figure 25) nous ont permis de déduire l'effet que peut avoir la concentration de l'auxine ANA du milieu sur l'enracinement. C'est toujours la concentration N4 (6,64 cm) qui paraît plus performante comparativement aux autres concentrations. Elle est suivie de la concentration N3 (3,08 cm), puis de la concentration N2 (1,59 cm) et en dernier de la concentration N1 (0,38 cm). Ces résultats confirment les conclusions que nous avons faites précédemment en analysant les trois paramètres séparément (taux d'enracinement ; longueur moyenne des racines ; nombre moyen de racines par pousse régénérée).

Les vitro-plants enracinés ont été transférés sur un substrat de tourbe et de perlite (2:1) *in vivo* (en serre) avec une humidité relative élevée. Durant cette phase, celles qui ont développées de nouvelles pousses, ont été soumises à une réduction progressive de l'humidité et une augmentation de l'intensité lumineuse. Après 30 jours, les plantules sont exposées aux conditions normales de température et d'humidité et transférées par la suite dans des sachets en plastique remplis de 5 litres de substrat (figure, 24 (B)).

Après 30 jours, les plantules atteints environ 10 cm de hauteur (figure, 24 (A)), sont transférées sous des conditions de serre contrôlées avec des taux d'acclimatation qui varient

en fonction de la concentration hormonale. Les pourcentages de plantules acclimatées avec succès enregistrent des taux de survie d'environ 80 % sans différences significatives ($p=0,384608$; annexe 9) (tableau 9). On a également observé que l'augmentation de la concentration d'ANA dans le milieu de culture a fait augmenter le taux de survie et la concentration N4 ($21,5 \mu\text{M}$) a donné les meilleures performances (80,66 %). Tandis que la concentration N1 ($2,7 \mu\text{M}$) a donné les plus faibles résultats (78,33 %) (tableau 9).

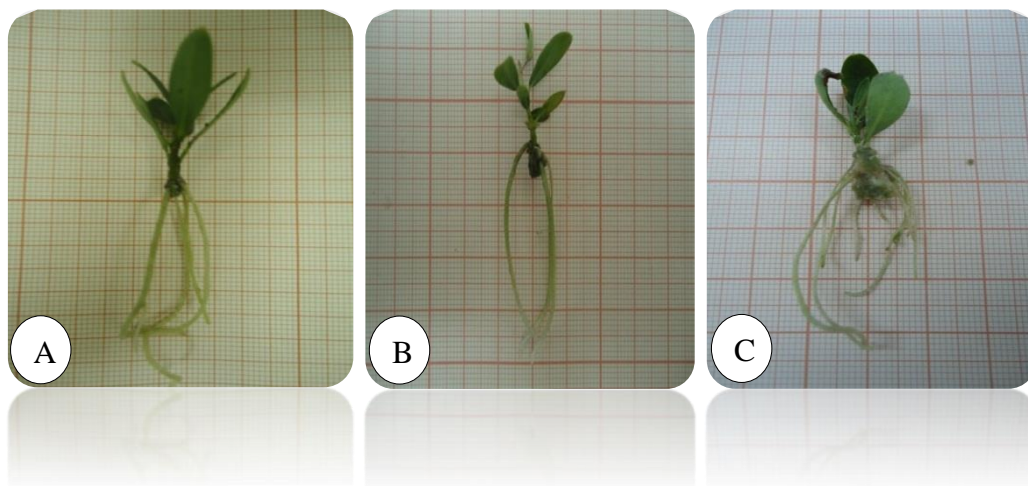


Figure 23. Aspect du système racinaire de la variété Chemlal après 1 mois de culture en fonction de la concentration de l'ANA utilisé : (A) 9,7 ; (B) 4,8 et (C) 2,4 μM .

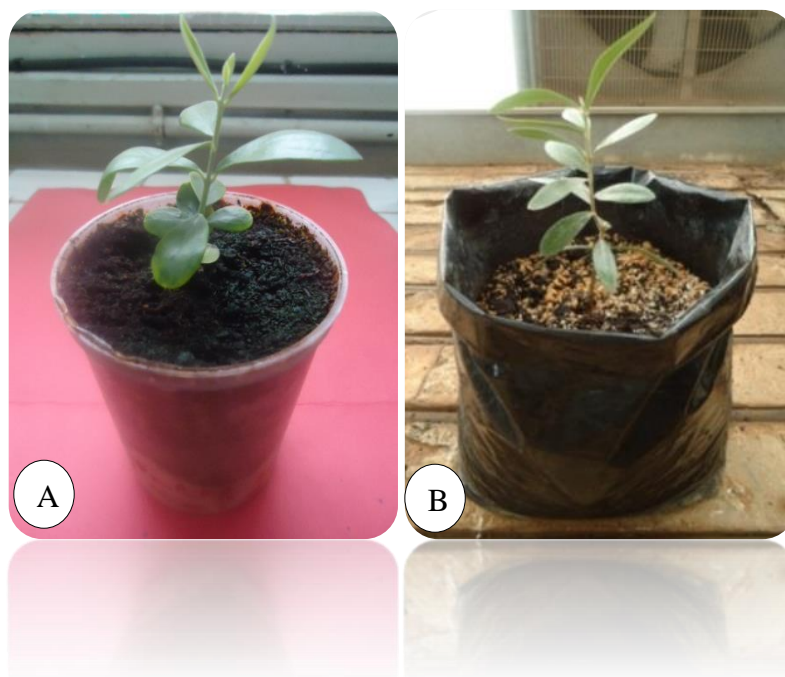


Figure 24. Aspect des plantules acclimatées de la variété Chemlal : (A) après 1 mois et (B) après 3 mois de la transplantation.

Tableau 9. Effet des traitements sur la formation des racines de l'*Olea europaea* variété

Chemlal

Concentration d'auxine (μM)	Pourcentage d'enracinement (%)	Longueur moyenne de racines (cm)	Nombre moyen de racines/pousse	Plantes acclimatées (%)
0	0 d			
2.7	8.7 \pm 1.26 d	4,35 \pm 0.10 a	1.00 \pm 0.39 b	78.33 \pm 1.52 a
5.4	25,0 \pm 2.18 c	4,23 \pm 0.24 a	1.50 \pm 0.28 b	79.66 \pm 1.50 a
10.8	35,0 \pm 2.18 b	2,57 \pm 0.18 c	3.43 \pm 0.21 a	80.00 \pm 2.00 a
21.7	60,0 \pm 2.18 a	3.57 \pm 0.15 b	3.10 \pm 0.13 a	80.66 \pm 1.15 a

La réponse à l'enracinement a été exprimée par le pourcentage d'enracinement des pousses, le nombre moyen de racines par pousse et la longueur moyenne de racines. Le pourcentage de plantes acclimatées a été aussi rapporté. Les données des trois premiers paramètres ont été collectées après 30 jours de la mise de l'expérimentation et les traitements comprennent 20 explants. Les données du dernier paramètre ont été collectées après 90 jours de la mise de l'expérimentation et chaque traitement comprend 20 explants. Moyenne \pm erreur standard, n= 20 entre chaque traitement. Les moyennes suivies de la même lettre sont non significatives selon le test de LSD.

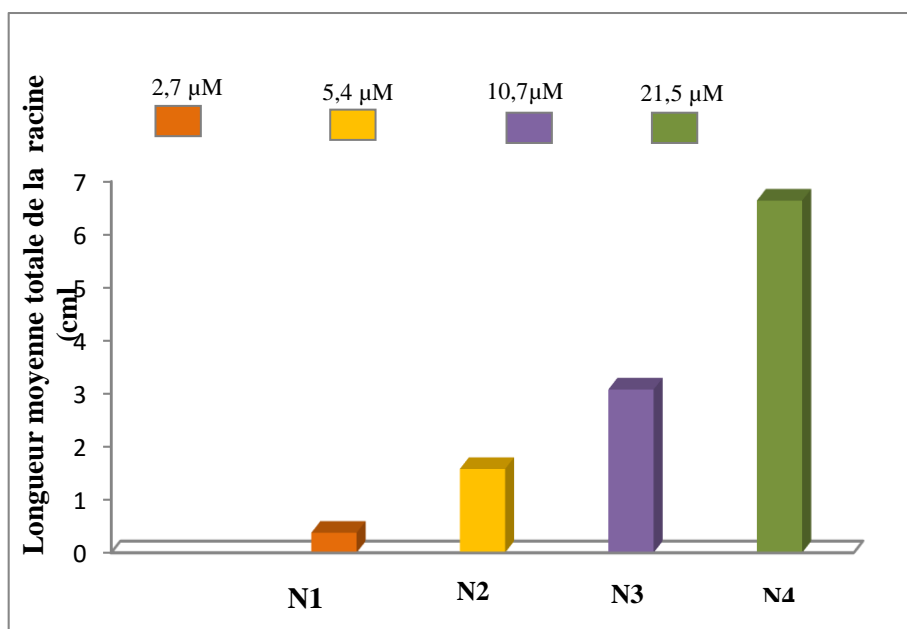


Figure 25. Effet de la concentration de l'ANA sur la prolifération des racines. Résultats sont exprimés en fonction de l'efficacité d'élongation des racines (REE) qui représente la longueur moyenne totale (cm) de la masse racinaire produite *in vitro* par explant.

1.2. Aptitude à la micropropagation de l'olivier

Dans cette partie du travail, nous avons testé l'efficacité des milieux ayant donné les meilleurs résultats (sur la croissance et le développement des pousses et aussi sur l'enracinement) avec la variété Chemlal (CH), lors des essais préliminaires, sur trois variétés cultivées d'olivier (*Olea europaea* L. subsp *sativa*) à savoir : Blanquette de Guelma (B); la Sigoise (SG) et la Ferkani (FK) et deux génotypes sauvages d'olive de Laperrine (*Olea europaea* L. subsp *laperinei*).

Pour les variétés cultivées, la phase d'initiation, de croissance et de développement des pousses, se déroule sur des milieux pourvus de MSM, comme milieu de base, supplémenté de 4 doses de ZEA (2,3 ; 4,6 ; 9,2 et 18,4 μM). Quant à la phase d'enracinement, elle est conduite sur des milieux MSM réduits de moitié et pourvu de 4 concentrations d'ANA (2,7 ; 5,4 ; 10,7 et 21,5 μM).

Compte tenu de la spécificité génotypique et de la nature sauvage des deux génotypes de l'olivier de Laperrine, nous avons préféré les tester sur des milieux à composition minérale et hormonale variée. Pour la phase d'initiation, de croissance et de développement des pousses, elle s'est déroulée sur des milieux pourvus de MSM ; d'OM et de MS, additionnés de BA et de ZEA à différentes doses : 2,3 ; 4,6 ; 9,2 et 18,4 μM . De même, la phase d'enracinement s'est déroulée sur des milieux $\frac{1}{2}$ MSM, contenant 4 doses d'ANA (2,7 ; 5,4 ; 10,7 et 21,5 μM) et d'AIB (2,4 ; 4,8 ; 9,8 et 19,7 μM).

1.2.1. Aptitudes des variétés cultivées au microbouturage

1. 2.1.1. Phase d'établissement de la culture et de multiplication

La phase d'établissement de la culture ne sera pas décrite dans cette partie puisqu'elle s'est déroulée de la même manière et dans les mêmes conditions que celles décrites lors des essais préliminaires menés avec la variété CH. Même, les résultats obtenus lors de cette phase étaient similaires à ceux des essais préliminaires.

Les lectures et les observations des résultats sont faites après un mois de l'ensemencement des explants et ont porté principalement sur le pourcentage de bourgeons ayant débouffé.

a. Taux de débourrement des explants

Les résultats de la figure 26 montrent que la régénération des pousses a été obtenue *in vitro* sous toutes les conditions de culture testées, seulement les réponses varient en fonction du génotype et de la concentration de ZEA qui ont affecté le débourrement des bourgeons axillaires (figure 26 et 27). Nous avons également observé que l'augmentation de la concentration de la ZEA dans le milieu de culture a fait augmenter fortement la réponse des explants et ceci, pour les trois génotypes étudiés. En effet, pour l'entrée en activité des bourgeons axillaires, les deux variétés : CH et SG, cultivées dans le milieu MSM complété de 4,6 ; 9,2 et 18,4 μM de ZEA ont donné les meilleurs taux de débourrement (100 %), alors le reste des variétés (BG) et (FK) ont donné des taux de l'ordre de 80 % pour les mêmes concentrations de ZEA.

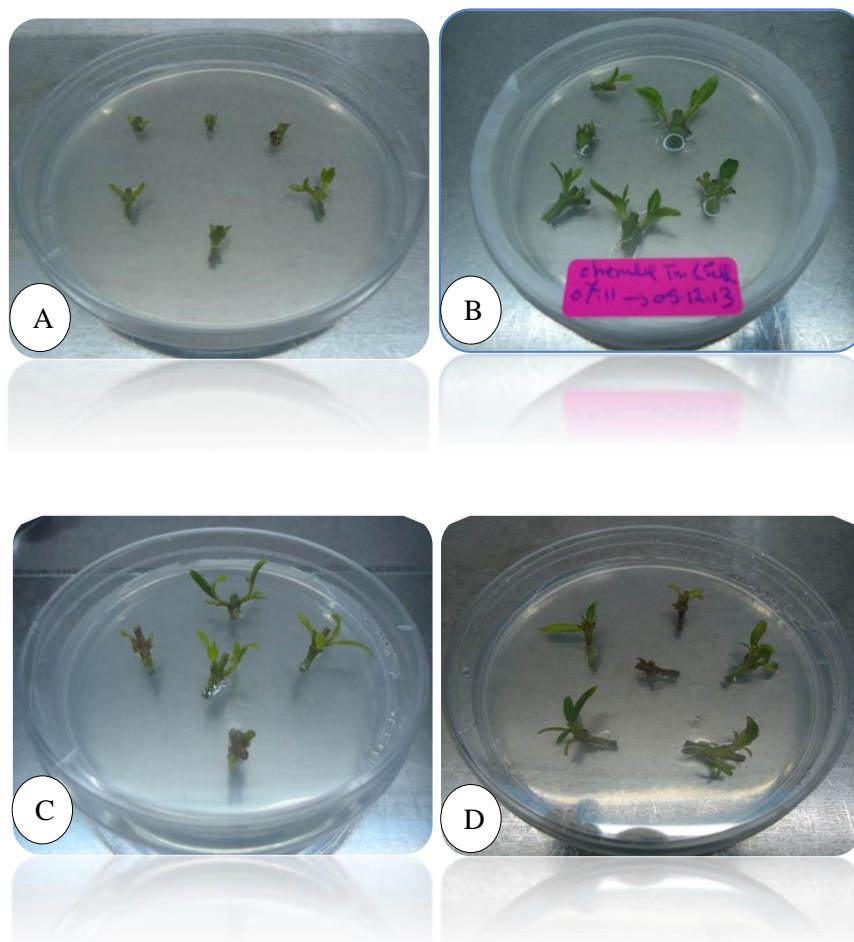


Figure 26. Débourrement des explants des variétés après 1 mois de culture : (A) BG, (B) CH, (C) FK et (D) SG.

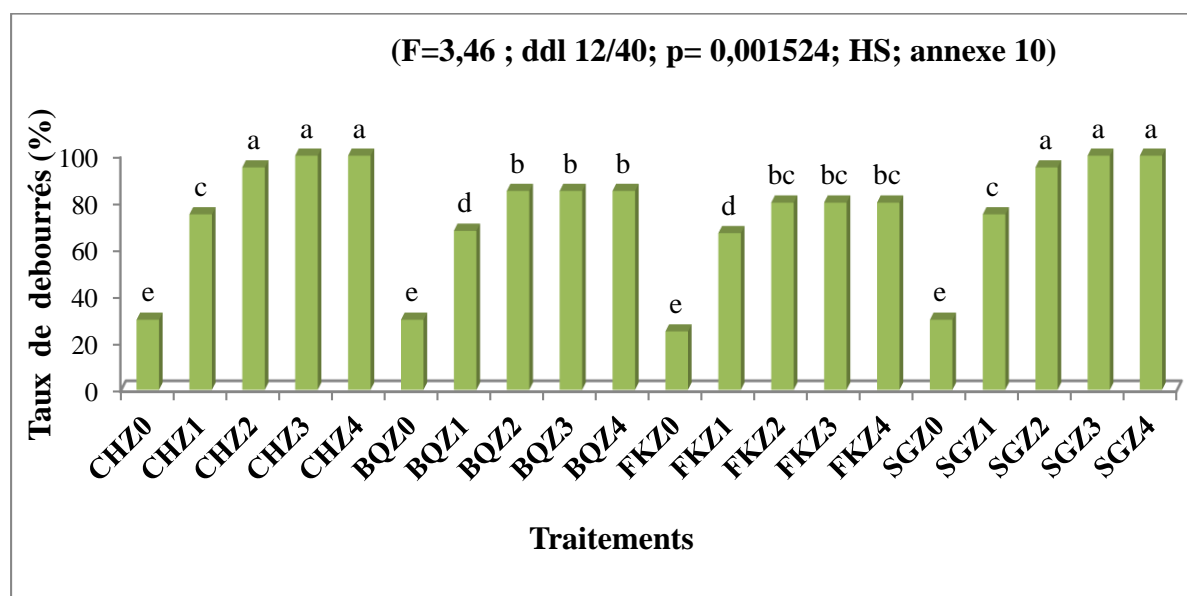


Figure 27. Effet de l'interaction (Génotype x Concentration de ZEA) sur le débourrement des bourgeons axillaires des explants, après 30 jours de culture.

b. Phase de multiplication

Pour la multiplication des pousses, des segments de tiges herbacées à deux nœuds, d'environ 1 à 1,5 cm de longueur, ont été récoltés puis repiqués sur milieu MSM supplémentés de 4 doses de ZEA (tableau 10). La croissance en longueur a commencé dans les 30 jours après la phase d'initiation de la culture. L'évaluation des résultats a porté sur différents aspects : le taux des explants ayant produit des pousses, la longueur moyenne de pousses nouvellement régénérées exprimée en cm, le nombre moyen de pousses régénérées par explant et le nombre moyen de feuilles par pousse.

Les résultats du tableau 10, montrent que la régénération des pousses a été obtenue *in vitro* sous toutes les conditions de culture testées, à l'exception du témoin (HF), par conséquent, la réponse varie en fonction du génotype et de la concentration de la ZEA testés.

La présence de la ZEA avec différentes concentrations a augmenté d'une manière significative la réponse de multiplication pour toutes les variétés micropropagées (tableau 10) ainsi qu'un effet d'interaction significatif (génotype x concentration de ZEA) a été révélé pour les quatre paramètres étudiés.

Le pourcentage d'explants ayant produit des pousses varie significativement ($p=0,000027$; annexe 11) de 33,33 (2,3 μM) à 83 % (9,2 μM) en fonction des doses de ZEA et indépendamment du génotype utilisé. La variété CH cultivée dans le milieu MSM enrichi de 18,4 μM de ZEA a révélé le taux le plus élevé (83 %) de prolifération des pousses comme pour les trois génotypes SG, BG et FK, cultivés dans les mêmes conditions ont donné aussi respectivement les meilleurs résultats (82,6 %), (80,70 %) et (76 %).

Pour stimuler le développement des pousses à partir des bourgeons débouffés, nous avons transféré ces dernières sur les mêmes milieux frais, de même composition que le milieu de départ. Cependant, les résultats de microbouturage après 2 mois ont montré que la prolifération des variétés testées varie en fonction des doses de ZEA et aussi en fonction des variétés testées.

Les résultats du micro-bouturage ont montré que indépendamment des variétés testées, le processus d'élongation des pousses régénérées a été fortement influencé par la concentration de ZEA utilisée. Cependant, les explants cultivés sur milieu dépourvu de ZEA ne présentent aucun allongement, et ce, quel que soit leur génotype (tableau 10). L'élongation des pousses de tous les génotypes utilisés régénérés dans le milieu MSM après 3 mois, augmente significativement ($p=0,000010$; annexe 12) avec la concentration de ZEA jusqu'à 9,2 μM et donne les meilleurs performances d'élongation (3,66 cm) ; (3,67 cm) ; (3,87 cm) et

(3,96 cm) respectivement pour les variétés CH, BG, FE et SG, alors qu'elle diminue pour des concentrations plus élevées (18,4 μM) (tableau 10).

Le nombre moyen de pousses par explant n'a pas été significativement ($P = 0,225357$; annexe 11) affecté par la concentration de ZEA dans le milieu de culture. Le nombre moyen de pousses le plus élevé (2,00) a été obtenu avec l'usage de 4,6 μM sur les variétés BG, SG et FK, cette même concentration n'a donné que 1,80 pour CH. Tandis que ce nombre a diminué lorsque la concentration de ZEA dépasse les 4.6 μM μM et ce pour les quatre variétés étudiées (tableau 10).

Le SEE montre clairement que la ZEA a été très efficace pour la multiplication des pousses (figure 28). Les 4 meilleures valeurs obtenues par génotype sont : de 6,4 pour la SG, de 4,94 pour la FK, de 4,21 pour la CH et de 2,51 pour la BG. Cependant, l'augmentation de la concentration de ZEA dans le milieu MSM a été favorable pour la prolifération des 4 génotypes et a fourni des meilleurs résultats de croissance, alors qu'une augmentation excessive de cette dernière (18,4 μM) a induit une diminution de la SEE pour les trois variétés seulement (FK, SG et CH).

Pour le nombre moyen de feuilles régénérées par explant, nous constatons qu'il dépend lui aussi selon la dose hormonale appliquée. En effet, l'augmentation de la concentration de ZEA a significativement favorisé ($p = 0,000149$; annexe 15) le développement du plus grand nombre moyen de feuilles régénérés par explant et cela indépendamment du génotype étudié. Dans ces conditions, le nombre moyen de feuilles régénérés par explant pour les variétés CH, FK, BG et SG a été obtenu avec la concentration de 9,2 μM et a donné respectivement les meilleurs résultats (4,9) ; (5,3) ; (2,6) et (3,1), tandis qu'il a diminué avec des concentrations plus élevées pour l'ensemble des génotypes étudiés (tableau 10). Par ailleurs, les plus faibles résultats pour les quatre variétés (CH, BG, FK et SG) ont été obtenus avec 2.3 μM de ZEA respectivement de 3,2 ; 1,6 ; 4,4 et 1,8. Cependant, tous les génotypes ont montré un feuillage vert, morphologiquement similaire à la plante mère (figure 29)

Tableau 10. Effet de la composition minérale et hormonale sur la prolifération et le développement des pousses des quatre variétés (CH, BG, FK et SG) après 3 mois de culture

Milieu	Cytokinines (μ M)	Tx explants ayant produit des pousses	Longueur moyenne de pousses (cm)	Nombre moyen de pousses/ explant	Nombre moyen de feuilles/ explant
Témoin	0	0 \pm I	//	//	
Chemlal	ZEA 2,3	58,0 \pm 2,3e	2.97 \pm 0.1cd	1.60 \pm 0.1a	3.2 \pm 0.1c
	ZEA 4,6	67,0 \pm 1,7d	3.58 \pm 0.1b	1.80 \pm 0.1a	4.1 \pm 0.2b
	ZEA 9,2	74,0 \pm 2,3c	3.66 \pm 0.1ab	1.70 \pm 0.1a	4.9 \pm 0.2a
	ZEA 18,4	83,0 \pm 1,7a	3.24 \pm 0.1c	1.65 \pm 0.1a	4,0 \pm 0,0b
Blanquette de Guelma	ZEA 2,3	38,6 \pm 1.8g	2.5 \pm 0.05e	1.80 \pm 0.1a	1.6 \pm 0.1d
	ZEA 4,6	44,0 \pm 0.6f	3.22 \pm 0.1c	2.00 \pm 0.1a	2.2 \pm 0.1b
	ZEA 9,2	73.3 \pm 1.2c	3.67 \pm 0.2ab	1.85 \pm 0.1a	2.6 \pm 0.1cd
	ZEA 18,4	80.6 \pm 1.8ab	2.74 \pm 0.1e	1.70 \pm 0,1a	2.1 \pm 0.1d
Ferkani	ZEA 2,3	33.3 \pm 1.8h	1.96 \pm 0.05f	1.60 \pm 0.1a	4.4 \pm 0.2b
	ZEA 4,6	42.0 \pm 1.1fg	3. 15 \pm 0.2c	2.00 \pm 0.1a	5.1 \pm 0.1a
	ZEA 9,2	54.3 \pm 1.2e	3. 87 \pm 0.1ab	1.90 \pm 0.1a	5.3 \pm 0.1a
	ZEA 18,4	76.0 \pm 1.7bc	2.74 \pm 0.03de	1.80 \pm 0.1a	4.7 \pm 0.2ab
Sigoise	ZEA 2,3	45.3 \pm 5.3f	2.47 \pm 0.1 ^e	1.85 \pm 0.05a	1.8 \pm 0.5cd
	ZEA4,6	64.0 \pm 1.7d	3.25 \pm 0.1c	2.00 \pm 0.1a	2.4 \pm 0.2cd
	ZEA 9,2	72,6 \pm 1.2c	3.96 \pm 0.1a	1.70 \pm 0.1a	3,1 \pm 0,0c
	ZEA 18,4	82.6 \pm 1.2a	3.23 \pm 0.1c	1.70 \pm 0.1a	3,0 \pm 0.1c

L'effet des traitements sur la formation des pousses a été exprimé en pourcentage des premiers bourgeons qui les ont produits. La longueur moyenne des pousses néoformées, le nombre moyen de pousses et de feuilles par explant. Les données ont été collectées après 90 jours à partir du début de l'expérimentation et chaque traitement comprend 100 explants. n= 100 traitements. Les moyennes suivies de la même lettre sont non significatives selon le test de LSD.

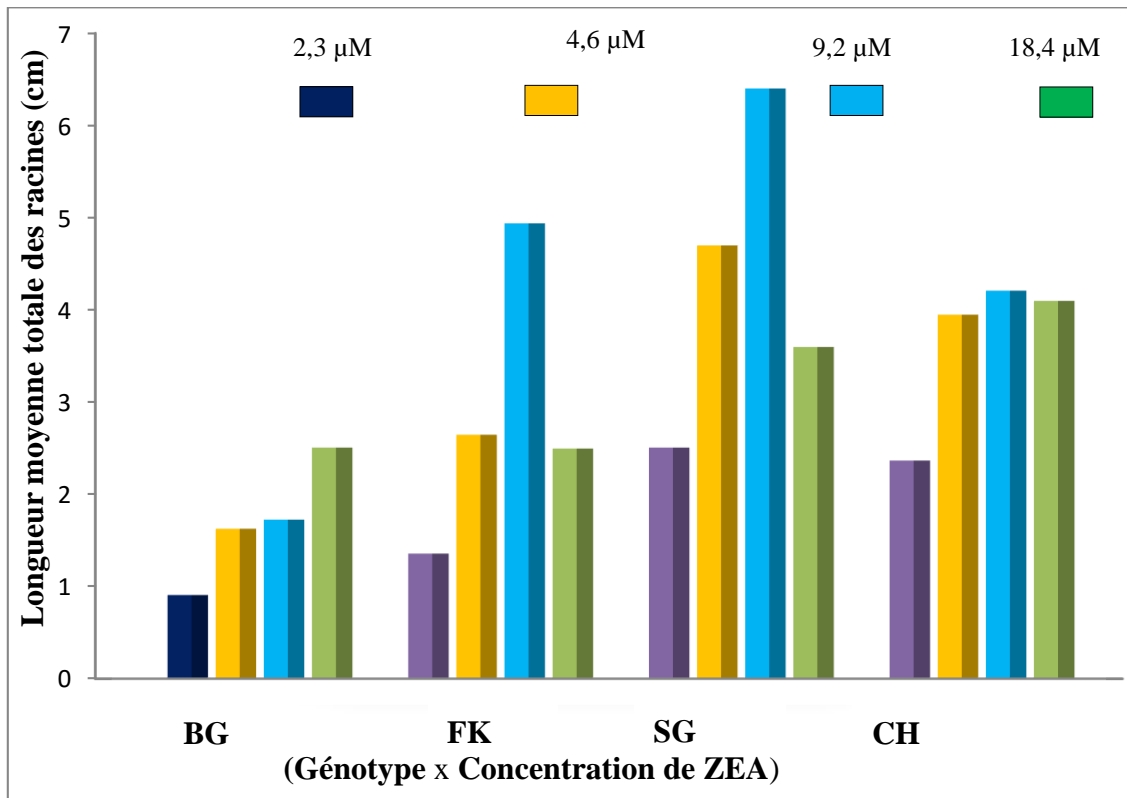


Figure 28. Effet de l'interaction (Génotype x Concentration de ZEA) sur la prolifération des pousses après 3 mois de culture. Les résultats sont exprimés en fonction de l'efficacité d'élongation des racines (SEE) qui représente la longueur moyenne totale (cm) de la végétation produite *in vitro* par explant

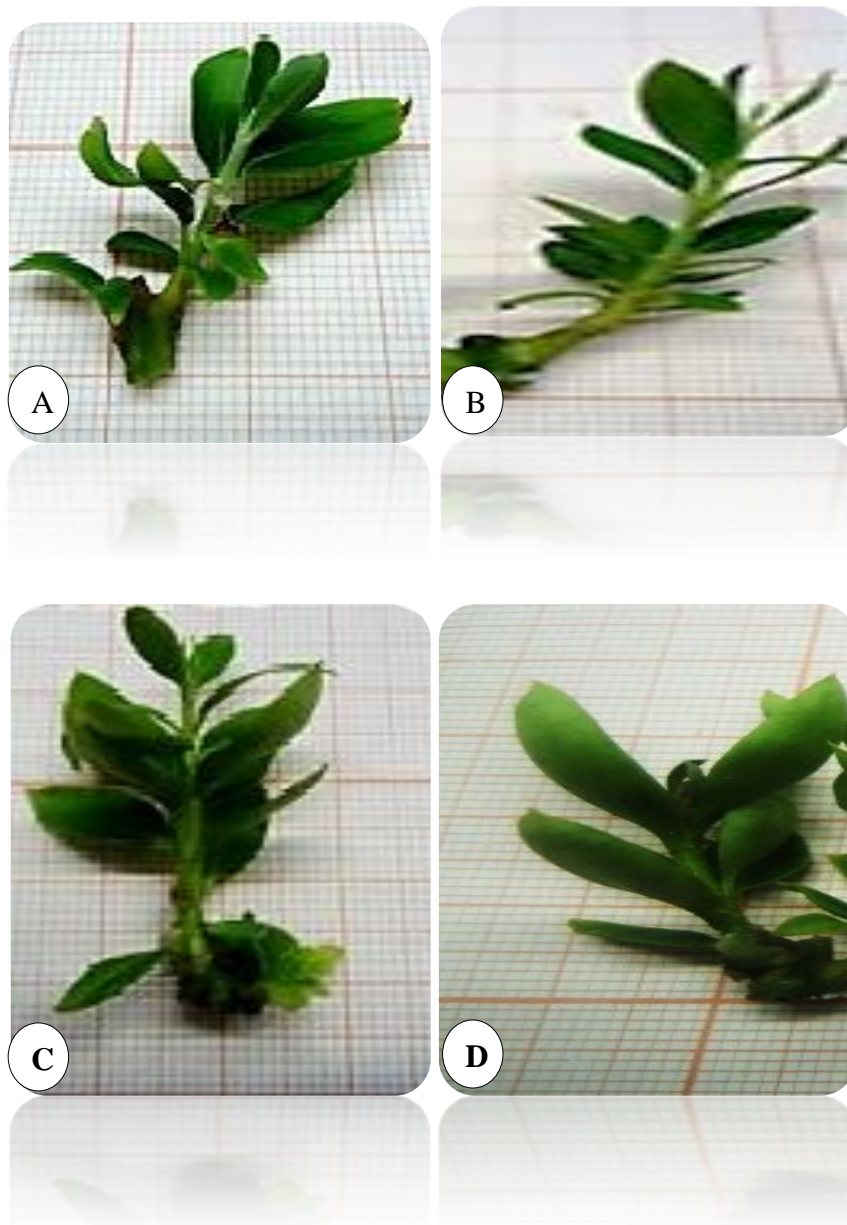


Figure 29. A, B, C et D. Pousses axillaires des variétés algériennes respectivement BG, FK, CH et SG régénérées à partir d'explants nodaux cultivés sur milieu MSM additionné de 9,2 μM ZEA après 2 mois d'élongation.

1.2.1.2. Phase d'enracinement et d'acclimatation

La phase d'enracinement réalisée sur des pousses bien développées, obtenues lors de la phase d'élongation, ont été transférées sur milieu $\frac{1}{2}$ MSM additionné d'AIB aux doses de 2,4 ; 4,8 ; 9,8 ; 19,7 μM et d'ANA aux doses de 2,7 ; 5,4 ; 10,7 ; 21,5 μM . Cette phase dont la durée était de 5 jours s'est déroulée à l'obscurité, puis transférées sur des milieux frais de même composition minérale pourvus uniquement de ZEA à la dose de 2,3 μM . Il y a lieu de souligner qu'au cours de cette phase, aucun développement racinaire ne s'est produit sur les boutures en culture, seule l'initiation semble être réalisée.

Les racines nouvellement formées commencent par apparaître sur les boutures qu'à partir du 5^{ème} jour suivant leur transfert sur milieux sans auxines en présence de lumière. Les résultats des différents traitements sur l'enracinement des 4 géotypes testés sont représentés dans le tableau 11. Ces résultats montrent d'une manière générale que l'enracinement a été possible sur l'ensemble des géotypes testés quelle que soit la concentration d'ANA employée. On note cependant que le taux d'enracinement ainsi que d'autres paramètres comme la longueur et le nombre moyen de racines varient significativement (annexe 15 ; 16 et 17) à la fois selon les doses d'ANA et les géotypes testés.

Concernant l'effet de l'auxine sur l'enracinement, nous avons noté, lors du travail préliminaire mené sur la variété CH, que seule l'ANA, était capable d'induire une rhizogenèse des pousses contrairement à l'AIB. Les résultats du tableau 11, montrent que l'ANA s'est montrée une nouvelle fois très efficace pour l'enracinement des trois autres géotypes à savoir : SG, FK et la BG. Les meilleures réponses surtout en terme de taux et longueurs d'enracinement respective sont celles obtenues en présence d'ANA à la dose de 5,4 μM , pour les trois géotypes SG (75,33 % ; 4,7 cm) FK (70 % ; 4,38) et la BG (60 % ; 3,96) à l'exception de la variété CH (21,5 μM) (60 % ; 4,23). Au-delà et/ou en deçà de ses concentrations optimales (c.à.d. celles offrant les meilleurs résultats), les réponses deviennent moins importantes.

S'agissant du paramètre (nombre moyen de racines par pousse), les meilleurs résultats (3,37 avec la BG et 3,42 avec la CH) sont obtenus surtout avec l'usage de fortes concentrations en ANA respectivement (21,5 et 10,7 μM).

Les résultats du tableau 11 mettent en évidence aussi, un effet géotypique sur l'enracinement. En effet, avec l'usage d'une même concentration optimale d'ANA (5,4 μM), les meilleures aptitudes à l'enracinement (surtout le taux et la longueur moyenne

d'enracinement) sont manifestées par la variété SG, suivie de la FK et en dernier par la BG. La CH quant à elle, ses meilleurs résultats, similaires à ceux de la BG, sont obtenus en présence de 21,5 μM d'ANA.

L'analyse des résultats (tableau 11), nous a conduit à calculer un nouveau paramètre que nous avons appelé : Efficience de l'Elongation Racinaire ou Root Elongation Efficiency (REE). Ce paramètre est calculé sur le même principe décrit précédemment.

Les résultats du REE (figure 31) nous ont permis de déduire l'effet que peut avoir l'interaction (Génotype x Concentration d'ANA) sur l'enracinement. C'est toujours la variété SG (6,4 cm) qui paraît plus performante comparativement aux autres variétés. Elle est suivie de la FK (4,94 cm), puis de la CH (4,21 cm) et en dernier par la BG (2,51 cm). Ces résultats confirment les conclusions que nous avons faites précédemment en analysant les trois paramètres séparément (taux d'enracinement ; nombre de racines par pousse ; longueur moyenne des racines) (tableau 11). Il y a lieu de signaler qu'une forte callogenèse s'est développées à la base des vitro plants de la variété BG (figure 30 (C)).

S'agissant de l'acclimatation, les vitro-plants enracinés ont séjournés dans la serre (d'acclimatation) pendant 1 mois. Au cours de leur développement, les plantes bien développées ont été soumises progressivement à une humidité relative plus faible et à une intensité lumineuse plus élevée. L'évaluation des taux de survie des vitro plants, après 1 mois d'adaptation, ont donné des résultats allant de 78.33 jusqu'à 82 %. Notons que, ce taux de survie n'a pas été affecté par le facteur génotypique.

Après 1 mois d'acclimatation, les plantules obtenues sont transférées dans des conteneurs en plastique contenant 5 litres de substrat (figure 32).

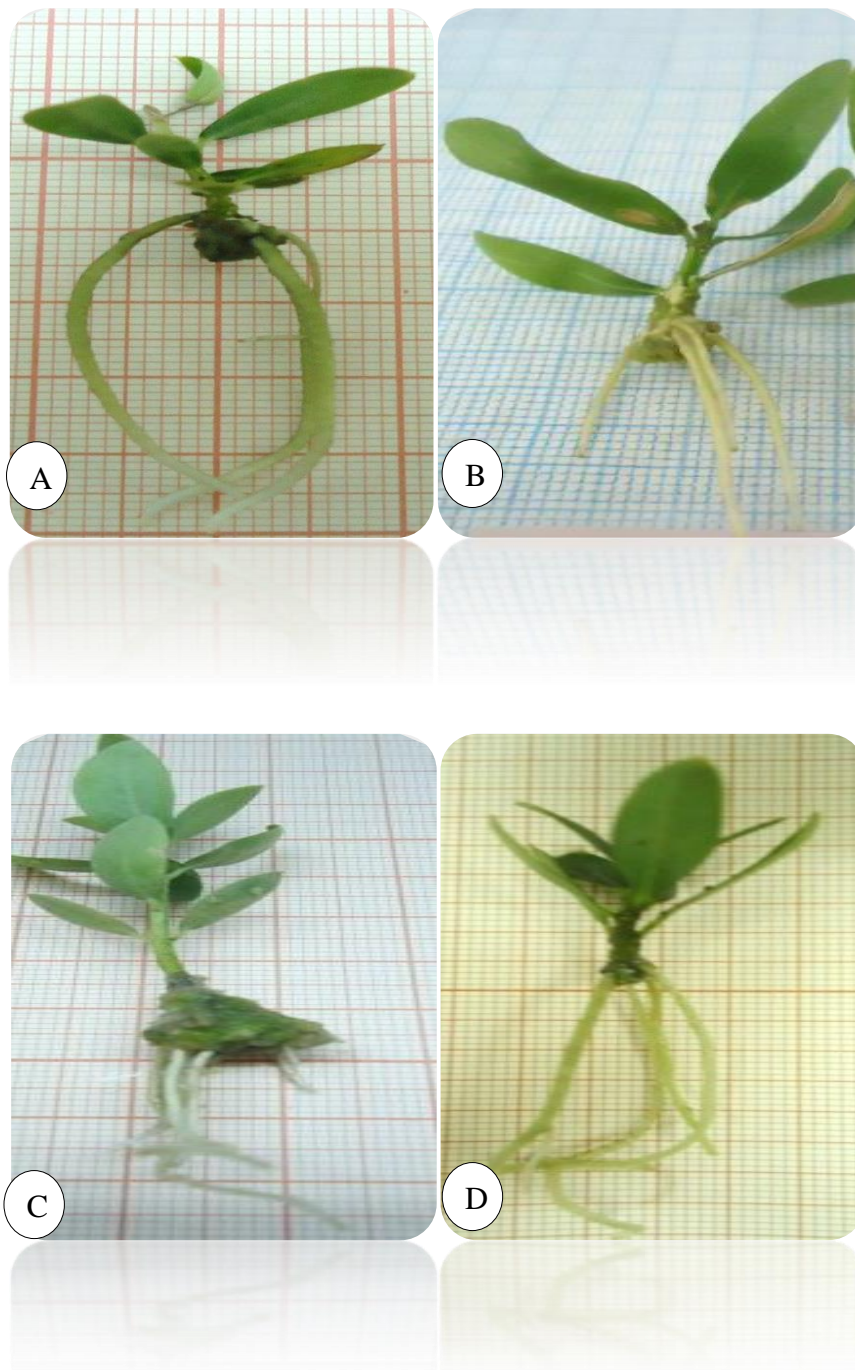


Figure 30. A, B, C et D : Vitro-plants des variétés algériennes, Sigoise, FerKani, Blanquette de Guelma et Chemlal enracinés après 30 jours sur milieu $\frac{1}{2}$ MSM, additionné de $2,3 \mu\text{M}$ ZEA.

Tableau 11. Effet des traitements sur la formation des racines de l'*Olea europaea* variétés cultivées (SG, FK ; BG et CH) après 30 jours de culture sur milieu d'enracinement ½ MSM supplémenté de 2,3 µM de ZEA

Génotypes	Concentration d'auxine (µM)	Taux d'enracinement (%)	Longueur moyennede racines (cm)	Nombre moyen de racines/pousse	Plantes acclimatées (%)	
Blanquette de Guelma		0				
		2.7	20,00±2,88i	3,33±0,14e	1,25±0,16e	78,33± 0,88a
	ANA	5.4	60,00±2,88c	3,96±0,13d	1,92±0,28cd	79,66 ±0,88a
		10.7	38,00±3,05ef	3,34±0,19e	2,50±0,12bc	80,00 ±1,15a
		21.5	20,00±1,15i	2,63±0,26f	3,37±0,18a	80,6 ±0,665a
Ferkani		0				
		2.7	40,00±2e	3,38±0,18 ^e	1,25±0,16 ^e	81,00± 0,57a
	ANA	5.4	70,00±2,3b	4,38±0,12b	2,16±0,28cd	81,66 ±1,2a
		10.7	50,00±2,3d	3,28±0,11e	2,50±0,13bc	82,00 ±1,52a
		21.5	30,00±1,15gh	2,50±0,19f	1,62±0,18de	82,00 ±1,15a
Sigoise	ANA	0				
		2.7	34,00±1,15gh	3,39±0,19e	1,25±0,16e	81,00± 0,57a
		5.4	75,33±0,6a	4,70±0,09a	2,16±0,28cd	81,00 ±0,57a
		10.7	45,33±1,7e	3,24±0,09e	2,5±0,13bc	80,33 ±1,33a
		21.5	35,33±1,7g	2,65±0,19f	1,63±0,18de	81,67 ±0,88a
Chemlal	ANA	0				
		2.7	8,00±2,0j	4,35±0,5b	1±0,0e	78,33± 0,88a
		5.4	25,33±1,15hi	4,22±0,18bc	1,5±0,28de	79,66 ±0,88a
		10.7	35,33±3,05efg	2,55±0,19f	3,4±0,20a	80,00 ±1,15a
		21.5	60,00±3,06c	3,57±0,09e	3,1±0,13ab	80,6 ±0,665a

La réponse à l'enracinement a été exprimée par le pourcentage d'enracinement des pousses, le nombre de racines par pousse et la longueur moyenne des racines. Le pourcentage de plants acclimatés a été aussi rapporté. Les données ont été collectées après 30 jours du début de l'expérimentation et les traitements comprennent 20 explants. Les moyennes suivies de la même lettre sont non significative selon test de LSD.

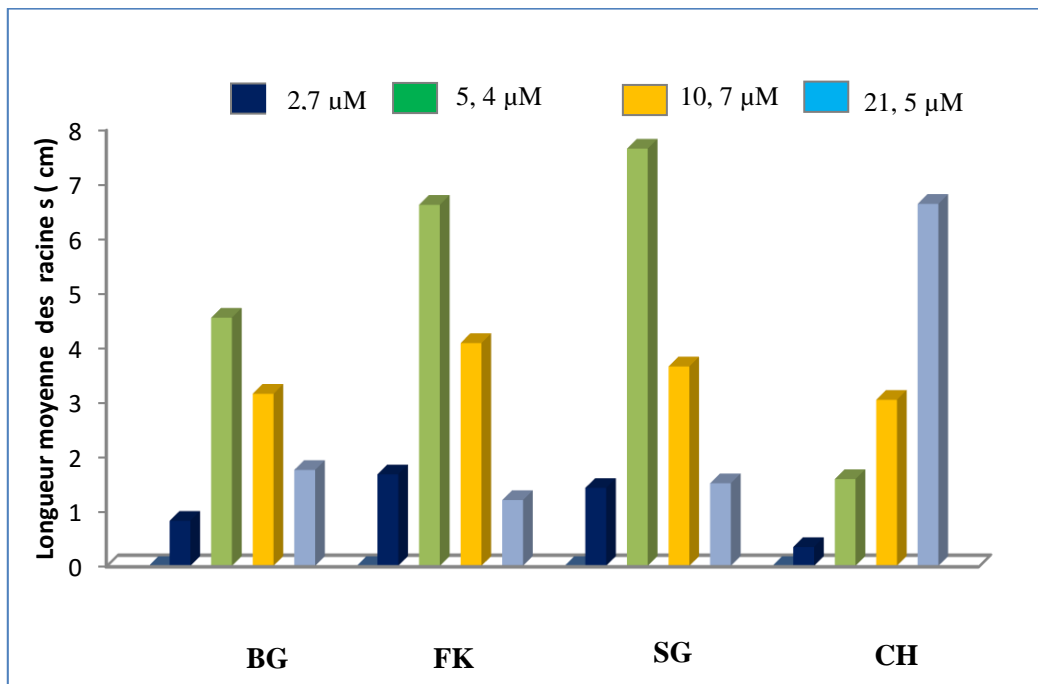


Figure 31. Effet de l'interaction (Génotypes X Concentration d'ANA) sur la prolifération des racines. Résultats sont exprimés en fonction de l'efficacité d'élongation des racines (REE) qui représente la longueur moyenne (cm) des racines produites *in vitro* par pousse.

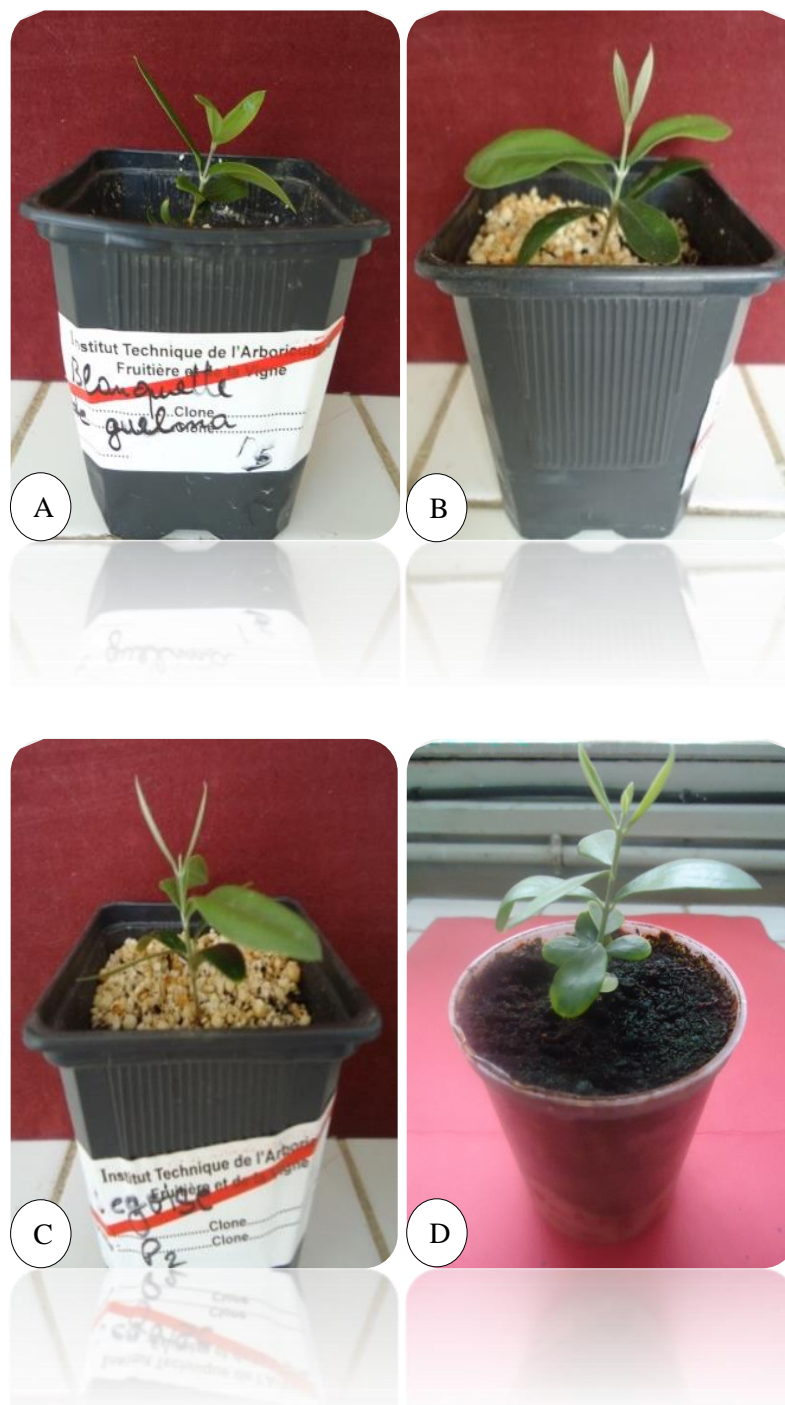


Figure 32. Aspects des plantules des variétés cultivées après 1 mois d'acclimatation :
 A) Blanquette de Guelma, (B) FerKani, (C) Sigoise et (D) Chemlal.

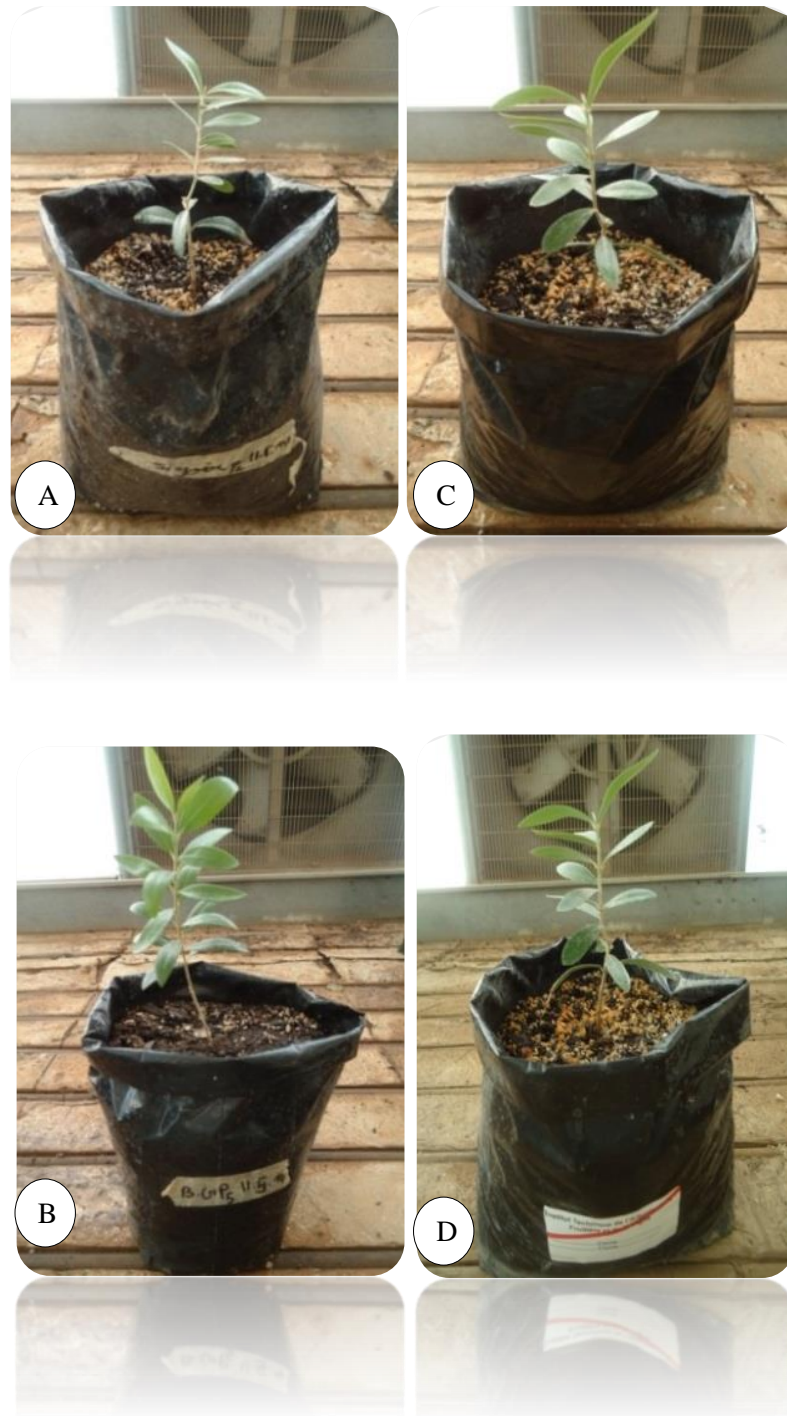


Figure 33. Aspect des plantules des variétés cultivées après 3 mois d'acclimatation : (A) Sigoise, (B) Blanquette de Guelma, (C) Chemlal et (D) Ferkani.

1.2.2. Aptitudes de l'olivier sauvage de Laperrine (*Olea europaea* L.) subsp *laperinei* au microbouturage

1.2.2.1. Phase d'établissement de la culture et de multiplication

La réussite de la phase d'établissement se base principalement sur la bonne maîtrise des problèmes de la contamination fongique et bactérienne, l'oxydation des explants et l'accumulation de composés phénoliques.

Le repiquage des microboutures (en nombre de 100 par traitement) a été effectué sur des milieux d'initiation qui diffèrent à la fois par leur milieu de base (OM ; MS et MSM) et aussi par la nature et la concentration des cytokinines qui les composent (ZEA et BA). Généralement, les bourgeons axillaires commencent à débourrer, après une semaine de la mise en culture des microboutures, quelle que soit la composition du milieu employé (figure 34).

a- Taux de débourrement des explants

Généralement, les bourgeons axillaires commencent à débourrer, après une semaine de la mise en culture des microboutures, quelle que soit la composition du milieu employé (figure 34).

Les résultats de la figure 35, révèlent des différences significatives des taux de débourrement des explants selon la composition des milieux de base et la composition hormonale des milieux ($p=0,001413$; annexe 19). Ces résultats montrent que l'usage de la ZEA à la dose de $18.4 \mu\text{M}$ donne des taux de débourrement de 100 %, quelle que soit la nature du milieu de base employé. Avec la BA comme cytokinine, seul le milieu MSM enrichi de $18.4 \mu\text{M}$ donne des taux similaires. Nous constatons aussi que les taux de débourrement augmentent au fur et à mesure que les concentrations en cytokinines augmentent.

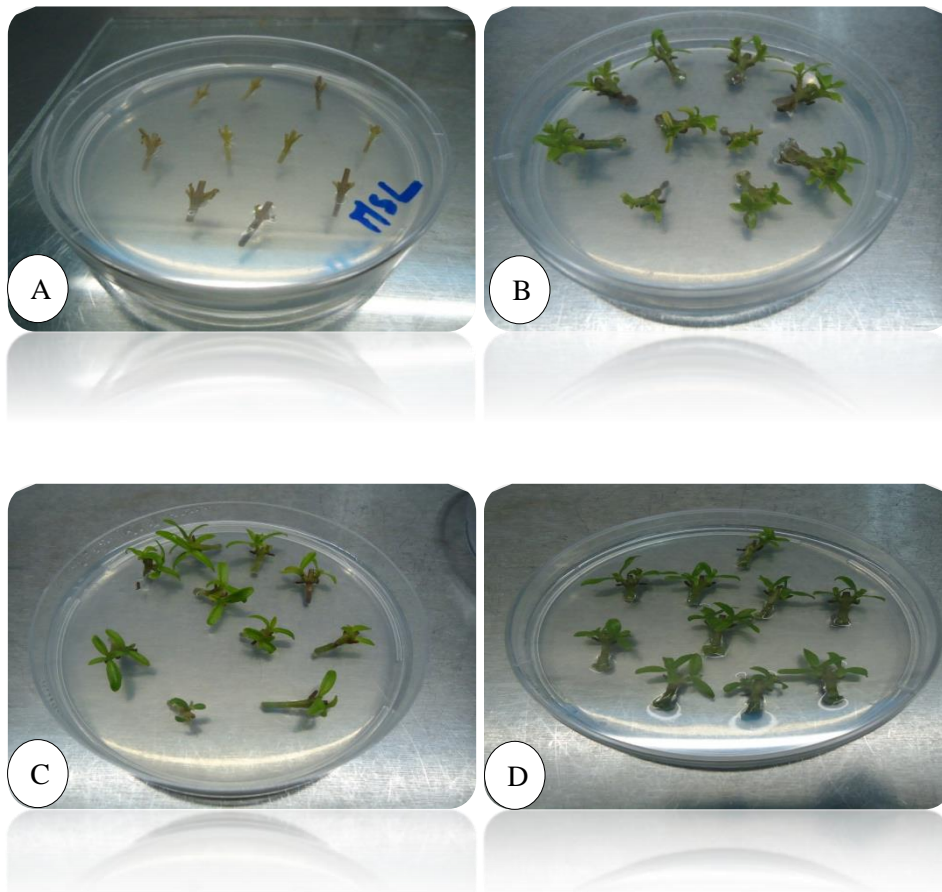
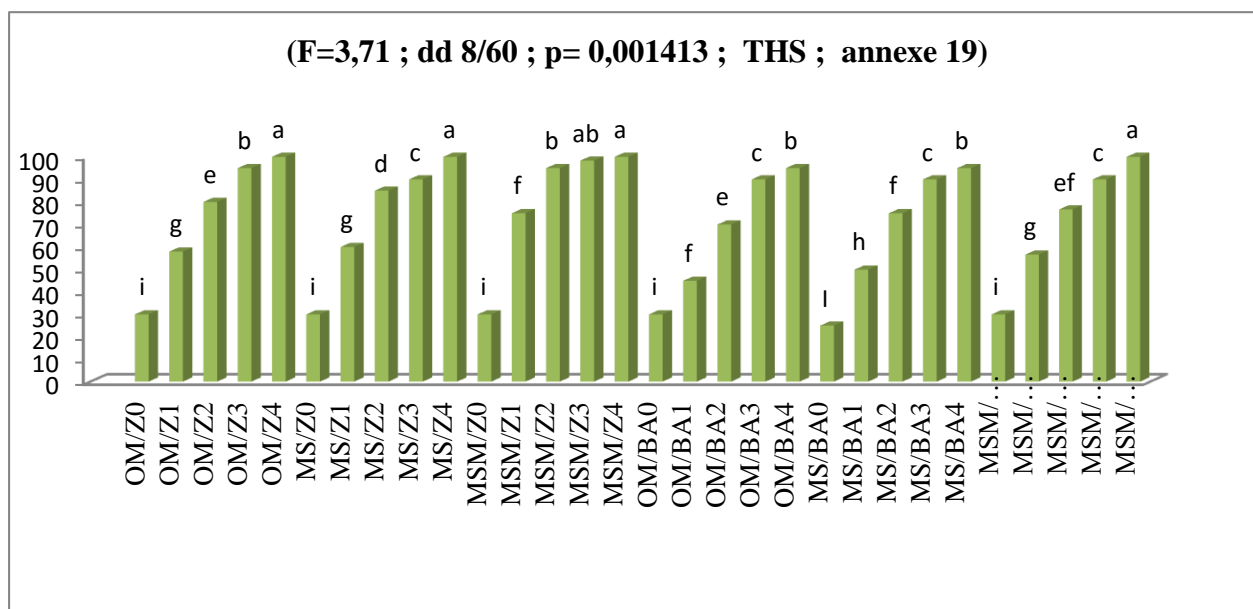


Figure 34. Phase de débourrement des explants de l'olive de Laperrine : (A) Mise en culture sur MSM, OM et MS enrichi de 18,4 μM de ZEA, (B) Après 1 mois sur MS, (C) Après 1 mois sur



OM et (D) Après 1 mois sur MSM.

Figure 35. Effet de la composition minérale et hormonale sur le taux de débourrement des explants de l'olive de Laperrine après un mois de culture.

b. Phase de multiplication

Lors de cette phase, nous avons employé comme bouture uniquement les segments de pousses à deux nœuds (1 à 1,5 cm de longueur) prélevés à partir des trois pieds-mères (34-V13P1, 38-V14P2 et 42-V15P3) obtenus sous Mist-système. A l'issue de la phase d'établissement de la culture, nous avons transplanté ces explants sur les mêmes milieux de culture (OM, MSM et MS) additionnés de deux de cytokinines ZEA et BA, afin de mettre en évidence l'impact que peut avoir la variation de la composition minérale et hormonale des milieux sur la croissance et le développement *in vitro* de l'olive de Laperrine.

Les résultats de la multiplication *in vitro* des microboutures prélevés de pieds mères triploïdes et diploïdes dans nos conditions ont donc été regroupés du fait qu'ils répondaient en culture *in vitro* d'une manière similaire (tableau 12 ; annexe 28, 29 et 30).

Pour stimuler le développement des pousses à partir des bourgeons débourrés (lors de la phase précédente), nous avons transféré ces derniers sur des milieux frais, de même composition que les milieux de départ. Ces milieux sont enrichis de ZEA et de BA. La durée de culture dans ces milieux était de 2 mois.

La régénération des pousses multiples a été obtenue *in vitro* dans toutes les conditions de culture testées, à l'exception du milieu sans hormone (témoin). Néanmoins, cette réponse varie en fonction de la composition minérale et hormonale du milieu utilisé (tableau 13). Il est à noter que la multiplication des pousses régénérées a été affectée par les traitements utilisés, ceux-ci ont significativement ($p= 0,000284$; annexe 20) favorisé un pourcentage de pousses régénérées dans toutes les conditions de culture testées et la réponse varie de 23,2 (milieu OM avec 2,3 μM BA) à 88,8 % (MSM supplémenté avec 9,2 μM de ZEA).

Nous avons également observé que indépendamment de milieu de culture testé, l'augmentation de la concentration des cytokinines (ZEA et BA) dans le milieu de culture a fait augmenter la réponse de multiplication des explants de l'olive de Laperrine pour les trois premières concentrations (2,3 ; 4,6 et 9,2 μM) mais une augmentation excessive (18,4 μM) a induit une diminution de cette réponse.

Les résultats présentés dans le tableau 20, indiquent que la longueur moyenne des pousses allait de 1,2 (OM avec 2,3 μM de BA) à 3,4 cm (MSM avec 4,6 μM de ZEA). De

même, ils révèlent que la nature et la concentration des cytokinines employées du milieu influencent fortement et d'une manière significative ($p=0,017921$; annexe 21) l'élongation des pousses régénérées.

Le nombre moyen de pousses formées a significativement ($p = 0,008815$; annexe 22) été affecté par la composition minérale et hormonale du milieu de culture. En effet, le nombre moyen de nouvelles pousses produites par explant varie de 1,6 (OM MSM enrichis respectivement de 4,6 et 2,3 μM de ZEA) à 2,1 (MSM supplémenté de 9,2 μM BA) (tableau 13).

Le SEE montre clairement que la ZEA a été très efficace dans la multiplication des pousses par rapport à la BA (figure 36). Les trois valeurs supérieures 5,1 (MSM avec 9,2 μM ZEA), 4,3 (MS avec 9,2 μM ZEA) et 4,2 (OM avec 9,2 μM ZEA), ont été obtenu lorsque les milieux ont été supplémenté avec de la ZEA. Le milieu MSM a induit les meilleurs résultats de croissance, caractérisés par des explants vigoureux, des pousses ramifiées ainsi que l'émergence de nouvelles pousses à la base des explants. Le milieu MS a montré des résultats intermédiaires, tandis que le milieu OM a produit la plus faible performance d'allongement de pousses (tableau 13).

Un grand nombre de feuilles (6,6) par explant a été obtenu sur milieu MSM enrichi de 4,6 μM de ZEA, de nouvelles pousses ont été développé à la base des explants (figure 37 (C)). Les explants cultivés sur MS et MSM ont montré un feuillage vert, tandis que les explants dans le milieu OM ont développé des feuilles chlorotiques et plus petites. Ils ont révélé que la nature et la concentration des cytokinines utilisées influencent fortement et d'une manière significative ($p=0,000000^*$; annexe 23) le nombre moyen de feuilles.

Tableau 12. Effet de la composition minérale et hormonale des milieux sur la prolifération des pousses diploïdes et triploïdes des explants de l'olive de Laperrine après 3 mois de culture.

Concentration de cytokinines (μM)	MS		OM		MSM	
	Diploïde	Triploïde	Diploïde	Triploïde	Diploïde	Triploïde
ZEA 2,3	31,6 \pm 1,7 ab	35,7 \pm 0,9b	28,3 \pm 4,4ab	31,3 \pm 1,7 b	47,6 \pm 1,5 cd	43,3 \pm 1,8 c
ZEA 4,6	43,3 \pm 1,7 c	42,0 \pm 0,6 c	40,0 \pm 2,9 c	40,0 \pm 1,7 c	63,3 \pm 1,7 e	62,0 \pm 1,7 e
ZEA 9,2	73,3 \pm 3,3f	78,7 \pm 1,9f	73,3 \pm 1,7f	74,0 \pm 1,7f	88,3 \pm 4,4g	89,3 \pm 1,8g
ZEA 18,2	68,3 \pm 4,4ef	71,3 \pm 1,2f	52,7 \pm 1,6 d	52,3 \pm 1,2 d	70,0 \pm 2,9f	73,0 \pm 1,5f
BA 2,3	25,0 \pm 0,0 ab	26,6 \pm 0,9 b	21,7 \pm 1,7 a	24,6 \pm 1,7 a	23,3 \pm 1,7 ab	33,3 \pm 1,7 b
BA 4,6	31,6 \pm 1,7 b	32,0 \pm 0,6 b	33,3 \pm 1,7 b	33,3 \pm 2,4 b	55,0 \pm 2,9 d	56,6 \pm 3,8 de
BA 9,2	60,0 \pm 5,0 de	58,7 \pm 1,9de	53,3 \pm 4,4 d	53,3 \pm 4,4 d	73,3 \pm 8,3f	74,0 \pm 3,1f
BA 18,2	53,3 \pm 3,3 d	58,0 \pm 2,6 de	46,7 \pm 1,7 c	47,0 \pm 3,5cd	51,7 \pm 1,7 d	59,6 \pm 1,8 de

L'effet des traitements pour la formation de pousses a été exprimé en pourcentage des premiers bourgeons produisant des pousses. Les données sont collectées après 3 mois du début de l'expérimentation et chaque traitement comprend 100 explants. Moyenne \pm erreur standard, n=100. Variation suivie de la même lettre est non significative selon le test de LSD

Tableau 13. Effet de la composition minérale et hormonale des milieux sur la prolifération des pousses et le développement des explants triploïdes de l'olive de Laperrine après 3mois.

Milieux de culture	Cytokinines (µM)	Taux des explants ayant produit des pousses	Longueur moyenne de pousses /explant (cm)	Nombre moyen de pousses /explant	Nombre moyen de feuilles /explant
Témoin	0	0a	//	//	//
OM	ZEA 2,3	28.9± 3.1b	1.4±0.1a	1.8±0.1b	4.6±0.2cd
	ZEA 4,6	40.0±2.0cd	1.8±0.05b	1.6±0.1 a	5.8±0.2 dc
	ZEA 9,2	73.7 ±3.0g	2.0±0.03b	1.9±0.1ab	5.7±0.2 d
	ZEA 18,4	52.5± 2.1e	1.6±0.1a	1.8±0.1 b	4.6±0.1 cd
MS	ZEA 2,3	33.6± 1.5c	1.4±0.05a	1.9±0.03 b	2.9±0.1 ab
	ZEA 4,6	42.7 ±1.0d	1.9±0.03b	1.9±0.03 b	5.4±0.4d
	ZEA 9,2	76.0± 3.2h	1.9±0.01b	1.9±0.03 b	5.3±0.3d
	ZEA 18,4	69.8± 2.1g	1.6±0.02a	2.0±0 b	5.1±0.2 cd
MSM	ZEA 2,3	45.5± 3.1d	2.3±0.1c	1.6±0.1 a	5.3±0.1d
	ZEA 4,6	62.7± 3.0f	3.4±0.1f	1.8±0.1b	6.6±0.2 de
	ZEA 9,2	88.8± 3.1i	2.9±0.02e	1.7±0.1 a	5.8±0.1de
	ZEA 18,4	71.5± 2.7g	2.7±0.1d	1.7±0.02 a	4.9±0.02 cd
OM	BA 2.3	23.2± 1.5b	1.2±0.05a	1.8±0.1ab	2.8±0.2 ab
	BA 4.6	33.3±0.1cd	1.6±0.1a	2.0±0b	3.7±0.1bc
	BA 9.2	53.3 ±0.1g	2.0±0.02b	2.0±0b	4.0±0c
	BA 18.4	46.8± 0.2e	1.8±0.05b	1.9±0.1 ab	3.1±0.1b
MS	BA 2.3	25.8± 0.8c	1.4±0.1a	2.0±0b	3.2±0.2b
	BA 4.6	31.8 ±0.2d	1.8±0.05b	1.8±0.05 ab	3.4±0.2bc
	BA 9.2	59.4± 0.7h	2.0±0.03b	1.9±0.02 ab	3.8±0.2bc
	BA 18.4	55.7± 2.4g	1.6±0.1a	1.9±0.05 ab	3.4±0.2bc
MSM	BA 2.3	28.3± 5d	1.4±0.05a	1.6±0.03a	2.2±0.1a
	BA 4.6	55.8± 0.8f	1.9±0.03b	1.8±0.1 ab	3.3±0.1bc
	BA 9.2	73.6± 0.4.i	1.9±0.01b	2.1±0.1b	4.0±0c
	BA 18.4	55.7± 3.9g	1.6±0.02a	1.8±0.02 ab	3.1±0.1b

L'effet des traitements sur la formation des pousses a été exprimé en pourcentage des premiers bourgeons qui les ont produits. La longueur moyenne des pousses néoformées, le nombre moyen de pousses et de feuilles par explant. Les données ont été collectées après 90 jours à partir du début de l'expérimentation et chaque traitement comprend 100 explants. n= 100 traitements. Les moyennes suivies de la même lettre sont non significatives selon le test de LSD.

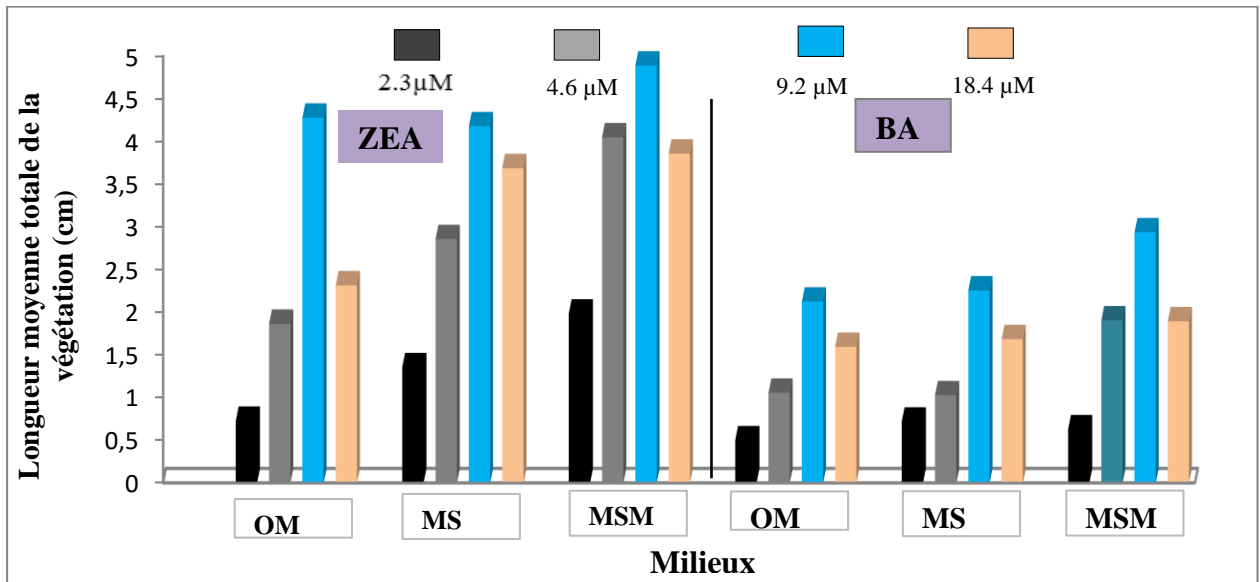


Figure 36. Effet de la composition minérale et hormonale sur la prolifération des pousses après 3 mois de culture. Résultats sont exprimés en fonction de l'efficacité d'élongation des pousses (SEE) qui représente la longueur moyenne totale (cm) de la végétation produite *in vitro* par explant.

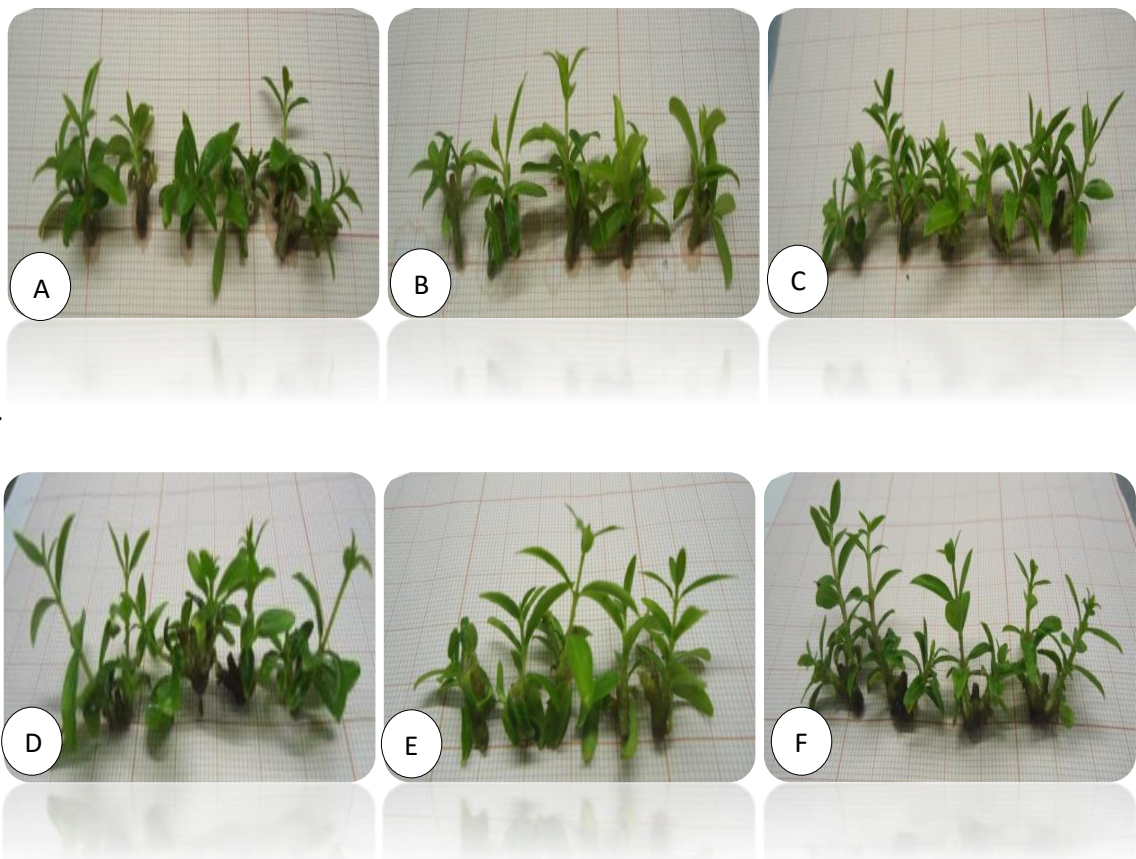


Figure 37. Aspect des pousses régénérées après 30 (A, B et C) et 60 jours (D, E et F) de culture respectivement sur les milieux MS, OM et MSM.

1.2.2.2. Phase d'enracinement et d'acclimatation

La réalisation de la phase d'enracinement, conduite avec les pousses obtenues bien développées régénérées précédemment lors de la phase d'élongation, s'est déroulée en deux phases : phase obscure, milieu enrichi d'auxines et phase lumière dont le milieu est dépourvu de celle-ci. L'application des auxines est nécessaire à l'induction racinaire mais le développement visible des racines ne commence qu'après le transfert des explants sur le milieu dépourvu d'auxines et cela, quelle que soit la durée du traitement inductif appliqué.

Les pousses bien développées ont été cultivées dans des milieux contenant de l'AIB ou de l'ANA. Elles ne produisent des racines que lorsqu'elles sont cultivées en présence d'AIB pour toutes les concentrations testées (tableau 14). La formation des racines a commencé dans les 5 jours après leur transfert (phase lumière). Chaque traitement a été évalué en déterminant le pourcentage de pousses enracinées, le nombre de racines par pousse régénérées, la longueur moyenne des racines et l'efficacité de l'élongation racinaire ou Root elongation efficiency (REE). Nos résultats montrent que les explants ont produit des racines uniquement lorsqu'ils ont été cultivés en présence d'AIB pour toutes les concentrations testées. Cependant, les doses croissantes d'AIB ont affecté significativement ($p=0.000000^*$; annexe 24) le processus d'induction racinaire (tableau 14). Le meilleur taux d'enracinement (61,7 %) a été obtenu avec 4,8 μM et le plus faible taux d'enracinement a été enregistré avec la concentration de 19,7 μM d'AIB soit 20 % (tableau 14, figure 39).

Pour le nombre moyen de racines par pousse, l'application de l'AIB a montré des effets significatifs ($p=0.022696$; annexe 25), la concentration de 9,8 μM d'AIB a induit le plus important nombre moyen de racines (2,5). Par ailleurs, la concentration (B1) de 2,4 μM d'AIB a donné les plus faibles résultats (1,3). La longueur moyenne des racines néoformées à la base des pousses était significativement élevée ($p=0,000389$; annexe 26), en effet, l'application de 19,7 μM (B4) a permis l'émergence de 2,1 cm contre seulement 1,1 cm pour 2,4 μM d'AIB. On a également observé que l'augmentation de la concentration d'AIB dans le milieu de culture a fait augmenter les trois paramètres de l'induction racinaire alors qu'une augmentation excessive a diminué le pourcentage et le nombre des racines des pousses.

Les résultats du REE (figure 38) nous ont permis de déduire l'effet que peut avoir la concentration de l'AIB sur l'enracinement. C'est toujours la concentration (B2) de 4,8 μM d'AIB (1,9 cm) qui paraît plus performante comparativement aux autres concentrations. Elle est suivie de la concentration (B3) de 9,8 μM d'AIB (1,77 cm), puis de la concentration 19,7 μM d'AIB (0,61 cm) et en dernier par la 2,4 μM d'AIB (0,31 cm). Ces résultats confirment

les conclusions que nous avons faites précédemment en analysant les trois paramètres séparément (taux d'enracinement, nombre moyen de racine par pousse et longueur moyenne des racines).

Les plantules enracinées *in vitro* ont été transférées sur un substrat composé de tourbe et de perlite (2:1) et maintenues dans une chambre de pré-acclimatation avec une forte humidité. Au cours de cette phase, les plantules bien développées ont été progressivement exposées à une humidité relative plus faible et à une plus grande intensité lumineuse. Après 30 jours, les plantules se développent pour atteindre des longueurs moyennes d'environ 10 cm (figure 40 (A)). Les plantules pré-acclimatées ont atteint des taux de survie allant de 77.7 à 80.7 % (tableau 14). Après un mois d'acclimatation les plantules sont transférées dans des conteneurs remplis de 2 litres de substrat puis dans des conteneurs plus grands de 20 litres (figure 40 (B et C)).

Tableau 14. Effet des traitements sur la formation des racines de l'*Olea europaea* subsp. *Laperrinei*.

Concentration d'auxine (μM)	Pourcentage d'enracinement (%)	Longueur moyenne de racines (cm)	Nombre moyen de racines/ explant	Plante acclimatée (%)
0	0a			
AIB 2.4	21.7 \pm 3.8b	1.1 \pm 0.2a	1.3 \pm 0.5a	77.7 \pm 1.5a
AIB 4.8	61.7 \pm 3.8d	1.4 \pm 0.4a	2.2 \pm 0.5bc	80.7 \pm 2.1a
AIB 9.8	41.7 \pm 3.8c	1.7 \pm 0.3b	2.5 \pm 0.5c	79.3 \pm 0.6a
AIB 19.7	20.8 \pm 2.9b	2.1 \pm 1.0b	1.4 \pm 1.6ab	77.3 \pm 0.6a

La réponse à l'enracinement a été exprimée par le pourcentage d'enracinement des pousses, le nombre moyen de racines par pousse et la longueur moyenne de racines. Le pourcentage de plants acclimatés a été aussi rapporté. Les données ont été collectées après 30 jours du début de l'expérimentation et les traitements comprennent 20 explants. Les données ont été collectées après 30 jours du début de l'expérimentation et chaque traitement comprend 20 explants. Moyenne \pm erreur standard, $n = 20$ entre chaque traitement. Les moyennes suivies de la même lettre sont non significative selon test de LSD.

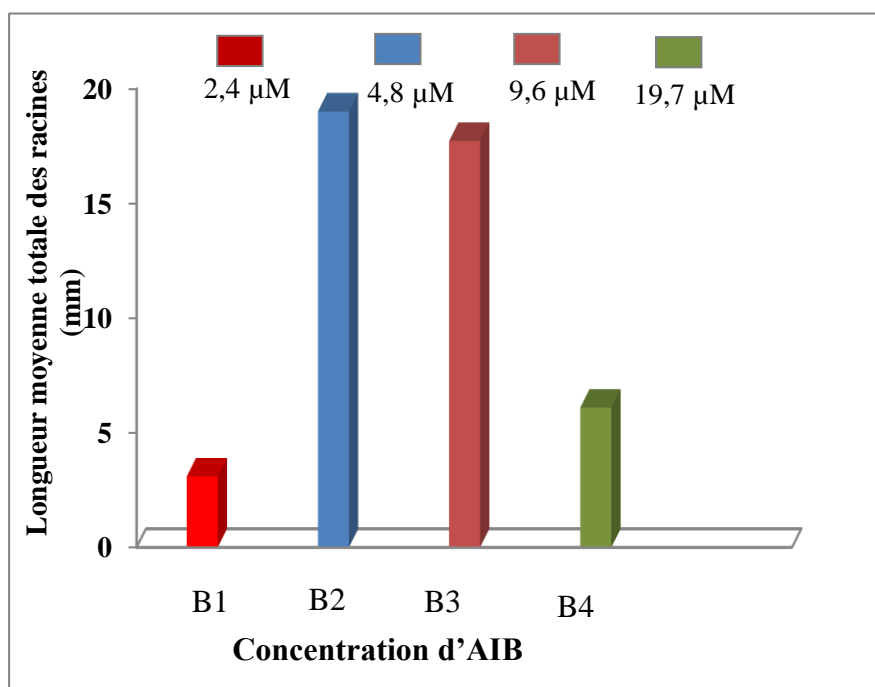


Figure 38. Effet de la concentration de l'AIB sur la prolifération des racines. Les résultats sont exprimés en fonction de l'efficacité d'élongation des racines (REE) qui représente la longueur moyenne totale (cm) des racines produites *in vitro* par explant



Figure 39. Enracinement des pousses adventives dans $\frac{1}{2}$ MSM supplémenté de $9.8 \mu\text{M}$ d'AIB : (A) après 5 jours d'obscurité, (B) Pousses enracinées après 15 jours sur milieu $\frac{1}{2}$ MSM supplémenté de $2.3 \mu\text{M}$ ZEA, (C) Elongation des racines après 30 jours sur le milieu d'enracinement.

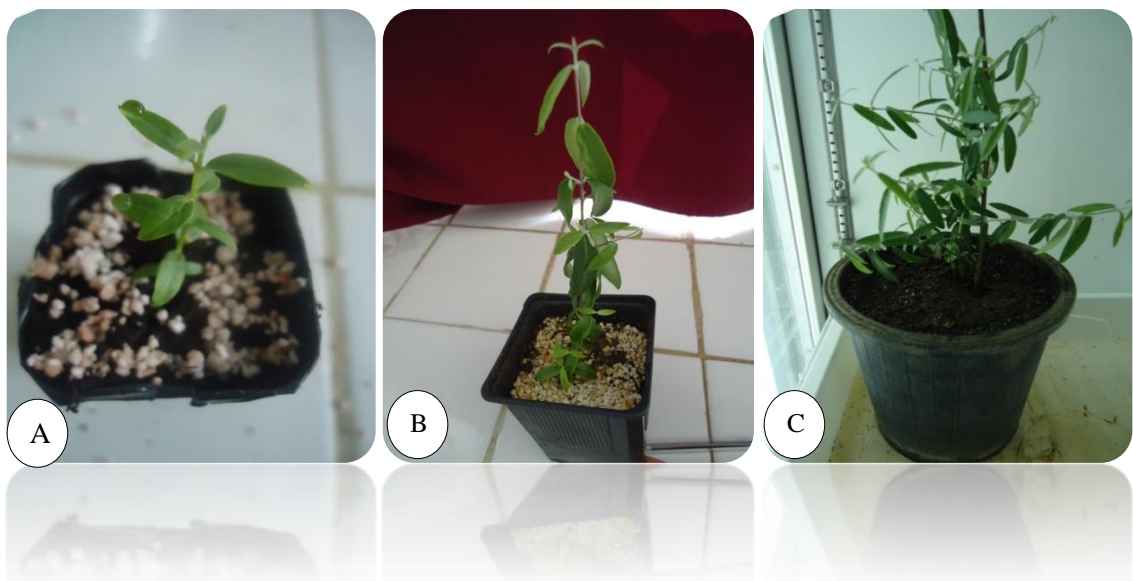


Figure 40. Aspect des plantules après (A) 1, (B) 3 et (C) 6 mois d'acclimatation.

2. Analyse moléculaire et cytofluorométrie

Lors de cette étude, nous avons fait recours aux techniques de biologie moléculaire pour évaluer, dans un premier temps, le niveau de ploïdie de trois plantes-mères de l'olive de Laperrine (*Olea europaea* subsp *laperrinei*), dénommées (34-V13P1, 38-V14P2 et 42-V15P3) (figure 41). Dans un deuxième temps, nous avons procédé à l'analyser de la conformité génétique des plants régénérés par microbouturage par rapport aux plantes mères à la fois des variétés autochtones : Chemlal, Sigoise, Ferkani et Blanquette de Guelma et aussi de l'olive de Laperrine.

Les analyses sont menées en se servant des marqueurs moléculaires micro-satellites SSR choisi parmi ceux rapportés dans la littérature (tableau 10) : quatre SSRs (GAPU47, GAPU59, GAPU71A et GAPU71B) cités par **Carriero et al. (2002)**, l'un (UDO03) rapporté par **Cipriani et al. (2002)**, et sept (DCA3, DCA5, DCA7, DCA11, DCA13, DCA15 et DCA18) par **SEFC et al. (2000)** et dix amorces ISSRs (ENEA12, ENEA13, ENEA14, ENEA21, ENEA34, ENEA45, ENEA47, ISSR1-6, ISSR2+2b, ISSR10+10b).

En plus de l'analyse moléculaire, nous avons utilisé la technique de cytométrie en flux pour confirmer davantage les résultats relatifs à la conformité génétique des plants régénérés chez les variétés autochtones et aussi la sous espèce Laperrine.

2.1. Evaluation du niveau de ploïdie chez les pieds-mères de l'olive de Laperrine (*Olea europaea* subsp *laperrinei*)

Le niveau de ploïdie, des trois plantes-mères enracinées de l'olive de Laperrine (34-V13P1, 38-V14P2 et 42-V15P3) a été évalué en se servant de 12 marqueurs SSRs. Seuls deux, notamment le GAPU71B et le DCA13, ont pu mettre en évidence l'existence de deux niveaux de ploïdie (diploïde et triploïde).

La simplicité du motif de bandes et de la nature multi-alléliques de locus SSRs ont été extrêmement utiles dans l'évaluation du niveau de ploïdie. En effet, les résultats montrent que les plantes-mères auto-enracinées présentent des niveaux de ploïdie différents (figure 41). Nous avons relevé que la plante 34-V13P1 présentait un profil de $2n$ clair avec une ou deux bandes pour tous les locus SSRs utilisés, tandis que les plantes 38-V14P2 et 42-V15P3 étaient triploïdes montrant trois allèles par génotype au GAPU71B et DCA13 locus.

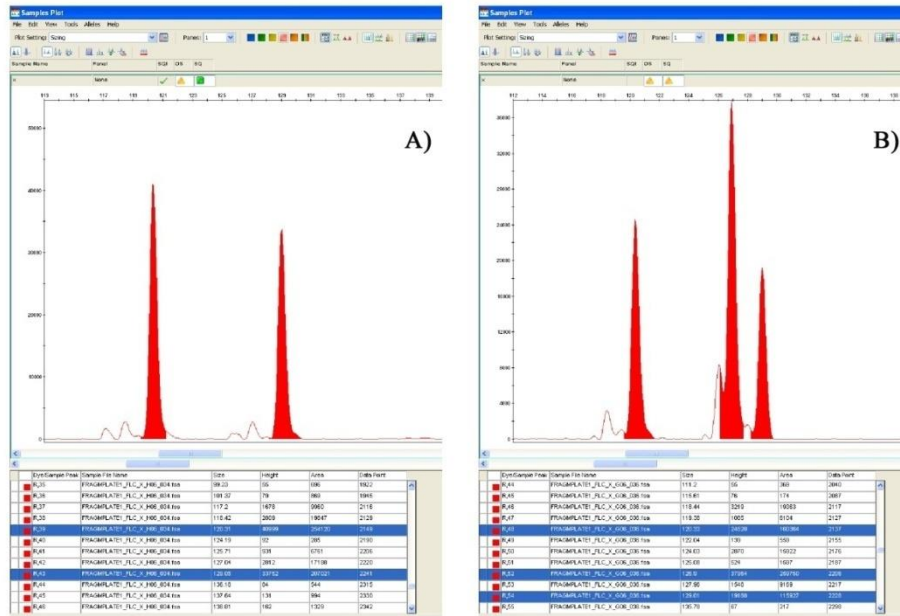


Figure 41. Mise en évidence du niveau de ploïdie des trois plantes-mères de l’olive de Laperrine : (A) Profil diploïde (34-V13P1) et (B) Profil triploïde (38-V14P2 et 42-V15P3) obtenu par l’utilisation de GAFU71B.

2.2. Evaluation de la stabilité génétique des vitro-plants

2.2.1. Evaluation de la stabilité génétique des vitro-plants par ISSRs

2.2.1. 1. Chez l’olive de Laperrine (*Olea europaea* L. subsp. *Laperrinei*)

Les plantes micropropagées provenant des trois plantes-mères de l’olive de Laperrine (34-V13P1, 38-V14P2 et 42-V15P3) (figure 41) d’*Olea europaea* L. subsp. *laperrinei* ont été testés pour leur conformité en procédant à des analyses moléculaires utilisant des marqueurs ISSRs. En tout dix amorces ISSRs (ENEA12, ENEA13, ENEA14, ENEA21, ENEA34, ENEA45, ENEA47, ISSR1-6, ISSR2+2b, ISSR10+10b) ont été testées (tableau 15 ; figure 42) (Baysal et al., 2011). Les résultats des analyses ont permis de révéler un total de 88 bandes bien résolues et reproductibles (une moyenne de 9 bandes par amorce, allant de 5 à 14 bandes). Les tailles des fragments amplifiés varient entre 220 pb (amorce ENEA21) et 2 000 pb (amorce ISSR1-6).

Les résultats des analyses phylogéniques effectuées montrent que les échantillons étudiés ont été divisés en deux principales branches et trois groupes distincts (figure 43). Dans chaque cluster les plantes régénérées et leurs plantes-mères, avec des fonds génétiques différents, ont été regroupées. L’analyse génétique a souligné que l’adoption de la stratégie de culture *in vitro* a été appliquée avec succès pour la micropropagation des deux génotypes

diploïdes et triploïdes. En effet, tous les amplifiants de plantes régénérées, comparés à leurs plantes-mères étaient monomorphes et montraient le même profil génétique.

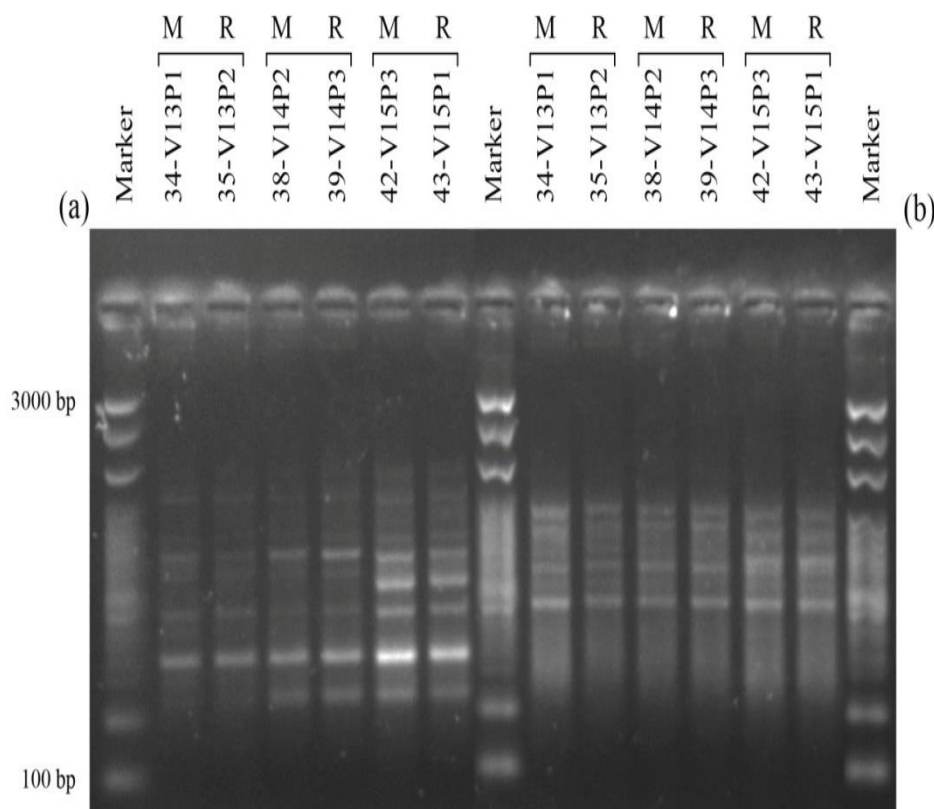


Figure 42. Profils d'ISSRs de plantes-mère de l'olive de Laperrine et leurs plantes régénérées, pour vérifier la stabilité génétique (M= pieds-mère ; R= plantes régénérées ; (A) ENEA 12 (B) ENEA14).

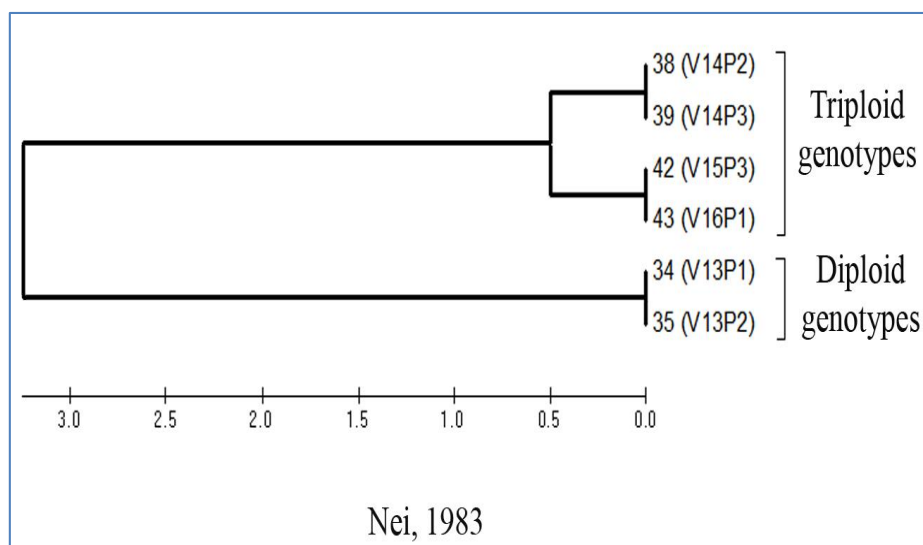


Figure 43. Relations génétiques entre les génotypes analysés (les pieds-mères et les plantes régénérées) développé avec le coefficient de Nei (Nei et al., 1983) et UPGMA analyse de cluster.

2.2.1.2. Chez les variétés autochtones Chemlal, Sigoise, Ferkani et Blanquette de Guelma

Les plantes micropropagées provenant de quatre plantes-mères des variétés autochtones Chemlal, Sigoise, Ferkani et Blanquette de Guelma (BG-PM, CH-PM et FE-PM et SG-PM) d'*Olea europaea* L. ont été analysées pour leur stabilité génétique. La conformité génétique des plantules régénérées *in vitro* a été vérifiée par l'analyse moléculaire en utilisant les marqueurs ISSRs comme ceux décrits dans la partie olive de Laperrine (tableau 15) (Baysal *et al.*, 2011). Les dix amorces ISSRs utilisés ont donné lieu à un total de bandes variant d'une variété à une autre (tableau 15), bien résolus et reproductibles environ 9 bandes par amorce en moyenne allant de 5 à 14. Les tailles des fragments amplifiés varient entre 210 pb (amorces ENEA 21) et 2,5 kb (amorces ISSR1-6). Pour la CH l'amorce AG (CA) 8 a amplifié le plus grand nombre de bandes (10) alors que l'amorce (AC) 8YG n'a amplifié que 6 bandes, avec une moyenne de 8,9 bandes par amorce ISSR (figure 44).

En effet, aucune variation somaclonale n'a été observée sur les profils totaux obtenus, un nombre total d'amorces pour les variétés BG, CH, SG et FK, respectivement (90 ; 89 ; 92 et 98) a été généré en utilisant les marqueurs ISSRs. Toutes les plantes régénérées ont été identiques à leurs plantes d'origines (plantes-mères) (figure 44, tableau 15).

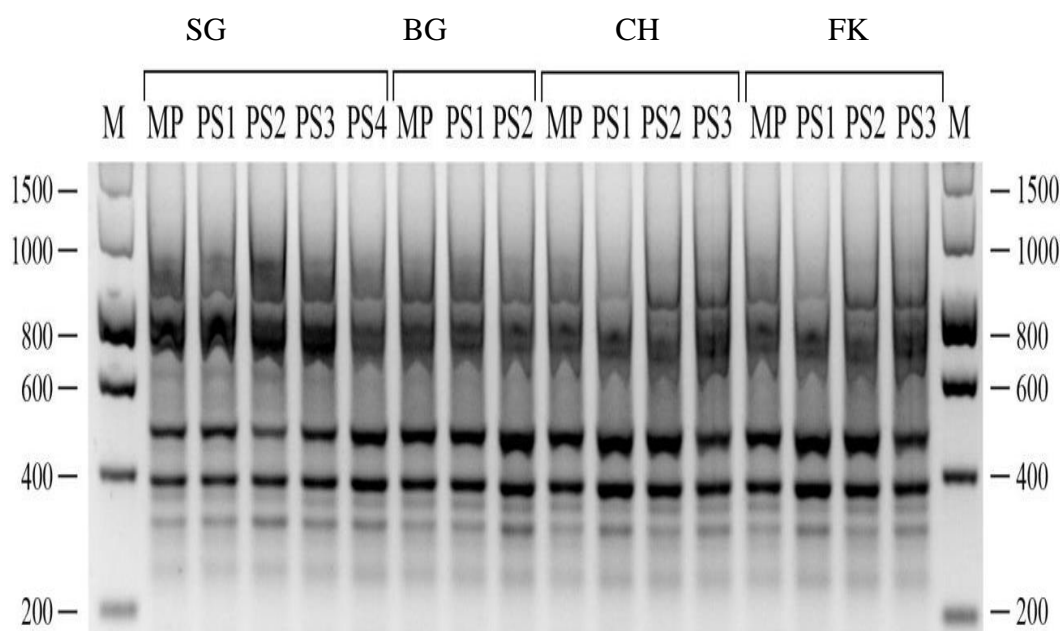


Figure 44. Profils d'ISSRs des plantes mères de BG, CH et FK et SG et leurs plantes régénérées pour vérifier la stabilité génétique (MP = pieds-mère ; MS1 = plantes régénérées : (A) ENEA 12 ; (B) ENEA 14.

Tableau 15. Efficacité des marqueurs ISSRs dans la détection des polymorphismes des plantes régénérées des variétés d'olivier cultivées (SG, FK, BG, et CH).

Paramètres Génétique	ISSRs			
	Blanquette de Guelma	Chemlal	Sigoise	Ferkani
Nombre d'amorces utilisées	10	10	10	10
Nombre Totale de bande	90	89	98	92
Classes de bande polymorphique Marqué	0	0	0	0
Nombre minimum de fragments par amorce	5	6	5	6
Nombre maximal de fragments par amorce	14	10	13	11
Nombre moyen de primer par fragment	9	8,9	9,8	9,2

2.2.2. Utilisation de la Cytofluométrie

2.2.2.1. Analyse cytométrique en flux de l'olive de Laperrine

Afin d'évaluer la stabilité de la ploïdie lors de la régénération des plantes triploïdes d'*Olea europaea* L. subsp *laperrinei*, des suspensions nucléaires ont été obtenues à partir de matériel végétal frais de l'olive de Laperrine qui a été analysé par cytométrie en flux (FCM). Les niveaux de ploïdies ont été reconnu en comparant le contenu d'ADN des plantes-mères et des plantes régénérées, soit un total de 11 plants régénérés ont été analysés comme il a été possible d'isoler une bonne quantité de noyaux de tous les échantillons testés. La présence d'un seul pic dans tous les échantillons analysés autour de 200 pb a révélé l'accumulation de noyaux 2C homogènes (figure 45), ne montrant aucune différence de ploïdie entre les plantes régénérées et les plantes-mères de départ. En outre, la ploïdie des plantes régénérées a été identique à celle de la plante mère, ce qui indique que la polyploïdisation n'a pas eu lieu.

2.2.2.2. Analyse cytométrique en flux des variétés Sigoise, Chemlal, Ferkani et Blanquette de Guelma

Pour évaluer la stabilité de la ploïdie lors de la régénération végétale, des suspensions nucléaires d'*Olea europaea* L., variété Blanquette de Guelma (BG), variété Sigoise (SG), variété Chemlal (CH) et variété Ferkani (FK) ont été extraites à partir de matières végétales fraîches, analysées par FCM. Les niveaux de ploïdies ont été reconnus en comparant le contenu d'ADN des plantes-mère et de leurs régénérants. Pour chaque variété, un total de 12 plants régénérés ont été analysés.

Le chevauchement du pic, dans tous les échantillons analysés au canal 200, a révélé l'accumulation de noyaux 2C homogènes, comme indiqué dans la figure 46 (A, B, C et D). Les résultats n'ont révélé aucune différence de ploïdie entre les plantes régénérées et leurs plantes-mères. En outre, la ploïdie des plantes régénérées était identique à celle de la plante-mère.

Dans nos conditions expérimentales, l'analyse cytofluorimétrique de l'ADN n'indique aucune différence entre les plantes régénérées et leurs plantes-mères. Cependant, pour la propagation clonale de masse, il est nécessaire d'utiliser un système de régénération capable de produire du matériel végétal homogène à partir de génotypes d'élite.

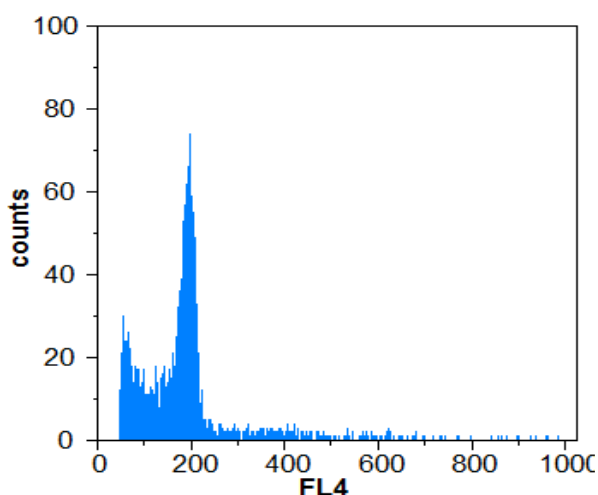


Figure 45. Histogramme d'intensité relative de fluorescence obtenu, après analyse simultanée de noyaux isolés, à partir de feuilles des plantes-mère triploïdes et des plantes régénérées de la sous espèce olive de Laperrine

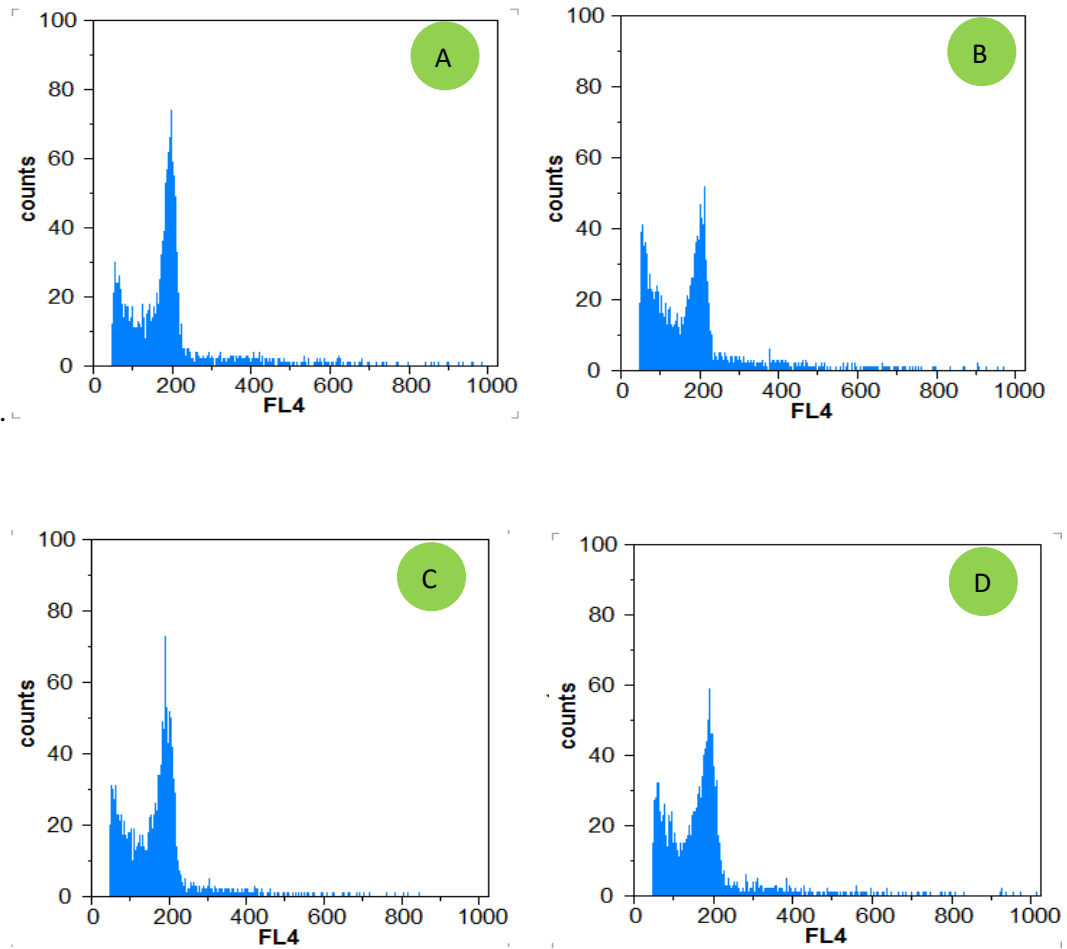


Figure 46. Histogrammes des intensités relatives de fluorescence obtenus, après analyse simultanée des noyaux isolés, à partir de feuilles de pieds-mères et leurs plantes régénérées : (A) CH, (B) FK (C) BG et (D) SG.

V. DISCUSSION GENERALE

Le microbouturage est un des plus spectaculaires applications de la culture *in vitro*. Cette technique de multiplication végétative reste l'innovation la plus récente pour l'olivier. Cependant, certaines recherches menés dans ce domaine indiquent qu'il est difficile d'adapter les tissus de l'espèce olivier aux manipulation *in vitro* (**Rugini, 1984 ; Bartolini et al., 1990**). C'est le cas de la variété Chemlal (ayant fait l'objet de cette étude) qui compte parmi les variétés récalcitrantes qui répondent difficilement à la technique du bouturage semi-ligneux (**Caballero et al., 1983 ; Mendil et Sebai 2006 ; khelifi et al., 2007 ; Haddad, 2009**).

Partant de ce constat, nous avons entrepris la présente étude dans le but de chercher et d'élaborer un protocole expérimental efficient de régénération *in vitro* via le microbouturage, de plusieurs variétés autochtones d'olivier (*Olea europaea* L.) appartenant à deux sous espèces : la subsp *sativa* (Chemlal, Sigoise, Ferkani et Blanquette de Guelma) et la subsp *laperinei* (diploïde et triploïde). Nous avons axé nos recherches beaucoup plus sur l'influence de deux principaux facteurs, connus pour leurs influences sur le micro-bouturage de l'olivier. Il s'agit notamment de la composition minérale de trois milieux de base (MS, OM et MSM) et aussi de la composition hormonale des milieux au cours de la phase de développement (avec l'apport de 4 cytokinines ZEA, BA, KN et TDZ) et de la phase d'enracinement (avec l'apport de 2 auxines AIB et ANA).

Les facteurs influant sur le microbouturage *in vitro* peuvent être divisés en deux grands groupes. Le premier représente, les facteurs internes, (ceux liés à la plante) et concerne d'une part le génotype, la nature et l'âge de l'explant et d'autre part l'état physiologique de la plante mère sur laquelle, l'explant a été prélevé. Le second, regroupe les différents facteurs externes (ceux liés à l'environnement) qui englobent à la fois le milieu (particulièrement la composition en milieu de base « minérale et vitamine », hormonale et sucres) et les conditions de culture (température, éclairage et humidité relative de l'air) (**Margara, 1989**).

La composition minérale et hormonale compte donc parmi les facteurs déterminants qui impactent fortement l'aptitude au microbouturage chez l'olivier (**Rugini, 1984 ; Bartolini et al., 1989 ; Rama et Pontikis, 1990 ; Leva et al., 1992 ; 1995 ; Mencuccini, 1995 ; Zuccherelli et Zuccherelli 2002 ; Chaari-Rkhis et al., 2011**). L'influence de ces facteurs ne se limite pas au microbouturage mais s'étant aussi à d'autres processus morphogénétique comme l'organogénèse *in vitro* (**Brhadda et al., 2003**). L'effet d'un milieu de culture résulte de l'ensemble des interactions des différents éléments qui le composent. Certains, d'entre eux stimulent les processus du développement *in vitro*, d'autres ont peu d'influence sur le

débourrement (**Thorpe, 1980 ; Rugini, 1984 ; Rugini, 1986 ; Caricato, 1995 ; Grigoriadou et al., 2002 ; Brhadda et al., 2003**).

Comme nous l'avons vu précédemment, la comparaison des résultats du microbouturage obtenus en fonction de la composition des milieux de base montre la supériorité du milieu de base MSM suivi du milieu OM spécifique à l'olivier et en dernier du milieu MS. L'efficacité du MSM comme milieu de base ne s'est pas exprimé uniquement avec nos variétés. D'autres auteurs comme **Leva et al. (1995)** confirment aussi la supériorité et l'efficacité de ce même (MSM) additionné de 9,2 µM de ZEA, à l'égard de la multiplication d'un grand nombre d'autres cultivars comme : Maurino, Leccino, Pendolino, Frangivento, Frantoio, Moraiolo, Taggiasca, Nocellara etnea, Nocellara del Belice, Biancolilla, Cerasuola et la Picholine.

Néanmoins, d'autres auteurs comme **Zacchini et De Agazio (2004)**, évoquent plutôt les performances du milieu OM lorsqu'il est utilisé avec la variété Nebbiara. Les trois milieux de base (MS, MSM et OM) que nous avons testé, diffèrent essentiellement par leur teneur en azote total (60 ; 30 et 26,24 méq/l) et en nitrates (39,4 ; 19,7 et 21,1 méq/l) (tableau 7). Le milieu MS, plus riche en azote total et en nitrates comparativement aux deux autres, se montre selon, **George (1993)** plus efficient à l'égard de l'organogenèse *in vitro*.

La forme avec laquelle est apporté l'azote au milieu de base semble avoir une influence notable sur le devenir des cultures selon le rapport de certains auteurs (**Rugini, 1984 ; Cozza et al., 1997 ; Chaari-Rkhis et al., 2011**). En effet, **Leva et al. (1995)** signalent que le microbouturage connaît une amélioration notable en augmentant la quantité du NH_4NO_3 et en réduisant celle de KNO_3 , du milieu OM. Tandis que dans le milieu MS, la forte concentration de NH_4NO_3 et de KNO_3 avait des effets négatifs sur les semis induisant des vitrifications (**Zryd, 1988**).

Comparativement aux autres milieux testés, le milieu OM est caractérisé par des teneurs élevées en macroélément pour les ions (K^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+}) respectivement (20,08 ; 11,06 et 12,17 méq/l). Plusieurs auteurs ont signalé l'importance des ions K^+ et Ca^{2+} sur l'organogenèse (**David et al., 1978 ; Bornman, 1983**). Aussi, **Margara (1978)** rapporte que la production de bourgeons est influencée par la richesse du milieu en K^+ .

L'effet favorable des phytohormones particulièrement les cytokinines sur la stimulation de la croissance et le développement des bourgeons axillaires est très connu, elles agissent selon leur nature et leurs concentrations dans le milieu (**Margara, 1989**).

Toutes les cytokinines testées lors de ce travail, induisent le débourrement des bourgeons et assurent la croissance et le développement des pousses mais à des degrés différents. Les meilleurs résultats ont été obtenus en présence de ZEA, quelque soit la variété ou le milieu de base employé. Les meilleurs taux de débouement sont obtenus avec de la ZEA lorsqu'elle est appliquée aux doses allant de 4,6 à 18,4 μM . Ce sont les variétés CH et SG qui donnent les meilleurs taux (100 %).

De nombreux auteurs confirment l'efficacité de l'emploi de la ZEA comme cytokinine, lors de la phase de débourrement et même de la phase de multiplication. Selon **Abousalim et al. (2004)**, les taux de débourrement les plus importants (100 %) ont été atteints également avec la ZEA (apportée à 2,3 μM) en travaillant sur la Picholine Marocaine. Aussi, **Binet et al. (2007)** signalent avoir obtenu des taux proches de 80 % pour la variété Aglandou en employant de la ZEA à 18,4 μM .

L'emploi de la ZEA, lors de cette étude, a permis d'améliorer les résultats chez la variété CH, comparativement aux résultats rapportés par **Yakoub-Bougdal et al. (2007)**. En effet, les meilleurs taux de débourrement ont atteint chez la variété CH, les 75 % sur des milieux MS enrichis de 9,2 μM de BA et 90 % sur milieu MS contenant 13,98 μM de Kinétine.

L'augmentation des doses des cytokinines, dans les milieux de culture, jusqu'à une certaine limite, entraîne à son tour une augmentation du pourcentage de bouture ayant donné des pousses. Les mêmes effets ont été signalés par **Donini et al. (2008)** avec la variété Koroneiki. En effet, ils signalent avoir obtenu des taux de l'ordre de 82,57 % en présence de 20 μM de ZEA. Aussi, De plus, **Brhadda et al. (2003)** rapportent des taux avoisinant les 67 et 65 % respectivement sur les milieux 1/2MS et OM en augmentant les doses des cytokinines. De même, les résultats sur l'élongation des pousses concordent avec ceux observés chez la variété Nebbiara qui a réagi en donnant des pousses plus vigoureuses sur OM que sur MS (**Zacchini et De Agazio, 2004**).

Les résultats sur l'élongation des pousses montrent que, quelle que soit la composition minérale et hormonale testée, de nouvelles pousses ont été régénérées et des résultats très hautement significatifs ont été obtenus avec la ZEA. Les meilleurs résultats ont été obtenus sur des milieux contenant de la ZEA aux doses de 2,3 à 18,4 μM . L'efficacité de l'emploi des mêmes doses sur l'allongement des pousses, a été signalée par **Abousalim et al. (2005)** et par **Chaari-Rkhis et al. (2006)** sur olivier.

Indépendamment des milieux de culture, une concentration croissante de ZEA a entraîné une diminution de la longueur des pousses. Ces résultats corroborent avec celles de

Roussos et Pontikis. (2002). Par ailleurs, en appliquant des doses supérieures à 9,2 μM de ZEA, induit un effet négatif sur la longueur de pousses régénérées. Cependant, plusieurs travaux ont rapporté qu'une forte dose de ZEA se traduit par un faible allongement des pousses (**Roussos et Pontikis, 2002**). Selon les travaux de ces mêmes auteurs, toutes les cytokinines lorsqu'elles sont employées à fortes doses impactent négativement l'élongation des pousses.

Malgré son efficacité, l'emploi de la ZEA, à grande échelle, par les pépiniéristes algériens ou les praticiens dans le domaine de microbouturage, reste très limité à cause de son prix élevé sur le marché. Elle est souvent substituée par le Thidiazuron TDZ (**Rugini 1986, 1995 ; Grigoriadou et al., 2002**), la BA (**García-Fe'rriz et al., 2002**), la KN (**Rugini, 1990 ; Chaari-Rkhis et al., 1999 ; Benderradji et al., 2007**). Cependant, les cytokinines synthétiques de substitution induisent souvent la formation de pousses courtes (**Rugini, 1990 ; Ansar et al., 2004 ; Ramzan Khan et al., 2002**).

Les résultats du nombre moyen de pousses par explant obtenus ne montrent aucun effet significatif des facteurs étudiés et dont la plupart des traitements étaient très rapprochés voir similaires. Nos résultats sont nettement supérieurs à ceux rapportés par **Grigoriadou et al. (2002)** sur la variété Chondrolia Chalkidiki dont le nombre de pousses/explant a atteint les 1,68 (obtenus en présence de 20 μM de ZEA). Par contre, des résultats proches des nôtres sont signalés sur d'autres cultivars d'olivier (**Rugini, 1984 ; Bartolini et al., 1990 ; Chaari-Rkhis et al., 1999**).

Aussi, les résultats sur l'efficacité de l'élongation des pousses SEE, confirme le pouvoir de la ZEA sur la multiplication de l'ensemble des géotypes testés. En effet, son emploi s'est révélé plus efficace que les autres cytokinines car elle a favorisé d'avantage à la fois le taux de prolifération et le développement de pousses indépendamment du milieu de base utilisé. C'est une hormone qui se montre donc comme étant la seule cytokinine capable d'induire efficacement la croissance des explants d'olivier (**Rugini, 1984 ; Lambardi et Rugini, 2003**).

La phase d'enracinement est déterminante dans le succès de tout protocole de propagation qui dépend de la capacité des boutures à produire des racines adventives de bonne qualité (**Kevers et al., 2000 ; Porfírio et al., 2016**). La réussite de l'enracinement *in vitro* dépend principalement, de la composition minérale du milieu (**Cozza et al., 1997 ; Rugini et Pannelli, 1993**), des régulateurs de croissance (**Chaari-Rkhis et al., 1997**) notamment les auxines.

Les auxines sont des phytohormones largement utilisés dans la propagation des plantes par l'induction racinaire des boutures (**Preece, 2003 ; Rademacher, 2015**). Ces auxines peuvent être soit naturelles (acide indole-3-butyrique (AIB)) ou des composés synthétiques [acide 1-naphtalène acétique (ANA)].

Notre étude a montré que l'auxine est essentielle pour induire l'enracinement des microboutures de l'ensemble des géotypes testés. Cependant, aucune rhizogenèse n'a été possible sur les milieux qui en sont dépourvus.

Les auxines agissent à la fois par leur nature et leur concentration dans le milieu d'enracinement. Lors de notre étude, seuls les milieux enrichis d'ANA ont favorisé l'induction racinaire chez les variétés cultivées. L'efficacité de l'ANA à l'égard de l'enracinement de la CH a été signalée aussi par **Ali et al. (2009)** et sur bien d'autres variétés d'olive italiennes (**Rugini, 1984**) ou marocaines (**Abousalim et al., 2005**).

Le bon pouvoir inducteur de l'ANA à l'égard de l'enracinement peut être dû principalement à la grande stabilité de cette molécule vis à vis de la lumière (**Dunlap et al., 1986 ; De Klerk et al., 1997**)

Contrairement aux variétés cultivées, l'enracinement des olives sauvages de Lapperine semblent bien réagir à l'usage de l'AIB comme source d'auxine. L'ANA quant à elle, s'est montré totalement inefficace. Selon l'avis de certains auteurs, c'est plutôt l'AIB et non l'ANA qui représente l'auxine la plus couramment utilisée durant la phase d'enracinement de l'olivier, car elle favorise fréquemment l'enracinement de manière plus efficace que l'ANA soit *in vivo* (**Das et al., 2006 ; Isfendiyaroglu et Özeke, 2008**), ou bien *in vitro* (**Lambardi et Rugini, 2003**).

L'AIB est l'auxine la plus utilisée car elle favorise souvent l'enracinement plus efficacement que l'ANA (**Das et al., 2006 ; Isfendiyaroglu et Özeke, 2008**).

Lors de notre étude, l'efficacité de l'ANA par rapport aux autres auxines, ne s'est pas limitée à favoriser le taux d'enracinement des explants mais elle augmente d'avantage le nombre moyen de racines par pousse végétative. La supériorité de nos résultats par rapport à celles de Yakoub-bougdal sur la variété CH peut être liée à la faible concentration ionique du milieu de culture utilisé (1/2 MSM) et à l'effet stimulant de l'obscurité sur l'induction racinaire (**Roussos et Pontikis, 2002**).

Pour le nombre moyen de racines obtenues par pousse, la néoformation des racines a été obtenue pour l'ensemble des concentrations d'ANA utilisées. Nos résultats concordent avec ceux rapportés par **Roussos et Pontikis (2002)**. Cependant, l'augmentation croissante du

nombre de racines néoformées est proportionnelle à l'augmentation de la concentration d'ANA, néanmoins une augmentation excessive de la concentration d'ANA a entraîné une réduction de ce paramètre. Ces résultats corroborent aussi avec ceux signalés par les deux mêmes auteurs cités précédemment. De même, des résultats similaires ont été rapportés par **Yakoub-Bougdal et al. (2007)** sur la même variété et pour la même concentration. Cependant, **Baker et Wetzstein (2004)** rapportent que les fortes concentrations d'auxines induisent des niveaux élevés de métabolites de dégradation dans les tissus, bloquant ainsi, le processus de régénération.

L'augmentation de la concentration d'ANA dans le milieu a été inversement proportionnelle avec l'élongation racinaire. A ce sujet, **De Klerk et al. (1995) ; Roussos et Pontikis (2002)** signalent aussi que l'augmentation de la concentration d'ANA a induit une diminution de la longueur moyenne des racines, du fait que les racines néoformées à la base des pousses peuvent s'émerger avec une concentration faible d'auxines alors qu'une forte concentration peut inhiber leur croissance (**Kollmeier et al., 2000 ; Li et al., 2009**), de plus qu'à ce niveau, l'auxine induit la production d'éthylène, inhibiteur de la croissance des racines (**Tai et al., 2010**).

Le facteur génotypique compte lui aussi comme facteur très influant sur l'aptitude des plantes à la micropropagation via le microbouturage, l'organogénèse et ou l'embryogénèse somatique. En effet, d'après nos résultats, l'effet génotypique était visible sur l'ensemble des paramètres étudiés que ce soit ceux liés à la phase de multiplication (taux de débourrement, pourcentage de pousses régénérées, longueur des pousses et le SEE) ou à la phase d'enracinement (taux d'enracinement, nombre et longueur de racines et le REE). Aussi, nous avons constaté que pour un milieu de même composition hormonale et minérale, les réactions des génotypes étaient différentes vis à vis les paramètres étudiés. Le génotype semble jouer un rôle majeur (**Khabou, 2000**), cependant, d'après **Trefois (1981)**, l'aptitude d'une plante à s'enraciner varie non seulement d'une espèce à l'autre, mais aussi d'une variété à une autre. De même, les études menées par **Caballero (1985)**, indiquent que chez l'olivier la diversité de l'aptitude des variétés à la rhizogénèse est tellement vaste que l'on peut l'attribuer à la constitution génétique des variétés, qui se traduit par des différences physiologiques et anatomiques existantes au sein des boutures. **Caballero (1979)**, a observé que le cultivar Swan Hill a une plus grande activité promotrice d'enracinement que le cultivar Ascolano.

Pour mettre en exergue l'effet génotypique sur la multiplication, nous avons cité, à titre d'exemple, uniquement les résultats de la SEE obtenus. Les dits résultats révèlent clairement qu'avec l'usage de la ZEA comme cytokinine, les meilleures aptitudes sont en faveur de la

variété SG (6,4), suivie de lapperine (5,1), suivie de FK (4,94), puis de la CH (4,21) et en dernier de la BG (2,51).

Mêmes remarques concernant l'effet génotypique sur l'enracinement, les résultats montrent que les meilleures performances en termes de REE sont en faveur de la variété SG (7,65 cm), suivie de CH (6,64 cm), suivie de FK (6,62), puis de la BG (4,56) et en dernier de Lapperine (1,9 cm).

Lors de la phase d'enracinement, nous avons relevé aussi l'existence d'un effet interaction (génotype X composition hormonale). En effet, l'enracinement qui a été induit sur l'ensemble des variétés cultivées en présence d'ANA, n'a pas été possible sur les génotypes sauvages de Lapperrine. L'enracinement de ces espèces n'a été induit qu'avec l'usage de l'AIB comme source d'auxine

L'acclimatation de plantes régénérées *in vitro* est habituellement une étape critique, dans le cas où elle n'est pas convenablement conduite. Durant notre étude, les plantes enracinées de la variété CH ont été transplantées avec succès et un pourcentage élevé de plantes acclimatées ont survécu. Cependant, Nos taux (80 %) se rapprochent de ceux obtenus (75 %) par **Roussos et Pontikis (2003)**, Par contre ils sont inférieurs à ceux obtenus (88 %) par **Chaari-Rkhis et al. (2009)**.

La formation et le développement de nouvelles racines fonctionnelles favorisé par les concentrations élevées d'auxines pendant le premier mois d'acclimatation adaptées à la vie *in vivo* étaient nécessaires pour la réussite de l'acclimatation des vitro-plants. En effet, selon **Lee et al. (1985)** généralement, les jeunes racines formées *in vitro* ont un rhizoderme non subérifié, au contact du substrat de culture elles se déshydratent et meurent, par la suite de nouvelles racines prennent naissance pour que la plantule s'alimente normalement.

La croissance des plantules transférées en serre d'acclimatation a été lente comparant à celle obtenue par **Chaari-Rkhis et al. (2009)**. Ceci peut être expliqué par le faite qu'au cours des premières journées de leurs transfert *in vivo*, le ralentissement de la croissance des vitro-plants est dû au stress après leur transplantation qui se traduit par un dysfonctionnement de la photosynthèse accompagné d'une augmentation importante du taux de transpiration (**Chaari-Rkhis et al., 2010**). Par ailleurs, **Pospisilova et al. (1999)**, signalent que ces changements peuvent être dû au faible développement de la cuticule.

Le protocole de micropropagation ne peut être utilisé à des fins commerciales qu'après vérification de la conformité des plantes micro-propagées par l'analyse génétique (**Rani et Rania, 2000**).

L'un des principaux objectifs de cette technique de micropropagation est de réaliser une propagation réelle du matériel végétal à cloner. La fidélité clonale est une considération majeure dans la micropropagation commerciale en utilisant des méthodes de culture *in vitro* (**Giri et al., 2004**).

La variation génétique dépend des espèces végétales, du génotype impliqué, du type d'explant, des milieux et des conditions de culture (**Karp et Brights, 1985 ; Shuangxia et al., 2008**). Ces altérations peuvent impliquer la mutation génomique, chromosomique et génétique (**Damato, 1985**), l'activation d'éléments transposables ou les modifications du motif de méthylation (**Brown et al., 1998**).

On sait que dans de nombreux cas, une proportion constante des plantes régénérées diffère du type parental original lorsqu'elles sont soumises à des techniques de culture *in vitro* (**Larkin et al., 1998**).

Selon **Caruso et al. (2011)** la micropropagation, peut produire des plantes indésirables, qui peuvent être le résultat de variations somaclonales qui sont établies au cours de la culture *in vitro*, en plus, des altérations chromosomiques et des changements dans le niveau de ploïdie des cellules végétales (**Leroy et al., 2000**). Une meilleure compréhension de la variation somaclonale est nécessaire pour évaluer l'utilité potentielle des techniques *in vitro* (**Armstrong et Phillips, 1988**).

Comparativement aux autres types de marqueurs, les marqueurs moléculaires comptent parmi les meilleurs outils d'analyse dans la surveillance de la variabilité au niveau de l'ADN dans les plantes. Ils offrent des résultats très efficaces.

Afin d'éviter la production de plantes avec variation génétique, des méthodes moléculaires ont été développées permettant de filtrer facilement et rapidement le matériel végétal pour révéler toute différence génétique par rapport aux pieds-mère (**Brown et al., 1993 ; Saker et al., 2000 ; Raimondi et al., 2001**). En effet, la stabilité génétique de régénérants a été vérifiée à l'aide de marqueurs micro-satellites (ISSRs). Nos résultats moléculaires ont indiqué que l'approche *in vitro* utilisée a été appliquée avec succès pour l'ensemble des variétés autochtones. En effet, l'analyse moléculaire confirme que les plantes régénérées étaient génétiquement conformes à leurs plantes-mères. Ce qui confirme les rapports de **Gemas et al. (2004) ; Gomes et al. (2008) ; Martins Lopes et al. (2007, 2009) ; Terzopoulos et al. (2005)**, En outre, les ISSRs ont été largement utilisés pour analyser la variation somaclonale et la variabilité génétique des cultivars d'olivier. De même, ces marqueurs ont été utilisés pour des études de la variabilité intra-variétale de 201 accessions de 11 cultivars portugais (**Gemas et al., 2004**). Toutefois, les marqueurs ISSRs ont été utilisés

dans des études phénologiques des plantes d'olivier obtenues par la technique *in vitro* (Leva et al., 2002 ; García-Ferriz et al., 2003 ; Leva et al., 2006 ; Bottalico et al., 2009 ; Caruso et al., 2011).

La stratégie appliquée à partir de génotypes avec le fond génétique différent, a souligné que la technique utilisée est une approche fiable et précise pour la micropropagation conforme de l'ensemble des génotypes étudiés.

La conformité génétique a été encore confirmée par l'analyse cytofluométrique de l'ADN des plantes régénérées *in vitro*. En effet, tous les régénérants ressemblent fidèlement à leurs pieds-mères. Nos résultats corroborent avec ceux obtenus par Carra et al. (2012), la micropropagation *in vitro* a permis de maintenir la stabilité du niveau de ploïdie et l'utilisation de la technique cytométrique, pour l'évaluation de la conformité génétique des plants d'olivier constitue des outils fiables pour l'étude phénologique des plantes obtenues par la technique *in vitro*.

Lors de notre étude, les résultats moléculaires obtenus, indiquent que la voie de micropropagation que nous avons emprunté n'a pas été un facteur inducteur de variabilité et a été appliquée avec succès aux quatre variétés testées (CH, SG, BG et FK). Les résultats, de l'analyse cytofluométrique obtenus, confirment que nos plantes régénérées ne présentent aucune variabilité génétique par rapport aux plantes-mères. L'emploi de l'outil cytofluométrique comme moyen pour dépister l'existence ou non de variants parmi les plants régénérées *in vitro* s'avère très efficace et précis. De nombreux auteurs, ayant travaillé sur l'olivier, recommandent ces techniques pour évaluer la conformité génétique de leurs plantes régénérées (García-Ferriz et al. (2003) ; Leva et al. (2006, 2012) ; Bottalico et al. (2009) ; Caruso et al. (2011).

CONCLUSION

A travers cette étude nous avons pu maîtriser le protocole de micropropagation de quelques variétés d'olivier autochtone (Sigoise, Chemlal, Blanquette de Guelma, Ferkani et l'olive de Laperrine) par la technique de microbouturage, de l'initiation jusqu'à l'élevage et l'évaluation génétique par l'emploi de marqueurs moléculaires et l'analyse cytofluorométrique.

De même, les résultats de la micropropagation sont importants pour la mise au point d'un schéma de multiplication *in vitro* de l'olivier autochtone. Cette technique pourrait présenter une alternative au bouturage pour la production massive d'olivier de qualité, la multiplication des variétés récalcitrantes, ainsi qu'une meilleure valorisation des zones arides.

En outre, on souligne l'intérêt que peut apporter cette technique pour la conservation et l'amélioration des ressources génétiques de l'olivier et le développement du secteur de la multiplication de l'olivier qui est devenu actuellement stratégique pour la filière oléicole.

Pour l'ensemble des essais effectués, le microbouturage a été réalisé en utilisant des segments de nœuds comme explants, récoltés à partir des pieds-mères.

Les essais préliminaires ont visé comme objectif l'évaluation de l'impact que peut avoir la variation de la composition hormonale (en qualité et en quantité) ainsi que les milieux de base sur l'amélioration et l'optimisation des principales phases de culture à savoir : la phase d'initiation et d'établissement, la phase de multiplication et la phase d'enracinement de la variété chemlal.

Les résultats des essais préliminaires menés avec la variété Chemlal, nous ont permis d'optimiser l'aptitude au microbouturage. En effet, le milieu MSM a donné les meilleurs pourcentages d'explants produisant des pousses, le nombre de pousses par explant, la longueur moyenne de pousses, le nombre moyen de feuilles par pousse régénérée et même la meilleure efficacité de l'élongation des pousses, suivi de OM et en dernier de MS, lorsqu'ils sont pourvus de 9,2 μM de ZEA comme cytokinine.

Quant à la phase d'enracinement, les meilleurs taux ont été atteints avec le même milieu de base MSM réduit de moitié et pourvu d'ANA.

Les résultats des tests de l'efficacité des milieux MSM pourvus de ZEA ayant donné les meilleurs résultats avec la variété Chemlal, lors des essais préliminaires, élargis sur les trois variétés cultivées d'olivier Blanquette de Guelma, la Sigoise et la Ferkani montrent :

La présence de la ZEA avec différentes concentrations a augmenté d'une manière claire la réponse de multiplication pour toutes les variétés micropropagées ainsi qu'un effet d'interaction significatif (Géotype x Concentration de ZEA) a été révélé pour les paramètres étudiés à l'exception du nombre de pousses régénérées par explant. En effet, l'emploi de la ZEA à la concentration 9,2 μM semble donné les meilleures performances pour l'ensemble des paramètres étudiés à l'exception de pourcentages d'explants produisant des pousses dont les meilleurs résultats ont été obtenu avec 18,4 μM .

Un effet génotypique sur les paramètres de multiplication a été mis en évidence. En effet, quel que soit la concentration de ZEA appliquée, les meilleures réponses à la multiplication de tous les paramètres étudiés sont manifestées par la variété Sigoise, à l'exception du nombre moyen de feuilles dont la Ferkani a enregistré les meilleurs résultats.

Quant à la phase d'enracinement, l'ANA s'est montrée une nouvelle fois très efficace pour l'enracinement des trois autres géotypes à savoir : Sigoise, Ferkani et la Blanquette de Guelma. Les meilleures réponses ont été atteintes pour la variété Sigoise sur le même milieu de base MSM réduit de moitié et pourvu d'ANA surtout en termes de taux, longueur et d'efficacité de l'élongation racinaire. Suivie de la variété Ferkani, puis de la Chemlal et en dernier la Blanquette de Guelma.

Les résultats des essais menés avec les deux géotypes diploïdes et triploïdes de l'olive de Laperrine, sur des milieux MSM, d'OM et de MS pourvus de BA et de ZEA à différentes doses ont révélés :

Le milieu MSM s'est montré performant en donnant les meilleurs pourcentages d'explants produisant des pousses, nombre de pousses par explant et même la meilleure longueur moyenne de pousses, suivi de milieu OM et en dernier de MS, lorsqu'ils sont pourvus de ZEA comme cytokinine.

Quant à la phase d'enracinement, les meilleurs taux ont été atteints avec le même milieu de base MSM réduit de moitié et pourvu d'AIB.

Les résultats obtenus à l'issue de cette étude, indiquent que la stratégie établie pouvant être destinée à la production efficace des plantes de l'olive autochtone (Sigoise, Chemlal, Blanquette de Guelma, Ferkani et l'olive de Laperrine). Par ailleurs, cette présente étude souligne l'importance des méthodes de multiplication non conventionnelles pour sauvegarder

les antécédents génétiques des espèces menacées. En outre, le protocole développé garantit fidèlement la stabilité génétique des plantes régénérées afin d'éviter l'érosion génétique, ce qui convient à la fois à la multiplication *ex situ* que *in-situ* pour la conservation de l'olive de Laperrine ainsi que garantir l'authenticité génétique des variétés autochtones, critère primordiale dans le processus de certification de matériel végétal oléicole, qui pourrait soutenir les travaux futurs destinés à l'évaluation, l'exploitation et la valorisation de ces variétés d'olivier.

Au terme de cette étude, nous pouvons dire que la régénération chez l'olivier via le microbouturage est possible. Il reste cependant, quelques problèmes, liés essentiellement à la phase de multiplication notamment le taux de multiplication, qui reste à résoudre pour que la technique soit exploitable à grande échelle.

REFERENDES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdessemed S., Muzzalupo I., Benbouza H., 2015. Assessment of genetic diversity among Algerian olive (*Olea europaea* L.) cultivars using SSR marker. *Sci Hortic-Amsterdam* 192:10-20.

Abousalim A., Brhadda N., 2008. Effet du sucre sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. ' Picholine marocaine *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2008 **12**(3), 245-250.

Abousalim A., Walali L.D., Slaoui K., 1993. Effet du stade phénologique sur l'enracinement des boutures semi-ligneuses de l'olivier en tablettes chauffantes. *Revue Oliveae.* N°46: 30-37.

Abousalim A., Brhadda N., Walali L.D.M., 2004. Essais de prolifération et d'enracinement de matériel issu de rajeunissement par bouturage d'oliviers adultes (*Olea europea* L.) et degermination *in vitro* : effets de cytokinine et d'auxines. *Biotechnology. Agronomical Society*, 2004 (9), pp. 237-240.

Abousalim A., Brhadda N., Walali L.D.M., 2005. Essais de prolifération et d'enracinement de matériel issu de rajeunissement par bouturage d'oliviers adultes (*Olea europaea* L.) et de germination *in vitro*: effets de cytokinine et d'auxines [Proliferation and rooting of juvenile and adult olive explants (*Olea europaea* L.): effects of cytokinins and auxins]. *Biotechnol Agron Soc Environ* 9: 237–240.

Acebedo M.M., Lavee S., Liñán J., Troncoso A., 1997. *In vitro* germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Scientia Horticulturae*, 69: 207-215.

Allison A. C., 1954. *Brit, med, J* 1,290.

Amos W., Hoffman I.J., Frodshan A., Zhang L., Best S., Hill V.S.I., 2007. Automated binning of micro satellite allele, problems and solution. *Mol Ecol*, 7, 10-14.

Armstrong C.L., Phillips R.L., 1988. Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. *Crop Sci.* 28: 363-369

Angiolillo A., Mencuccini M., Baldoni L., 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 98: 411–421.

- Angiollillo A., Reache S., Pilla F., Baldoni L., 2006.** Molecular analysis of cultivars in the Malise region of Italy, *Genetic Res Crop Evol*, 53, 289-295.
- Ansar A., Touqeer A., Abbasi N.A., Hafiz I.A., 2009.** Effect of different concentration of auxins on *in vitro* rooting of olive cultivar 'Moraiolo'. *Pakistan Journal of Botany*, 41 (3): 1223-1231.
- Anthelme F., Abdoukader A., Besnard G., 2008.** Distribution, shape and clonal growth of the rare endemic tree *Olea europaea* subsp. *Laperrinei* (Oleaceae) in the Saharan mountains of Niger. *Plant Ecol* 198: 73–87.
- Argenson A., 1999.** Olivier. Ed. Centre technique inter. Professionnel. Paris 1999, 203 p.
- Auge R., Beauchense G., Boccon-Gibod J., Decourtyre L., Diget B., Jalouzot R., Minier R., Morand J., Reynoird J.P., Strullu D.G., Vidalie H., 1989.** La culture *in vitro* et ses applications horticoles. 3^{ème} Ed. Tec.Doc. Lavoisier, pp.207
- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H., 2008.** Advances in molecular marker techniques.
- Amane M., Lumaret R., Hany V., Ouazzani N., Debain C., Vivier G., Deguilloux M.F., 1999.** Chloroplast-DNA variation in cultivated and wild olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Vol.99, No.1-2, pp. 133-139.
- Baali-Cherif D., Besnard G., 2005.** High genetic diversity and clonal growth in relict populations of *Olea europaea* subsp *Laperrinei* (Oleaceae) from Hoggar. Algeria *Ann Bot* 96: 823–830.
- Bartolini G., Pervost G., Messeri C., Gargnari G., 1998.** Olive germplasm; cultivars and world-wide collections. F.A.O Roma.
- Baldoni, L., Tosti, N., Ricciolini, C., Belaj, A., Arcioni, S., Pannelli, G., Germana, M.A., Mulas, M., Porceddu, A., 2006.** Genetic structure of wild and cultivated olives in the Central Mediterranean Basin. *Ann. Bot.* 98, 935–942.
- Baldoni L., Nicolo G., Mariotti R., Ricciolini C., Arcioni S., Vendramin G., Buonamici A., Porceddu A., Vania Sarri V., Ojeda M., Trujillo I., Luis Rallo L., Belaj A., Perri E., Salimonti A., Innocenzo M., Casagrande A., Lain O., Messina R., Testolin R., 2009.** A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. *Mol. Breed.* 24, 213–231.

Barranco D., Cimato A., Fiorino P., Rallo L., Touzani A., Castaneda C., Serafini F., Trujillo I., 2000. World Catalogue of Olive Varieties. International Olive Oil Council, Madrid, Spain.

Barranco D., 2008. Variedades y patrones. En: Barranco D., FernándezEscobar R., Rallo L., (Eds.). El cultivo del olivo. Mundi-Prensa y Junta de Andalucía. pp. 37-62.

Barranco D., Fernandez-Escobar R., Rallo L., 2008. Variedades y Patrones *El cultivo del olivo* 6th edn Madrid Mundi-Prensa y Junta de Andalucía pp 37-62.

Barranco D., Rallo L., 1984. Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Ministerio de Agricultura, Madrid.

Barranco D., Rallo L., 1985. Las variedades de olivo cultivadas en España. *Olivae* 9:16–22.

Barranco D., Trujillo I., Rallo L., 2005. Elaiografía Hispánica. In: Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J.M., del Río, C., Martín, A., Tous, J., Trujillo, I. (Eds.), Variedades de olivo en España. ~ Junta de Andalucía. MAPA-Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 48–76.

Bartolini G., Leva A.R., Benelli A., 1989. Advances in vitro culture of the olive: propagation of cv Maurino. *Acta Hort* 286: 41–44.

Bartolini G., Leva A.R., Benelli A., 1990. Advances in *in vitro* culture of the olive: propagation of cv. Maurino. *Acta Horticulturae* 286, 41–44.

Bartolini G., Messeri C., 1993. Cultivar italiane di olivo e loro sinonimi. Lucca

Bautista R., Crespillo R., Canovas F.M., 2003. Identification of olive-tree cultivars with SCAR markers. *Euphytica*, Vol.129, pp. 33-41.

Baysal O., Mercati F., Ikten H., Yıldız RC., Carimi F., Aysan Y., Da Silva J.A.T., 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* : Tracking strains using their genetic differentiations by ISSRs markers in Southern Turkey. *Physiol Mol Plant* 75: 113–119.

Bednorz L., Myczko L., Kosinski P., 2004. Isozyme polymorphism and genetic structure of the population of *Sorbus torminalis* (L.)Crantz from the Bytyn Forest (Poland). *J. Appl. Genet.*, 45 (3), 321-324.

Belaj A., Satovic Z., Rallo L., Trujillo I., 2002. Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphism DNA. *Theor. Appl. Genet.* 105: 638–644.

Belaj A., Satovic Z., Cipriani G., Baldoni L., Testolin R., Rallo L., Trujillo I., 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(4):736-744.

R., 2011. Variability of wild olives (*Olea europaea*

Belaj A., Satovic Z., Rallo L., Trujillo I., 2004. Optimal use of RAPD markers for varietal identification in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Vol.129, No.2, pp. 266-270.

Belaj A., Ojeda M.A., Muñoz C., Rodríguez E., Díaz A., Rallo P., De la Rosa R., Barranco D., Rallo L., Trujillo I., 2006. The use of molecular markers to characterize olive (*Olea europaea* L.) germplasm and its wild relatives. *Olive Biotech.* pp. 391-396.

Belaj A., Muñoz-Diez C., Baldoni L., Satovic Z., Barranco D., 2010. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. *Sci Hort* 124:323–330.

Belaj A., Leóna L., Satovic Z., De la Rosa subsp. *europaea* var. *sylvestris*) analyzed by agro-morphological traits and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 129: 561–569.

Benamar D., Bouguedoura N., 2000. Essai de germination de l'Olivier Laperrine (*Olea laperrinei*) Batt et Trab. *La forêt Algérienne* 5: 15–18.

Benderradji L., Bouzerzour H., Ykhlef N., Djekoun A., Kellou K., 2007. Réponse à la culture *in vitro* de trois variétés de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Sciences et Technologie C-N°26*, Décembre 2007, pp.27-32.

Benelli C., Fabbri A., Grassi S., Lambardi M., Rugini E., 2001. Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*Olea europaea* L.). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 76 (1), 112–119.

Ben-Tor A., 1992. The archaeology of ancient Israel. A. Ed. University Press.

Berenguer B., Gonzalez G., 1989. Ressources génétiques. Actes du séminaire international sur les innovations scientifiques et leur application en oleiculture et oleitechnie” Cité par Cimmino 10-12 Mars (1999). Florence Italie : *Conseil international* (1989), pp1-30.

Besnard G., Baradat P., Berville A., 2001. Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theor Appl Genet* 102:251–258.

- Besnard G., de Casas R., Vargas P., 2007.** Plastid and nuclear DNA polymorphism reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea* L.).
- Besnard G., Baali-Cherif D., Bettinelli-Riccardi S., Parietti D., Bouguedoura N., 2009.** Pollen-mediated gene flow in a highly fragmented landscape: consequences for defining a conservation strategy of the relict Laperrine's olive. *Comptes Rendus Biol* 332: 662–672.
- Besnard G., Baali-Cherif D., 2009.** Coexistence of diploids and triploids in a Saharan relict olive: Evidence from nuclear microsatellite and flow cytometry analyses. *Comptes Rendus Biol* 332: 1115–1120.
- Besnard G., Khadari B., Navascues M., Fernandez-Mazuecos M., El Bakkali A., 2013.** The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *Proc R Soc B* 280:20122833.
- Binet M.N., Lemoine M.C., Martin C., Chambon C., Gianinazzi S., 2007.** Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) and application of mycorrhiza to improve plantlet establishment. *In Vitro Cell & Developmental Biology- Plant*, 43: 473-478.
- Bogani P., Cavalieri D., Petruccelli R., Polsinelli L., Roselli G., 1994.** Identification of olive tree by using random amplified polymorphic DNA. *Acta Horticultura*. 356, 98-101.
- Bolibok-Bragoszewska H., Heller-Uszynska K., Wenzl P., Uszynski G., Kilian A., Rakoczy-Trojanowska M., 2009.** DArT markers for the rye genome genetic diversity and mapping. *BMC Genomics*.doi: 10.1186/1471-2164-10-578.
- Bornman C.H., 1983.** Possibilities and constraints in the regeneration of trees from cotyledonary needles of *Picea abies in vitro*. *Physiol. Plant*. **57**, p. 5–16.
- Bottalico G., Fatone M.T., Campanale A., Saponari A., Savino V., 2009.** Validazione e trasferimento di protocolli per la coltura *in vitro* di tessuti vegetali di fruttiferi e olivo. *Frutticoltura*, 4: 70-73.
- Boucheffa S., Miazzi M.M., Di Rienzo V., Mangini G., Fanelli V., Tamendjari A., Pignone D., Montemurro C., 2016.** The coexistence of oleaster and traditional varieties affects genetic diversity and population structure in Algerian olive (*Olea europaea* L.) germplasm. *Genet Resour Crop Evol*. doi:10.1007/s10722-016-0365-4.

- Boulouha B., 1981.** Recherches sur la micropropagation de la Picholine marocaine. *Olea* 6: 45–56.
- Boxus P., 1995.** Multiplication végétative: micropropagation et embryogenèse somatique in biotechnologies végétales. BV 93, Ed CNED. AUPELF- UREF 191p.
- Brhadda N., Abousalim A., Loudiyi D.E.W., Benali D., 2003.** Effet du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europaea* L.). CV. Picoline Marocaine. *Biotechnologie. Agron. Environ. Soc. Environ*, N°3-4 :177-182.
- Breton C., Tersac M., Berville' A., 2006.** Genetic diversity and gene flow between the wild olive (oleaster, *Olea europaea* L.) and the olive: several Plio-Pleistocene refuge zones in the Mediterranean basin suggested by simple sequence repeats analysis. *J Biogeogr* 33:1916–1928.
- BretonC., Pinatel C., Médail, F. Bonhomme F., Bervillé A., 2008.** Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms, *Plant Sci.* 175 (2008) 524–532, doi:10.1016/j.plantsci.2008.05.025.
- Bronzini de Caraffa V., Giannettini J., Gambotti C., Maury J., 2002.** Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers. *Euphytica* 123: 263–271.
- Brown, C.S., Schuerger A.C.. 1993.** Growth of pepper, lettuce and cucumber under light emitting diodes. *Plant Physiol.* 102(1):88.
- Brown JL., Mucci D., Whiteley M., Dirksen M.L., Kassis J.A., 1998.** The *Drosophila* Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol Cell* 1: 1057-1064.
- Busconi M., Sebastiani L., Fogher C., 2006.** Development of SCAR markers for germplasm characterisation in Olive Tree (*Olea europaea* L.). *Molecular Breeding*, Vol.17, No.1, pp. 59–68.
- Caballero J. M., 1979.** Promotores e inhibidores encógenos de la iniciación radical en olivo. *Anales del I.N. I. A. Série : Producción Vegetal.* 201-207.
- Caballero J. M., 1983.** Reproduction de l'olivier par bouturage semi ligneux sous nébulisation. In « la multiplication de l'olivier » INIA Espagne. 129-176.

Caballero J. M., 1985. Reproduction de l'olivier par bouturage semi-ligneux sous nébulisation in multiplication de l'olivier. Projet régional d'amélioration et de la production oléicole. Ed. Cordoux. Espagne, 1985.

Cañas L.A., Benbadis A., 1988. *In vitro* plant regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L.). Plant Science, 54: 65-74.

Cañas L.A., Ávila J., Vicente M., Benbadis A., 1992. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.). En Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 18: HighTech and Micropropagation II (Y.P.S. Bajaj, Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp: 493- 505

Cantini C., Cimato A., Sani G., 1999. Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. Euphytica 109:173–181

Carimi F., Mercati F., De Michele R., Fiore MC., Riccardi P., Sunseri F., 2011. Intra-varietal genetic diversity of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivar 'Nero d'Avola' as revealed by microsatellite markers. Genet Resour Crop Evol 58: 967–975.

Caruso T., Campisi G., Occorso G., Loconsole G., SaponariM., 2011. Manuale per la roduzione, gestione e difesa in vivaio dell'olivoProgetto di Ricerca Interregionale Rete Interregionale per la Ricerca Agraria, Forestale, Acquacoltura e PescaISBN 978-88-88793-93-1 *OLVIVA*.

Carra A., Del Signore M.B., Sottile F., Ricci A., Carimi F., 2012. Potential use of new diphenylurea derivatives in micropropagation of *Capparis spinosa*L. Plant Growth Regul66: 229–237.

Carriero F., Fontanazza G., Cellini F., Giorio G., 2002. Identifcation of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea*L.).Theor Appl Genet 104: 301–307.

Cerezo S., Mercado J.A., Pliego-Alfaro F. 2011. An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in olive.Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 106: 337-344.

Cevie A., 1997. Les Multiples Applicationde la Culture in vitro des vegetaux Superieurs, 8^{ieme} edition 154pp.

Chaari-Rkhis A, Chelly-Chaabouni A, Maalej M, Drira N. 2002. Meski olive variety propagated by tissue culture. Acta Hort 586: 871–874.

Chaari-Rkhis A., Maalej M., Messaoud S.O., Drira N., 2006. *In vitro* vegetative growth and flowering of olive tree in response to GA3 treatment. African Journal of Biotechnology, 5 (22): 2097-2302.

Chaari-Rkhis A., Trigui A., Drira N., 1997. Micropropagation of olive tree Tunisian Cultivars: Preliminary results. Acta Horticulturae 474(1): 79-81.

Chaari Rkhis A., Gueriani L., Kanmmoun N., Oueld Amor A., Maaley M., 2009. Comportement de six variétés d'olivier à l'huile dans le biotope de Taous, (Sfax, Tunisie) : Résultat de 4 compagnes de suivi. Olivebioteq. 45 p.

Chaari-rkhis A., Maalej M., Drira N., Standardi A., 2010. Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L. 'Oueslati Turk J Agric For 35 (2011) 403-412©TÜBİTAK doi:10.3906/tar-1002-741.

Chaari-Rkhis A., Maalej M., Drira N., Standardi A., 2011. Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L. 'Oueslati'. Turk J Agric 35: 403–412.

Cheliak W.M., Pitel J.A., 1984. Electrophoretic identification of clones in trembling aspen. CanJforRes 14, 740-743.

Cantini C., Cimoto A., Sani G., 1999. Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany región. Euphytica 109: 173–181, 1999.

CIDES., 1999. Micropropagation en entreprise Cahier de références techniques Édition 1999. Centre d'information et de développement expérimental en sericulture.

Cimoto A., Cantini C., Sani G., Marranci M., 1993. Il Germoplasma dell'Olivo in Toscana. Ed. Regione Toscana, Florence, Italy.

Cimoto A., 1999. Nursery production of olive plants. In: Conseil Oléicole International, editors, International seminar on scientific innovations and their applications to olive farming and olive oil technology. Madrid, Conseil Oléicole Intl, pp.1–30.

Cipriani G., Marrazo M.T., Marconi R., Cimoto A., 2002. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 104: 223-228.

Civantos L., 2004. La olivicultura en el mundo y en España. En: El Cultivo del Olivo. D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds). Mundi-Prensa, Madrid; pp: 17-35.

Civantos L., 1998. L'olivier, l'huile d'olive et l'olive. Ed. C. O.I. 130 p.

COI., 2009. Les zones de production oléicole mondiale. www.Internationalolioil.org.

Cordeiro A.I., Sanchez-Sevilla J.F., Alvarez-Tinaut M.C., Gomez-Jimenez M.C., 2008. Genetic diversity assessment in Portugal accessions of *Olea europaea* by RAPD markers. *Biologia Plantarum*, Vol.52, No.4, pp. 642-647

Cozza R., Turco D., Briccoli Bati C., Bitonti M.B., 1997. Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*L. *Plant Cell Tiss Org* 51: 215–223.

Crisosto C., Sutter E., 1985. Role of the endocarp in 'Manzanillo' olive seed germination. *Journal American Society for Horticultural Science*, 110 (1): 50-52.

D' Amato F., 1985. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. *CRC Critical Reviews in Plant Science* 3 73-112.

Das B., Tantry F., Srivastava K., 2006. Rooting response of olive stem cuttings under zero energy environment. *Indian J. Hortic.* 63, 209–212

David H.K., Isemukali K., David A., 1978. Obtention de plants de pin maritime (*Pinus pinaster* Soland.) à partir de brachyblastes ou d'apex caulinaires de très jeunes sujets cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci.* 287, p. 245–248.

De Klerk G.J., Brugge J.T., Marinova S., 1997. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus 'Jork 9'*. *Sci. Hortic.* 31: 15-119.

De la Rosa R., Angiolillo A., Guerrero C., Pellegrini M., Rallo L., Besnard G., Berville A., Martin A., Baldoni L., 2003. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol.106, pp 1273-1282.

De la Rosa R., James C. M., Tobutt K. R., 2004. Using microsatellites for paternity testing in olive progenies. *HortScience*, 39(2): 351-354.

Denninger C., Garnaud V., Laverne J.P., 1993. *Savoir tout faire au jardin*. Ed. Readers Digest, 658 pp.

Deninson E.L., 1979. *Principales of Horticulture*. 2nd edn. Memillan Publishing Company, New York.

Diaz A., De la Rosa R., Martín A., Rallo P., 2006., Development: characterization and inheritance of new microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and evaluation of their usefulness in cultivar identification and genetic relationship studies. *Tree. Genet. Genomes* 2, 165–175.

Diaz A., De la Rosa R., Rallo P., Muñoz-Diez C., Trujillo I., Barranco D., Martín A., Belaj A., 2007. Selections of an olive breeding program identified by microsatellite markers. *Crop Sci.* 47, 2317-2322.

Dominguez-Garcia M.C., Laib M., De la Rosa R., Belaj A., 2012. Characterisation and identification of olive cultivars from North-eastern Algeria using molecular markers. *J HortiSci Biotech* 87:95-100

Donini L.P., Schuch M.W., Ribeiro M., Almeida de Souza J., Campos Soares G., 2008. *In vitro* establishment of olive tree cultivar ‘Arbequina’ formicropropagation starting. *Ciência Rural*, 38 (6): 1-5

Doyle J.J., Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11–15.

Driver J.A., Kuniyuki A., 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock [*Juglans hindsii* x *Juglans regia*, tissue culture]. *HorstScience*, 19 (4): 507-509.

Dunlap J.R., Kresovich S., McGee R.E., 1986. The effect of salt concentration on auxin stability in culture media. *Plant Physiol.* 81:934- 936.

Ercisli S., Barut E., Ipek A., 2009. Molecular characterization of olive cultivars using amplified fragment length polymorphism markers. *Genetics and Molecular Research*, Vol.8, pp. 414-419.

Essadki M., Ouazzani O., Lumar., R., Moumni M., 2006. ISSR variation in olive-tree cultivars from Morocco and other western countries of the Mediterranean Basin. *Genetic Resource and Crop Evolution*, Vol.53, No.3, pp. 475–482.

Fabbri A., Hormaza J.I., Polito V.S., 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Vol.120, No.3, pp. 538–542.

Fabbri A., Bartolini G., Lambardi M., Kailis S., 2004. Olive Propagation Manual. Landlinks Press; pp: 1-7. ISBN 0643 0666764.

FAO., 2008. Annual report

- Fendri M., Trujillo I., Trigui A., Rodríguez-García M.I., Ramírez J.D.A., 2010.** Simple sequences repeat identification and endocarp characterization of olive tree accessions in a Tunisian germplasm collection. *HortScience*, 45(10), 1429-1436.
- Fiorino P., Leva A.R., 1986.** Investigations on the micropropagation of the olive (*Olea europaea* L.) and influence of some mineral elements on the proliferation and rooting of explants. *Olea* 17:101–104.
- Ferreira L., De Oliveira A., Fraguas C., Pasqual M., 2003.** Multiplication in vitro de Oliveira (*Olea europea* L.) *Ciencia e Agrotecnologia*, volumen 28, numero 1, 2004, pp 135-141.
- Francllet A., 1979.** Rajeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation végétative. *AFOCEL, Etud. Rech.* 12, p. 3–8.
- García-Férriz L., Ghorbel R., Ybarra M., Marí A., Belaj., A., Trujillo I., 2001.** Micropropagación de olivo a partir de material adulto. *Fruticultura Profesional*, 120: 73- 75.
- García J.L., Troncoso J., Sarmiento R., Troncoso A., 2002.** Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 95-100.
- García-Férriz L, Ghorbel R. Ybarra M., Belaj A., Trujillo I., 2003.** Cultivo *in vitro* y comportamiento en campo de olivo adulto. *Horticultura: Material Vegetal*, 172: 64-66.
- Gemas V.J.V., Rijo-Johansen M.J., Tenreiro R., Fevereiro P., 2000.** Inter-and intravarietal analysis of tree *Olea europaea* L. cultivars using RAPD technique. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, Vol.75, No.3, pp. 312-319.
- Gemas V., Almadanim M., Tenreiro R., Martins A., Fevereiro P., 2004.** Genetic diversity in the olive tree (*Olea europea* L subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genet Resour Crop Evol* 51:501–511.
- George E.F., 1993.** Plant propagation by tissue culture, Vol. 1.England: Exegetics.
- George EF., Sherrington P.D., 1984.** Plant propagation by tissue culture.Handbook and directory of commercial laboratories. London: Exegetics, 709 p.
- George E.F., 2008.** Plant Propagation by Tissue Culture. Vol. I: The Background. Springer, The germination in vitro: effets de cytokinine et d’auxines. *Biotechnology. Agronomical Society Netherlands*.

Giri C., Shyamkumar B., Anjaneyulu C., 2004. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees Struct Funct* 18: 115–135.

Gomez-Rico A., Fregapane G., Desamparados M. S., 2008. Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41 (4), pp. 433-440.

Gonzalez-Padilla I., Vidoy I., Encina C.L., 2009. Influence of indole-butyric acid and electro-pulse on *in vitro* rooting and development of olive (*Olea europaea* L.) microshoots. *Plant Cell Report*, 28: 1411-1420.

Grati-Kamoun N., Lamy-Mahmoud E., Rebai A., Gargouri A., Panaud O., Saar A., 2006. Genetic diversity of Tunisian olive tree *Olea europaea* L. cultivars assessed by AFLP markers. *Genetic Res Crop Evol.* 53, 265-275.

Green P.S., 2002. A revision of *Olea europaea* L. (Oleaceae). *Kew Bull* 57:91–140.

Grigoriadou K., Vasilakakis M., Eleftheriou E.P., 2002. *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar 'Chondrolia Chalkidikis'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 47-54.

Haddad B., 2009. Amélioration par transformation génétique de l'enracinement de 6 variétés d'olivier récalcitrantes au bouturage. These de Magister ensa.dz.

Hakim R.I., Grati-Kammon N., Makhloufi E., Rabai A., 2010. Discovery and potential of SNP markers in characterization of Tunisian olive germplasm. *Diversity*. 2, 17-27.

Hamada H., Petrini M.G., Kakunaga T., 1982. A novel repeated element with ZDNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 79, 6465-6469.

Hannachi H., Breton C., Msallem M., Ben Elhadj S., El Gazzah M., Bervillé A., 2008. Differences between native and introduced olive cultivars as revealed by morphology of drupes; oil composition and SSR polymorphisms: A case study in Tunisia. *Sci Horticulture Amsterdam* 116:280-290.

Hannachi H., Sommerlatte H., Breton C., Msallem M., El Gazzah M., El Hadj S.B., Bervillé A., 2009. Oleaster (var. *sylvestris*) and subsp. *Cuspidate* are suitable genetic resources for improvement of the olive (*Olea europaea* subsp. *Europaea* var. *europaea*). *Genet Resour Crop Evol* 56: 393–403.

- Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T., 1990.** Plant Propagation: Principles and Practices, 2nd Edition, Prentice-Hall, New Jersey.
- Hauville, 1953.** La répartition des variétés d'olives en Algérie et ses conséquences pratiques. Bulletin de la société des Agriculteurs d'Algérie, 580.
- Hernández P., De la Rosa R., Rallo L., Dorado G., 2001.** Development of SCAR markers in olive (*Olea europaea* L.) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive germplasm evaluation and mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol.103, pp. 788-79.
- Hess J., Kadereit W., Vargas P., 2000.** The colonization history of *Olea europaea* L. in Macronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR). *Molecular Ecology* 9, 857–868.
- Heywood V.H., 1978.** Flowering plants of the world. Oxford University Press. Oxford. U.K
- Honnay O., Bossuyt B., 2005.** Prolonged clonal growth: escape route or route to extinction. *Oikos* 108: 427–432.
- Hormanza J.I., 1996.** Marcadores de ADN aplicados a la mejora de frutales ¿ITEA; 92(1), 5-15.
- Hormaza J.I., 2002.** Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 321-328.
- Isfendiyaro M., Özeker E., 2008.** Rooting of *Olea europaea* L. Domat cuttings by auxin and salicylic acid treatments. *Pak. J. Bot.* 40, 1135–1141.
- INRAA., 2006.** Rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture. République Algérienne Démocratique et Populaire. Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie. Juin 2006.
- Jacoboni N., 1987.** L'olivier, remis en question, abandon, reconstitution ou réimplantation?
- Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A., 2001.** Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping *Nucleic Acids Research*, Volume 29, Issue 4, 15 February 2001, Pages 25. <https://doi.org/10.1093/nar/29.4.25>.
- Janick J., 1986.** Horticultural science. 4th ed. W.H. Freeman, New York.
- Jeffreus A.J., Wilson V., Thein S., 1985.** Individual specific “Fingerprints” of Human DNA, *Nature*, 316, 76-79.

- Jiménez-Terry F.A., Ramírez-Aguilar D., Agromonte-Peñalver D., 2001.** Use of biobras-6 in micropropagation of FHIA-21. *Info Musa*, 13(1): 4-6.
- Kahl G., 2001.** The Dictionary of Gene Technology.
- Wiley- VCH, WeinheimKanievski D., Van Campo E., Boiy T., Terral J.F., Khadari B., 2012.** Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biol Rev* 87 : 885-899.
- Karp A., Brights. W. J., 1985.** On the causes and origins of somaclonal variation. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Bioi*, 2: 199-234.
- Karp A., Edwards K., 1997.** Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity. In: Ayad W., Hodgkin T., Jaradat A., Rao V. (eds.), *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*, 9-11 October 1995, IPGRI, Rome, Italy, pp 11-22.
- Kevers C., Le Gal N., Monteiro M., Dommes J., Gaspar T.H., 2000.** Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. *Plant Growth Regul.* 31: 209–214.
- Khabou W., Drira N., 2000.** Variation de la rhizogenèse des boutures semi-ligneuses de quelques variétés et clones d'olivier (*Olea europaea* L.) cultivés en Tunisie. *Revue Olivaea*. N°84 : 47-49.
- Khadari B., Charafi J., Moukhli A., Ater M., 2008.** Substantial genetic diversity in cultivated Moroccan olive despite a single major cultivar: a paradoxical situation evidenced by the use of SSR loci. *Tree.Genet. Genomes* 4, 213–221.
- Khadari B., Breton C., Moutier N., Roger J.P., Besnard G.,Berville´ A., 2003.** The use of olecular markers for germplasm management in a French olive collection. *Theor Appl Genet* 106:521–529
- Khadari B., El Aabidine A.Z., Grout C., 2010.** A genetic linkage map of olive based on amplified fragment length polymorphism, intersimple sequence repeat and simple sequence repeat markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 135(6), 548-555.
- Khelifi L., Haddad B., Haddad N., Khelifi-Slaoui M., Amdoun R., Mendil M., 2007.** Transformation génétique de l'olivier : une alternative pour améliorer sa multiplication végétative, *Proceeding du colloque international sur les biotechnologies, Quelles Biotechnologies pour les pays sud*, Oran 24et 25 Novembre.

Kockar F., Ilkci R., 2003. Investigations of genetic variation between olive (*Olea europaea* L.) cultivars using arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *PCR Applied to Genetics of Olives*, Vol.58, pp. 837- 842.

Kollmeier M., Hubert H., Felle., Walter J., Horst., 2000. Genotypical Differences in Aluminum Resistance of Maize Are Expressed in the Distal Part of the Transition Zone. Is Reduced Basipetal Auxin Flow Involved in Inhibition of Root Elongation by Aluminum. *Plant Physiology*, Vol. 122, pp. 945–956. www.plantphysiol.org.

Kozlowsky G., Gibbs D., Huan F., Frey D., Gratzfeld J., 2012. Conservation of threatened relict trees through living ex situ collections: lessons from the global survey of the genus.

Zelkova (Ulmaceae). *Biodivers Conserv* 21: 671–685.

Lacape J.M., Dessauw D., Rajab M., Moyer J.L., Hau B., 2007. Microsatellite diversity in tetraploid *Cossypium* germplasm: assembling a highly informative genotyping set of cotton SSRs. *Mol Breed*. 19, 45-58.

Lambardi M., Caccavale A., Rugini E., Caricato G., 1999. Histological observations on somatic embryos of olive (*Olea europaea* L.). *Acta Hort* 474:67-70

Lambardi M., Rugini E., 2003. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.). In: SM Jain, K Ishii, editors. *Micropropagation of woody trees and fruits*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 621–646.

Larkin P.J., Banks P.M., Bhati R., Bretell R.I.S., Davis P.A., Ryan S.A., Scowcroft W.R., Spindler L.H., Tanner G.J., 1989. From somatic variation to variant plants: mechanism and applications. *Genome* 31: 705 – 711

Lavee S., 1990. Aims, methods and advances in breeding of new olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Acta Horticulturae* 286, pp. 23–36.

Lee G.P., Lee C.H., Kim C.S., 2004. Molecular markers derived from RAPD, SCAR, and the conserved 18S rDNA sequences for classification and identification in *Pyrus pyrifolia* and *P communis*. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol.108, pp. 1487–1491

Lee N., Wetzstein H.Y., Sommer H.F., 1985. Effect of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedling of *liquaidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *plant physiology*, 78:637-641.

Leroy T., Henry A. M., Royer M., Altosaar I., Frutos R., Duris D., Philippe R., 2000. Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Reports* 19 : 382–389.

Leva A.R., Petruccelli R., Goretti R., Panicucci M., 1992. Ruolo di alcuni microelementi e carboidrati nella proliferazione *in vitro* di cv. di olivo (*Olea europaea* L.). Atti del congresso inter.: “Olive: oil quality” Firenze, pp. 333–334.

Leva A.R., Petruccelli R., Bartolini G. 1994. Mannitol *in vitro* culture of *Olea europaea* L. (Cv. Maurino). *Acta Hort* 356 : 43–46.

Leva A.R., Petruccelli R., Muleo R., Goretti R., Bartolini G., 1995. Influenza di fattori trofici, regolativi e condizioni di coltura *in vitro* di diverse cultivar di olivo. Proceeding of an National Symposium “L’Olivicoltura Mediterranea: Stato e Prospettive della Coltura e della Ricerca, Cosenza. pp. 239–248

Leva A.R., Petruccelli R., Montagni G., Muleo R., 2002. Field performance of micropropagated olive plants (cv. Maurino): morphological and molecular features. *Acta Horticulturae*, 586 : 891-894.

Leva A.R., Petruccelli R., Montagni G., Muleo R., 2006. Field performance of micropropagated olive plants (cv. Maurino): Morphological and molecular features. *Acta Horticulturae* 717, volume 586, pp. 891-894.

Leva A.R., Petruccelli R., 1995. Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons. *Journal of Horticultural Science*, 70 : 417–421.

Leva A.R., Petruccelli R., 2012. Monitoring of cultivar identity in micropropagated olive plants using RAPD and ISSR markers *Biologia Plantarum* 56 (2): 373-376.

Liu Z., Furnier G. R., 1993. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theor. Appl. Genet.* 87 : 97-105.

Liu K., Muse S.V., 2005. Power marker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21 : 2128–2129.

Lloyd G., McCown B., 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proceedings of International Plant Propagators Society*, 30 : 421-427.

Lopes T., Capelo A., Brito G., Loureiro J., Santos C., 2009. Genetic variability analyses of the somatic embryogenesis induction process in *Olea spp.* using nuclear microsatellites. *Trees*, 23(1):29–36

Loukas M., Krimbas C.B., 1983. History of Olive cultivars based on their genetic distances. *Journal of Horticultural Science*, Vol.58, pp. 121–127.

Loumou A., Giourga C., 2003. Olive groves: 'The life and identity of the Mediterranean'. *Agri Hum Values* 20: 87–95

Loussert R., Brousse G., 1978. L'olivier. Systématique et classification botanique. G.P. Maisonneuve et Larose, Paris

Mace E.S., Rami J.F., Bouchet S., Klein P.E., Klein R.R., Kilian A., Wenzl P., Xia L., Halloran K., Jordan D.R., 2008. A consensus genetic map of sorghum that integrates multiple component maps and high-throughput Diversity Array Technology (DART) markers. *BMC Plant Biol.* Doi 10. 1186/1471-2229-9-13.

Maddison W.P., Maddison D.R., 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. Available: http://mesquite_project.org.

MADR., 2006.Rapport de Ministère de l'Agriculture et du Développement Rurale Programme de développement de l'oléiculture, Algérie, Juin. 2006, 46 p.

M.A.D.R., 2010. Rapport de Ministère de l'Agriculture et du Développement Rurale Programme de développement de l'oléiculture 2010/2014.

M.A.D.R., 2015. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rurale. Section des Statistiques Agricoles et des Systèmes d'information (DSASI).

M.A.D.R., 2016. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rurale. Section des Statistiques Agricoles et des Systèmes d'information (DSASI).

Maire R., 1933. Etudes sur la flore et la végétation du Sahara central. Mémoires de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord No. 3. Mission du Hoggar II : 166–168.

Mammou S., 2007. Marché mondial des huiles d'olives, des olives de table. Article ITAFV. Chambre National de l'Agriculture 30p.

Margara J., 1978. Mise au point d'une gamme de milieux minéraux pour les conditions de la culture *in vitro*. *C. R.Acad. Sci.* **8**, p. 654–661.

Margara J., 1982. Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris.

- Margara J., 1989.** Bases de la multiplication végétative. INRA. Paris. 254 p.
- Marieschi M., Torelli A., Bianchi A., Bruni R., 2011.** Development of a SCAR marker for the identification of *Olea europaea* L.: A newly detected adulterant in commercial Mediterranean oregano. *Food Chemistry*, Vol.126, No.2, pp. 705-709.
- Mariotti ., Cultrera N.C.M., Munoz Diez C., Baldoni L., Rubino A., 2010.** Identification of new polymorphic regions and differentiation of cultivated olives *olea europea* L. through plastid sequence comparison. *BMC Plant Biol.* 10 : 211.
- Martín A., Rallo L., 2005.** Libro III. Mejora genética y biotecnología. En: Variedades de olivo en España. Luis Rallo, Diego Barranco, Juan M. Caballero, Carmen del Río, Antonio Martín, Joan Tous e Isabel Trujillo (Eds.) Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid
- Martin G.C., 1996.** *Olea europaea* L.
- Martins-Lopes P., Lima-Brito J., Gomes S., Meirinhos J., Santos L., Guedes-Pinto H., 2007.** RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L. genetic variability and molecular cultivar identification. *Genet. Res. Crop. Evol.* 54, 117–128.
- Martins-Lopes P., Gomes S., Lima-Brito J., Lopes J., Guedes-Pinto H., 2009.** Assessment of clonal genetic variability in *Olea europaea* L. ‘Cobrançosa’ by molecular markers. *Scientia Horticulturae*, Vol.123, pp. 82-89.
- Médail F., Quézel P., Besnard G., Khadari B., 2001.** Systematics ecology, and phylogeographic significance of *Olea europaea* L. subsp. *Maroccana* (Greuter & Burdet). *Bot J Linn Soc* 137 : 249–266.
- Mehri H., Mehri K. R., 2007.** The bioagronomic characterization of a local olive cultivar Gerboui. *Am J Plant Physiol* 2(1) : 1-16.
- Merkuria G.T., Collins G.C., Sedgley M., 1999.** Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 74 : 309–314.
- Mekuria G., Collins G., Sedgley M., 2002.** Genetic diversity within an isolated olive (*Olea europaea* L.) population in relation to feral spread. *Sci. Hortic.* 94, 91–105
- Mencuccini M., 1995.** Micropropagazione e miglioramento genetico *in vitro* dell’olivo. Stato dell’arte e prospettive future. *Riv. Fruttic. Ortofloricolt.* 57 (12), p. 73–82

- Mendil M., Sebai A., 2006.** L'olivier en Algérie, Catalogue des variétés algériennes de l'olivier. ITAF n° 1840, p: 104.
- Mendoza-de Gyves E., Mira F.R., Ruiu F., Rugini E., 2008.** Stimulation of node and lateral shoot formation in micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) by using dikegulac. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92: 233-238.
- Miouline., 2002.** Le Truffaut, Encyclopédie Pratique Illustrée Du Jardin. Ed. Protea, BORDAS, 186pp.
- Mitrakos K., Alexaki A., Papadimitriou P., 1992.** Dependence of olive morphogenesis on callus origin and age. *Journal of Plant Physiology*, 139: 269-273.
- Mohan M., Nair S., Bhagwat A., Krishna T.G., Yano M., Bhatia C.R., Sasaki T., 1997.** Genome mapping, molecular markers and markers-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, Vol.3, pp. 87-103.
- Montemurro C., Simeone R., Pasqualone A., Ferrara E., Blanco A., 2005.** Genetic relationships and cultivar identification among 112 olive accessions using AFLP and SSR markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, Vol.80, pp. 105-110
- Murashige T., Skoog F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–479.
- Muzzalupo I., Stefanizzi F., Perri E., 2009.** Evaluation of olives cultivated in southern Italy by simple sequence repeat markers. *HortScience*, Vol.44, pp. 582-588.
- Nei M., Tajima F., Tateno Y., 1983.** Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J Mol Evol* 19: 153–170.
- Orinos T., Mitrakos K., 1991.** Rhizogenesis and somatic embryogenesis in callo from wild olive (*Olea europea* var. *sylvestris* (Miller) Lehr) mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27: 183-187.
- Owen C., Bitá E.C., Banilas G., Hajjar S.H., Sellianakis V., Aksoy U., Hepaksoy S., Chamoun R., Talhouk S., Metzidakis I., Hatzopoulos P., Kalaitzis P., 2005.** AFLP reveals structural details of genetic diversity within cultivated olive germplasm from the eastern Mediterranean. *Theor Appl Genet* 110:1169–1176.
- Ouazzani N., Lumaret R., Villemur P., 1995.** Apport du polymorphisme alloenzymatique à l'identification variétale de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Agronomie*, EDP Sciences, 1995, 15 (1), pp.31-37.

- Ouazzani N., Lumaret R., Villemur P., 1996.** Genetic variation in the olive tree (*Olea europea* L.) cultivated in Morocco. *Euphytica* 91:9–20.
- Pafundo S., Agrimonti C., Maestri E., Marmioli N., 2007.** Applicability of SCAR markers to food genomics: olive oil traceability. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6052-6059.
- Paran I., Michelmore W.R., 1993.** Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol.85, pp. 985-993 Partec, <http://www.partec.de>,
- Pasqualone A., Caponio F., and Blanco A., 2001.** Inter-Simple Sequences Repeat DNA markers for identification of drupes from different *Olea europaea* L. cultivars. *Eur. Food Res. Technol.* 213: 240–243.
- Peixe A., Raposo A., Lourenco R., Cardoso H., Macedo E., 2007.** Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Sci Hort* 113: 1–7. Partec, <http://www.partec.de>,
- Peyvandi M., Farahani F., Noormohamadi Z., Baninashemi O., HosseiniMazinani M., Ataee S., 2009.** Mass production of *Olea europaea* L. (cv Rowghani) through micropropagation. *General and Applied Plant Physiology*, 35 (1-2): 35-43.
- Peyvandi M., Farahani F., Hosseini-Mazinani M., Noormohamadi Z., Attaii S., Asgharzade A., 2010.** *Pseudomonas fluorescens* and its ability to promote root formation of olive microshoots. *International Journal of Plant Production*, 4 (1): 63-66.
- Porfírio S., Da Silva M.D.G., Cabrita M.J., Azadi P., Peixe A., 2016.** Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation. *Sci Hort* 198: 207–226
- Powell W., Machray G.C., Provan J., 1996.** Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1:215–222.
- Preece E., 2003 **A century of progress with vegetative plant propagation** *HortScience*. VOL. 38(5). 1115-1125.
- Pritsa T. S., Voyiatzis., 1999.** The in vitro morphogenetic capacity of olive embryos as affected by their development stage and the L-arginine and L-glutamine concentration in the nutrient substrate. *Acta Horticulturae*, 474:87-90.
- Pospisilova J., Ticha I., Kadlec P., Haisel D., Plzakova S., 1999.** Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, 42, 481-497.

- Ouksili I.A., 1983.** L'olivier: connaissance de la plante .3ieme cours international d'oléiculture. Tizi Ouzou.28Nov/14Dec 1983.
- Quézel P., 1965.** La végétation du Sahara. Du Tchad a` la Mauritanie. Stuttgart: Gustav FischerVerlag.
- Quézel P., 1978.**Analysis of the flora of Mediterranean and Sahara Africa. Ann Missouri Bot Gard 65: 479–534.
- Quoirin M., Lepoivre P., 1977.**Improved media for in vitro culture of Prunus spp. Acta Horticulturae, 78: 437-442.
- Rademacher W., 2015.** Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production Journal of Plant Growth Regulation Volume 34, Issue 4, pp 845–872
- Rallo P., 2001.** Desarrollo y aplicacion de microsate´ lites en olivo (*Olea europaea* L.). Tesis Doctoral, Universidad de Cordoba, España
- Rallo P., Dorado G., Martin A., 2000.** Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). Theoretical and Applied Genetics 101, 984–989.
- Rallo L., 2005.** Antecedentes y presentacion. In: L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Ri´o, A. Marti´n, J. Tous, and I. Trujillo (eds.). Variedades de olivo en espan˜a, Junta de Andalucia, M.A.P.A. y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Spain, pp. 17–44.
- Rama P., Pontikis C.A., 1990.** In vitro propagation of olive (*Olea europaea sativa* L.) Kalamon. J Horti Sci 65: 347–353.
- Raimondi J.P., Masuelli W. R., Camadro L.E., 2001.** Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD fingerprinting and cytogenetic analyses Scientia Horticulturae Vol 90, Issues 1–2, pp 19-29.
- Ramzan-Kan M., Rashid H., Quraishi A., 2002.** In vitro shoot development from juvenile cuttings of field-growth olive (*Olea europaea* L.) cv. Leccino. Journal of Biological Sciences, 2 (7): 438-440.
- Rani V., Raina S.N., 2000.** Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 36(5): 319-330.
- Rapoport H.F., 2008.** Botánica y Morfología. En: D. Barranco, R. Fernández Escobar, L. Rallo (Eds.). El cultivo del olivo. Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, Madrid. pp 128-162.

Reale S., Doveri S., Díaz A., Angiolillo A., Lucentini L., Pilla F., Martín A., Donini P., Lee D., 2006. SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Genome* 49:1193–1205.

Reinert J., 1958. Morphogenese and libre controlle and Gewebekulturene aus Karotten *naturwiss* 45 344-345.

Revilla M.A., Pacheco J., Casares A., Rodríguez R., 1996. *In vitro* reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 32: 257-261.

Risterucci A.M., Hippolyte I., Perrier X., Xia L., Caig V., Evers E., Huttner E., Kilian A., Glaszmann A.C., 2009. Development and assessment of Diversity Arrays Technology for high-throughput DNA analyses in *Musa*. *Theor. Appl. Genet.* 119, 1093-1103.

Roussos P.A., Pontikis C.A., 2001. Phenolic compounds in olive explants and their contribution to browning during the establishment stage *in vitro*. *Gartenbauwissenschaft*, 66 (6): 298–303.

Roussos P.A., Pontikis C.A., 2002. *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. *Plant Growth Regul* 37: 295–304.

Rovira M., Tous J., 1995. Caracterización isoenzimática de variedades de olivo. Comunicación VI Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Barcelona.

Rugini E., Lavee S., 1992. Olive. In: Hammershlag FA., Litz RE. (eds). *Biotechnology of perennial fruit crops*, CAB international, p. 371–382.

Rugini E., Pannelli G., 1993. Olive (*Olea europaea* L.) biotechnology for short term genetic improvement. *Agro-Food-Industry Hi-Tech*, 4: 3-5

Rugini E., Jacobini A., Bazzoffia A., 1987. A simple *in vitro* method to avoid the initial dark period and increase rooting in woody species. *Acta Horticulturae*, 227: 438-440.

Rugini E., Baldoni L., 2005. *Olea europaea* olive. In: *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. R.E. Litz (ed.), CABI, Cambribge, pp: 404-428.

Rugini E., Caricato G., 1995. Somatic embriogenesis and plant recovery from mature tissue olive cultivars (*Olea europea* L.) “Canino” and “Moraiolo”. *Plant Cell Report*, 14: 257-260.

Rugini E., Fedeli E., 1990. Olive (*Olea europaea* L.) as an oilseed crop. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol.10. Y.P.S. Bajaj (ed.), SpringerVerlag, New York, pp: 593-635.

Rugini E., Fontanazza G., 1981. *In vitro* propagation of 'Dolce Agogia' olive. HortScience, 16 (4): 492-493.

Rugini E., et Muganu., 1998. A novel strategy for the induction and maintenance of shoot regeneration from callus derived from established shoots of apple [*Malus ×Domestica* Borkh.] cv. Golden Delicious. Plant Cell Reports, 17: 581–585.

Rugini E., 1990. *In vitro* culture of the olive: an overview of the present scientific status. ActaHorticulturae 286: 93-96.

Rugini E., Tarini P., 1986. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). In: MoetHennessy (ed.), Proceedings Conference Fruit Tree Biotechnology. Paris (France), p.62.

Rugini E., 1984. *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 Horti 24: 123–134.

Rugini E., 1986. Olive (*Olea europaea* L.). En: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 1: Trees. Y.P.S. Bajaj (ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 253-266.

Rugini E., 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 14: 207-214.

Rugini E., 1995. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). En: Somatic Embryogenesis in Woody Plant, S. Jain; P. Gupta; R. Newton (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp: 171-189.

Rugini E., 2002. Miglioramento genetico Ed applicazioni biotecnologiche per la salvaguardia della biodiversità in olivo (Genetic improvement and biotechnology application for safeguard biodiversity in olive. Atti Convegno Internazionale di Olivicoltura, Spoleto, 22-23 Aprile, pp. 74-81.

Rugini E., Pezza A., Muganu M., Caricato G., 1995. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). In: Bajaj, Y.P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I, Vol. 30. Springer Verlag, Berlin, pp. 404–414.

Rugini E., Biasi R., Muleo R., 2000. Olive (*Olea europaea* var. *sativa*) transformation. In : Jain, S.M. and Minocha, S.C. (Eds) Molecular Biology of Woody Plants, Vol. 2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 245–279.

Saker M., Bekheet S., Taha H., Fahmy A., Moursy H., 2000. Detection of somaclonal variations in tissue culture-derived date palm plants using isozyme analysis and RAPD fingerprints. - Biol. Plant. 43: 347-351.

Sakunasingh P., Thepsithar C. and Thongpukdee A., 2004. *In vitro* shoot culture of olive (*Olea europaea* L.) cv. Arbequina. Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand.

Sansaloni C.P., Petroli C.D., Carling J., Hudson C.J., Steane D.A., Myburg A.A., Grattapaglia D., Vaillancourt R.E., Kilian A., 2010. A high density Diversity Arrays Technology (DArT) microarray for genome-wide genotyping in Eucalyptus. Plant Methods. <http://www.plantmethods.com/content>.

Santos C.V., Brito G., Pinto G., Fonseca H., 2003. *In vitro* plantlet regeneration of *Olea europaea* subsp *maderensis*. Sci Hortic 97:83–87.

Santos Macedo E., Cardoso HG., Hernandez A., Peixe A.A., Polidoros A., Ferreira A., Cordeiro A., Arnholdt-Schmitt B., 2009. Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction. Physiol Plant 137 : 532–552.

Sarri V., Baldoni L., Porceddu A., Cultrera N.G.M., Contento A., Frediani M., 2006. Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. Genome 49:606–1615. Doi : 10.1139/G06-126.

Sefc K.M., Lopes M.S., Mendonça D., Rodrigues Dos Santos M., Da Câmara Machado M.L., Da Câmara Machado A., 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*L.) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. Mol Ecol 9: 1171–1173.

Seker M., Dulger S., Kaynas N., 2008. Determination of isozyme polymorphism in open-pollinated olive (*Olea europaea* L.) seedlings used as rootstock. Acta Horticultura, 791 part 1, pp. 173-176.

Sghir S., Chatelet P., Ouazzani N., Dosba F., Belkoura I. , 2005. Micropropagation of eight Moroccan and French olive cultivars. HortScience, 40 (1):193-196.

- Shibli R.A., Shatnawi M., Abu E., Al-Juboory K.H., 2001.** Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of ‘Nabali’ olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 88 : 243–256
- Shuangxia J., Ramesh M., Huaguo Z., Lili T., Zhongxu L., Yanxin Z., Xianlong Z., 2008.** Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Rep*, 27:1303–1316.
- Sibbett S., Ferguson L., Martin G., 1994.** Olive production manual, 2nd Edt. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 3354, pp. 20-84.
- Soltis D.E., Soltis P.S., 1989.** Isozymes in plant Biology En: Soltis DE, Soltis PS (Eds) Discoides Press, Portland, Oregon.
- Tanksley S.D., Orton T.J., 1983.** Isozymes in plant genetics and breeding. Elsevier, Amsterdam.
- Technivit W., 2007.** Lescultures *in vitro* et les techniques appliquées.
- Terzopoulos P.J., Kolano B., Bebeli P.J., Kaltsikes P.J., Metzidakis I., 2005.** Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. *Scientia Horticulturae*, Vol.105, pp. 45–51.
- Tinker N.A., Kilian A., Wight C.P., Heller-Uszynska K., Wenzl P., Rines H.W., Bjornstad A., Howarth C.J., Jannink J.L., Anderson J.M., Rossonagel B.G., Stuthman D.D., Sorrells M., Jackson E.W., Tuvesson S., Kolb F.L., Olson O., Federizzi C., Carson M.L., Ohm H.W., Molnar S.J., Scoles G.J., Eckstein P.E., Bonman J.M., Ceplitis A., Langdon T., 2009.** New DArT markers for oar provide enhanced map coverage and global germplasm characterization BMC genomics, doi: 10. 1186/1471-2164-10-39.
- Tous J., Romero A., 1993.** Variedades del olivo. Fundación “La Caixa”, Barcelona, España
- Torres A.M., 1989.** Isozyme analysis of tree fruits. In : Isozymes in Plant Biology (DE Soltis, PS Soltis, eds), Dioscorides Press, Portland, OR, USA, 192- 205.
- Thorpe T.A., 1980.** Organogenesis *in vitro*: structural physiological and biochemical aspects. In Vasil IK. (Ed) International review of cytology. Suppl. II, p. 71–111.
- Trefois R., 1981.** Le bouturage sous brouillard. *Revue fruit beige*, N°396, pp259-279.
- Trujillo I., Rallo L., Arus P., 1995.** Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 120(2), 318-324.

Trujillo M.E., Scherer P.E., 2005. A diponect in journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *Journal of Internal Medicine* 2005 ; 257 : 167–175.

Tsitsipis J.A., Varikou K., Kalaitzaki A., Alexandrakis V., Margaritopoulos J., Skouras P., 2009. Chemical control of olive pests: blessing or curse. In : Quesada Moraga J. (Ed.). 4th European Meeting of the IOBC/WPRS Working Group Integrated Protection of Olive Crops. Sevilla: Junta De Andalucía - Consejería de Agricultura y Pesca. p. 31. (Congresos y Jornadas).

Van Der Vossen H.A., Mkamilo G.S., Corbière H., 2007. Oléagineux, Pub. Prota, 236 pp.

Vargas P., Kadereit J.W., 2001. Molecular fingerprinting evidence (ISSR) for a wild status of *Olea europaea* L. (Oleaceae) in the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. *Flora* 196: 142–52.

Vidalis H., Augé R., Beauchesne G., 1989. La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Lavoisier, Tec et Doc (ed). 7- 24.

Vidal F., Hasbroucq T., Grapperon J., Bonnet M., 2000. Is the “error negativity” specific to errors? *Biol. Psychol.* 51, 109–128.

Vidoy-Mercado I., Imbroda-Solano I., Barceló-Muñoz A., Pliego-Alfaro F., 2012. Differential *in vitro* behavior of the Spanish olive (*Olea europaea* L.) cultivars ‘Arbequina’ and ‘Picual’. *Acta Horticulturae*, 949: 27-30.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Vande Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23:4407–4414.

Vossen P., 2007. Olive Oil: History, Production, and Characteristics.

Walali L., 1993. La multiplication *in vitro* des espèces ligneuses : état actuel et perspectives de développement. Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l’inventaire des gènes. AUPELF-UREF. Paris: John Libbey Eurotext.

Wallander E., Albert V.A., 2000. Phylogeny and classification of *Oleaceae* based on *RPS16* and *TRNL-F* sequence data. *Amer. J. Bot.* 87:1827-1841

Wang J., Hill W.G., Charlesworth D., Charlesworth B., 1999. Dynamics of inbreeding depression due to deleterious mutations in small populations: Mutation parameters and inbreeding rate. *Genet Res* 74: 165–178.

Wickens G.E., 1976. The floral of Jebel Marra (Sudan Republic) and its geographical affinities. *Kew Bull Additional Ser* 5:1–368

Wiesman Z., 2009. Desert olive oil cultivation: advanced bio technologies. Academic Press

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Vol.18, pp. 6531-6535.

Weeden N.F., 1989. Applications of isozymes in plant breeding. In : *Plant Breeding Reviews* (J Janick, Ed), Timber Press, Portland, OR, USA, 11-54.

Welsh J., McClelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, Volume 18, Issue 24, Pages 7213–7218,

Wu K.S., Tanksley S.D., 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Molecular General Genetics*, Vol. 241, pp. 225-2353.

www.diversity.arrays.com.

www.ipgri.cgiar.org/index.htm

Zabeau M., Vos P., 1993. Selective restriction fragment amplification. A general method for DNA fingerprinting. European Patent Application. Publ. 0534858A1.

Zacchini M., De Agazio M., 2004. Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. *Biol Plant* 48: 589–592.

Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting and simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, Vol.20, pp. 176-183.

Zohary D., Hopf M., Weiss E., 2012. Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin: Oxford University Press.

Zohary D., Hopf M., 1994. Domestication of plants in the Old World, 2nd edn. Oxford Clarendon Press, pp 137–442.

<http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>.

Zohary D., Sepiegel-Roy P., 1975. Beginnings of fruit growing in the old world. *Science* 187, 319–327.

Zohary D., 1994. The wild genetic resources of the cultivated olive. *Acta Horticulturae*, Vol.356, pp. 62-65.

Zryd J.P., 1988. Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Lausanne, Suisse: Presses Polytechnique Romandes, p. 305.

Zuccherelli G., Zuccherelli S., 2000. In vitro propagation of fifty olive cultivars. *Acta Horticulturae*, 586: 931-934.

Zuccherelli G., Zuccherelli S., 2002. In vitro propagation of fifty olive cultivars. *Acta Hort* 586: 931–934.

Zuccherelli G., Zuccherelli S., 2003. In vitro propagation of fifty olive cultivars. *ISHS Acta Horticulturae* 586: IV International Symposium on Olive Growing.

ANNEXES

1. RESULTATS DES ANALYSES STATISTIQUE DE LA PARTIE CULTURE *IN VITRO* DE L'OLIVIER CULTIVÉ VARIÉTÉ CHEMLAL

Annexe 1. Modèle ANOVA appliqué aux effets des milieux, cytokinines et leurs concentrations sur le taux de débourrement des explants (%)

	SCE	DDL	CM	Test F	Probabilité
Ordre d'origine	767536,2	1	767536,2	149036,2	0,000000*
Milieu	3072,9	2	1536,5	298,3	0,000000*
Cytokinine	12333,8	3	4111,3	798,3	0,000000*1
Concentration Cytokinine	69790,3	4	17447,6	3387,9	0,000000*
Milieu*Cytokinine	619,9	6	103,3	20,1	0,000000*
Milieu* Concentration Cytokinine	893,6	8	111,7	21,7	0,000000*
Cytokinine* Concentration Cytokinine	6487,7	12	540,6	105,0	0,000000*
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	3553,6	24	148,1	28,8	0,000000*
Erreur	618,0	120	5,2		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Niveau	Niveau	Taux de débournements	Groupe homogène
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	Temoins	30,0000	o
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN1	65,0000	j
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN2	65,0000	j
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN3	70,0000	hi
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN4	80,0000	ef
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	Temoins	30,0000	o
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA1	75,0000	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA2	95,0000	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA3	100,0000	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA4	100,0000	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	Temoins	30,0000	o
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA1	60,0000	k
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA2	85,0000	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA3	90,0000	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA4	90,0000	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	Temoins	30,0000	o
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ1	65,0000	j
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ2	82,0000	de
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ3	78,0000	fg
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ4	75,0000	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	Temoins	25,0000	p
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN1	50,0000	n
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN2	60,0000	k
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN3	65,0000	j
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN4	30,0000	o

Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	Temoins	25,0000	p
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA1	67,0000	ij
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA2	85,0000	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA3	95,0000	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA4	95,0000	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	Temoins	25,0000	p
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA1	50,0000	n
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA2	75,0000	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA3	90,0000	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA4	85,0000	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	Temoins	25,0000	o
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ1	55,0000	m
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ2	80,0000	ef
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ3	60,0000	k
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ4	55,0000	m
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	Temoins	30,0000	l
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN1	45,0000	l
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN2	65,0000	j
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN3	70,0000	hi
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN4	71,0000	kj
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	Temoins	30,0000	o
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA1	68,0000	hij
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA2	90,0000	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA3	95,0000	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA4	95,0000	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	Temoins	30,0000	o
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA1	75,0000	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA2	80,0000	ef
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA3	90,0000	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA4	85,0000	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	Temoins	30,0000	o
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ1	65,0000	j
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ2	80,0000	ef
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ3	70,0000	h
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ4	60,0000	k

1.2. Phase de multiplication

Annexe 2. Modèle ANOVA appliqué aux effets des milieux, cytokinines et leurs concentrations sur le taux des explants ayant produit des pousses (%)

	SCE	DDL	C M	Test F	Probabilité
Ordre d'origine	289602,2	1	289602,2	51257,03	0,000000*
Milieu	1006,7	2	503,3	89,09	0,000000*
Cytokinine	18058,8	3	6019,6	1065,42	0,000000*
Concentration Cytokinine	82637,2	4	20659,3	3656,51	0,000000*
Milieu*Cytokinine	98,3	6	16,4	2,90	0,011280
Milieu* Concentration Cytokinine	369,9	8	46,2	8,18	0,000000*
Cytokinine* Concentration Cytokinine	5681,1	12	473,4	83,79	0,000000*
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	313,8	24	13,1	2,31	0,001579
Erreur	678,0	120	5,6		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Niveau	Niveau	Taux moyen des explants ayant produit des pousses (%)	Groupe homogène
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	Temoins	0	v
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN1	52	j
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN2	65	h
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN3	71	cde
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN4	79	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	Temoins	0	v
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA1	46	kl
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA2	61	hi
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA3	69	fg
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA4	73	cde
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	Temoins	0	v
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA1	58	i
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA2	67	gh
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA3	74	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA4	83	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	Temoins	0	v
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ1	43	lm
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ2	49	jk
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ3	64	hi
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ4	70	cde
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	Temoins	0	v
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN1	34	qr
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN2	45	klm
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN3	65	h
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN4	69	fg
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	Temoins	0	v

Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA1	51	j
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA2	61i	hi
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA3	67	gh
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA4	73	cde
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	Temoins	0	v
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA1	26	tu
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA2	43	m
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA3	46	kl
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA4	49	jk
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	Temoins	0	v
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ1	23	u
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ2	42	mn
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ3	43	m
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ4	46	klm
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	Temoins	0	v
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN1	31	rs
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN2	46	kl
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN3	49	jk
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN4	52	j
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	Temoins	0	v
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA1	27	r
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA2	35	opq
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA3	35,7	h
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA4	38	op
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	Temoins	0	v
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA1	25	tu
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA2	33	qri
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA3	38	op
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA4	40	op
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	Temoins	0	v
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ1	28	stj
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ2	39	no
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ3	42	mn
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ4	43	lm

Annexe 3. Modèle ANOVA appliqué aux effets des milieux, cytokinines et leurs concentrations sur la longueur moyenne de pousses (cm)

	SCE	DDL	C M	Test F	Probabilité
Ordre d'origine	2393,016	1	2393,016	93709,01	0,000000*
Milieu	30,269	2	15,134	592,65	0,000000*
Cytokinine	337,135	3	112,378	4400,66	0,000000*
Concentration Cytokinine	30,223	3	10,074	394,50	0,000000*
Milieu*Cytokinine	92,609	6	15,435	604,42	0,000000*
Milieu* Concentration Cytokinine	0,545	6	0,091	3,56	0,001726
Cytokinine* Concentration Cytokinine	3,741	9	0,416	16,28	0,000000*
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	1,604	18	0,089	3,49	0,000000*
Erreur	23,289	912	0,026		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Niveau	Niveau	Longueur moyenne de pousses (cm)	Groupe homogène
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN1	0.8	h
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN2	1.0	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN3	1.1	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN4	1.1	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA1	2.9	ab
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA2	3.7	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA3	3.6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA4	3.3	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA1	1,3	f
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA2	1.7	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA3	2	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA4	1.6	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ1	0,9	h
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ2	1.2	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ3	1.1	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ4	1.2	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN1	0,7	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN2	1.1	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN3	1.2	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN4	1.1	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA1	1.3	f
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA2	1.7	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA3	1.9	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA4	1.6	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA1	1.4	f
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA2	1.7	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA3	1.7	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA4	1.6	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ1	0.7	g

Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ2	1.1	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ3	1.2	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ4	1.1	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN1	1.0	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN2	1.1	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN3	1.3	f
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN4	1.2	f
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA1	2.3	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA2	2.7	ab
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA3	2.9	ab
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA4	2.4	cg
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA1	1.4	f
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA2	1.7	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA3	2.0	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA4	1.6	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ1	0.8	h
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ2	1.2	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ3	1.2	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ4	1.1	g

Annexe 4. Modèle ANOVA appliqué aux effets des milieux, cytokinines et leurs concentrations sur le nombre moyen de pousses/explant

	SCE	DDL	C M	Test F	Probabilité
Ordre d'origine	3040,380	1	3040,380	18924,87	0,000000*
Milieu	2,701	2	1,351	8,41	0,000241
Cytokinine	0,741	3	0,247	1,54	0,203353
Concentration Cytokinine	0,336	3	0,112	0,70	0,553795
Milieu*Cytokinine	7,442	6	1,240	7,72	0,000000*
Milieu* Concentration Cytokinine	2,471	6	0,412	2,56	0,018151
Cytokinine* Concentration Cytokinine	1,128	9	0,125	0,78	0,634661
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	3,353	18	0,186	1,16	0,288776
Erreur	146,518	912	0,161		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Niveau	Niveau	Nombre moyen de pousses/ explant	Groupe homogene
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN1	1.5	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN2	1.6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN3	1.6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN4	1.6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA1	1.6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA2	1.8	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA3	1.7	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA4	1.7	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA1	1,7	a

Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA2	1.8	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA3	1,7	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA4	1.8	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ1	1,9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ2	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ3	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ4	2.0	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN1	1,9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN2	1.8	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN3	2,0	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN4	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA1	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA2	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA3	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA4	2.0	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA1	2.0	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA2	1.7	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA3	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA4	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ1	1.8	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ2	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ3	1.5	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ4	1.6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN1	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN2	1.8	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN3	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN4	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA1	1.8	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA2	1.6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA3	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA4	1.8	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA1	1.8	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA2	1.6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA3	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA4	1.7	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ1	1.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ2	1.8	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ3	2,0	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ4	1.9	a

Annexe 5. Modèle ANOVA appliqué aux effets des milieux, cytokinines et leurs concentration sur le nombre de feuilles régénéré /pousse

	SCE	DDL	CM	Test F	Probabilité
Ordre d'origine	6550,713	1	6550,713	38957,82	0,000000*
Milieu	508,199	2	254,100	1511,16	0,000000*
Cytokinine	974,788	3	324,929	1932,39	0,000000*
Concentration Cytokinine	92,685	3	30,895	183,74	0,000000*
Milieu*Cytokinine	401,633	6	66,939	398,09	0,000000*
Milieu* Concentration Cytokinine	3,043	6	0,507	3,02	0,006329
Cytokinine* Concentration Cytokinine	36,997	9	4,111	24,45	0,000000*
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	9,742	18	0,541	3,22	0,000007
Erreur	153,352	912	0,168		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Niveau	Niveau	Nombre moyen de feuilles/ pousse	Groupe homogène
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN1	1.0	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN2	1.3	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN3	1.1	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	KN4	1.1	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA1	4.4	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA2	5.1	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA3	5.3	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	ZEA4	4.7	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA1	1.7	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA2	2.2	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA3	2.6	de
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	BA4	2.1	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ1	1.0	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ2	1.5	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ3	1.4	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM	TDZ4	1.3	de
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN1	1.1	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN2	1.0	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN3	1.3	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	KN4	1.0	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA1	1.6	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA2	2.2	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA3	2.6	cd
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	ZEA4	2.1	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA1	1.5	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA2	2.2	cd
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA3	2.7	cd
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	BA4	2.1	cd
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ1	1.0	e

Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ2	1.6	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ3	1.4	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS	TDZ4	1.5	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN1	1.2	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN2	1.3	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN3	1.7	de
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	KN4	1.5	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA1	3.2	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA2	4.1	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA3	4.9	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	ZEA4	4,0	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA1	1.8	cd
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA2	2.4	cd
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA3	3,0	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	BA4	3,0	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ1	1.0	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ2	1.6	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ3	1.5	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM	TDZ4	1.6	d

Annexe 6. Modèle ANOVA appliqué aux effets de la concentration de l'ANA sur le pourcentage d'enracinement (%)

	SCE	DDL	C. M	Test F	Probabilité
Ordre. Origine	12416,33	1	12416,33	650,6376	0,000000*
Concentration ANA	4159,00	3	1386,33	72,6463	0,000004
Erreur	152,67	8	19,08		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Pourcentage Moyen d'enracinement (%)	Groupes homogènes
N1	8,66667	D
N2	25,00000	C
N3	35,00000	B
N4	60,00000	A

Annexe 7. Modèle ANOVA appliqué aux effets de la concentration de l'ANA sur le nombre moyen de racine/ pousse

	SCE	DDL	CM	Test F	Probabilité
ord. Origine	86,31533	1	86,31533	284,2071	0,000000*
Concentration ANA	17,71499	3	5,90500	19,4432	0,000000*
Erreur	8,50376	28	0,30371		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Nombre moyen de racine/ pousse	Groupe homogène
N1	1,000000	b
N2	1,500000	b
N3	3,428571	a
N4	3,105263	a

Annexe 8. Modèle ANOVA appliqué aux effets de la concentration de l'ANA sur la longueur moyenne de racines / pousse (cm)

	S.CE	DDL	C. M	Test F	Probabilité
ord. Origine	229,0105	1	229,0105	1270,305	0,000000*
Concentration ANA	9,6609	3	3,2203	17,863	0,000000*
Erreur	5,0478	28	0,1803		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Longueur moyenne de racines / pousse (cm)	Groupe homogène
N1	4,350000	a
N2	4,225000	a
N3	2,571429	c
N4	3,568421	b

Annexe 9. Modèle ANOVA appliqué aux effets de la concentration de l'ANA sur le pourcentage des plantes acclimatées (%)

	S. CE	DDL	C. M	Test F	Probabilité
Orde d'origine	76161,33	1	76161,33	30464,53	0,000000*
Concentration ANA	8,67	3	2,89	1,16	0,384608
Erreur	20,00	8	2,50		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Plantes acclimatées (%)	Groupe homogène
N1	78,33333	a
N2	79,66667	a
N3	80,00000	a
N4	80,66667	a

2. RESULTATS DES ANALYSES STATISTIQUE DE LA PARTIE CULTURE *IN VITRO* DE L'OLIVIER CULTIVÉ VARIÉTÉ CHEMLAL, BLANQUETTE DE GUELMA, SIGOISE ET FERKANI

Annexe 10. Modèle ANOVA appliqué aux effets du génotype et de la concentration de ZEA sur le taux de débourrement des explants (%)

	SCE	DDL	CM	Test F	Probabilité
Orde d'origine	330783,8	1	330783,8	25943,82	0,000000*
Génotype	2116,1	3	705,4	55,32	0,000000*
ZEA Concentration	34410,0	4	8602,5	674,71	0,000000*
Génotype* ZEA Concentration	529,2	12	44,1	3,46	0,001524
Erreur	510,0	40	12,8		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symbole	Taux de débourrement (%)	Groupe homogène
Génotype* Concentration ZEA	CH*ZEA0	30,0000	e
Génotype* Concentration ZEA	CH*ZEA1	75,0000	c
Génotype* Concentration ZEA	CH*ZEA2	95,0000	a
Génotype* Concentration ZEA	CH*ZEA3	100,0000	a
Génotype* Concentration ZEA	CH*ZEA4	100,0000	a
Génotype* Concentration ZEA	BG*ZEA0	30,0000	e
Génotype* Concentration ZEA	BG*ZEA1	68,0000	d
Génotype* Concentration ZEA	BG*ZEA2	85,0000	b
Génotype* Concentration ZEA	BG*ZEA3	85,0000	b
Génotype* Concentration ZEA	BG*ZEA4	85,0000	b
Génotype* Concentration ZEA	FK*ZEA0	25,0000	e
Génotype* Concentration ZEA	FK*ZEA1	67,0000	d
Génotype* Concentration ZEA	FK*ZEA2	80,0000	bc
Génotype* Concentration ZEA	FK*ZEA3	80,0000	bc
Génotype* Concentration ZEA	FK*ZEA4	80,0000	bc
Génotype* Concentration ZEA	SG*ZEA0	30,0000	e
Génotype* Concentration ZEA	SG*ZEA1	75,0000	c
Génotype* Concentration ZEA	SG*ZEA2	95,0000	a
Génotype* Concentration ZEA	SG*ZEA3	100,0000	a
Génotype* Concentration ZEA	SG*ZEA4	100,0000	a

Annexe 11. Modèle ANOVA appliqué aux effets du génotype et de la concentration de ZEA sur le pourcentage des explants ayant produit des pousses (%)

	SCE	DDL	CM	Test F	Probabilité
Orde d'origine	146718,2		146718,2		
Génotype	2011,3	3	670,4	21,673	0,000000*
Concentration ZEA	45496,6	4	11374,2	367,699	0,000000*
Génotype* Concentration ZEA	1981,7	12	165,1	5,339	0,000027
Error	1237,3	40	30,9		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symbole	Taux d'explant ayant produit des pousses	Groupe homogène
Géotype*Zea concentration	CH*ZEA0	0,00000	i
Genotype*Zea concentration	CH*ZEA1	58,00000	e
Genotype*Zea concentration	CH*ZEA2	67,00000	d
Genotype*Zea concentration	CH*ZEA3	74,00000	c
Genotype*Zea concentration	CH*ZEA4	83,00000	a
Genotype*Zea concentration	BG*ZEA0	0,00000	i
Genotype*Zea concentration	BG*ZEA1	38,66667	g
Genotype*Zea concentration	BG*ZEA2	44,00000	f
Genotype*Zea concentration	BG*ZEA3	80,66667	c
Genotype*Zea concentration	BG*ZEA4	73,33333	ab
Genotype*Zea concentration	FK*ZEA0	0,00000	i
Genotype*Zea concentration	FK*ZEA1	33,33333	h
Genotype*Zea concentration	FK*ZEA2	42,00000	fg
Genotype*Zea concentration	FK*ZEA3	76,00000	e
Genotype*Zea concentration	FK*ZEA4	54,33333	bc
Genotype*Zea concentration	SG*ZEA0	0,00000	i
Genotype*Zea concentration	SG*ZEA1	45,33333	f
Genotype*Zea concentration	SG*ZEA2	64,00000	d
Genotype*Zea concentration	SG*ZEA3	82,66667	c
Genotype*Zea concentration	SG*ZEA4	72,66667	a

Annexe 12. Modèle ANOVA appliqué aux effets génotype et de la concentration de ZEA sur la longueur moyenne de pousses (cm)

	SCE	DDL	CM	Test F	Probabilité
Orde d'origine	3156,956	1	3156,956	11794,53	0,000000*
Génotype	9,049	3	3,016	11,27	0,000000*
ZEA	71,618	3	23,873	89,19	0,000000*
Génotype* Concentration ZEA	11,117	9	1,235	4,61	0,000010
Erreur	81,370	304	0,268		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symbole	longueur moyenne de pousses (cm)	Groupe homogène
Génotype* Concentration ZEA	CH* ZEA1	2,975000	cd
Génotype* Concentration ZEA	CH*ZEA2	3,585000	b
Génotype* Concentration ZEA	CH*ZEA3	3,660000	ab
Génotype* Concentration ZEA	CH*ZEA4	3,245000	c
Génotype* Concentration ZEA	BG*ZEA1	2,500000	e

Géotype* Concentration ZEA	BG*ZEA2	3,670000	ab
Géotype* Concentration ZEA	BG*ZEA3	3,225000	c
Géotype* Concentration ZEA	BG*ZEA4	2,740000	e
Géotype* Concentration ZEA	FK*ZEA1	1,960000	f
Géotype* Concentration ZEA	FK*ZEA2	3,875000	ab
Géotype* Concentration ZEA	FK*ZEA3	3,155000	c
Géotype* Concentration ZEA	FK*ZEA4	2,745000	de
Géotype* Concentration ZEA	SG*ZEA1	2,475000	e
Géotype* Concentration ZEA	SG*ZEA2	3,960000	a
Géotype* Concentration ZEA	SG*ZEA3	3,255000	c
Géotype* Concentration ZEA	SG*ZEA4	3,230000	c

Annexe 13. Modèle ANOVA appliqué aux effets génotype et de la concentration de ZEA sur le nombre moyen de pousses/explant

	SCE	DDL	CM	Test F	Probabilité
Orde d'origine	1001,113	1	1001,113	5699,217	0,000000*
Géotype	0,762	3	0,254	1,447	0,229187
Concentration ZEA	0,637	3	0,212	1,210	0,306320
Géotype* Concentration ZEA	2,088	9	0,232	1,320	0,225357
Erreur	53,400	304	0,176		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symbole	Nombre moyen de pousses /explant	Groupe homogène
Géotype* Concentration ZEA	CH* ZEA1	1,600000	a
Géotype* Concentration ZEA	CH*ZEA2	1,800000	a
Géotype* Concentration ZEA	CH*ZEA3	1,700000	a
Géotype* Concentration ZEA	CH*ZEA4	1,650000	a
Géotype* Concentration ZEA	BG*ZEA1	2,000000	a
Géotype* Concentration ZEA	BG*ZEA2	1,800000	a
Géotype* Concentration ZEA	BG*ZEA3	1,850000	a
Géotype* Concentration ZEA	BG*ZEA4	1,700000	a
Géotype* Concentration ZEA	FK*ZEA1	2,000000	a
Géotype* Concentration ZEA	FK*ZEA2	1,600000	a
Géotype* Concentration ZEA	FK*ZEA3	1,800000	a
Géotype* Concentration ZEA	FK*ZEA4	1,800000	a
Géotype* Concentration ZEA	SG*ZEA1	2,000000	a
Géotype* Concentration ZEA	SG*ZEA2	1,850000	a
Géotype* Concentration ZEA	SG*ZEA3	1,700000	a
Géotype* Concentration ZEA	SG*ZEA4	1,700000	a

Annexe 14. Modèle ANOVA appliqué aux effets du génotype et de la concentration de ZEA sur le nombre moyen de feuilles /pousse

	SCE	DDL	CM	Test F	Probabilité
Orde d'origine	3341,113	1	3341,113	12586,10	0,000000*
Génotype	287,263	3	95,754	360,71	0,000000*
Concentration ZEA	39,863	3	13,288	50,05	0,000000*
Génotype*Concentration ZEA	9,063	9	1,007	3,79	0,000149
Erreur	80,700	304	0,265		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symbole	Nombre moyen de feuilles / pousse	Groupe homogène
Génotype* concentration ZEA	CH*ZEA1	3,2	c
Génotype* concentration ZEA	CH*ZEA2	4,1	b
Génotype* concentration ZEA	CH*ZEA3	4,9	a
Génotype* concentration ZEA	CH*ZEA4	4,0	b
Génotype* concentration ZEA	BG*ZEA1	1,6	d
Génotype* concentration ZEA	BG*ZEA2	2,2	cd
Génotype* concentration ZEA	BG*ZEA3	2,6	cd
Génotype* concentration ZEA	BG*ZEA4	2,1	d
Génotype* concentration ZEA	FK*ZEA1	4,4	b
Génotype* concentration ZEA	FK*ZEA2	5,1	a
Génotype* concentration ZEA	FK*ZEA3	5,3	a
Génotype* concentration ZEA	FK*ZEA4	4,7	ab
Génotype* concentration ZEA	SG*ZEA1	1,8	cd
Génotype* concentration ZEA	SG*ZEA2	2,4	cd
Génotype* concentration ZEA	SG*ZEA3	3,1	c
Génotype* concentration ZEA	SG*ZEA4	2,95	c

Annexe 15. Modèle ANOVA appliqué aux effets génotype et de la concentration de l'ANA sur le pourcentage d'enracinement (%)

	SCE	DDL	C M	Test F	Probabilité
Orde d'origine	78246,75	1	78246,75	8129,532	0,000000*
Génotype	2474,25	3	824,75	85,688	0,000000*
Concentration ANA	6439,75	3	2146,58	223,022	0,000000*
Genotype* Concentration ANA	7017,25	9	779,69	81,007	0,000000*
Erreur	308,00	32	9,63		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symbole	Pourcentage d'enracinement	Groupe homogène
Géotype* Concentration ANA	CH*N0	0	K
Géotype* Concentration ANA	CH*N1	8,00000	j
Géotype* Concentration ANA	CH*N2	25,00000	hi
Géotype* Concentration ANA	CH*N3	35,00000	efg
Géotype* Concentration ANA	CH*N4	60,00000	c
Géotype* Concentration ANA	BG*N0	0	K
Géotype* Concentration ANA	BG*N1	20,00000	i
Géotype* Concentration ANA	BG*N2	60,00000	c
Géotype* Concentration ANA	BG*N3	38,00000	ef
Géotype* Concentration ANA	BG*N4	20,00000	i
Géotype* Concentration ANA	FK*N0	0	K
Géotype* Concentration ANA	FK*N1	40,00000	e
Géotype* Concentration ANA	FK*N2	70,00000	b
Géotype* Concentration ANA	FK*N3	50,00000	d
Géotype* Concentration ANA	FK*N4	30,00000	gh
Géotype* Concentration ANA	SG*N0	0	K
Géotype* Concentration ANA	SG*N1	34,00000	fg
Géotype* Concentration ANA	SG*N2	75,33333	a
Géotype* Concentration ANA	SG*N3	45,33333	e
Géotype* Concentration ANA	SG*N4	35,33333	g

Annexe 16. Modèle ANOVA appliqué aux effets géotype et de la concentration de l'ANA sur la longueur moyenne de racine (cm)

	SCE	DDL	CM	Test F	Probabilité
Orde d'origine	1533,321	1	1533,321	5280,993	0,000000*
Géotype	1,907	3	0,636	2,190	0,090796
Concentration ANA	52,342	3	17,447	60,092	0,000000*
Géotype* Concentration ANA	16,891	9	1,877	6,464	0,000000*
Erreur	53,424	184	0,290		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symbole	Longure moyenne de racine	groupe homogene
Géotype* Concentration ANA	CH*N1	4,350000	b
Géotype* Concentration ANA	CH*N2	4,225000	bc
Géotype* Concentration ANA	CH*N3	2,551429	f
Géotype* Concentration ANA	CH*N4	3,568421	e
Géotype* Concentration ANA	BG*N1	3,331500	e
Géotype* Concentration ANA	BG*N2	3,962500	d

Géotype* Concentration ANA	BG*N3	3,337500	e
Géotype* Concentration ANA	BG*N4	2,626000	f
Géotype* Concentration ANA	FK*N1	3,376000	e
Géotype* Concentration ANA	FK*N2	4,383333	b
Géotype* Concentration ANA	FK*N3	3,281250	e
Géotype* Concentration ANA	FK*N4	2,500000	f
Géotype* Concentration ANA	SG*N1	3,387500	e
Géotype* Concentration ANA	SG*N2	4,695833	a
Géotype* Concentration ANA	SG*N3	3,237500	e
Géotype* Concentration ANA	SG*N4	2,650000	f

Annexe 17. Modèle ANOVA appliqué aux effets géotype et de la concentration de l'ANA sur le nombre moyen de racine/ pousse

	SCE	DDL	C M	Test F	Probabilité
Orde d'origine	499,1471	1	499,1471	571,7723	0,000000*
Genotype	2,0935	3	0,6978	0,7994	0,495667
ANA	35,1939	3	11,7313	13,4382	0,000000*
Genotype* Concentration ANA	15,1840	9	1,6871	1,9326	0,049795
Erreur	160,6288	184	0,8730		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symbole	Nombre moyen de racine/ pousset	Groupe homogène
Géotype* Concentration ANA	CH*N1	1,000000	e
Géotype* Concentration ANA	CH*N2	1,500000	de
Géotype* Concentration ANA	CH*N3	3,428571	a
Géotype* Concentration ANA	CH*N4	3,105263	ab
Géotype* Concentration ANA	BG*N1	1,250000	e
Géotype* Concentration ANA	BG*N2	1,926667	cd
Géotype* Concentration ANA	BG*N3	2,500000	bc
Géotype* Concentration ANA	BG*N4	3,375000	de
Géotype* Concentration ANA	FK*N1	1,250000	e
Géotype* Concentration ANA	FK*N2	2,166667	cd
Géotype* Concentration ANA	FK*N3	2,500000	bc
Géotype* Concentration ANA	FK*N4	1,625000	de
Géotype* Concentration ANA	SG*N1	1,250000	e
Géotype* Concentration ANA	SG*N2	2,166667	cd
Géotype* Concentration ANA	SG*N3	2,500000	bc
Géotype* Concentration ANA	SG*N4	1,627000	de

Annexe 18. Modèle ANOVA appliqué aux effets génotype et de la concentration de l'ANA sur le pourcentage des plantes acclimatées (%)

	S.CE	DDL	CM	Test F	Probabilité
Orde d'origine	311052,0	1	311052,0	108192,0	0,000000*
Génotype	36,0	3	12,0	4,2	0,013302
ANA	15,2	3	5,1	1,8	0,174940
Génotype* ANA	6,8	9	0,8	0,3	0,979915
Erreur	92,0	32	2,9		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symbole	Pourcentage des plantes acclimatées	groupe homogène
Génotype* Concentration ANA	CH*N1	78,33	a
Génotype* Concentration ANA	CH*N2	79,66	a
Génotype* Concentration ANA	CH*N3	80,00	a
Génotype* Concentration ANA	CH*N4	80,60	a
Génotype* Concentration ANA	BG*N1	78,33	a
Génotype* Concentration ANA	BG*N2	79,66	a
Génotype* Concentration ANA	BG*N3	80,00	a
Génotype* Concentration ANA	BG*N4	80,60	a
Génotype* Concentration ANA	FK*N1	81,00	a
Génotype* Concentration ANA	FK*N2	81,66	a
Génotype* Concentration ANA	FK*N3	82,00	a
Génotype* Concentration ANA	FK*N4	82,00	a
Génotype* Concentration ANA	SG*N1	81,00	a
Génotype* Concentration ANA	SG*N2	81,00	a
Génotype* Concentration ANA	SG*N3	80,33	a
Génotype* Concentration ANA	SG*N4	81,67	a

3. RESULTATS DES ESSAIS CONDUITS AVEC L'OLIVIER DE LAPERRINE (*OLEA EUROPAEA L.*) SUBSP *LAPERRINEI*

Annexe 19. Modèle ANOVA appliqué aux effets des milieux et des cytokinines sur le taux de débourrement des explants (%)

	S. CE	DDL	C. M	Test F	Probabilité
Ord origine	457817,3	1	457817,3	73315,94	0,000000*
Milieu	624,7	2	312,3	50,02	0,000000*
Cytoytkinine	1116,5	1	1116,5	178,81	0,000000*
Concentration Cytokinines	57337,0	4	14334,3	2295,52	0,000000*
Milieu*Cytoytkinine	52,3	2	26,1	4,19	0,019855
Milieu* Concentration Cytoytkinine	470,1	8	58,8	9,41	0,000000*
Cytoytkinine* Concentration Cytoytkinine	645,2	4	161,3	25,83	0,000000*
Milieu*Cytoytkinine * Concentration Cytoytkinine	185,2	8	23,1	3,71	0,001413
Erreur	374,7	60	6,2		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symbole	Taux de débourrement des explants (%)	Groupe homogène
Milieu* Cytokinine* Concentration Cytokinine	OM/ZEA0	30,000	i
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA1	58,000	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA2	80,000	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA3	95,000	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA4	100,000	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA0	30,000	i
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA1	60,000	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA2	85,000	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA3	90,000	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA4	100,000	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA0	30,000	i
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA1	75,000	ef

Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA2	95,000	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA3	98 ,333	ab
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA4	100,000	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA0	30,000	i
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA1	45,000	hi
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA2	70,000	f
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA3	90,000	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA4	95,000	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA0	25,000	i
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA1	50,000	h
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA2	75,000	ef
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA3	90,000	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA4	95 ,000	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA0	30,000	i
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA1	56,667	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA2	76,667	ef
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA3	90,000	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA4	100,000	a

Annexe 20. Modèle ANOVA appliqué aux effets des milieux et des cytokinines sur le pourcentage des explants ayant produit des pousses (%)

. Sources de variation	S. CE	DDL	C. M	Test F	Probabilité
Ord origine	149132,9	1	149132,9	24403,57	0,000000*
Milieu	2695,1	2	1347,6	220,51	0,000000*
Cytoytkinine	1895,2	1	1895,2	310,13	0,000000*
Concentration Cytokinines	53307,1	4	13326,8	2180,75	0,000000*
Milieu*Cytoytkinine	41,3	2	20,6	3,38	0,040749
Milieu* Concentration Cytoytkinine	1434,7	8	179,3	29,35	0,000000*
Cytoytkinine* Concentration Cytoytkinine	629,5	4	157,4	25,75	0,000000*
Milieu*Cytoytkinine * Concentration Cytoytkinine	217,5	8	27,2	4,45	0,000284
Erreur	366,7	60	6,1		

Comaraison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symbole	Taux des explants ayant produit des pousses	Groupe homogene
Milieu*Cytokinine*Concentration Cytokinine	OM/ZEA0	0	a
Milieu*Cytokinine*Concentration Cytokinine	OM/ZEA1	28,9	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA2	40	cd
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA3	73,7	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA4	52,5	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA0	0	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA1	33,6	cd
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA2	42,7	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA3	76	h
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA4	69,8	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA0	0	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA1	45,5	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA2	62,7	f
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA3	88,8	i
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA4	71,5	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA0	0	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA1	23,2	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA2	33,3	cd
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA3	53,3	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA4	46,8	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA0	0	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA1	25,8	cd
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA2	31,8	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA3	59,4	h

Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA4	55,7	g
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA0	0	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA1	28,3	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA2	55,8	f
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA3	73,6	h
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA4	55,7	g

Annexe 21. Modèle ANOVA appliqué aux effets des milieux et des cytokinines sur la longueur moyenne de pousses (cm)

	SCE	DDL	CM	Test F	Probabilité
Ord origine	2346,181	1	2346,181	20784,69	0,000000*
Milieu	11,056	2	5,528	48,97	0,000000*
Cytoytkinine	147,419	1	147,419	1305,98	0,000000*
Concentration Cytokinines	57,323	3	19,108	169,27	0,000000*
Milieu*Cytoytkinine	7,506	2	3,753	33,25	0,000000*
Milieu* Concentration Cytoytkinine	6,668	6	1,111	9,85	0,000000*
Cytoytkinine* Concentration Cytoytkinine	9,444	3	3,148	27,89	0,000000*
Milieu*Cytoytkinine * Concentration Cytoytkinine	1,751	6	0,292	2,58	0,017921
Erreur	51,473	456	0,113		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symbole	Longueur moyenne des pousses / explant	Groupe homogène
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA1	1,4	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA2	1,8	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA3	2	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA4	1,6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA1	2,3	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA2	3,4	f
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA3	2,9	e
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA4	2,7	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA1	1,4	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA2	1,9	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA3	1,9	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA4	1,6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA1	1,2	a

Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA2	1,6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA3	2	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA4	1,8	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA1	1,4	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA2	1,8	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA3	2	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA4	1,6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA1	1,4	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA2	1,9	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA3	1,9	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA4	1,6	a

Annexe 22. Modèle ANOVA appliqué aux effets des milieux et des cytokinines sur le nombre moyen de pousses /explant

	SCE	DDL	CM	Test F	Probabilité
Ord origine	1613,333	1	1613,333	13548,43	0,000000*
Milieu	6,454	2	3,227	27,10	0,000000*
Cytoytkinine	1,008	1	1,008	8,47	0,003792
Concentration Cytokinines	1,050	3	0,350	2,94	0,032909
Milieu*Cytoytkinine	1,679	2	0,840	7,05	0,000965
Milieu* Concentration Cytoytkinine	0,613	6	0,102	0,86	0,526336
Cytoytkinine* Concentration Cytoytkinine	0,242	3	0,081	0,68	0,566784
Milieu*Cytoytkinine * Concentration Cytoytkinine	1,321	6	0,220	1,85	0,008815
Erreur	54,300	456	0,119		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symbole	Nombre moyen de pousses/ explant	Groupe homogene
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA1	1,8	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA2	1,6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA3	1,9	ab
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA4	1,8	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA1	1,9	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA2	1,9	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA3	1,9	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA4	2	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA1	1,6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA2	1,8	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA3	1,7	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA4	1,7	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA1	1,8	ab

Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA2	2	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA3	2	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA4	1,9	ab
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA1	2	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA2	1,8	ab
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA3	1,9	ab
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA4	1,9	ab
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA1	1,6	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA2	1,8	ab
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA3	2,1	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA4	1,8	ab

Annexe 23. Modèle ANOVA appliqué aux effets des milieux et cytokinines sur le nombre moyen de feuilles / pousse régénérés

	SCE	DDL	CM	Test F	Probabilité
Ord origine	8325,002	1	8325,002	16756,57	0,000000*
Milieu	24,817	2	12,408	24,98	0,000000*
Cytoytkinine	397,852	1	397,852	800,80	0,000000*
Concentration Cytokinines	123,256	3	41,085	82,70	0,000000*
Milieu*Cytoytkinine	26,467	2	13,233	26,64	0,000000*
Milieu* Concentration Cytoytkinine	14,150	6	2,358	4,75	0,000105
Cytoytkinine* Concentration Cytoytkinine	10,573	3	3,524	7,09	0,000115
Milieu*Cytoytkinine * Concentration Cytoytkinine	26,333	6	4,389	8,83	0,000000*
Erreur	226,550	456	0,497		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symbole	Nombre moyen de feuilles/pousse	Groupe homogene
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA1	4,6	cd
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA2	5,8	de
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA3	5,7	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/ZEA4	4,6	cd
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA1	2,9	ab
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA2	5,4	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA3	5,3	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/ZEA4	5,1	cd
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA1	5,3	d
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA2	6,6	dc
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA3	5,8	dc
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/ZEA4	4,9	cd

Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA1	2,8	ab
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA2	3,7	bc
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA3	4	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	OM/BA4	3,1	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA1	3,2	b
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA2	3,4	bc
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA3	3,8	bc
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MS/BA4	3,4	bc
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA1	2,2	a
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA2	3,3	bc
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA3	4	c
Milieu*Cytokinine * Concentration Cytokinine	MSM/BA4	3,1	b

Annexe 24. Modèle ANOVA appliqué aux effets de la concentration de l'AIB sur le pourcentage d'enracinement (%)

	SCE	DDL	CM	Test F	Probabilité
Ord origine	7975,260	1	7975,260	1225,000	0,000000*
AIB	1688,281	3	562,760	86,440	0,000000*
Var. Résiduelle	104,167	16	6,510		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symboles	Pourcentage d'enracinement	Groupe homogène
AIB1	B1	21,67	a
AIB2	B2	61,67	d
AIB3	B3	41,67	b
AIB4	B4	20,83	a

Annexe 25. Modèle ANOVA appliqué aux effets de la concentration de l'AIB sur le nombre moyen de racine/ pousse

	SCE	DDL	CM	Test F	Probabilité
Ord. Origine	160,5931	1	160,5931	164,6838	0,000000*
AIB	10,1310	3	3,3770	3,4630	0,022696
Erreur	50,7083	52	0,9752		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symboles	Nombre moyen de racine/ pousse	Groupe homogene
AIB1	B1	1,3	a
AIB2	B2	2,2	bc
AIB3	B3	2,5	c
AIB4	B4	1,4	ab

Annexe 26. Modèle ANOVA appliqué aux effets de la concentration de l'AIB sur la longueur moyenne de racine (cm)

	S.C.E	DDL	C .M	Test F	Probabilité
ord. Origine	111,8288	1	111,8288	444,3978	0,00000*
Concentration AIB	5,4448	3	1,8149	7,2124	0,000389
Erreur	13,0853	52	0,2516		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symboles	Longueur moyenne de racine	Groupe homogène
AIB1	B1	1,1	a
AIB2	B2	1,4	a
AIB3	B3	1,7	b
AIB4	B4	2,1	b

Annexe 27. Modèle ANOVA appliqué aux effets de la concentration de l'AIB sur le pourcentage des plantes acclimatées (%)

	SCE	DDL	C M	Test F	Probabilité
ord. Origine	74418,75	1	74418,75	28807,26	0,000000*
Concentration AIB	21,58	3	7,19	2,70	0,109694
Erreur	20,67	8	2,58		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Symboles	Pourcentage des plantes acclimatées	Groupes homogène
AIB1	B1	77,67	A
AIB2	B2	80,67	A
AIB3	B3	79,33	A
AIB4	B4	77,33	A

Annexe 28. Modèle ANOVA appliqué aux effets des génotypes, milieux, la nature et la concentration des cytokinines sur le pourcentage des explants ayant produit des pousses (%)

	S.C.E	DDL	C.M	Test F	probabilité
Ordre d'origine	367943,3	1	367943,3	37338,86	0,000000*
Génotype	396,7	1	396,7	40,25	0,000000*
Milieu	7117,1	2	3558,5	361,12	0,000000*
Cytokinine	4000,6	1	4000,6	405,98	0,000000*
Concentration Cytokinine	29990,9	3	9997,0	1014,49	0,000000*
Génotype*Milieu	306,1	2	153,0	15,53	0,000001
Génotype*Cytokinines	12,8	1	12,8	1,30	0,256500
Milieu*Cytokinines	282,2	2	141,1	14,32	0,000004
Génotype *Concentration de cytokinine	120,1	3	40,0	4,06	0,009177
Milieux*Concentration de cyokinine	1768,7	6	294,8	29,91	0,000000*
Cytokinines*Concentration cytokinine	172,9	3	57,6	5,85	0,001035
Génotype*Milieu*Cytokinines	557,4	2	278,7	28,28	0,000000*
Génotype*Milieu*Concentration de cytokinine	137,4	6	22,9	2,32	0,038661
Génotype*Cytokinines*Concentration de cytokinine	197,4	3	65,8	6,68	0,000385
Milieu*Cytokinines*Concentration de cytokinine	290,0	6	48,3	4,90	0,000205
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	133,7	6	22,3	2,26	0,043878
Error	946,0	96	9,9		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Génotype	Milieu	Cytokinine *Concentration de cytokinines	Longueur moyenne des pousses / explant (cm)	Goupe homogène
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	OM	ZEA1	31,3	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	OM	ZEA2	40,0	c
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	OM	ZEA3	74 ,0	f
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	OM	ZEA4	52,3	d
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	OM	BA1	24,6	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	OM	BA2	33,3	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	OM	BA3	53, 3	d
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	OM	BA4	47,0	cd

Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MS	ZEA1	35,7	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MS	ZEA2	42,0	c
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MS	ZEA3	78,7	f
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MS	ZEA4	71,3	f
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MS	BA1	26,6	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MS	BA2	32,0	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MS	BA3	58,7	de
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MS	BA4	58,0	de
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MSM	ZEA1	43,3	hi
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MSM	ZEA2	62,0	c
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MSM	ZEA3	89,3	e
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MSM	ZEA4	73,0	ig
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MSM	BA1	33,3	f
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MSM	BA2	56,6	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MSM	BA3	74,0	f
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploïde	MSM	BA4	59,6	de
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploïde	OM	ZEA1	28,3	ab
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploïde	OM	ZEA2	40,00	c
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploïde	OM	ZEA3	73,3	f
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploïde	OM	ZEA4	52,7	d
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploïde	OM	BA1	21,7	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploïde	OM	BA2	33,3	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploïde	OM	BA3	53,3	d
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploïde	OM	BA4	46,7	c
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploïde	MS	ZEA1	31,6	ab
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploïde	MS	ZEA2	43,3	c
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploïde	MS	ZEA3	73,3	f
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploïde	MS	ZEA4	68,3	ef

Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	BA1	25	ab
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	BA2	31,6	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	BA3	60	de
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	BA4	53,3	d
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	ZEA1	47,6	cd
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	ZEA2	63,3	e
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	ZEA3	88,3	g
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	ZEA4	70	f
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	BA1	23,3	ab
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	BA2	55	d
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	BA3	73,3	f
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	BA4	51,7	d

Annexe 29. Modèle ANOVA appliqué aux effets des Génotypes, milieux, la nature et la concentration des cytokinines sur la longueur moyenne de pousses / explant (cm)

	S.C.E	DDL	C.M	Test F	probabilité
Ordre d'origine	4827,699	1	4827,699	32829,82	0,000000*
Génotype	0,280	1	0,280	1,90	0,168093
Milieu	25,928	2	12,964	88,16	0,000000*
Cytokinine	305,338	1	305,338	2076,39	0,000000*
Concentration Cytokinine	117,396	3	39,132	266,11	0,000000*
Génotype*Milieu	0,997	2	0,498	3,39	0,034143
Génotype*Cytokinines	0,022	1	0,022	0,15	0,698108
Milieu*Cytokinines	17,072	2	8,536	58,05	0,000000*
Ecotypes*Concentration de cytokinine	0,842	3	0,281	1,91	0,126375
Milieux*Concentration de cytokinine	15,367	6	2,561	17,42	0,000000*
Cytokinines*Concentration cytokinine	17,153	3	5,718	38,88	0,000000*
Génotype*Milieu*Cytokinine	0,708	2	0,354	2,41	0,090572
Génotype*Milieu*Concentration de cytokinine	2,288	6	0,381	2,59	0,016933
Génotype*Cytokinine*Concentration de cytokinine	1,081	3	0,360	2,45	0,062212
Milieu*Cytokinine*Concentration de cytokinine	4,000	6	0,667	4,53	0,000153
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	2,182	6	0,364	2,47	0,022273
Error	134,112	912	0,147		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Genotype	Milieu	Cytokinine *Concentration de cytokinines	Longueur moyenne des pousses / explant (cm)	Groupe homogene
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	ZEA1	1,4	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	ZEA2	1,8	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	ZEA3	2	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	ZEA4	1,6	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	BA1	1,2	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	BA2	1,6	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	BA3	2,	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	BA4	1,8	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	ZEA1	2,3	c
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	ZEA2	3,4	f
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	ZEA3	2,9	e
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	ZEA4	2,7	d
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	BA1	1,2	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	BA2	1,6	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	BA3	2,	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	BA4	1,6	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	ZEA1	1,4	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	ZEA2	1,9	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	ZEA3	1,9	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	ZEA4	1,6	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	BA1	1,4	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	BA2	1,9	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	BA3	1,9	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	BA4	1,6	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	ZEA1	1,3	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	ZEA2	3,2	f

Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	ZEA3	3,04	ef
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	ZEA4	2,4	c
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	BA1	1,12	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	BA2	1,6	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	BA3	1,96	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	BA4	1,74	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	ZEA1	2,2	bc
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	ZEA2	2,2	bc
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	ZEA3	1,97	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	ZEA4	1,65	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	BA1	1,38	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	BA2	1,79	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	BA3	1,94	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	BA4	1,59	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	ZEA1	2,5	c
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	ZEA2	3,6	f
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	ZEA3	3,1	ef
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	ZEA4	2,92	e
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	BA1	1,39	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	BA2	1,84	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	BA3	1,92	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	BA4	1,56	a

Annexe 30. Modèle ANOVA appliqué aux effets des génotypes, milieux et la nature et la concentration des cytokinines sur le nombre moyen de pousses /explant

	SS	DDL	MS	F	p
Ordre d'origine	3230,334	1	3230,334	27341,67	0,000000*
Génotype	0,651	1	0,651	5,51	0,019116
Milieu	4,856	2	2,428	20,55	0,000000*
Cytokinine	2,301	1	2,301	19,48	0,000011
Concentration Cytokinine	3,953	3	1,318	11,15	0,000000*
Génotype*Milieu	0,577	2	0,289	2,44	0,087536
Génotype*Cytokinines	0,301	1	0,301	2,55	0,110778
Milieu*Cytokinines	3,215	2	1,607	13,60	0,000002
Génotype*Concentration de cytokinine	0,803	3	0,268	2,27	0,079384
Milieu*Concentration de cytokinine	3,194	6	0,532	4,51	0,000165
Cytokinine*Concentration cytokinine	0,336	3	0,112	0,95	0,416159
Génotype*Milieu*Cytokinine	0,627	2	0,314	2,65	0,070925
Génotype*Milieu*Concentration de cytokinine	2,006	6	0,334	2,83	0,009805
Génotype*Cytokinines*Concentration de cytokinine	1,103	3	0,368	3,11	0,025621
Milieu*Cytokinines*Concentration de cytokinine	3,235	6	0,539	4,56	0,000142
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	1,756	6	0,293	2,48	0,022061
Error	107,750	912	0,118		

Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Traitements	Génotype	Milieu	Cytokinine *Concentration de cytokinines	Nombre moyen de pousses/explant	Groupe homogène
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	ZEA1	1,10	a
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	ZEA2	1,60	ab
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	ZEA3	1,85	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	ZEA4	1,85	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	BA1	1,75	b

Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	BA2	2,00	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	BA3	2,00	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	OM	BA4	1,90	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	ZEA1	1,90	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	ZEA2	1,90	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	ZEA3	1,95	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	ZEA4	2,00	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	BA1	2,00	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	BA2	1,70	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	BA3	1,90	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MS	BA4	1,85	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	ZEA1	1,60	ab
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	ZEA2	1,80	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	ZEA3	1,70	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	ZEA4	1,65	ab
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	BA1	1,65	ab
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	BA2	1,80	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Triploide	MSM	BA3	2,10	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration	Triploide	MSM	BA4	1,85	b

de cytokinine					
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	ZEA1	1,95	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	ZEA2	1,60	ab
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	ZEA3	1,85	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	ZEA4	1,85	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	BA1	1,75	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	BA2	2,00	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	BA3	2,00	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	OM	BA4	1,90	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	ZEA1	1,95	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	ZEA2	2,00	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	ZEA3	2,00	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	ZEA4	2,00	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	BA1	2,00	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	BA2	1,80	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	BA3	1,95	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MS	BA4	2,00	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	ZEA1	1,60	ab
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	ZEA2	1,80	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	ZEA3	1,70	b

Cytokinines* Concentration de cytokinine					
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	ZEA4	1,65	ab
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	BA1	1,65	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	BA2	1,80	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	BA3	2,00	b
Génotype *Milieu* Cytokinines* Concentration de cytokinine	Diploide	MSM	BA4	1,85	b