



## Banque Nationale de Gènes de Tunisie BNGT

### Projet : Valorisation des espèces végétales autochtones Siciliennes et Tunisiennes avec un intérêt nutritif et bon pour la santé « ESPAS »

#### Groupe de Tâche 3: Recherches et Analyses pour la Définition de Protocoles Scientifiques d'Espèce Végétales autochtones à haute valeur Nutraceutique et de Santé dans la zone de coopération

### Rapport Intermédiaire n°2

### Propagation *in vivo* et *in vitro* d'espèces identifiées pour la production de plantes en masse.



Valorisation des espèces végétales  
autochtones SICILIENNES & TUNISIENNES  
avec un intérêt nutritif et bon pour la santé

**Pr. M'barek Ben Naceur (BNGT)**  
**Dr. Awatef Rhimi (BNGT)**  
**Dr. Neila Jellouli (BNGT)**  
**MSc. Sonia Hjaoujia (BNGT)**  
**MSc. Mohsen Trabelssi (Pépinière Forestière de Borj El-Amri)**

Banque Nationale de Gènes de Tunisie BNGT  
Boulevard du Leader Yasser Arafat, 1080 Charguia 1, Tunis  
Tél 1: 0021671771756  
Tél 2: 0021671771678  
Fax: 0021671771827  
Mail: [bng@bng.nat.tn](mailto:bng@bng.nat.tn)  
Site Web: <http://www.bng.na.tn>

Subdivision Forestière de Borj El Amri -Commissariat Régional du Développement Agricole  
Borj Amri, 1142 - MANOUBA  
Tél : 0021671 542 235  
Mail: [trabelsimohsen.DGF@gmail.com](mailto:trabelsimohsen.DGF@gmail.com)





## R 3.3 : Définition des protocoles pilotes efficaces de multiplication des espèces identifiées.

- **Activité 3.3.1** Propagation *in vivo* des espèces identifiées pour la production en nombre de plantes.
- **Activité 3.3.2** Propagation *in vitro* des espèces identifiées pour la production en nombre de plantes.
- **Activité 3.3.3** Utilisation des techniques de multiplication des bourgeons axillaires pour les *Capparis/Rosa/Origanum*.
- **Activité 3.3.4** Etudes pour l'amélioration des protocoles *in vitro* utilisés sur les Câpres de Pantelleria.
- **Activité 3.3.5** Création du rapport pilote sur la définition des protocoles efficaces de multiplication des espèces objet d'étude.



## Sommaire

<b>INTRODUCTION</b> -----	<b>5</b>
<b>ESPECES IDENTIFIEES POUR LA PRODUCTION EN NOMBRE DE PLANTS</b> -----	<b>6</b>
<b>A. Espèces du genre <i>Origanum</i> L.</b> -----	<b>6</b>
- <i>O. vulgare ssp. glandulosum</i> Desf. -----	6
I. Description morphologique du genre <i>Origanum</i> L.-----	7
II. Répartition géographique d' <i>Origanum</i> L.-----	8
III. Exigences écologiques d' <i>Origanum</i> L.-----	8
IV. Multiplication d' <i>Origanum</i> L.-----	9
V. Problématiques d' <i>Origanum</i> tunisien-----	9
<b>B. Espèces du genre <i>Capparis</i> L.</b> -----	<b>13</b>
I. Description morphologique du <i>Capparis spinosa</i> L. -----	14
II. Répartition géographique du <i>Capparis spinosa</i> L. -----	14
III. Exigence écologique du <i>Capparis spinosa</i> L. -----	14
IV. Multiplication du <i>Capparis spinosa</i> L.-----	15
V. Problématiques du Câprier tunisien-----	15
<b>C. Espèces du genre <i>Rosa</i> L.</b> -----	<b>18</b>
I. Description morphologique de <i>Rosa</i> sp. L. -----	18
II. Répartition géographique de <i>Rosa</i> sp. L. -----	19
III. Exigences écologiques de <i>Rosa</i> sp. L. -----	19
IV. Multiplication de <i>Rosa</i> sp. L. -----	19
V. Problématiques de <i>Rosa</i> tunisienne-----	20
<b>ACTIVITE 3.3.1 : PROPAGATION <i>IN VIVO</i> DES ESPECES IDENTIFIEES POUR LA PRODUCTION EN NOMBRE DE PLANTES</b> -----	<b>23</b>
<b>A. Propagation <i>in vivo</i> d'<i>Origanum</i> pour la production en nombre de plantes.</b> -----	<b>23</b>
I. Définition de protocole de multiplication <i>in vivo</i> par semis d' <i>Origanum</i> ( <i>O. vulgare</i> , <i>O. onites</i> et <i>O. majorana</i> ). -----	23
1. Introduction -----	23
2. Matériel végétal -----	23
3. Protocole expérimental de semis -----	24
4. Résultats-----	24
II. Définition de protocole de multiplication <i>in vivo</i> par bouturage d' <i>Origanum</i> ( <i>O. vulgare</i> , <i>O. onites</i> et <i>O. majorana</i> ). -----	27
1. Introduction -----	27
2. Matériel végétal -----	27
3. Protocole expérimental-----	27
4. Résultats-----	30
5. Conclusions -----	35
<b>B. Propagation <i>in vivo</i> pour la production en nombre de plantes du <i>Capparis spinosa</i> L.</b> -----	<b>36</b>
I. Définition de protocole de multiplication <i>in vivo</i> par Bouturage du <i>Capparis spinosa</i> L. ( <i>C. spinosa</i> subsp. <i>spinosa</i> L. et <i>C. spinosa</i> subsp. <i>inermis</i> L.,)-----	36
1. Introduction -----	36
2. Matériel végétal -----	36
3. Protocole expérimental de Bouturage-----	38
4. Résultats-----	40
5. Conclusions -----	42



<b>C. Propagation <i>in vivo</i> pour la production en nombre de plantes du Rosa L.</b> -----	<b>43</b>
I. Définition de protocole de multiplication <i>in vivo</i> par Bouturage du Rosa L. (R. canina L., R. sempervirens L. et R. moschata L.) -----	43
1. Introduction -----	43
2. Matériel végétal -----	43
3. Protocole expérimental de Bouturage -----	43
4. Résultats-----	46
5. Conclusions -----	48

### **ACTIVITE 3.3.2 : PROPAGATION *IN VITRO* DES ESPECES IDENTIFIEES POUR LA PRODUCTION EN NOMBRE DES PLANTES.**-----

<b>I. Définition de protocole de multiplication <i>in vitro</i> par germination du Capparis spinosa</b> -----	<b>50</b>
1. Introduction -----	50
2. Matériel végétal -----	50
3. Protocole expérimental-----	52
4. Résultats-----	53
5. Conclusions -----	55

### **ACTIVITE 3.3.3 UTILISATION DES TECHNIQUES DE MULTIPLICATION DES BOURGEONS AXILLAIRES POUR LES CAPPARIS/ROSA/ORIGANUM.**-----

<b>A. Introduction</b> -----	<b>60</b>
<b>B. Propagation <i>in vitro</i> d'<i>Origanum</i> pour la production en nombre de plantes.</b> -----	<b>60</b>
I. Définition de protocole de multiplication <i>in vitro</i> par microbouturage (O. vulgare, O. onites et O. majorana)-----	60
1. Introduction -----	60
2. Matériel végétal -----	61
3. Protocole expérimental-----	61
4. Résultats-----	63
5. Conclusions -----	65
<b>C. Propagation <i>in vitro</i> du Capparis pour la production en nombre de plantes.</b> -----	<b>66</b>
II. Définition de protocole de multiplication <i>in vitro</i> par bourgeons axillaires (C. spinosa subsp. spinosa L., C. spinosa subsp. inermis L.)-----	66
1. Introduction -----	66
2. Matériel végétal -----	66
3. Protocoles expérimentales-----	67
4. Résultats-----	69
5. Conclusions -----	71
<b>D. Propagation <i>in vitro</i> du Rosa sp pour la production en nombre de plantes.</b> -----	<b>73</b>
I. Définition de protocole de multiplication <i>in vitro</i> par bourgeons axillaires de Rosa L. (R. canina L., R. sempervirens L. et R. moschata L), -----	73
1. Introduction -----	73
Les roses sont hétérogènes et ne sont pas conformes à la plante mère. Par conséquent, sa multiplication par des méthodes végétatives est nécessaire. Étant donné que la plupart des espèces de roses sont difficile à enraciner, les méthodes de propagation conventionnelles sont très lent, long et fatiguant. La culture <i>in vitro</i> d'autre part devient de plus en plus répandue et constitue une alternative à la multiplication végétative conventionnelle. En Tunisie, les espèces de Rosa sont menacées de disparition.	73
2. Matériel végétal -----	73
3. Protocoles expérimentales-----	73
4. Résultats-----	75
5. Conclusions -----	77

## Liste des Figures

<b>Figure 1:</b> A- Individu d' <i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>glandulosum</i> L.....	10
<b>Figure 2:</b> A- Individu d' <i>Origanum onites</i> L.....	11
<b>Figure 3:</b> A- Individu d' <i>Origanum majorana</i> L.....	12
<b>Figure 4:</b> A- Individu de <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>inermis</i> L.....	16
<b>Figure 5:</b> A- Individu de <i>Capparis spinosa</i> subsp. <i>spinosa</i> L.....	17
<b>Figure 6:</b> A- Individu de <i>Rosa sempervirens</i> L.....	21
<b>Figure 7 :</b> Graines d' <i>Origanum</i> L.....	23
<b>Figure 8:</b> Germination des graines d' <i>Origanum</i> L. des 3 lots.....	25
<b>Figure 9:</b> Transplantation de plantules issues de germination dans des pots.....	26
<b>Figure 10:</b> Préparation des substrats de culture.....	27
<b>Figure 11:</b> Préparation des boutures d'origan avant la mise en culture.....	28
<b>Figure 12:</b> Mise en culture des boutures d'origan.....	29
<b>Figure 13:</b> Mise en culture des boutures d'origan.....	29
<b>Figure 14:</b> Développements des boutures d' <i>Origanum</i> en fonction du substrat.....	31
<b>Figure 15:</b> Pourcentages de réussite de bouturage in vivo.....	32
<b>Figure 16:</b> Pourcentages de réussite de bouturage in vivo.....	32
<b>Figure 17 :</b> Pourcentage de réussite de bouturage in vivo.....	33
<b>Figure 18:</b> Plantes d'origan (4000 ppm AIB ; 1/3 Tourbe 2/3 Sable).....	33
<b>Figure 19:</b> Variabilité morphologique chez l'origan.....	35
<b>Figure 20 :</b> Boutures du Câprier inerme.....	37
<b>Figure 21:</b> Boutures du Câprier épineux.....	37
<b>Figure 22 :</b> Préparation des substrats de culture.....	38
<b>Figure 23 :</b> Préparation des boutures de câprier.....	38
<b>Figure 24 :</b> Trempage des boutures de câprier dans une solution de fongicide.....	39
<b>Figure 25 :</b> Mise en culture des boutures de câprier.....	39
<b>Figure 26 :</b> Tunnels de Bouturage du Câprier.....	40
<b>Figure 27 :</b> Pourcentages de réussite de bouturage in vivo du câprier.....	41
<b>Figure 28 :</b> Multiplication du <i>Capparis spinosa</i> subsp <i>inermis</i> in vivo par bouturage.....	42
<b>Figure 29 :</b> Multiplication par bouturage in vivo du <i>Capparis spinosa</i> subsp <i>spinosa</i> .....	42
<b>Figure 30:</b> Préparation des substrats de culture.....	44
<b>Figure 31:</b> Préparation de bouture de <i>Rosa</i> avant la mise culture.....	44
<b>Figure 32:</b> Culture de boutures de <i>Rosa</i> sous des mini-serres en plastique.....	45
<b>Figure 33:</b> Pourcentages de réussite de bouturage in vivo.....	46
<b>Figure 34:</b> Pourcentages de réussite de bouturage.....	47
<b>Figure 35:</b> Multiplication par bouturage in vivo du <i>Rosa</i> . A et A1-Tourbe.....	47
<b>Figure 36:</b> Multiplication par bouturage in vivo du <i>Rosa</i> : Les stades d'enracinement des boutures.....	48
<b>Figure 37:</b> Semences de câprier inerme spontanées.....	51
<b>Figure 38:</b> Semences de câprier inerme spontanées.....	51
<b>Figure 39:</b> stades de germination in vitro des graines de câpres.....	56
<b>Figure 40:</b> Pourcentage de germination des graines des populations de <i>C. spinosa</i> .....	57
<b>Figure 41:</b> Pourcentage de germination des graines des populations de <i>C. spinosa</i> .....	57
<b>Figure 42:</b> Acclimatation des plants de câprier, 2 semaines après transfert.....	58
<b>Figure 43:</b> Câpres acclimatés poussant en pots sous serre, 3 mois après transfert.....	58
<b>Figure 44:</b> Boutures herbacés d' <i>Origanum</i> .....	61
<b>Figure 45:</b> Mise en culture des explants d' <i>Origanum</i> .....	62
<b>Figure 46:</b> Pourcentage d'explants présentant des bourgeons néoformés.....	64
<b>Figure 47:</b> Bourgeons néoformés d' <i>Origanum</i> .....	64
<b>Figure 50:</b> Boutures de <i>Capparis spinosa</i> L.....	67
<b>Figure 51:</b> Variation du taux de réussite de micro-bouturage de câprier inerme.....	69
<b>Figure 52:</b> Pousses néoformées issues de bourgeons axillaires chez le câprier.....	70
<b>Figure 53:</b> Bourgeons axillaires développés sur bouture du câprier épineux.....	70
<b>Figure 54:</b> Bourgeons axillaires développés sur bouture du câprier inerme.....	70
<b>Figure 55:</b> Pourcentage de bourgeonnement et nombre de bourgeons par explant.....	76
<b>Figure 56:</b> Bourgeons axillaires développés sur boutures de <i>Rosa</i> .....	77
<b>Figure 57:</b> Développement de bourgeons axillaires de <i>Rosa</i> sur MS additionné de 2 mg BAP.....	77



# Introduction Générale



## Introduction

La finalité de ces travaux est la multiplication rapide et uniforme des espèces autochtones d'intérêt nutraceutique et de santé par la création et la définition de protocoles de propagation efficaces à travers des méthodologies de recherche mises en place.

La méthodologie est le développement de protocoles de multiplication « in vivo et in vitro » des espèces d'*Origanum*, du *Capparis* et de *Rosa* identifiées dans la phase d'analyse pour assurer leur reproductibilité. Ces activités ont été effectuées entre avril et juillet 2021.

Dans ce rapport, nous avons détaillé le matériel végétal utilisé, les protocoles expérimentaux in vivo et in vitro, ainsi que les résultats obtenus pour chaque espèce. Toutes les activités ont été achevées et les délais prévus ont été respectés. Trois techniques de multiplication ont été testées : le semis, le bouturage in vivo et le microbouturage in vitro. Pour les espèces d'origan (*Origanum onites*, *Origanum vulgare* et *Origanum majorana*), de câprier (*Capparis spinosa* : subsp. *spinosa* et subsp. *inermis*) et de rose (*R. canina*, *R. moschata* et *R. sempervirens*), les protocoles expérimentaux ont été réalisés in vivo et in vitro à partir de graines, de boutures et de bourgeons axillaires prélevées sur des plants spontanés. Les étapes et les tests utilisés ont été détaillés. Les résultats ont été présentés et illustrés. Pour sélectionner les protocoles efficaces la BNGT a fondé sur la répétabilité des résultats obtenus (plusieurs répétitions par test) et sur l'évaluation des effets des tests utilisés sur la vigueur végétative des plantes obtenues par essais à travers des études morphologiques menés sur les plants et les feuilles. Les pourcentages de réussite et les données morphologiques (valeurs moyennes  $\pm$  erreur standard) ont été calculés pour chaque essai. Les paramètres quantitatifs mesurés ont été soumis à des analyses de variance. Le test de comparaison des moyennes et le test de Duncun, ont été réalisés, pour évaluer les effets des milieux de culture, des hormones, des concentrations hormonales et le génotype et leurs interactions sur le pourcentage de réussite et pour pouvoir classer les différentes moyennes en groupes et définir le protocole optimum.

Pour les espèces étudiées, les protocoles expérimentaux sont définis, les résultats sont fiables et la reproductibilité des résultats est un excellent indicateur de validation des protocoles expérimentaux utilisés.



## Espèces identifiées pour la production en nombre de plants

### A. Espèces du genre *Origanum* L.

- *O. vulgare ssp. glandulosum* Desf.
- *O. onites* L.
- *O. majorana* L.

*Origanum sp.* appartenant à la famille des Labiées (Lamiacées), la plante peut être herbacée ou vivace. L'origan (*Origanum sp.*) est parmi les plantes aromatiques et médicinales (PAM) les plus réputées par ses innombrables vertus thérapeutiques et dont l'usage traditionnel n'a jamais cessé d'augmenter. Ainsi, les puissantes activités antimicrobienne, antioxydante et bactéricide font de l'origan une plante de choix pour l'utilisation à des fins culinaires et pharmaceutiques.

L'exploitation excessive, non planifiée et irrationnelle des PAM constitue une menace sérieuse à la pérennité et à la diversité des espèces tunisiennes. Le risque de dégradation, voire même de disparition de certaines espèces autochtones est réel, ce qui incite à penser sérieusement à rationaliser la cueillette des espèces sur des bases écologiques et à favoriser leur culture comme une alternative à l'exploitation des peuplements menacés de disparition. La culture des espèces les plus exploitées pourrait ainsi contribuer à conserver le patrimoine naturel en assurant un approvisionnement régulier en matière première de qualité. La domestication des PAM n'est pas encore très pratiquée en Tunisie ; des études devraient être menées pour appréhender les différents aspects relatifs aux techniques appropriées à la mise en culture, tels que la multiplication, les pratiques culturales et l'exploitation.

L'objectif de ce travail est la multiplication de l'origan, différents axes de recherche sont associés à ce programme : collecte de germplasm, caractérisation morphologique et chimique des différentes accessions collectées, ... Cette étude s'intègre dans le contexte de la mise en valeur de la plante et son choix est fondé sur les critères suivants :



➤ Les peuplements d'origan sont actuellement fortement exploités, ce qui menace leur pérennité.

Dans quelques régions de Tunisie, cette plante a pratiquement disparu de son milieu naturel.

➤ Ainsi, l'origan demeure encore une plante peu étudiée, malgré son importance économique, car jusqu'à présent peu de travaux ont été effectués sur sa domestication et l'amélioration de sa culture.

### ***I. Description morphologique du genre *Origanum L.****

L'origan est un petit arbuste pérenne plus ou moins rustique selon les espèces et les variétés.

- ***O. glandulosum*** : *Origanum glandulosum* Desf. également *Origanum vulgare* ssp. *glandulosum* (Desf.) est appelé en Arabe «Zaâtar el Moulouk». C'est l'une des sous-espèces d'*Origanum vulgare*. *Origanum vulgare* L. est une espèce diploïde hémicryptophyte dont les bourgeons de renouvellement sont situés au niveau du sol. Sa taille varie de 30 à 80 cm (Fig. 1-A). Les parties aériennes meurent pendant la mauvaise saison, et la plante peut répartir à partir des bourgeons de renouvellement. La plante est souvent rougeâtre violacée et qui est couverte de poils (Fig. 1-D). Elle possède de nombreuses tiges dressées à la section carrée et ramifiée (Fig. 1-C). Ces tiges peuvent persister l'hiver à l'état sec (Rameau et al. 2009). Les feuilles sont ovales, vaguement denticulées ou entières, pétiolées et opposées (Fig. 1-C). Fleurs roses, boutons et bractées pourprés, agglomérées au sommet des rameaux (Fig. 1-B)

- ***O. onites*** : *Origanum onites* L. est une plante vivace pouvant atteindre 0,30 mètre de haut (Fig. 2). Il est récolté dans la nature pour une utilisation locale comme aliment, médicament et source de matériaux. Les fleurs sont très attractives pour les abeilles. Les feuilles et les tiges florifères sont antiseptiques, antispasmodiques, carminatives, cholagogue, diaphorétique, emménagogue, expectorante, stimulante, stomacale et légèrement tonique. Ils sont récoltés en été et peuvent être utilisés frais ou séché.

- ***O. majorana*** : Plante vivace, de 60 cm de haut (Fig. 3). Feuilles opposées, duveteuses, vert grisâtre, de forme ovale entière, de 1 à 2 cm de long (Fig. 3-B). Petites fleurs blanches ou mauves, réunies en groupes serrés à l'aisselle des feuilles avec deux bractées en forme de cuillère (Fig. 2-C).



## II. Répartition géographique d'*Origanum L.*

Le genre *Origanum L.* est principalement réparti autour du bassin Méditerranéen dont 81% (35 sur 43 espèces) des espèces se distribuent exclusivement dans l'Est Méditerranéen.

Les sections *Amaracus*, *Brevifilamentum*, *longitubus*, *Chicocalyx*, *Majorana* et *Campanulicalyx* sont limitées à l'Est Méditerranéen (Grèce, Turquie, Moyen Orient). *Anatolicon* présente une distribution très restreinte en Grèce, Turquie, Liban et Libye. *Elongataspica* comporte trois espèces endémiques de l'Afrique du Nord (Maroc et Algérie). *Prolaticorolla* est rencontrée dans deux endroits extrêmes à l'Est et l'Ouest Méditerranéen (Maroc, Espagne, Liban et Turquie). L'*Origanum* est une section mono spécifique comprenant l'espèce *O. vulgare L.* qui est largement distribuée en Euro-Asie et en Afrique du Nord. L'aire géographique de la section *Origanum* s'étend jusqu'aux Açores, îles Canaries, Bretagne, Scandinavie et Chine et Taiwan.

En Tunisie, le genre *Origanum L.* comporte deux espèces spontanées et un endémique :

- *Origanum majorana L.* : l'espèce se trouve au Nord, au Centre et au Sud de la Tunisie.
- *Origanum onites L.* : Son aire de répartition est relativement restreinte, elle pousse entre 350 et 1600 m d'altitude). Elle abonde dans les forêts claires, matorrals et rocailles des montagnes, sur substrats siliceux et sols profonds et bien drainés. L'espèce est localisée au Nord de la Tunisie et occupe les étages bioclimatiques Subhumide et Humide, correspondant à une variante allant depuis le tempérée jusqu'au très froide.
- *Origanum vulgare ssp glandulosum Desf.*, est une espèce endémique de Tunisie. Elle se rencontre spécialement dans le nord, dans les forêts claires et matorrals, sur substrats calcaires et sols rocailloux bien drainés. Elle est caractérisée par une plasticité bioclimatique assez importante allant du Semi-aride jusqu'au Humide.

## III. Exigences écologiques d'*Origanum L.*

L'origan apprécie les sols calcaires plus ou moins rocailloux, riches et bien drainés et tolère les pH de 4,5 à 8,7. La plante exige un emplacement chaud et protégé et peut croître à une température allant de 5 à 28°C et une pluviométrie allant de 400 mm à plus de 2000 mm. L'origan, considéré comme une plante de jours longs, est assez exigeant en humidité.



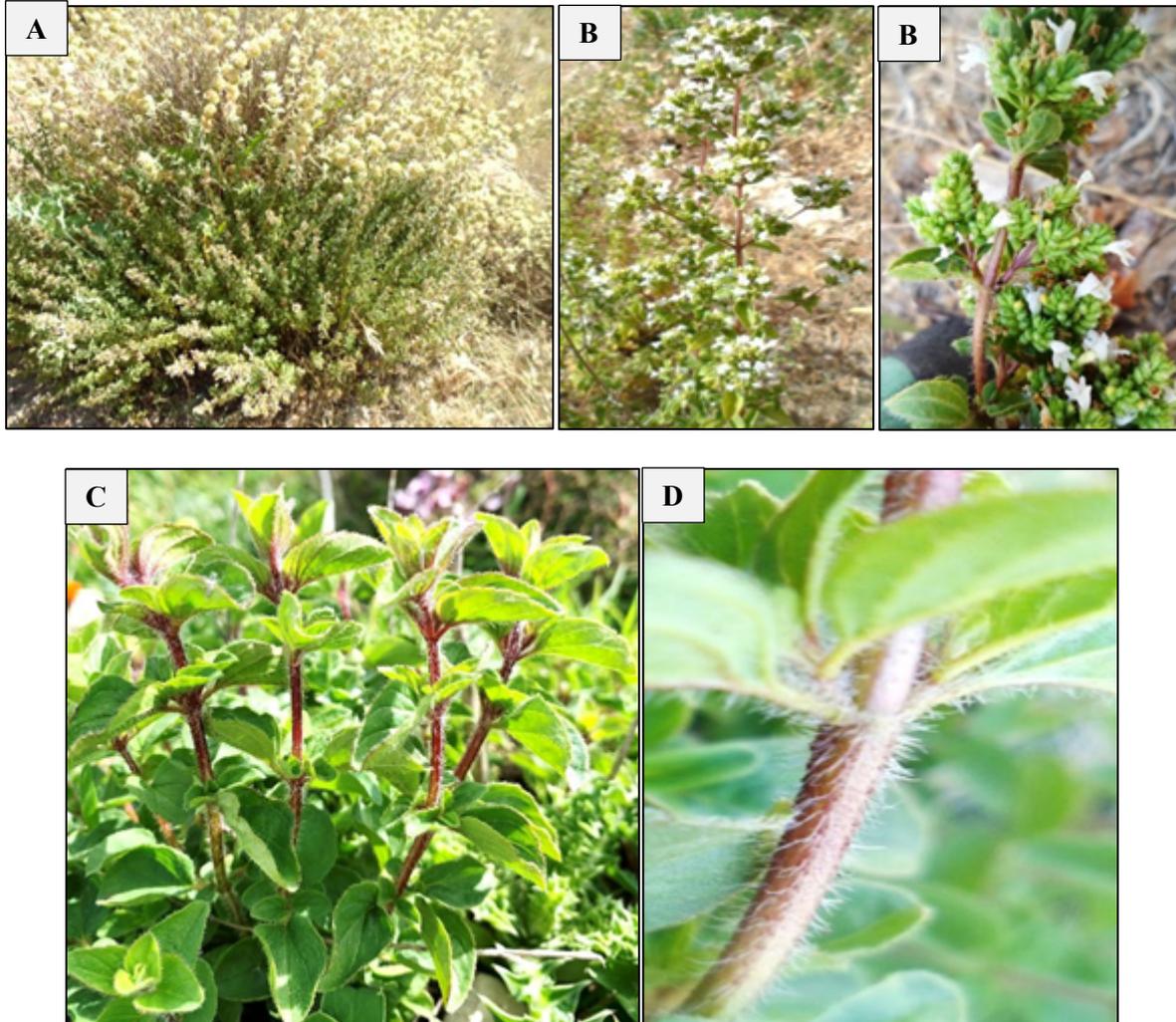
#### ***IV. Multiplication d'Origanum L.***

La multiplication est indispensable pour la lutte contre les menaces des espèces locales. Elle permet la reconstitution de réserves de ressources phylogénétiques. Cependant elle est souvent onéreuse du fait du coût des plantations et de leur entretien. Quant au semis, son succès est tributaire de plusieurs facteurs (traitement des semences, profondeur de semis, régime hydrique,).

#### ***V. Problématiques d'Origanum tunisien***

L'origan tunisien souffre d'une surexploitation des ressources, d'un surpâturage, des incendies au plus s'ajoutent les changements climatiques. Toutes ces formes de dégradation ont fragilisé la majorité des zones et menace leur pérennité et leur diversité. Dans quelques régions de Tunisie, cette plante a pratiquement disparu de son milieu naturel. Le risque de dégradation, voire même de disparition des origans autochtones est réel, ce qui incite à penser sérieusement à rationaliser son utilisation sur des bases écologiques et à favoriser leur culture comme une alternative à l'exploitation des peuplements menacés de disparition. La culture des espèces d'Origan pourrait ainsi contribuer à conserver le patrimoine naturel et à assurer un approvisionnement régulier en matière première de qualité (huiles essentielles, ....). La domestication de l'origan n'est pas encore très pratiquée en Tunisie ; des études devraient être menées pour appréhender les différents aspects relatifs aux techniques appropriées à la mise en culture, tels que la multiplication, les pratiques culturelles et l'exploitation.

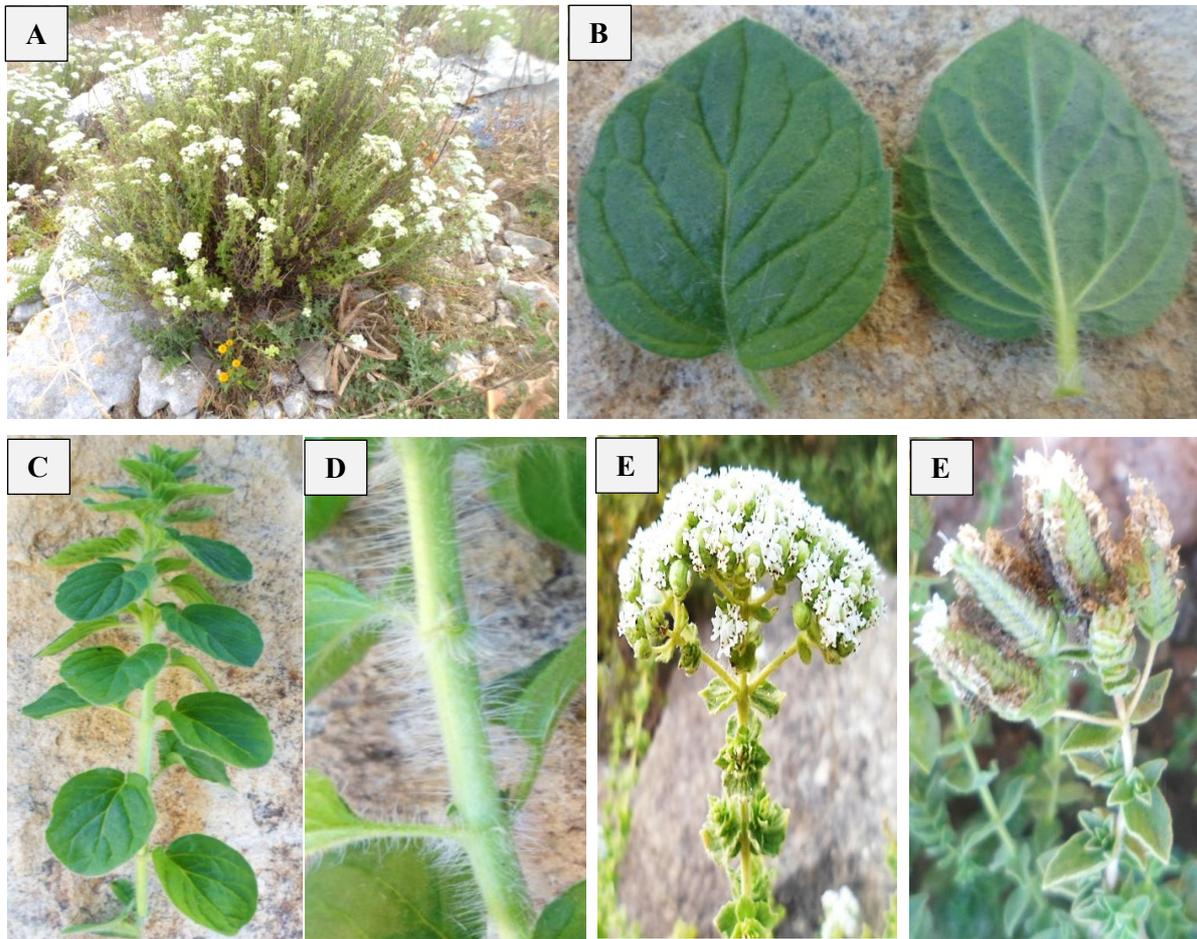
## *Origanum vulgare* ssp *glandulosum* Desf.



**Figure 1:** A- Individu d'*Origanum vulgare* ssp. *glandulosum* Desf  
B- Inflorescences ; C- Tiges ; D- Pubescences



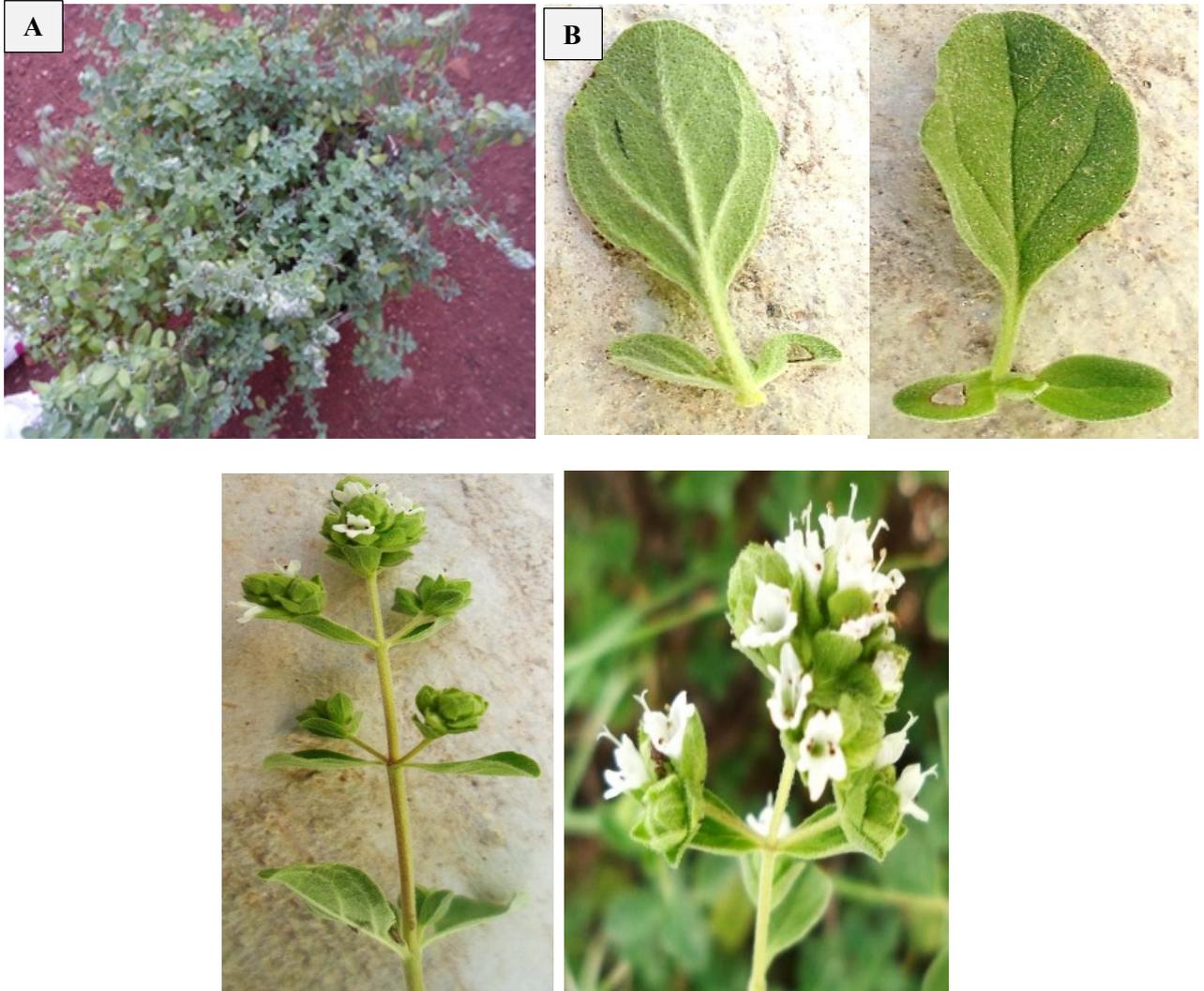
## *Origanum onites* L.



**Figure 2:** A- Individu d'*Origanum onites* L  
B-Feuilles ; C- Tige, D- Pubescences ; E- Inflorescences



## *Origanum majorana* L.



**Figure 3:** A- Individu d'*Origanum majorana* L.  
B- Feuilles; C- Inflorescences



## B. Espèces du genre *Capparis* L.

- *spinosa* ssp, *inermis* L.
- *spinosa* ssp, *spinosa* L.

Le genre *Capparis* L. comprend plus de 350 espèces réparties dans le monde entier. Il est représenté dans la région méditerranéenne une seule espèce et deux sous-espèces : *C. spinosa* ssp. *spinosa* L. et *C. spinosa* ssp. *inermis* L.

En Tunisie, le câprier montre une vaste aire de répartition géographique. Il existe dans plusieurs sites au Nord et dans quelques localités au centre et au sud du pays. Ainsi, il est polymorphe et sa taxonomie est encore confuse. Toutefois, une seule espèce (*C. spinosa*) a été retenue, subdivisée en deux sous espèces (*C. spinosa* ssp *spinosa* et ssp. *inermis*).

Le câprier pousse généralement sur des blocs rocheux, des murs en ruines et des sols dégradés et accidentés. Il existe aussi sur des sols argileux et limoneux profonds. Il caractérise cinq bioclimats différents (humide, subhumide, semi-aride, aride et saharien).

La plante souffre d'une surexploitation, d'un surpâturage des parcours, de défrichement et des changements climatiques. Toutes ces formes de dégradation ont fragilisées un certain nombre de zones dont la richesse des écosystèmes constitue un potentiel naturel et économique de la plus haute importance. Le câprier est l'une des formations forestières considérée comme une espèce menacées de disparition. En effet, la destruction des habitats naturels, particulièrement en zones semi-arides et arides a conduit à une érosion génétique importante, caractérisée par la diminution de la taille des populations et leur fragmentation. En plus, les techniques sylvo-pastorales appliquées peuvent avoir des effets négatifs sur ces populations, essentiellement le déboisement et le reboisement des câpriers par des essences forestières, (eucalyptus, cyprès, pin...) car le câprier est une espèce héliophile, peu concurrente.

L'objectif principal de ce travail de recherche est la multiplication du câprier. Pour entamer cet objectif nous devons faire tout d'abord l'inventaire. Les résultats obtenus seront par la suite intégrés dans une base de données spatialisée dans le but d'étudier et de suivre l'extension et la répartition géographique des populations naturelles de cette espèce, ainsi la multiplication *in vivo* et *in vitro* sera optimisée dans le but de sa conservation et sa valorisation.



## ***I. Description morphologique du Capparis spinosa L.***

Le câprier (*Capparis spinosa* L.) est une espèce diploïde, vivace, spontanée sous forme arbrisseau buissonnant, xérophyte, héliophile, semi-ligneux et hémicryptophyte, caractérisée par de nombreux rejets érigés, généralement ramifiés. Le buisson peut occuper une superficie supérieure à 10 m<sup>2</sup>, les feuilles sont généralement caduques, opposées et entières quelque fois le feuillage est persistant, celui-ci s'explique par des facteurs génétiques et ou géographiques. A la période de défoliation, la partie aérienne de câprier épineux à port érigé se dessèchent totalement. Les nouvelles poussent débutent à partir des bourgeons basaux. Elles peuvent y avoir des stipules épineuses, fines ou en crochues, d'origine épidermique. Quelques fois, les épines sont totalement absentes ou tombant tôt pour plusieurs taxons. Le développement d'épines est supposé comme un critère d'évolution, lié à la pression des herbivores.

## ***II. Répartition géographique du Capparis spinosa L.***

En Tunisie, le câprier occupe une vaste aire de répartition géographique qui s'étend du Nord au Sud, bien que les principales populations se localisent au Nord. L'espèce est présentée sur les chaînes et des massifs montagneux au Sud. Le câprier caractérise cinq bioclimats différents (humide, subhumide, semi-aride, aride et saharien). Ainsi, il parvient coloniser des régions diverses, caractérisées par des conditions environnementales diverses, reflétant des adaptations, essentiellement morphologiques.

## ***III. Exigence écologique du Capparis spinosa L.***

En Tunisie, le câprier occupe les différents étages bioclimatiques, à partir de l'humide jusqu'au saharien. Malgré la large tolérance de la plante à la faible pluviométrie et les températures extrêmes, elle est vulnérable au froid aigu, qui est rare pendant l'hiver méditerranéen.

Le câprier tolère la diversité des conditions environnementales. Néanmoins, il montre des exigences écologiques particulières, essentiellement pour la lumière et le sol.

Le câprier est une plante héliophile. Il existe généralement dans les régions exposées au soleil. Il fleurit abondamment s'il est bien exposé au soleil. Les zones bien ensoleillées conviennent avec cette plante qui paraît moins concurrente dans les conditions des garrigues denses, occupées par des herbacées et des arbustes à croissance rapide.

Le câprier est attaché à des unités géomorphologiques spécifiques. Il est caractéristique des sols dégradés et peu fertiles des régions méditerranéennes. Le câprier pousse généralement



sur des sols squelettiques. Il occupe les sols dégradés, les plus pauvres et les plus accidentés, ou l'eau et les éléments nutritifs sont très limités et sur lesquels peu d'espèces végétales peuvent vivre. C'est une plante rupicole et saxicole qui pousse sur des falaises, des pentes rocailleuses, des roches et des vieux murs.

#### ***IV. Multiplication du *Capparis spinosa* L.***

Le câprier est une plante pérenne, qui a une survie de 25 à 30 ans. La pérennité de l'espèce est assurée uniquement par les graines. Aucun cas de multiplication végétative naturelle n'a été observé dans tous les sites prospectés et à travers les différentes conditions. Pourtant, la plante peut se multiplier par semis, bouturage et par la technique de la culture in vitro.

La propagation de cette plante par des plantations commerciales s'est considérablement développée à l'étranger en raison des abondantes récoltes de câpres.

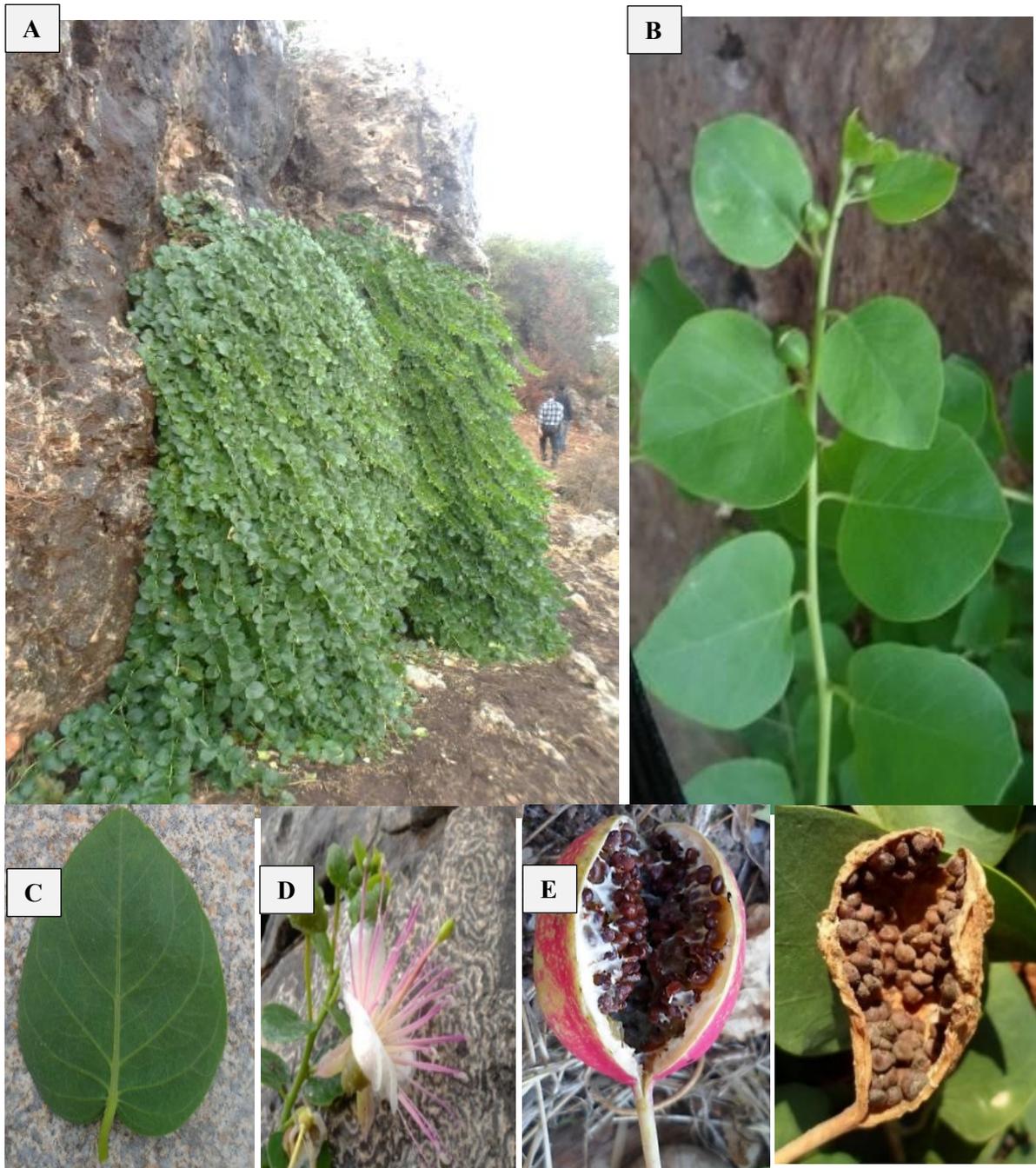
En Tunisie, la production de câpres est de 300 t. environ. Elle provient des plants spontanés, dans les zones de collines situées au nord et au Nord-Ouest de Tunis. L'augmentation croissante de la demande du marché, consisterait à préserver les plants spontanés et à créer des plantations artificielles. La culture de l'espèce constitue le meilleur moyen pour répondre aux besoins du marché et pour la lutte contre les menaces des espèces locales. En effet, la propagation de câprier par les semences est difficile à cause de la dormance embryonnaire et des inhibitions tégumentaires (graines dures). Ce mode de multiplication donne un faible pourcentage de germination et une hétérogénéité tant en termes de productivité qu'en termes de qualité des câpres. Des essais de multiplication herbacée et de micropropagation du câprier ont été abordés dont le but d'améliorer les pourcentages d'enracinement et de reprise afin d'augmenter le taux de production de câprier.

#### ***V. Problématiques du Câprier tunisien***

Le câprier est parmi les représentants les plus primitifs de la famille des Capparidacées, c'est une espèce transformée aujourd'hui, probablement du fait des changements climatiques et des cultures,

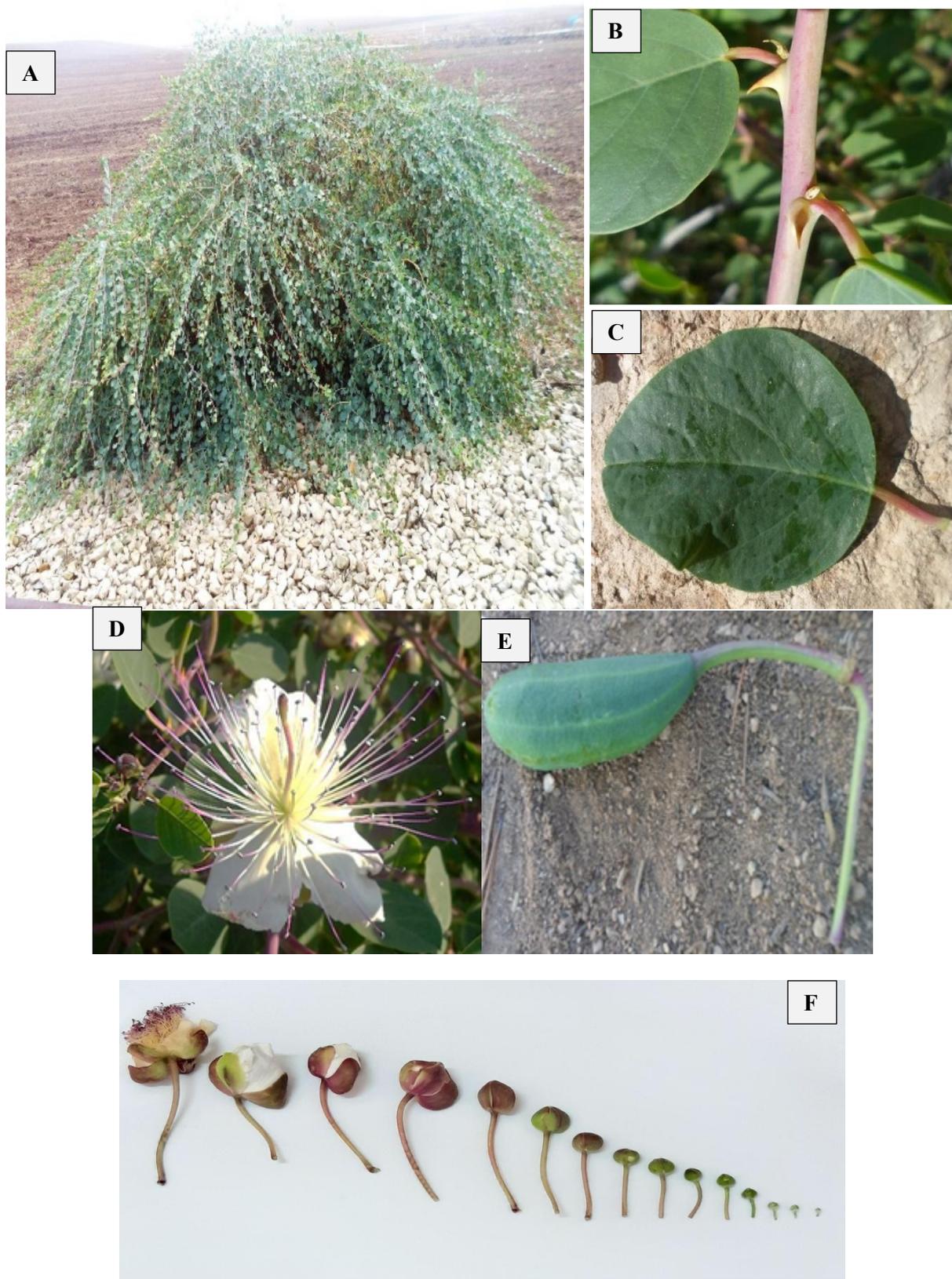
Le câprier tunisien souffre du surpâturage de l'espèce (pousse dans des zones de parcours très dégradés), des incendies, des défrichements, des changements climatiques au plus s'ajoutent les attaques de phytophages, de virus et de ravageurs. Toutes ces formes de dégradation ont affaibli la majorité des zones et menacent leur pérennité

## *Capparis spinosa* subsp *inermis* L.



**Figure 4:** A- Individu de *Capparis spinosa* subsp. *Inermis* L.  
B- Rameau ; C- Feuille ; D- Fleur ; E- Fruit et graines

## *Capparis spinosa* subsp. *spinosa* L.



**Figure 5:** A- Individu de *Capparis spinosa* subsp. *spinosa* L.  
B- Epines ; C-Feuille ; D- eur ; E- Fruit; F- Différents stades de développement de la fleur.



## C. Espèces du genre *Rosa* L.

- *R. canina* L.
- *R. sempervirens* L.
- *R. moschata* L.

Parmi les diverses plantes médicinales et aromatiques, le genre *Rosa* L., de la famille des *Rosaceae*, suscite aujourd'hui beaucoup d'intérêt sur le plan économique, grâce à leurs diverses utilisations de ses fleurs, fruits, huiles essentielles, huiles des graines et pulpes dans le domaine alimentaire, cosmétique, des produits pharmaceutiques, médecine traditionnelles en raison de leur richesse en composés bioactifs comme le phénol, caroténoïde, tocophérols, terpènes, glucolipides, des acides gras, des acides organiques, sucres, protéines et minéraux. Ce qui leur donne des propriétés antiseptiques, anti-diarrhéiques et anti-bronchiques.

Cependant, la culture de *Rosa* rencontre différents types de problèmes principalement ceux en rapport avec sa propagation. En effet, l'églantier peut être multiplié soit par semis, soit par bouturage, soit par greffage ou encore par culture *in vitro*. En effet, le taux de réussite du bouturage chez cette espèce est faible.

### I. Description morphologique de *Rosa* sp. L.

*Rosa Sempervirens* appartient à la section des *Synstylae*. L'espèce est un arbuste vivace, sarmenteux à rameaux décombrant ou grimpants, pouvant atteindre 5 à 10 m de hauteur (Fig. 6). Elle ne supporte pas le froid et occupe les zones fraîches dans les ravins, les cours des oueds, les champs de broussailles fraîches, les haies et les forêts.

*Rosa moschata* Herrm est une espèce diploïde qui appartient à la famille des Rosacées, genre *Rosa* et section *Synstylae*. Il s'agit d'un arbrisseau sarmenteux à rameaux longs, flexibles et portant quelques aiguillons sensiblement égaux. Les feuilles sont coriaces, persistantes et composées généralement de 7 folioles et les fleurs de couleur blanches sont groupées en bouquets. Les roses musquées sont originaires de l'hémisphère nord du globe. Elles sont répandues dans l'Afrique du Nord et dans la région couvrant le sud de l'Europe jusqu'à l'Asie occidentale. Cette espèce est répartie dans la région du Cap Bon et plus précisément à Beni Khalled. A l'échelle mondiale, elle est aussi rencontrée à l'Éthiopie.

*Rosa canina* L. appartient à la famille des Rosacées, qui contiennent plus de 100 espèces et pousse principalement en Europe, Asie, Amérique du Nord, Afrique et Moyen-Orient. Les



pseudo-ruits de *R. canina* sont l'organe le mieux caractérisé de cette plante. Les hanches sont utilisées dans le monde entier comme antioxydant, anti-inflammatoire, agent immunosuppresseur, cardioprotecteur, gastroprotecteur et antimicrobien. De nos jours, les extraits de hanche sont couramment utilisés dans les industries cosmétiques et alimentaires.

## II. Répartition géographique de *Rosa sp.* L.

Le genre *Rosa* (plus de 150 espèces) est très largement répandu dans le monde (Europe, Asie, Amérique du Nord et le Moyen-Orient). Leur répartition dépend de l'altitude et la température. L'espèce pousse dans les endroits à basse altitude (jusqu'à 500 m). Les hautes altitudes représentent une barrière à son existence et par conséquent elle est considérée parmi les espèces les plus sensibles au froid.

En Tunisie, le genre *Rosa* est représenté par huit espèces : *Rosa gallica* L., *R. agrestis* Savi, *R. sicula* Tratt., *R. sempervirens* L., *R. stylosa* Desv., *R. micrantha* Borrerex Sm., *R. canina* L., et *R. moschata* Herrm. Il est bien rencontré dans les zones humides à subhumides allant du nord, Nord-Est jusqu'au Dorsale de la Tunisie. Il pousse dans les ravins, les champs de broussailles, les haies et les forêts.

## III. Exigences écologiques de *Rosa sp.* L.

A l'état naturelle, l'espèce est bien représenté dans les étages bioclimatiques humides à subhumides. Elle peut se rencontrer dans des régions à forte pluviométrie (740 à 1572 mm) et à température variant entre 14,9 et 17,4°C. La plante pousse aussi sur des sols à textures variées-équilibrées (limono-sableuse, et limono-argilo-sableuse), limoneuses, limono-argileuses et sableuses. Elle préfère des sols neutres à basiques. Les rosiers montrent aussi une forte résistance aux conditions environnementales sévères (endroit incliné et rocheux, sol pauvre, carence hydrique,...).

## IV. Multiplication de *Rosa sp.* L.

La multiplication végétative des rosiers se fait essentiellement par bouturage et peut se propager aussi par semis, drageonnage et greffage. Elles sont généralement bouturées à la fin de l'été par la méthode semi-aoutée sur des rameaux fleuri. La réussite du bouturage dépend de plusieurs facteurs endogènes (l'âge des pieds-mères, la saison de prélèvement) et exogènes (la température, l'humidité du milieu, les substrats de culture, hormones de bouturage,...).

La multiplication sexuée ou bien la multiplication par graine est l'ensemble des

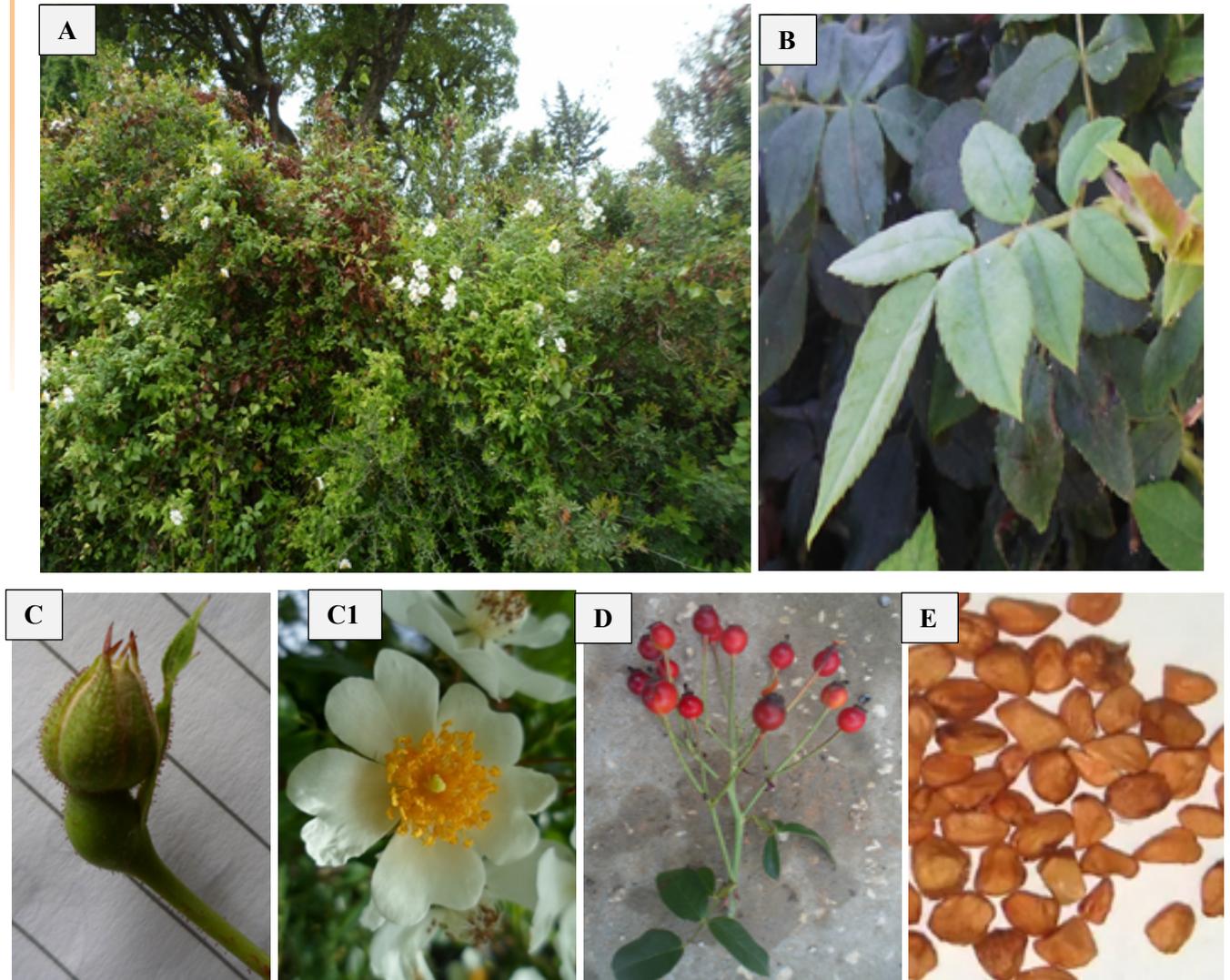


événements qui commencent principalement par l'absorption de l'eau par la graine et se terminent par l'élongation de l'axe embryonnaire et l'émergence de la radicule à travers les structures qui entourent l'embryon. Les graines des rosiers sont généralement à germination difficile à cause de plusieurs contraintes liées à la graine (dormance embryonnaire, inhibition tégumentaire,...) et autres environnementales (substrat, température, humidité,...) qui peuvent influencer l'aptitude des grains à germer.

### ***V. Problématiques de Rosa tunisienne***

Rosa, rencontre différents types de problèmes. Les conditions du milieu ont un impact sur la répartition des différentes espèces des rosiers en Tunisie. Cette répartition est régie par les exigences édaphoclimatiques des différentes espèces. D'autres en rapport avec sa propagation. En effet, le taux de réussite du bouturage ou de germination chez cette espèce est faible.

## *Rosa sempervirens* L.



**Figure 6:** A- Individu de *Rosa sempervirens* L. ; B- Feuille ; C- Bouton floral ; C1-Fleur ; D- Fruits ; E- Graines



# Activité 3.3.1

## Propagation in vivo des espèces identifiées pour la production en nombre de plantes



## Activité 3.3.1 : Propagation *in vivo* des espèces identifiées pour la production en nombre de plantes

### A. Propagation *in vivo* d'*Origanum* pour la production en nombre de plantes.

#### I. Définition de protocole de multiplication *in vivo* par semis d'*Origanum* (*O. vulgare*, *O. onites* et *O. majorana*).

### 1. Introduction

Il est nécessaire de connaître les exigences germinatives de l'espèce qui constitue une base pour accéder à des programmes de conservation et de valorisation durable. Chez l'*Origanum*, les graines peuvent entrer en dormance, ce qui rend le taux de germination faible. En effet, l'origan montre une germination plus importante à une température relativement basse avec un optimum de 15-20°C. Une étude expérimentale des effets de la lumière peut améliorer le taux de germination.

Dans notre étude nous avons testé l'effet des conditions de conservation (température, humidité,..) sur le pouvoir germinatif et le taux de germination des graines d'origan tunisien.

### 2. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour cette étude est sous forme de graines d'origan qui ont été récoltées en Juillet 2020 sur des pieds spontanés (Fig. 7). Après leur récolte, les graines ont été nettoyées et conservées, un lot à la BNGT (à 4°C), le 2<sup>ème</sup> dans les conditions ambiantes de laboratoire et le 3<sup>èmes</sup> dans le sol. Trois lots de 200 graines de la même accession ont été étudiés.

L'étude a été menée dans deux sites : la Banque Nationale de Gènes et la Pépinière Forestière de Borj El Amri à Manouba.



Figure 7 : Graines d'*Origanum* L.



### 3. Protocole expérimental de semis

#### a. Préparation des graines

Avant la mise en germination des graines, il est nécessaire de réaliser un protocole de stérilisation afin d'éviter toute sorte de contamination. La démarche suivie est la suivante :

- Nettoyage de graines par rinçage avec de l'eau distillée + quelques gouttes de fongicides (Banko 270 SC).
- Immersion des graines avec de l'eau distillée stérile additionnée de quelques gouttes de Tween 20.
- Désinfection dans l'alcool 70% pendant 3min.
- Désinfection dans l'hypochlorite de sodium à 1.5% pendant 5min.
- Rinçage avec de l'eau distillée stérile 5 fois.

#### b. Substrat de culture

Les graines ont été semées dans des plateaux. Le substrat utilisé est constitué par un mélange contenant 2/3 de tourbe et 1/3 de sable. Les plateaux de semis ont été installés sous serre. L'irrigation a été assurée à l'aide d'un pulvérisateur à raison d'une fois par jour.

D'autres sont mises en culture dans des boîtes de pétri contenant du papier filtre imbibé d'eau distillée stérile.

#### c. Transplantation

Les plantules ont été transplantées en pots à raison d'une plantule par pot. Un mélange contenant 50% de sable et 50% de tourbe a été utilisé comme substrat. Les plantules ont été suivies jusqu'à leur transplantation au champ. L'étude a été menée à la Banque Nationale de Gènes (BNGT).

### 4. Résultats

Pour apprécier et comparer le pouvoir germinatif des trois lots de semences d'origan étudiées nous avons mesuré les paramètres suivants :

- Pourcentage de germination
- Longueur de la tige :LT
- Nombre de feuilles :NF
- Diamètre de la tige : DT

### a. Effet de la conservation des graines

Les conditions de conservation des trois lots de la même accession de graines, se diffèrent d'un lot à l'autre. Les pourcentages de germination obtenus sont illustrés dans le tableau ci-dessus (Tableau 1).

Le pourcentage de germination des graines varie selon les conditions de conservation. Ils varient entre 0 et 89% (Fig. 8). En effet les graines conservées à la BNGT à 4°C montrent le plus haut pouvoir germinatif (Fig. 8 et 9).

Les conditions de conservation à la BNGT sont bien contrôlées (4°C, à obscurité et à humidité 15%). Pour les deux autres lots, les conditions environnementales variables affectent le pouvoir germinatif des graines.

Il est donc d'une importance primordiale de conserver les graines dans des conditions favorables afin de maintenir la qualité des semences. La conservation non contrôlée (température, humidité,...) a pour conséquence la perte du pouvoir germinatif et la longévité des graines, ce qui confirme bien le résultat du Tableau 1.

**Tableau 1** : Pourcentage de germination en fonction des conditions de conservation

Lot	Condition de conservation des graines	Nombre de graines	Pourcentage de germination (%)
1	Conservation dans des conditions contrôlées (BNGT)	200	89
2	Conservation dans les conditions ambiantes du laboratoire	200	0
3	Conservation dans le sol	200	40



**Figure 8**: Germination des graines d'*Origanum L.* des 3 lots.



**Figure 9:** Transplantation de plantules issues de germination dans des pots contenant 50% de sable et 50% de tourbe

### **b. Etude morphologique des plantules obtenus par germination**

Les plantules obtenus par germination ont été transplantées dans des pots et maintenus à la BNGT.

Après un mois de culture des mesures du diamètre de la tige (DT), de la distance inter-nœud (DIN) et du nombre des feuilles (NF) ont été effectuées pour suivre la croissance des plantules. Les meilleures mesures sont obtenues sur des plants du lot n°1. Les meilleures mesures moyennes du nombre de feuilles (NF), du diamètre de la tige (DT) et de la distance inter-nœud (DIN) sont respectivement 10.4, 3.82 mm et 16.7mm.

## II. Définition de protocole de multiplication *in vivo* par bouturage d'*Origanum* (*O. vulgare*, *O. onites* et *O. majorana*).

### 1. Introduction

La culture d'origan, et en raison du faible taux de germination (tributaire de plusieurs facteurs), du période de germination plus ou moins longue (2 à 3 semaines) et de la très petite taille des semences (1000 grains pèsent entre 0,1 et 0,2g), le bouturage est souvent recommandé.

### 2. Matériel végétal

Des boutures apicales herbacées, prélevées sur des pieds spontanés d'*Origanum* L. d'une longueur de 20 cm, dans la région de Manouba au mois de février. Les boutures sont humidifiées et conservés dans des sachets.

La mise en culture a été réalisée le jour même du prélèvement. L'étude a été menée dans deux sites : la serre vitrée de la Banque Nationale de Gènes et la Pépinière Forestière de Borj El Amri à Manouba.

### 3. Protocole expérimental

Les facteurs testés sont : le type de substrat, le type de l'hormone de bouturage (AIA et AIB) et la concentration de l'hormone (0, 3000, 4000 et 5000ppm).

#### a. Préparation des substrats

Les substrats utilisés sont : S1 : Tourbe ; S2 : 1/2 tourbe 1/2 sable, S3 : 1/3 Tourbe 2/3 sable, S4 : Sable (Fig. 10).



Figure 10: Préparation des substrats de culture

## b. Préparation des boutures

Les boutures ont été préparées et mises en culture dans les heures qui suivent le prélèvement car au-delà de 36 à 48 heures le pourcentage de rhizogenèse diminue.

Les boutures sont coupées à l'aide d'un sécateur à une longueur de 10 cm, les feuilles basales ont été éliminées (Fig. 11).



**Figure 11:** Préparation des boutures d'origan avant la mise en culture.

## c. Hormones de bouturage

L'acide indole butyrique (AIB) et l'acide indole acétique (AIA) sont les hormones de bouturage les plus généralement utilisées grâce à ses stabilités et ses faibles toxicités.

## d. Mise en culture

Les extrémités inférieures des boutures ont été trempées dans des solutions hormonales de différentes concentrations d'AIA et d'AIB (0, 3000, 4000 et 5000 ppm) pendant 1min. Ensuite mise en culture dans différents substrats (S1 : Tourbe ; S2 : 1/2 tourbe 1/2 sable, S3 : 1/3 Tourbe 2/3 sable, S4 : Sable) (Fig.12 et 13). Les cultures sont placées dans des cages à raison de 48 boutures par lot (Fig.13).



Figure 12: Mise en culture des boutures d'origan



Figure 13: Mise en culture des boutures d'origan

#### e. Conditions de culture

Les cultures sont placées dans des cages à une densité de 48 boutures par lot sous des tunnels en plastique à humidité saturante. Les besoins en eau varient en fonction du stade végétatif. Ils sont plus faibles lors de la plantation et deviennent de plus en plus élevées avec la croissance végétative. L'irrigation des jeunes plants se fait tous les trois jours à raison de 0.25 litres d'eau par plant.

#### f. Etude morphologique

Afin de sélectionner le substrat adéquat pour la multiplication et qui donne la meilleure vigueur des plants, une étude morphologique a été développée sur des plantes issues de bouturage. La caractérisation morphologique est focalisée sur la description de la plante, des

feuilles et des tiges, en respectant les normes internationales. Les descripteurs utilisés englobant des critères quantitatifs, dont certains sont déduits à partir de travaux précédemment effectués sur l'espèce.

L'évaluation morphologique des plants est réalisée sur 15 échantillons pour chaque essaie. Les paramètres étudiés sont détaillés dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

La caractérisation morphologique de la tige est effectuée sur des portions composées de 15 nœuds. 50 échantillons de tiges sont considérés pour chaque essaie et les paramètres mesurés sont cités dans le tableau suivant.

**Tableau 2: Paramètres morphologiques mesurés**

Paramètre	Code
Longueur de tige (cm)	LoT
Diamètre de la tige (mm) SD	DiaT
Forme de la tige (R=LoT/DT)	FT
Nombre de feuilles	NF
Nombre de nœuds par tige NNS	NN
Distance moyenne inter-nœud (mm)	DIN
Diamètre moyenne inter-nœud (mm)	DaIN
Nombre total de branches TNB	NB

#### g. Expression des résultats

Les données quantitatives mesurées sur la plante ont été soumises d'abord à une analyse statistique descriptive par la détermination des principaux paramètres statistiques (moyenne, écart type, maximum, minimum, coefficient de variation, etc.) puis une analyse de la variance (ANOVA) pour tester s'il y a des différences significatives entre les essaies (substrat et hormone). L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé par l'utilisation du logiciel statistique SPSS version 26.

## 4. Résultats

Le taux d'enracinement obtenu varie entre 50% et 90 % en fonction de substrat et de l'hormone de bouturage utilisée (Figure 14 et 15).

Après 1 mois de culture, les résultats de réussite du bouturage sont notés en fonction des 3 facteurs : le type de substrat, le type d'hormone de bouturage (AIA et AIB) et la concentration de l'hormone (0, 3000, 4000 et 5000ppm) (Figure 14 et 15).



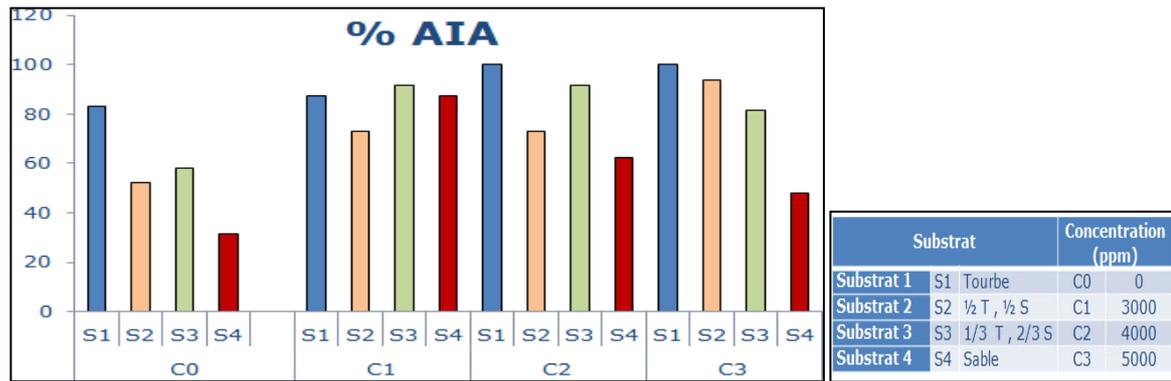
**Figure 14:** Développements des boutures d'*Origanum* en fonction du substrat de. A- Sable ; B- 2/3 Sable, 1/3 tourbe ; C- Tourbe

#### a. Influence des hormones sur la réussite du bouturage

- Effet d'AIA

Les histogrammes ci-dessous montrent le pourcentage de réussite des boutures cultivées sur différents substrats en fonction de différentes concentrations d'AIA (Figure 15).

Un pourcentage d'enracinement faible a été obtenu pour les boutures non traitées par l'AIA alors que les concentrations hormonales de 3000 ppm, 4000 ppm et 5000 ppm d'AIA montre un résultat de réussite plus important. Sur le substrat Tourbe nous observant toujours un pourcentage d'enracinement élevé qui varie entre 80% et 100%. Pour le substrat sable la concentration hormonale qui a donné les meilleurs résultats est 3000 ppm AIA.



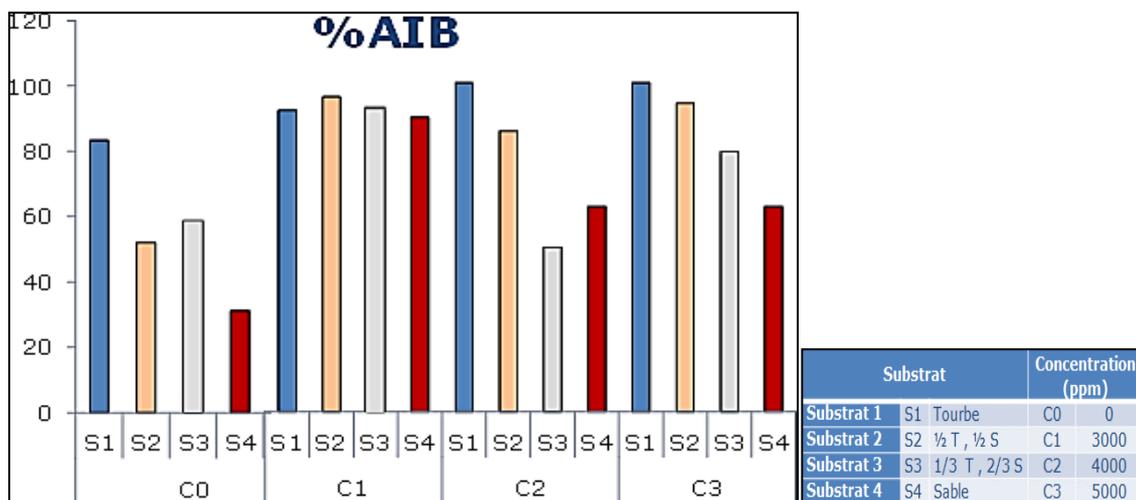
**Figure 15:** Pourcentages de réussite de bouturage in vivo : Comparaison entre substrats et concentrations hormonales en AIA

• Effet d'AIB

Le graphique ci-dessous montre le taux de réussite des boutures cultivées dans les substrats en fonction de différentes concentrations en AIB (Figure 16).

Sur le substrat tourbe le taux de réussite obtenu est élevé quel que soit la concentration en AIB utilisé, ce dernier varie entre 85 et 95% (Figure 16).

Pour les autres substrats la concentration hormonale la plus favorable et celle de 3000 ppm pour obtenir un meilleur pourcentage d'enracinement.



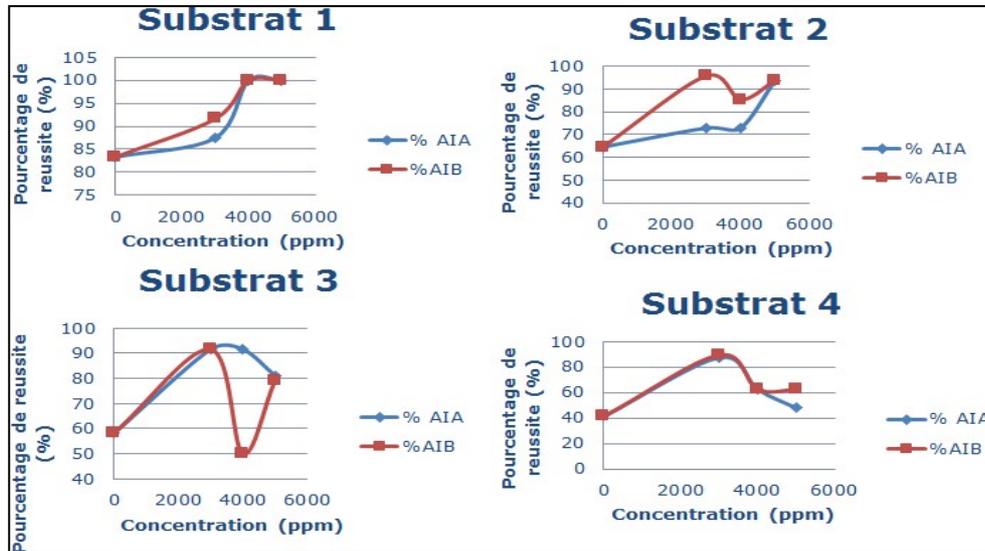
**Figure 16:** Pourcentages de réussite de bouturage in vivo : Comparaison entre substrats et concentrations hormonales en AIB

**b. Effet du substrat sur la réussite du bouturage**

Le pourcentage de réussite du bouturage augmente (80% à 100%) en fonction des concentrations hormonales d'enracinement AIA et AIB sur le substrat tourbe.

La substitution partielle ou totale de la tourbe par le substrat sable entraîne une diminution du pourcentage d'enracinement (60%). Cette diminution peut être compensée (90%

à 100%) par un traitement aux hormones d'enracinement à une concentration de 3000 ppm (Figure 17 et 18).



**Figure 17 :** Pourcentage de réussite de bouturage in vivo : Comparaison entre hormones pour le même substrat.



**Figure 18:** Plantes d'origan (4000 ppm AIB ; 1/3 Tourbe 2/3 Sable).



### c. Etude morphologique

Cette étude a été menée sur les différents essais réalisés. Les descripteurs utilisés englobent des critères quantitatifs. Nous avons utilisé dans cette étude différents descripteurs morphologiques pour la plante qui sont : Longueur de tige (cm), Diamètre de la tige (mm), Nombre de feuilles, Nombre de nœuds par tige, Distance moyenne inter-nœud (mm), Diamètre moyenne inter-nœud (mm) et Nombre total de branches.

L'analyse de la variance des caractères quantitatifs montre une différence significative pour chaque caractère entre les différents substrats et le traitement hormonale qui est la résultante d'une diversité de réponses entre les individus qui composent ces essais (Fig. 19). Les valeurs indiquent une faible variation entre les individus pour le diamètre de la tige (DiaT), Distance moyenne inter-nœud (DIN). À l'inverse, on observe une forte variation entre les essais pour la longueur de la tige (LoT), le nombre de feuilles (NF), nombre de nœuds par tige (NN), Diamètre moyenne inter-nœud (DaIN) et Nombre total de branches (NB). Cela indique une forte hétérogénéité de réponse pour les différents traitements. Les individus du substrat sable ont les plus faibles productivités végétatifs et un nombre de feuilles faible. Les rendements les plus importants sont observés sur le substrat S2 avec un traitement de 3000 ppm AIA OU AIB avec des individus de grande taille à caractères végétatifs très développés : nombres de feuilles plus élevés, longueur et diamètre de la tige.



**Figure 19:** Variabilité morphologique chez l'origan en fonction du substrat et de l'hormone de bouturage.

## 5. Conclusions

Le protocole de multiplication de l'origan le plus favorable est celui qui donne le pourcentage d'enracinement le plus élevé et en même temps les caractères végétatifs les plus développés. Ces résultats sont observés en cultivant des boutures d'origan de 10 cm prélevés sur des pieds mère spontanés au mois de février, traités par 3000 ppm AIA ou AIB et plantés dans un substrat composé de  $\frac{1}{2}$  tourbe +  $\frac{1}{2}$  sable pendant 4 mois.



## B. Propagation in vivo pour la production en nombre de plantes du *Capparis spinosa* L.

### I. Définition de protocole de multiplication in vivo par Bouturage du *Capparis spinosa* L. (*C. spinosa* subsp. *spinosa* L. et *C. spinosa* subsp. *inermis* L.,)

#### 1. Introduction

Le câprier est une plante pérenne, qui a une survie de 25 à 30 ans. La pérennité de l'espèce est assurée uniquement par les graines. Aucun cas de multiplication végétative naturelle n'a été observé dans tous les sites prospectés et à travers les différentes conditions. Pourtant, la plante peut se multiplier par semis, bouturage et par la technique de la culture in vitro.

Généralement, les boutures du câprier ont des difficultés d'enracinement, mais la réussite dépend du génotype, de la période de prélèvement des boutures et de la nature du substrat. Les boutures ligneuses, semi-ligneuses ou herbacées sont utilisées, mais les premières donnent le meilleur taux d'enracinement.

#### 2. Matériel végétal

Les essais ont concerné aussi bien des variétés inermes qu'épineuses de câpriers tunisiens. Des boutures basales, d'une longueur de 20 cm, prélevées à la fin du mois de mars des pieds spontanés dans la région de Mateur gouvernorat de Bizerte (Fig.20 et 21). Elles sont humidifiées, conservées dans un sachet puis introduites dans un sac enfin de faciliter le transport au lieu de bouturage.

L'étude a été menée dans deux sites : la Banque Nationale de Gènes de Tunisie et la Pépinière Forestière de Borj El Amri à Manouba.



Figure 20 : Boutures du Câprier inerme



Figure 21: Boutures du Câprier épineux



### 3. Protocole expérimental de Bouturage

#### a. Préparation des substrats

Les substrats utilisés sont : S1: Sable , S2: 2/3sable1/3Tourbe , S3: 1/2 sable1/2 tourbe, S4: 1/3 sable2/3 tourbe , S5 : Tourbe (Fig. 22).



Figure 22 : Préparation des substrats de culture

#### b. Préparation des boutures

- Prélèvement des boutures : des tiges vigoureuses prélevées sur des pieds mères préalablement testés pour leurs états phytosanitaires et performances. Ils doivent être indemnes de toutes attaques parasitaires.
- Préparation des boutures : Des boutures ligneuses avec des nœuds sont coupées à l'aide d'un sécateur d'une longueur de 20 cm (Fig. 23).
- les boutures collectées doivent être mises en culture dans les heures qui suivent le prélèvement pour n'a pas affecté.



Figure 23 : Préparation des boutures de câprier



### c. Hormones de bouturage

L'acide indole butyrique (AIB) est l'hormone de bouturage le plus généralement utilisée grâce à sa stabilité et sa faible toxicité. L'AIB en solution est appliquée sur l'extrémité proximale des boutures sous deux concentrations (4000 et 5000 ppm).

### d. Mise en culture

Les boutures collectées sont incubées dans une solution antifongique pendant 5min (Fig. 24). Ensuite les extrémités inférieures sont trempées dans des solutions hormonales de différentes concentrations d'AIB (0, 4000 et 5000 ppm) pendant 1 min. Les boutures sont mises en culture dans différents substrats (Sable, 2/3sable1/3Tourbe, 1/2 sable1/2 tourbe, 1/3 sable2/3 tourbe et Tourbe) (Fig. 25).



**Figure 24** : Trempage des boutures de câprier dans une solution de fongicide.



**Figure 25** : Mise en culture des boutures de câprier.



### e. Conditions de culture

Les cultures sont placées dans des cages à une densité de 150 boutures par lot sous des tunnels en plastique (Fig. 26). L'humidité est saturante et La température du substrat étant maintenue entre 23 et 25 C°. Les besoins en eau varient en fonction du stade végétatif. Ils sont plus faibles lors de la plantation et deviennent de plus en plus élevées avec la croissance végétative. L'irrigation des jeunes plants se fait tous les trois jours à raison de 0.25 litres d'eau par plant.



**Figure 26** : Tunnels de Bouturage du Câprier.

### f. Expression des résultats

Les facteurs testés sont : le type de substrat et la concentration de l'hormone AIB (0, 0333, 4000 et 5000 ppm). Les données quantitatives ont été soumises à une analyse statistique (SAS, SPSS).

## 4. Résultats

L'obtention d'un maximum de plants est atteinte par le choix des boutures, du substrat de culture et de la concentration de l'hormone de bouturage adéquate. Dans nos conditions expérimentales, le taux de réussite de bouturage attend les 100%.

### a. Influence de la nature du substrat

La composition du substrat de mise en culture joue un rôle très important dans la réussite de bouturage *in vivo* chez le câprier. L'effet du substrat de culture résulte de l'ensemble des interactions des différents éléments qui le composent. La présence et la concentration de certains d'entre eux stimulent les processus d'enracinement et de développement de la partie aérienne et d'autres par contre ont peu d'influence.

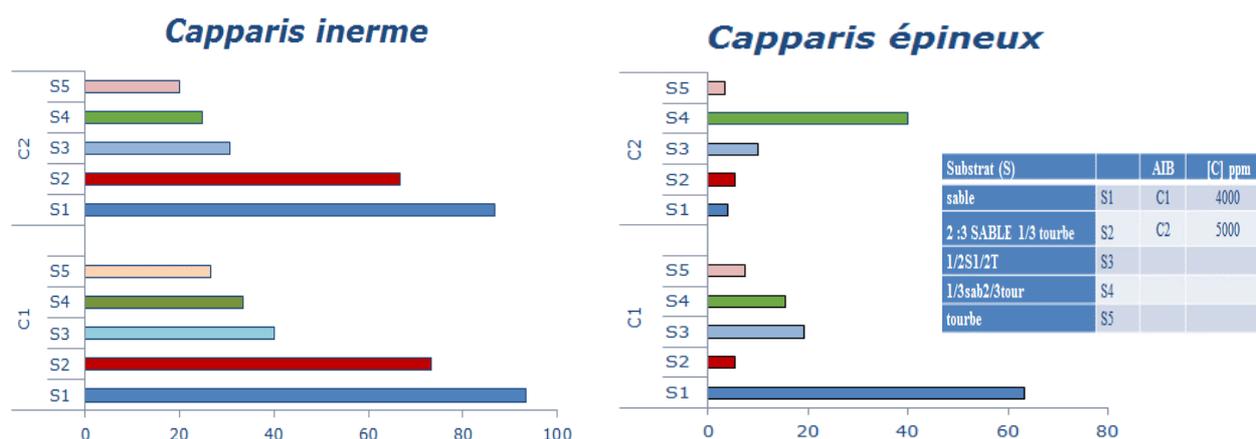


L'effet favorable de substrat de culture sur le développement des racines et des bourgeons des boutures, nous a incités à améliorer leur qualité en variant les mélanges entre sable et tourbe tout en ajoutant une hormone d'enracinement (AIB). Pour les deux sous espèces, nous avons testé la réussite de bouturage sur cinq combinaisons de substrats de culture et deux concentrations d'AIB (4000ppm et 5000ppm).

Les paramètres de détermination de la réussite du bouturage (nombres de plants enracinés par essai) ont été soumis à une analyse après 10 semaines de culture.

Chez les deux espèces du câprier, un bourgeonnement d'intensité variable apparait sur toutes les boutures mises en culture (Fig.27, 28 et 29).

Les boutures expriment des réactions variables selon les substrats de culture (Fig. 27). Le pourcentage de boutures enracinées varie de 3.33% à 63.33% pour le câprier épineux et de 20% à 93.33% pour le câprier inerme respectivement pour les substrats S5 (100% Tourbe et 5000 ppm AIB) et S1 (100% Sable et 4000 ppm) (Fig. 27).



**Figure 27** : Pourcentages de réussite de bouturage in vivo du câprier : Comparaison entre substrats et concentrations hormonales en AIB.

### b. Influence de la concentration d'AIB sur la réussite du bouturage

L'AIB utilisée favorise l'induction de l'enracinement des boutures. Les meilleurs pourcentages obtenus sont 40% et 60% pour le câprier épineux et 86.66% et 93.33 % pour le câprier inerme respectivement pour 5000 et 4000 ppm d'AIB (Fig.27, 28 et 29).

La concentration 4000 ppm d'AIB est la meilleure concentration hormonale inductrice d'enracinement chez le câprier. Elle active la totipotence végétale et favorise la prolifération cellulaire des boutures.



**Figure 28** : Multiplication du *Capparis spinosa* subsp *inermis* in vivo par bouturage.



**Figure 29** : Multiplication par bouturage in vivo du *Capparis spinosa* subsp *spinosa*

## 5. Conclusions

- Le taux de réussite (plante enracinée) obtenu varie en fonction de génotype, de substrat et de la concentration hormonale.
- Les meilleurs taux de réussite sont obtenus sur le sable pour les deux génotypes
- Les meilleurs taux de réussite sont obtenus en présence de 4000 ppm AIB pour les deux génotypes
- Le meilleur pourcentage de réussite est de 93,33% chez *C. inermis*,
- Le meilleur pourcentage de réussite est de 63,33% chez *C. spinosa*,



## C. Propagation *in vivo* pour la production en nombre de plantes du *Rosa L.*

### I. Définition de protocole de multiplication *in vivo* par Bouturage du *Rosa L.* (*R. canina L.*, *R. sempervirens L.* et *R. moschata L.*)

#### 1. Introduction

*Rosa sp. L.*, plante aromatique et médicinale de la famille des Rosacées, rencontre différents types de problèmes principalement ceux en rapport avec sa propagation. En effet, le taux de réussite du bouturage chez cette espèce est faible. Ainsi, le présent travail a consisté à faire une mise au point de la méthode de multiplication par bouturage en expérimentant des boutures semi-ligneuses de rosier poussant à l'état spontané au Nord de la Tunisie.

#### 2. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de boutures basales, d'une longueur de 20 cm, prélevées au mois de février. Elles sont humidifiées, conservées dans un sachet puis introduites dans un sac enfin de faciliter le transport au lieu de bouturage.

L'étude a été menée dans deux sites : la Banque Nationale de Gènes de Tunisie et la Pépinière Forestière de Borj El Amri à Manouba.

#### 3. Protocole expérimental de Bouturage

##### a. Préparation des substrats

Les substrats utilisés sont : S1 : Sable, S2 : 2/3sable1/3Tourbe, S3 : 1/2 sable1/2 tourbe, S4 : 1/3 sable2/3 tourbe, S5 : Tourbe (Fig.30).



Figure 30: Préparation des substrats de culture

### b. Préparation des boutures

- Prélèvement des boutures : des tiges vigoureuses prélevées sur des pieds mères préalablement testés pour leurs états phytosanitaires et performances. Ils doivent être indemnes de toutes attaques parasitaires.
- Préparation des boutures : Des boutures semi-ligneuses avec deux à trois nœuds sont coupées à l'aide d'un sécateur d'une longueur de 20 cm (Fig.31).
- Les boutures collectées doivent être mises en culture dans les heures qui suivent le prélèvement pour n'a pas affecté.



Figure 31: Préparation de bouture de Rosa avant la mise culture



### c. Hormones de bouturage

L'acide indole butyrique (AIB) et l'acide indole acétique (AIA) sont les hormones de bouturage utilisées grâce à ses stabilités et ses faibles toxicités. L'AIB et l'AIA en solution sont appliquées sur l'extrémité proximale des boutures sous quatre concentrations différentes (0, 3000, 4000 et 5000ppm).

### d. Mise en culture

Les boutures de deux à trois nœuds ont été incisées à la base de leurs extrémités inférieure puis trempées pendant une minute dans l'acide indole butyrique (AIB) ou l'acide indole acétique (AIA) à des concentrations différentes (0, 3000, 4000 et 5000ppm). Les boutures sont mises en culture dans différents substrats (Sable, 2/3sable1/3Tourbe, 1/2 sable1/2 tourbe, 1/3 sable2/3 tourbe et Tourbe) (Fig.32). Les cultures sont placées dans des cages à une densité de 24 boutures par lot sous des minis serres à humidité saturante (Fig. 32).



**Figure 32:** Culture de boutures de Rosa sous des mini-serres en plastique

### e. Conditions de culture

Les cultures sont placées dans des cages à une densité de 24 boutures par lot sous des mini serre en plastique. L'humidité est saturante et La température du substrat étant maintenue entre 23 et 25 C°. Les besoins en eau varient en fonction du stade végétatif. Ils sont plus faibles lors de la plantation et deviennent de plus en plus élevées avec la croissance végétative. L'irriguer des jeunes plants se fait tous les trois jours à raison de 0.25 litres d'eau par plant.

### f. Expression des résultats

Les facteurs testés sont : le type de substrat, le type de l'hormone (AIA ou AIB) et la concentration de l'hormone (0, 3000, 4000 et 5000 ppm). Les paramètres mesurés sont les taux de survie et d'enracinement,



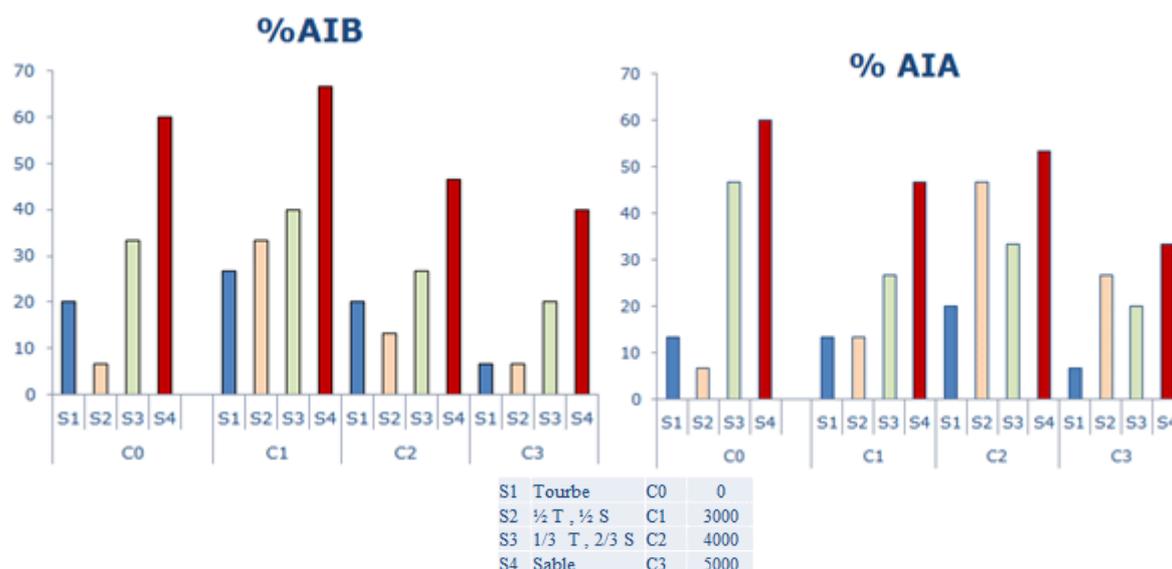
## 4. Résultats

Des différences significatives ont été observées entre les 5 types de substrats de bouturage pour le nombre de réussite (boutures enracinées). En effet, le substrat S1 (sable) a présenté le pourcentage de plants enracinés le plus élevé (60% avec l'AIA et 66.67% avec l'AIB). Vient ensuite le substrat (1/3 tourbe et 2/3 sable) avec un pourcentage de boutures enracinées de 46.66 et 40% respectivement avec l'AIA et l'AIB. Par contre le plus faible pourcentage de réussite (6.66%) est obtenu dans la tourbe quel que soit l'hormone de bouturage utilisée.

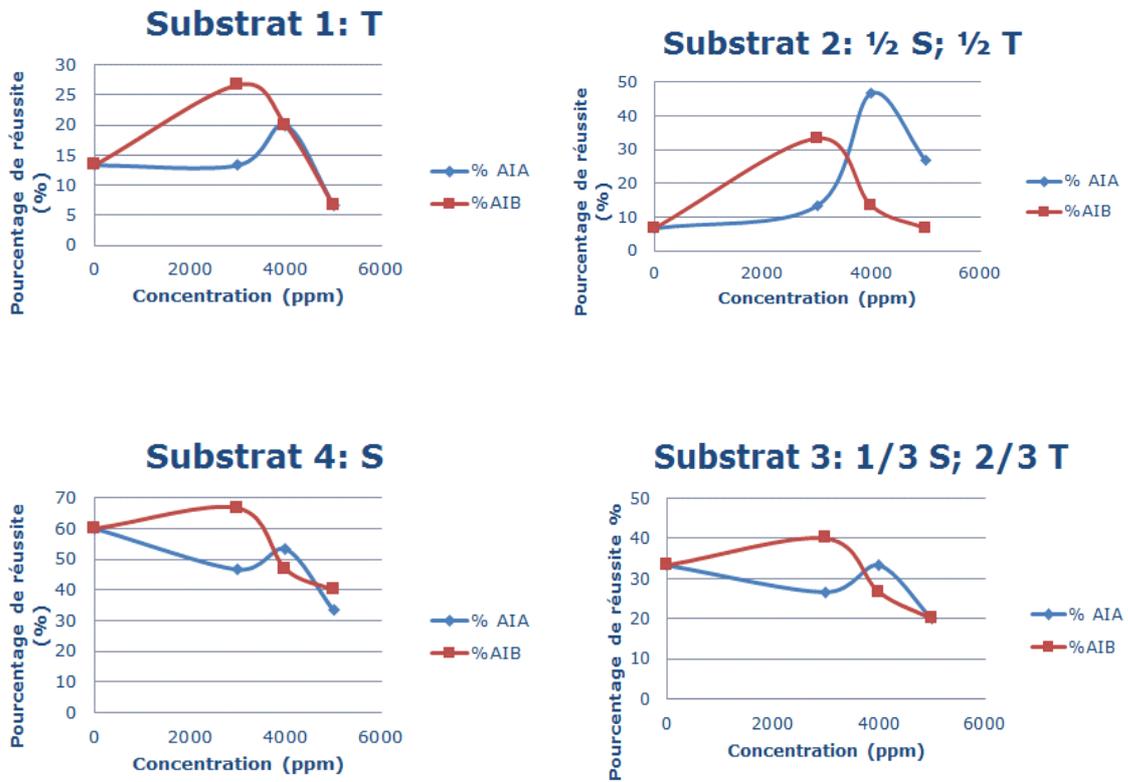
La longueur et la vigueur des nouvelles pousses développées sur les boutures mises en culture sur le sable sont les plus élevées. Cependant, celles développées sur les boutures cultivées dans la tourbe sont les plus petites (Fig. 33, 34 et 35).

Le nombre de feuilles par bouture est significativement le plus grand pour celles cultivées dans le sable. Toutefois, le nombre de feuilles développées chez les boutures cultivées dans la tourbe est le plus faible (Fig. 33, 34 et 35).

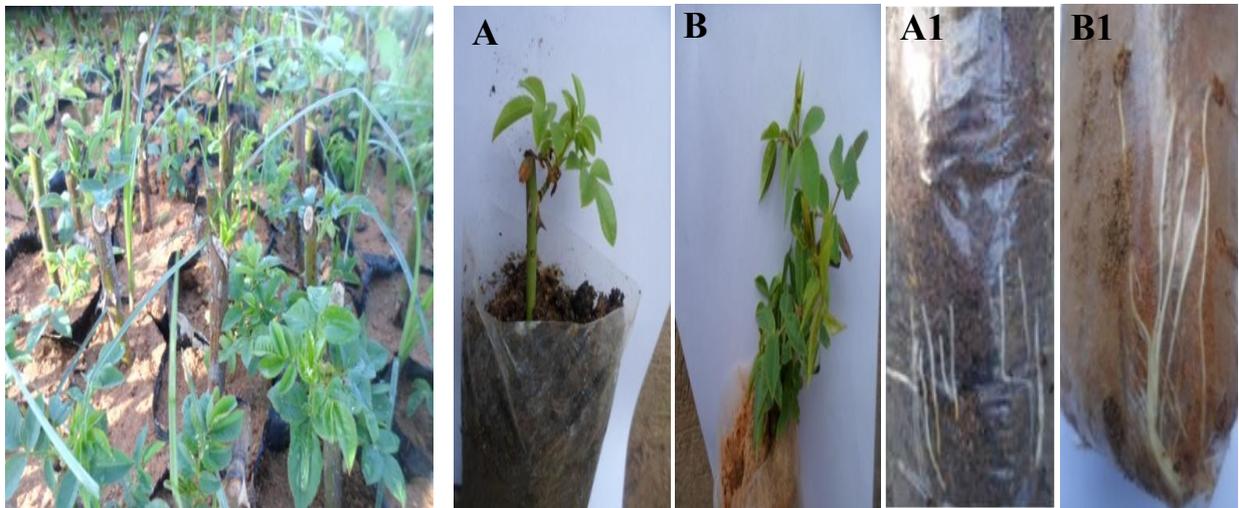
Concernant les paramètres enracinement des boutures, vigueur et densité des racines développées sur le substrat sable sont les plus élevées (Fig. 33, 34, 35 et 36). Cependant, celles développées chez les boutures cultivées dans la tourbe sont les plus faibles.



**Figure 33:** Pourcentages de réussite de bouturage in vivo : Comparaison entre substrats, hormones et concentrations hormonales



**Figure 34:** Pourcentages de réussite de bouturage : Comparaison entre substrats, entre hormones et entre concentrations hormonales



**Figure 35:** Multiplication par bouturage in vivo du Rosa. A et A1-Tourbe,



**Figure 36:** Multiplication par bouturage in vivo du Rosa : Les stades d'enracinement des boutures

## 5. Conclusions

En considérant l'ensemble des résultats obtenus lors de la multiplication par bouturage de *Rosa sempervirens* poussant à l'état spontané en Tunisie, des différences significatives ont été observées quant à l'effet du type de substrat, type et concentration de l'hormone de bouturage sur le pourcentage de réussite et des paramètres agronomiques.

Des différences remarquables des pourcentages de réussite ont été observées entre les 5 types de substrats, entre les deux types d'hormones de bouturage et entre les 4 concentrations hormonales quelques soit le paramètre agronomiques relatifs à la qualité des parties racinaire et aérienne des plants obtenus. En considérant l'ensemble des résultats obtenus en utilisant des boutures semi- ligneuses lors de la multiplication, un intérêt particulier doit être porté à cet écotype puisqu'il a donné des résultats intéressants en termes de qualité de bouturage.

Les meilleurs taux de réussite en utilisant des boutures semi-ligneuses sont obtenus sur le sable : en absence d'hormone (60%) et une légère amélioration en présence de 3000 ppm AIB (66%)



# Activité 3.3.2

## Propagation in vitro des espèces identifiées pour la production en nombre des plantes



## Activité 3.3.2 : Propagation *in vitro* des espèces identifiées pour la production en nombre des plantes.

### *1. Définition de protocole de multiplication in vitro par germination du Capparis spinosa*

#### 1. Introduction

La propagation des câpres par les graines est difficile en raison de la dormance des embryons car le tégument contient des inhibiteurs, et par conséquent les taux de germination de cette espèce sont très faibles. La germination des câpriers est très limitée et variable dans des conditions naturelles. Le problème devient de plus en plus grave lorsque la culture de l'espèce est nécessaire pour une plus grande production. Pour assurer une culture et une survie élevées, un pourcentage de germination élevé est requis. La germination à l'aide de régulateurs de croissance des plantes a déjà été signalée pour de nombreuses plantes. Il a été rapporté que les effets de la température, de la lumière, du traitement, de pré-trempage et de l'élimination du tégument affectent la germination de diverses cultures. Les informations sur la germination des graines de câpres sont encore limitées. Par conséquent, on a pensé que le traitement des graines avec des régulateurs de croissance des plantes peut influencer la formation des racines et la germination rapide. La présente étude rapporte les résultats des essais de germination visant à maximiser le taux de germination des graines et à obtenir des plants de câpres dans des conditions contrôlées en utilisant de l'acide gibbérellique et des milieux MS et H<sub>2</sub>O. La présente étude a été menée i) pour examiner l'importance du génotype, l'acide gibbérellique (GA3) et le milieu de germination qui pourraient affecter la germination des graines de câpres, ii) pour étudier les avantages possibles de la germination *in vitro* par rapport au semis direct des graines dans le sol, iii) pour la production en masse de plants de câprier.

#### 2. Matériel végétal

Les semences utilisées dans cette étude ont été obtenues auprès de la Banque Nationale de Gène de Tunisie (NGBT). Ces graines ont été collectées sur des câpres qui poussent spontanément dans le nord de la Tunisie (Tableau 3) (Fig. 37 et 38). Les zones de collecte

incluses Nahli (Gouvernorat d'Ariana), Fahs (Gouvernorat de Zaghouan), Mateur (Gouvernorat de Bizerte) et Hammam Lif (Gouvernorat de Ben Arous) sont situées entre 9.66E et 10.33E, et entre 36.36N et 37.04N. L'altitude des zones de collecte varie entre 1100 et 1200 m au-dessus du niveau de la mer et ces zones reçoivent une quantité moyenne de pluie annuelle entre 400 et 600 mm.

Tableau 3: Populations du câprier utilisées

Population	
P1	Nahli (épineux)
P2	Fahs (épineux)
P3	Mateur (épineux)
P4	Hammam Lif (inermes)



Figure 37: Semences de câprier inermes spontanées



Figure 38: Semences de câprier inermes spontanées



### 3. Protocole expérimental

#### d. Procédure de stérilisation

Les graines ont été nettoyées manuellement et lavées à l'eau courante. Elles ont été traitées avec de l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) pendant 30 min. Après plusieurs rinçages avec de l'eau distillée stérile, les graines ont été désinfectées dans de l'alcool 70 % pendant 5 min puis transférées dans de l'hypochlorite de sodium à 6 % pendant 20 min sous agitation continue. Enfin, les semences ont été lavées avec de l'eau distillée stérile pendant 5 min, puis trempées dans 1000 ou 2000 mg.l<sup>-1</sup> de GA3 pendant 6, 12, 24 et 48h. Ces graines ont été mise en germination dans des boîtes de Pétri placées dans des conditions contrôlées pendant 30 jours.

#### e. Milieu de germination

Les potentialités de germination des graines ont été testées sur le milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962) et sur de l'eau distillée stérile pour déterminer le milieu de germination optimal. Le milieu MS contenant des sels inorganiques, myo-inositol (100 mg.l<sup>-1</sup>), thiamine-HCl (0,10 mg.l<sup>-1</sup>), acide nicotinique (0,50 mg.l<sup>-1</sup>) et pyridoxine-HCl (0,50 mg.l<sup>-1</sup>). Après ajustement du pH à 5,8, les milieux ont été autoclavés à 121°C, 100 KPa pendant 20 min. les graines ont été placées dans des boîtes de Pétri (100 × 15 mm<sup>2</sup>) contenant chacune 25 ml de milieu liquide. Divers traitements ont été testés pour briser la dormance des graines et favoriser la croissance des pousses. Deux réplicas avec 12 graines par réplica ont été utilisés pour chaque traitement.

#### f. Conditions de culture

Les cultures ont été incubées à :

- Température : 23 ± 1°C/ jour ; 19 ± 1°C/nuit.
- Photopériode : 16 heures/jour.
- Eclairage : 42 Mol de photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>
- Hygrométrie : 70 %.

#### g. Acclimatation

Des jeunes plantules issues de germination, âgés de quinze jours ont été transférés dans des pots contenant un sol stérile (2/3 de tourbe et 1/3 de sable), initialement placés sous haute humidité (80%) dans une chambre de croissance puis transférées sous serre.



## h. Expression des résultats

- Pourcentages de germination pour chaque traitement.
- Effet de génotype (population)
- Effet de milieu
- Effet de GA3

## i. Analyses statistiques

Les pourcentages de germination (valeurs moyennes  $\pm$  erreur standard) ont été calculés pour chaque traitement. Les données à différents temps de trempage ont été soumises à une analyse multifactorielle de la variance (MANOVA) pour évaluer les effets des concentrations de population, de milieu et de GA3 et leurs interactions sur le pourcentage de germination. L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica (version 8).

## 4. Résultats

### a. Induction de la germination

Les milieux H2O et MS et les taux de GA3 (1000 et 2000 mg.l<sup>-1</sup>) ont été testés pour leur capacité à induire la germination pour les populations considérées (Tableau 3). Les deux milieux (H2O et MS) différaient par la composition, le MS contenant des micro, macro éléments et vitamines. Les résultats obtenus avec les différentes combinaisons (1000 ou 2000 mg.l<sup>-1</sup> de GA3 pendant 6, 12, 24 et 48h) pour les quatre populations de câpres (inerte et épineux) étudiées sont présentés dans le tableau 1. *C. spinosa* a montré une grande variabilité du taux de germination. Les graines développées sur milieu témoin MS ou H2O (H2O et MS sans GA3) n'ont présenté aucune germination avant 17 jours. Les taux de germination maximaux étaient respectivement de 12,50, 8,33 et 4,16 % pour les populations codées P1, P3 et P4 sur milieu H2O. En revanche sur les autres milieux où GA3 a été ajouté, les graines ont germé après une semaine de culture. Tous les semis étaient verts et phénotypiquement normaux. Ces plantules, lorsqu'elles ont été transférées dans des milieux frais, ont continué à croître et n'ont présenté aucune transformation. Tous les stades de germination ont été observés sur les différentes populations (Figures 39). Statistiquement, le niveau de germination varie selon les milieux, la dose de GA3 et le génotype.

La population (P1) présente les meilleures capacités de germination. La germination des graines la plus élevée (75%) a été obtenue lorsque les graines ont été traitées pendant 48h avec 2000 mg.l<sup>-1</sup> de solution de GA3. Les racines observées à partir des semis étaient plus longues



et vigoureuses par rapport à celles obtenues à partir du témoin. La germination la plus élevée dans chaque cas a été obtenue à partir de graines trempées pendant 48 h dans GA3. Le faible pourcentage de germination en cas de contrôle était peut-être dû à la dormance et aux graines dures.

### **b. Effet du génotype sur le pourcentage de germination des graines de câpres**

Les résultats d'AMOVA ont montré des différences hautement significatives ( $p < 0,001$ ) dans le pourcentage de germination à différents temps de trempage ont été obtenues parmi les différentes populations étudiées, suggérant que le génotype a un effet sur la germination des graines. Par conséquent, indépendamment des conditions testées, le génotype semblait être un facteur significatif influençant l'induction de la germination. Les réponses de P1 (*Capparis épineux*) étaient meilleures que celles observées pour les populations P2 (*Capparis inerme*), P3 (*Capparis épineux*) et P4 (*Capparis inerme*). Statistiquement, il y avait une différence significative entre les populations (P1, P2, P3 et P4) pour MS et le milieu H<sub>2</sub>O à divers traitements concernant les pourcentages de germination (Figure 44 et 45). En revanche, l'interaction population-milieu n'a pas de différence significative.

En condition contrôle, le pourcentage de germination variait de 4,16 à 12,50 %. La population P2 ne peut pas germer en condition contrôlée. Cependant, placées en condition témoin, les graines de câpres présentent des difficultés de germination qui s'expliqueraient par la dormance des graines.

### **c. Effet du milieu sur le pourcentage de germination des graines de câpres**

Les résultats ont montré des différences significatives ( $p < 0,001$ ) entre les deux milieux testés (MS et H<sub>2</sub>O) concernant leur effet sur l'induction de la germination des câpres (épineux et inerme) en culture *in vitro*. Pour toutes les populations, le milieu H<sub>2</sub>O a réalisé la meilleure induction de germination que le milieu MS (Figure 40 et 41). La germination de graines la plus élevée était de 75 % obtenue en utilisant le milieu H<sub>2</sub>O contre 37,5 % en utilisant le milieu MS. En présence de différentes concentrations de GA3, l'utilisation de milieux H<sub>2</sub>O semble être meilleure pour la germination des populations de *C. spinosa* (P1, P2, P3 et P4) par rapport aux milieux MS.



#### d. Effet du niveau GA3 sur le pourcentage de germination des graines de câpres

L'augmentation de GA3 de 1000 à 2000 mg.l-1 dans les milieux MS a diminué les pourcentages de germination de toutes les populations étudiées (Figure 40). Dans le milieu MS avec 2000 mg l-1 GA3, les temps de trempage 6 et 12 h semblent inhiber la germination de la population P2. Dans les conditions témoins (H2O et MS sans GA3), les populations P2 et P4 n'ont pas pu germer. Le pourcentage de germination n'était que de 4,16 (P1 et P3) dans les milieux MS.

Pour le milieu H2O, l'effet de diverses concentrations de GA3 pour différentes durées de traitement a montré des réponses positives sur la germination des graines (Figure 41) pour toutes les populations. La germination la plus élevée dans chaque cas a été obtenue à partir de graines trempées pendant 48 h dans GA3 à un niveau de 2000 mg.l-1. Nous supposons que l'augmentation de la durée de trempage, indépendamment de la concentration en GA3, était stimulatrice, montrant une amélioration du pourcentage de germination. L'augmentation du pourcentage de germination varie selon les populations étudiées et les concentrations de GA3.

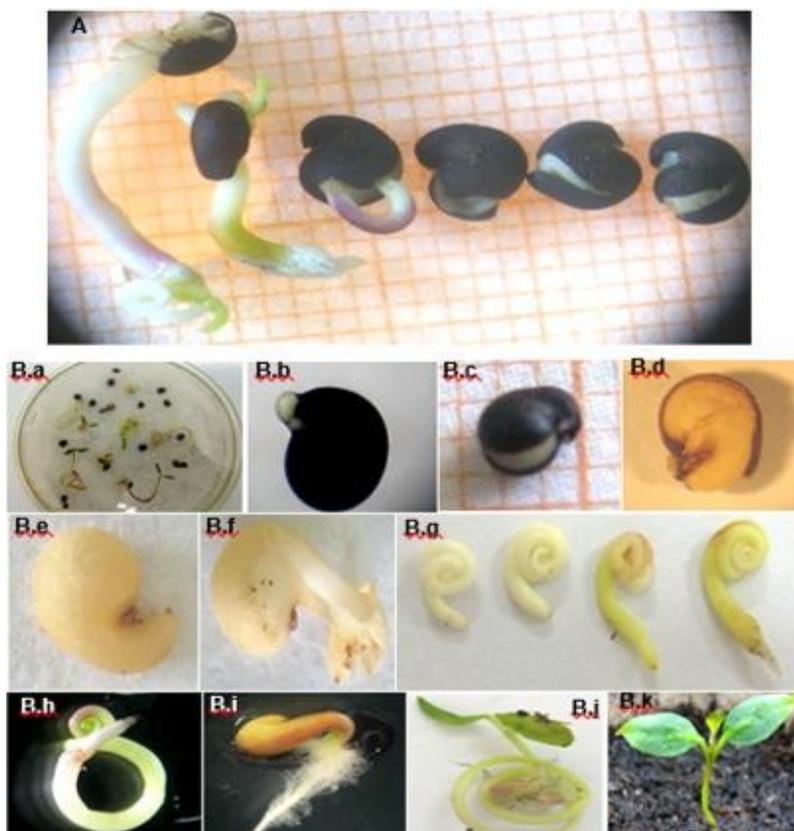
#### e. Survie des plants acclimatés

Les plantules issues de la germination des graines ont été acclimatées (Figure 42 et 43). Le pourcentage de survie des plants est de 95%. Ils ont ensuite été transférés dans des pots contenant un sol stérile (2/3 de tourbe et 1/3 de sable), initialement placés sous une humidité élevée (80 %) dans une chambre de croissance puis cultivés en serre. Toutes les plantes ont atteint la maturité (Figure 42 et 43).

## 5. Conclusions

La propagation en masse de plantes de *Capparis spinosa*, une plante vivace signalée rare en Tunisie, est standardisée pour une utilisation commerciale ultérieure durable. Le processus de germination des graines de câpriers est influencé par le génotype, le milieu et la concentration en GA3. Dans la présente étude, nous avons noté que les conditions optimales pour le pourcentage de germination 75% câprier épineux et 41,66% câprier inerme est :

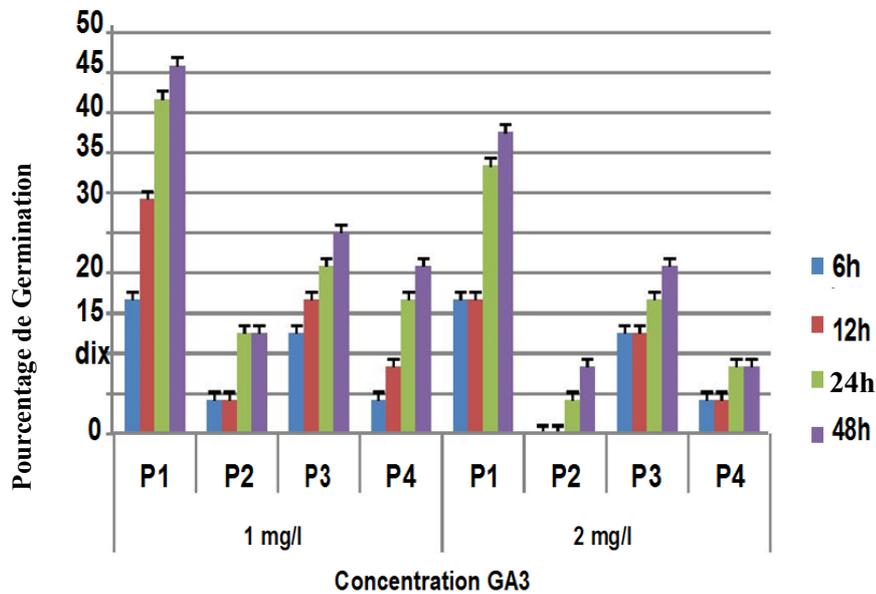
- L'utilisation de H2O comme milieu pour la germination in vitro
- Le prétraitement des graines avec 2000 mg.l-1 GA3 pendant 48 heures.



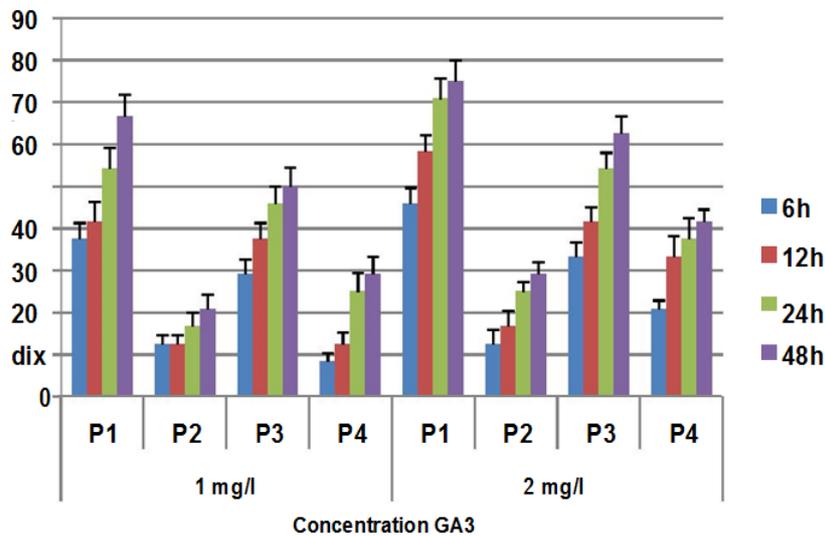
**Figure 39:** stades de germination in vitro des graines de câpres

A : Lacération du tégument et allongement de la radicule et des hypocotyles du câprier P2 B : Rupture du tégument et allongement de la radicule et des hypocotyles du câprier P1.

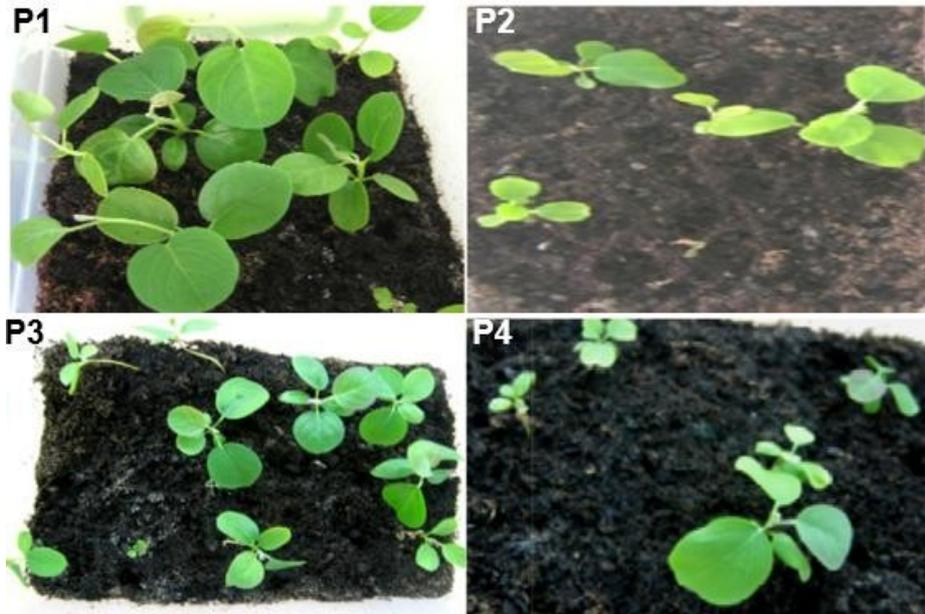
- a. Germination des graines sur milieu MS
- b. Extension radicale
- c. Déchirure du tégument dure. Ouverture de deux valves
- d. Embryon nu
- e. Déchirer le tégument interne
- f. Allongement de la radicule et de l'hypocotyle
- g. Apparition des deux premières feuilles je. Apparition de poils absorbants
- h. Plante entière régénérée in vitro
- i. Plante transférée à la tourbe



**Figure 40:** Pourcentage de germination des graines des populations de *C. spinosa* (P1, P2, P3 et P4) en utilisant des milieux MS avec différentes concentrations de GA3 en fonction des temps de trempage.



**Figure 41:** Pourcentage de germination des graines des populations de *C. spinosa* (P1, P2, P3 et P4) en utilisant des milieux H2O additionnés de différentes concentrations de GA3 selon les temps de trempage



**Figure 42:** Acclimation des plants de câprier, 2 semaines après transfert (P : population).



**Figure 43:** Câpres acclimatés poussant en pots sous serre, 3 mois après transfert



# Activité 3.3.3

## Utilisation des techniques de multiplication des bourgeons axillaires pour les **Origanum/Capparis /Rosa**



## Activité 3.3.3 Utilisation des techniques de multiplication des bourgeons axillaires pour les *Capparis/Rosa/Origanum*.

### A. Introduction

Les méthodes classiques de multiplication sont relativement limitées et sont rendues difficiles par l'existence de nombreuses contraintes spécifiques à l'espèce. L'introduction des méthodes biotechnologiques pour suppléer les voies classiques de multiplication peut répondre aux nombreux impératifs économiques, médicaux et sociaux. La culture *in vitro* est considérée actuellement comme un outil performant pour accélérer la propagation et assurer la conservation et la valorisation des espèces. Plusieurs tentatives ont été faites dans ce domaine. Dans le présent travail, des résultats satisfaisants de microbouturages et de germination ont été obtenus. En effet, la multiplication *in vitro* est basée sur le développement des milieux de culture qui favorisent l'initiation, la multiplication ainsi que l'enracinement de *in vitro* plants obtenus à partir des explants utilisés (boutures herbacées, graines, bourgeons terminaux,...).

Notre objectif est de définir les protocoles permettant de maîtriser les étapes de la multiplication *in vitro* des espèces identifiées pour la production en masse de plants, depuis le prélèvement de l'explant primaire (sur terrain) jusqu'au transfert des plantes obtenues sous serre et au champ.

### B. Propagation *in vitro* d'*Origanum* pour la production en nombre de plantes.

#### I. Définition de protocole de multiplication *in vitro* par microbouturage (*O. vulgare*, *O. onites* et *O. majorana*)

##### 1. Introduction

L'origan est le sujet principal d'un nombre croissant d'études. L'utilisation de ses potentiels antimicrobien et antioxydant sont ceux qui montrent son plus grand intérêt, tant au niveau pharmaceutique que pour l'industrie agroalimentaire. En effet, l'utilisation de l'origan pourrait



probablement permettre de diminuer le recours aux substances synthétiques. Toutefois la culture *in vitro* est la seule technique capable de trouver des solutions efficaces pour un certain nombre de problèmes et qu'elle présente de gros avantages, parmi lesquels :

- L'obtention de clones sélectionnés pour leurs caractères intéressants.
- La production de substances biochimiques intéressantes pour l'industrie alimentaires et pharmaceutiques.
- L'assainissement des végétaux : obtention de plantes indemnes de virus.
- La sauvegarde des espèces menacées de disparition

## 2. Matériel végétal

Des boutures herbacées prélevées au mois de février sur des plantes spontanées d'origan, cultivées en conditions aseptiques sur le milieu de Murashige et Skoog (MS) additionné de différentes concentrations et combinaisons de régulateurs de croissance de BAP, Zéatine et ANA, donnent des bourgeons (Fig. 44).



Figure 44: Boutures herbacées d'*Origanum*

## 3. Protocole expérimental

### a. Procédure de stérilisation

Les pousses herbacées prélevées des plantes spontanées, ont été lavées sous l'eau courante du robinet pendant 30 min. des micro-boutures coupées de 2 cm de long (2 à 3 nœuds) ont été rincés plusieurs fois à l'eau distillée stérile additionnée de quelques gouttes de tween 20 sous la hotte à flux laminaire stérile. Les explants ont été désinfectés pendant 5 min dans de l'éthanol 70% puis dans l'hypochlorite de sodium à 2.4 % pendant 30 min. Elles sont par la suite lavées plusieurs fois à l'eau distillée stérile. Les explants sont ensuite mis en culture dans des tubes à essai contenant chacun 20 ml de l'un des milieux utilisés.



### b. Mode de culture

Des boutures sont coupées en fragments de 2 cm de long ( 2 à 3 nœuds). Chaque fragment est déposé verticalement dans des tubes à essai contenant chacune 20 ml de milieu de Murashige et Skoog (1962) (Fig. 45).



Figure 45: Mise en culture des explants d'*Origanum*

### c. Milieux de culture des explants

Le milieu de culture des explants primaires et des structures qui en sont issues (cals, bourgeons, ...) est celui de Murashige et Skoog solidifié par de l'agar (7g/l). Le saccharose est ajouté au milieu, à raison de 30 g/l. Il a été additionné de doses et de combinaisons variables d'acide naphthalène acétique (de 0.1 à 3.mg/l), de Zéatine (de 5mg/l) et de 6 benzyl-aminopurine (de 0.1 à 2 mg/l). Le pH du milieu est ajusté 5,6 – 5,8 avant l'autoclavage, à l'aide de solutions de soude (0.1N) ou d'acide chlorhydrique (0.1N). Tous les milieux sont stérilisés par un autoclavage à 120°C pendant 20 min à une pression de 1 atm. Le milieu est distribué dans des tubes à essai (20 x 2 cm) à raison de 20 ml par tube.

### d. Condition de culture

Les cultures sont mises dans des tubes à essai à raison de 20 ml par tubes sont ensuite placées dans une enceinte climatisée. La température est de l'ordre de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  le jour et de  $19 \pm 1^\circ\text{C}$  la nuit. La photopériode est de 16 heures/jour. La lumière est fournie par des tubes fluorescents placés à 60 cm au-dessus des cultures. L'éclairement est de l'ordre de 6000 lux au voisinage des cultures et l'hygrométrie est de l'ordre de 70 %.

### e. Expression des résultats

Pour apprécier les potentialités morphogènes des boutures mis en culture, nous avons



évalué :

- Le nombre moyen de bourgeonnement.
- Le nombre moyen de bourgeons par explant. Ce critère est évalué par rapport au nombre total d'explants primaires mis en culture.

Les paramètres quantitatifs ont été soumis à des analyses de variance à un ou à deux facteurs de classification (Dagnelie, 1994). Un test de comparaison des moyennes, le test de Duncun, a été réalisé, après l'analyse de variance, pour classer les différentes moyennes en groupes.

## 4. Résultats

L'obtention d'un maximum de bourgeons régénérés est atteinte par le choix d'un milieu de culture riche en éléments minéraux et organiques en présence de phytohormones. Dans nos conditions expérimentales, le taux de régénération des bourgeons atteint les 64%.

### a. Influence de la nature du milieu de culture sur l'induction des bourgeons

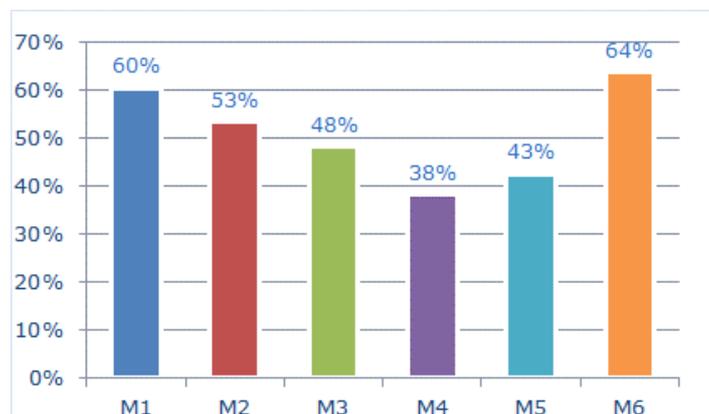
La composition du milieu de mise en culture joue un rôle très important dans la multiplication et la croissance des boutures.

Un gonflement des nœuds d'intensité variable apparaît sur tous les explants mis en culture. Les boutures expriment des réactions variables selon les milieux de culture (Fig. 46).

Des structures organogènes (foliaire et/ou caulinaire) apparaissent après une semaine de culture. Le pourcentage d'explants présentant des néoformations varie de 38% (milieu additionné de 0.1 mg/l ANA et 1mg/l BAP) à 64% (milieu additionné de 2mg/l ANA et 5mg/l Zéatine) (Figure 46 et 47). Le milieu M6 (MS additionné de 2mg/l ANA et 5 mg/l zéatine) semble être le plus favorable à induire la formation de bourgeons adventifs 64%. Les milieux autres milieux qui présentent des doses hormonales de Zéatine et de BAP variables sont moins favorables à l'induction du bourgeonnement, le pourcentage de réussite varie entre 53% et 60%. Les milieux les plus favorables à l'organogénèse sont ceux qui induisent le maximum de bourgeons par explant. Le nombre moyen de bourgeons par explant est de 4 (Fig. 47).

Les paramètres d'appréciation de la réussite du microbouturage (Nombre des explants bourgeonnés et nombre de bourgeons par explant) ont été soumis à une analyse après 4 semaines

de culture. L'analyse de la variance montre un effet milieu et un effet hormonal non significatifs ( $p = 0.05$ ). Les milieux M1, M2 et M6 sont les plus favorables pour induire la formation de bourgeons par explants.



**Figure 46:** Pourcentage d'explants présentant des bourgeons néoformés



**Figure 47:** Bourgeons néoformés d'*Origanum*

#### a. Transfert pour l'enracinement des bourgeons néoformés

Les bourgeons ayant initié quatre à six feuilles bien étalées ont été séparés et mis en



culture sur des milieux de Murashige et Skoog, additionné de 0.1, 0.8 et 1mg/l ANA. Les conditions de culture sont les mêmes que ceux qui ont servi à l'induction du bourgeonnement (température de 22°C, éclairage de 6000 lux à raison de 16 h, par jour).



**Figure 48:** Bourgeons néoformés d'*Origanum* transférés sur milieu d'enracinement

## 5. Conclusions

Nos résultats ont montré qu'à partir des bourgeons axillaires, cultivés *in vitro* on peut régénérer des plantes entières. Les potentialités morphogènes des explants sont différentes et tributaires de nombreux facteurs :

Dans nos conditions expérimentales :

- L'induction des bourgeons axillaires dépend de milieu de culture et de la composition hormonale. Le milieu de culture des explants et le type de l'hormone de croissance, stimulent l'aptitude des explants au bourgeonnement. Elle atteint 64 % sur le milieu de MS additionné de 2 mL ANA et de 5 mg/l de Zéatine. Le nombre moyen de bourgeons par explant est de 4 sur le même milieu de bourgeonnement.
- Des bourgeons ayant initié six à 10 feuilles bien étalées ont été séparés et mis en culture sur des milieux de Murashige et Skoog, additionné de 0.1, 0.8 et 1mg/l AIA. L'enracinement dépend de l'effet de la concentration de l'auxine et le milieu de culture. L'hormone de croissance utilisée pour l'enracinement est l'AIA. L'analyse des résultats obtenus a révélé des problèmes de d'enracinement sont liées principalement au problème de vitrification. Nos essais d'enracinement donnent des résultats.



## C. Propagation *in vitro* du *Capparis* pour la production en nombre de plantes.

### II. Définition de protocole de multiplication *in vitro* par bourgeons axillaires (*C. spinosa* subsp. *spinosa* L., *C. spinosa* subsp. *inermis* L.)

#### 1. Introduction

La propagation de câprier par les semences est difficile à cause de la dormance embryonnaire et des inhibitions tégumentaires (graines dures). Ce mode de multiplication donne une hétérogénéité tant en termes de productivité qu'en termes de qualité des câpres. Des essais de multiplication via des bourgeons axillaires du câprier ont été abordés dont le but d'améliorer les pourcentages d'enracinement et de reprise afin d'augmenter le taux de production de plants de câprier.

#### 2. Matériel végétal

Chez le câprier, la néoformation *in vitro* de plantes a été souvent difficile à partir de tissus cotylédonaire, hypocotylaires et à partir des boutures.

Dans notre travail, nous avons utilisé, des boutures semi ligneux à deux ou trois nœuds, prélevées sur des plantes spontanées de *Capparis spinosa* L. (Fig. 48). Elles sont coupées en fragments de 2 cm de long puis cultivées *in vitro* sur le milieu de Murashige et Skoog additionné de différentes concentrations et combinaisons de régulateurs de croissance, donnent des bourgeons. L'étude a été menée dans la Banque Nationale de Gènes de Tunisie.



Figure 49: Boutures de *Capparis spinosa* L.

### 3. Protocoles expérimentales

La régulation des différents types de morphogenèse (rhizogénèse, organogénèse, débourrement, callogenèse, embryogénèse, etc.) de tissus cultivés *in vitro* dépend d'interactions complexes, faisant intervenir des facteurs endogènes (nature, âge et taille du tissu) et environnementaux relatifs à la composition du milieu de culture (nature et richesse en régulateurs de croissance,...) et au milieu physique (température, lumière, hygrométrie, etc.).

#### a. Procédure de stérilisation

Les boutures utilisées ont été lavées à l'eau courante pendant 30min, puis trempées dans de l'eau distillée stérile additionnées de quelques gouttes de fongicides (Banko 270 SC) pendant 30 min. Dans des conditions stériles, elles sont désinfectées à l'alcool 70° pendant 5 minutes puis à l'hypochlorite de calcium à 6 % pendant 30 min. Les boutures sont par la suite lavées plusieurs fois à l'eau distillée stérile. Enfin, les boutures sont mises à culture sur le milieu de Murashige et Skoog (1962) (MS).

#### b. Mode de culture

Des micro-boutures de 2 à 3 nœuds sont coupées en fragments de 2 cm de long. Chaque fragment est déposé verticalement dans des tubes à essai contenant chacune 20 ml de milieu de Murashige et Skoog (1962).



### c. Milieux de culture des boutures

Le milieu de culture des boutures est celui de Murashige et Skoog solidifié par de l'agar (7g/l) et additionné de 30 g/l de saccharose. A ce milieu nous avons ajouté des régulateurs de croissance [6-benzyl-aminopurine BAP (0.1, 1, et 2 mg/l), l'acide naphthalène acétique ANA (0.1, 1, 2, 3 mg/l) et la Zéatine (5 mg/l)]. Ces régulateurs de croissance, exercent des actions corrélatives en activant l'expression de débourrement des bourgeons axillaires. Le pH du milieu est ajusté à 5,6 – 5,8 à l'aide de solutions de soude (0,1N) ou d'acide chlorhydrique (0,1N) avant l'autoclavage à 120°C pendant 20 min, à une pression de 1 atm.

### d. Conditions de culture des explants

Le repiquage des cultures s'effectuent aseptiquement sous une hotte à flux laminaire dans des tubes à essai (20 ml). Les cultures sont ensuite placées dans une chambre de culture. La température est de l'ordre de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  le jour et de  $19 \pm 1^\circ\text{C}$  la nuit. La photopériode est de 16 heures/jour. La lumière est fournie par des tubes fluorescents placés à 60 cm au-dessus des cultures. L'éclairage est de l'ordre de 6000 lux au voisinage des cultures et l'hygrométrie est de l'ordre de 80 %.

### e. Enracinement et développement des néoformations

Les pousses qui régénèrent au niveau des nœuds, sont excisées puis transférées sur un milieu de croissance et d'enracinement (MS) additionnées de différentes concentrations d'AIA (0.1, 0.8 et 1mg /l).

### f. Méthodes statistiques d'interprétation des résultats

Pour apprécier les potentialités morphogènes des explants mis en culture, nous avons évalué :

- Le nombre moyen d'explants exprimés des bourgeons
- Le nombre moyen de bourgeons par explant. Ce critère est évalué par rapport au nombre total de boutures primaires mis en culture.
- Les paramètres quantitatifs ont été soumis à des analyses de variance à un seul facteur de classification en utilisant le programme SAS (1990). Un test de comparaison des moyennes, le test de Duncun au seuil de 5% (Dagnelie, 1975), a été réalisé, pour classer les différentes moyennes en groupes.



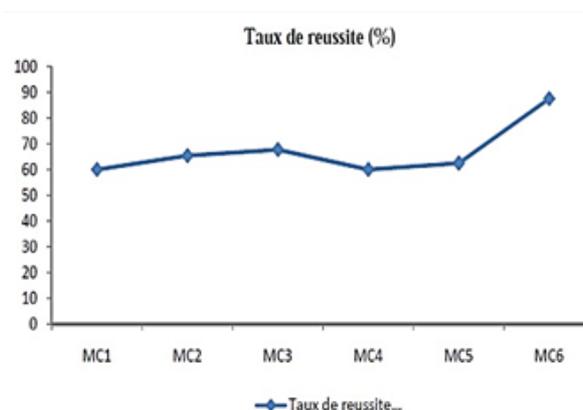
## 4. Résultats

### a. Influence de la nature du milieu de culture sur l'induction des bourgeons axillaires

La composition du milieu de mise en culture joue un rôle très important dans le débourrement des explants. L'effet favorable de la solution nutritive du milieu de Murashige et Skoog (1962) sur l'expression des bourgeons axillaires, nous a incités à améliorer la qualité des milieux de culture utilisés en leur ajoutant divers régulateurs de croissance : 6-benzyl-aminopurine, l'acide naphthalène acétique et la Zéatine. Nous avons testé le bourgeonnement des boutures, un gonflement des nœuds d'intensité variable apparaît sur tous les explants mis en culture. Les boutures sont d'abord chlorophylliens puis vert claire. Les boutures expriment des réactions variables selon les milieux de culture (Fig. 50 et 51). Des structures organogènes de nature caulinaire apparaissent après une semaine de culture (Fig. 51). Le pourcentage d'explants présentant des néoformations vari de 20.83% (milieu MS additionné de 0.1mg/l BAP+3mg/l ANA) à 50% (milieu additionné de 2mg/l BAP) chez le câprier épineux (Fig. 52). Pour le câprier inerme le pourcentage de réussite vari de 60% (milieu additionné de 1.2 mg/l BAP) à 87.50% (milieu additionné de 3mg/l Zéatine) (Figure 53).

Pour le câprier épineux, le pourcentage de réussite varie entre 20.33 et 50. Le milieu (MS+2mg/l BAP) à l'opposé des milieux (MS+1.2mg/l BAP et MS+3mg/l BAP), semble être le plus favorable à induire la formation de bourgeons axillaires (50%). Pour les autres milieux sont moins favorables à l'induction du bourgeonnement.

Pour le câprier inerme, le pourcentage d'explants présentant des néoformations varie de 60% (milieu additionné de 1.2 mg/l BAP) à 87.50% (milieu additionné de 3mg/l Zéatine).



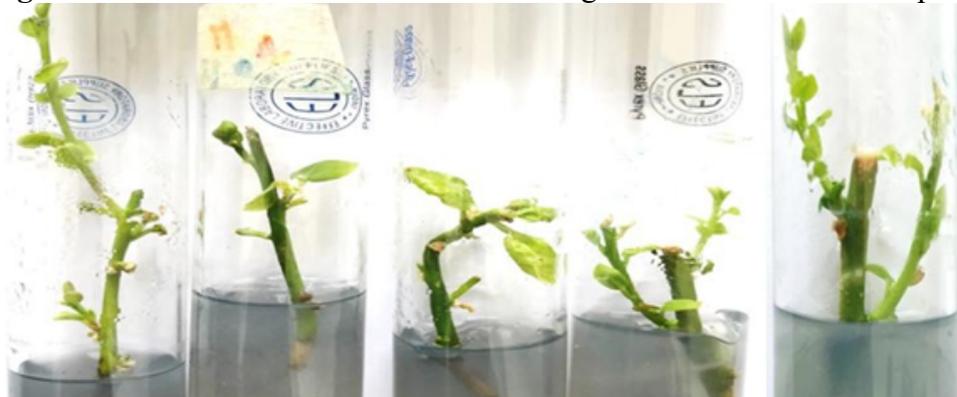
**Figure 50:** Variation du taux de réussite de micro-bouturage de câprier inerme selon le milieu de culture.



Le nombre moyen de bourgeons par explant, diffère selon les milieux de culture. Il varie dans le même sens que celui du nombre d'explants organogènes. Les milieux les plus favorables à l'organogenèse sont ceux qui induisent le maximum de nombre de bourgeons par explant. Le nombre moyen de bourgeons par explant varie entre 1 et 3 sur tous les milieux testés (Fig.51 et 52). L'analyse de variance montre un effet milieu et un effet hormone hautement significatifs ( $p = 0.0051$ ). Le milieu (MS+2mg/l BAP) est les plus favorables à induire la formation de bourgeons axillaires par explant pour le câprier épineux et inerme. Pour les milieux testés, la composition des milieux n'influe pas significativement sur l'induction des bourgeons axillaires par explant.



**Figure 51 :** Pousses néoformées issus de bourgeons axillaires chez le câprier.



**Figure 52:** Bourgeons axillaires développés sur bouture du câprier épineux.



**Figure 53:** Bourgeons axillaires développés sur bouture du câprier inerme.



### **b. Influence de la nature de l'hormone de croissance sur l'induction des bourgeons axillaire**

La Zéatine et la BAP utilisées isolément ou additionnés avec l'ANA ou la GA3 permettent d'induire la formation de bourgeons axillaires chez le câprier. Les pourcentages de bourgeonnement varient de 60% (milieu additionné de 1.2 mg/l BAP) à 87.50% (milieu additionné de 3 mg/l Zéatine) chez le câprier inerme et de 20.83% (milieu additionné de 0.1 mg/l BAP) à 50% (milieu additionné de 2 mg/l BAP) chez le câprier épineux. La Zéatine (3 mg/l) et la BAP (2 mg/l) semble être les meilleures hormones de croissance inductrices du bourgeonnement axillaire respectivement chez le câprier inerme et épineux. Elles activent la totipotence végétale et favorisent la prolifération cellulaire des explants. Le nombre de bourgeons par explant optimum est obtenu en présence de BAP chez les deux sous espèces. Des concentrations élevées de BAP peut entraîner un phénomène de vitrification et parfois certaines anomalies telles que l'arrêt de croissance.

### **c. Enracinement et développement des bourgeons néoformés**

L'induction de la rhizogénèse des bourgeons axillaires néoformés *in vitro* est une tâche souvent délicate. L'enracinement et la survie des néoformations dépendent généralement, de l'état physiologique et des degrés de développement morphologique des bourgeons, des facteurs physiques (température et lumière) et de la concentration du milieu en régulateurs de croissance.

Pour obtenir des plantules entières il est nécessaire de repiquer les bourgeons sur un milieu sans cytokinine. Un apport d'auxine exogène (AIA, AIB, etc.) peut stimuler la rhizogénèse. Dans notre travail les bourgeons ayant initié quatre à six feuilles bien étalées ont été séparés et mis en culture sur des milieux de Murashige et Skoog, additionné de 0.1, 0.8 et 1 mg/l AIA. Les conditions de culture sont les mêmes que ceux qui ont servi à l'induction du bourgeonnement (température de 22°C, éclairage de 6000 lux à raison de 16 h, par jour).

## **5. Conclusions**

Le câprier joue un rôle très important dans le développement durable des pays. En effet, leurs rôles écologiques, médicaux et socioéconomiques doivent être intégrés dans les programmes des progrès ruraux durables. Pour cela, la définition de protocole de multiplication du câprier est un préalable nécessaire à la mise en œuvre de ces objectifs. La culture *in vitro* de micro-boutures, tester les potentialités organogènes de ces tissus et obtenir des plantes entières constituent des étapes primordiales conditionnant tout programme et toute stratégie



d'amélioration, de conservation et de valorisation de cette ressource autochtone. Nos investigations préliminaires ont montré qu'à partir de micro boutures, cultivés *in vitro* on peut régénérer des plantes entières. Les potentialités morphogènes des explants sont différentes et tributaires de nombreux facteurs :

- Le milieu de culture des explants et le type de l'hormone de croissance, détermine lacapacité de bourgeonnement des tissus. En effet, l'aptitude au bourgeonnement, sur les différents milieuxde culture testés, est importante. Elle atteint 87.5 % sur le milieu de MS additionné de 3 mg/l de Zéatine (câprier inerme) et 50% sur le milieu de MS additionné de 2mg/l BAP (câprier épineux).
- Le facteur stimulant l'induction des bourgeons c'est l'hormone additionnée au milieu de Murashige and Skoog (MS). En effet, le milieu contenant la Zéatine semble être le plus favorable au bourgeonnement que la BAP. Le milieu additionné de 3 mg/l de Zéatine donne la meilleure réponse (87.5%).
- Des bourgeons ayant initié quatre à six feuilles bien étalées ont été séparés et mis en culture sur des milieux de Murashige et Skoog, additionné de 0.1, 0.8 et 1mg/l ANA. L'enracinement dépend de l'effet de la concentration de l'auxine, le milieu de culture et la position des implants dans le milieu. L'hormone de croissance utilisée pour l'enracinement est l'ANA. L'analyse des résultats obtenus a révélé une multitude de réponses en fonction du traitement. Des difficultés d'enracinement sont liées principalement au problème de vitrification et de callogenèse excessives ont été rencontrés pour l'AIA. Nos essais d'enracinement donnent des résultats et il faut faire le recours à d'autres régulateurs de croissance tout en variant les doses utilisées.



## D. Propagation *in vitro* du *Rosa* sp pour la production en nombre de plantes.

### I. Définition de protocole de multiplication *in vitro* par bourgeons axillaires de *Rosa* L. (*R. canina* L., *R. sempervirens* L. et *R. moschata* L),

#### 1. Introduction

Les roses sont hétérogènes et ne sont pas conformes à la plante mère. Par conséquent, sa multiplication par des méthodes végétatives est nécessaire. Étant donné que la plupart des espèces de roses sont difficile à enraciner, les méthodes de propagation conventionnelles sont très lent, long et fatiguant. La culture *in vitro* d'autre part devient de plus en plus répandue et constitue une alternative à la multiplication végétative conventionnelle. En Tunisie, les espèces de *Rosa* sont menacées de disparition.

#### 2. Matériel végétal

Chez les rosiers, la néoformation *in vitro* de plantes est difficile. Dans le présent travail, nous avons utilisé, des boutures semi ligneux à deux ou trois nœuds, prélevées sur des plantes spontanées de rosier. Elles sont coupées en fragments de 2 cm de long puis cultivées *in vitro* sur le milieu de Murashige et Skoog additionné de différentes concentrations et combinaisons de régulateurs de croissance, donnent des bourgeons. L'étude a été menée dans la Banque Nationale de Gènes de Tunisie.

#### 3. Protocoles expérimentales

##### a. Procédure de stérilisation

Les boutures utilisées ont été lavées à l'eau courante pendant 30 min, puis trempées dans de l'eau distillée stérile additionnées de quelques gouttes de fongicides (Banko 270 SC) pendant 30 min et lavées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile additionnée de quelques gouttes de Tween 20. Dans des conditions stériles, elles sont désinfectées à l'alcool 70° pendant 5 minutes



puis à l'hypochlorite de calcium à 6 % pendant 30 min. Les boutures sont par la suite lavées plusieurs fois à l'eau distillée stérile additionnée. Enfin, les boutures sont mises à culture sur le milieu de Murashige et Skoog (1962) (MS).

### **b. Mode de culture**

Des micro-boutures de 2 à 3 nœuds sont coupées en fragments de 2 cm de long. Chaque fragment est déposé verticalement dans des tubes à essai contenant chacune 20 ml de milieu de Murashige et Skoog (1962).

### **c. Milieux de culture des boutures**

Le milieu de culture des boutures est celui de Murashige et Skoog solidifié par de l'agar (7g/l) et additionné de 30 g/l de saccharose. A ce milieu nous avons ajouté des régulateurs de croissance [6-benzyl-aminopurine BAP (0,1, 1, et 2 mg/l), l'acide naphthalène acétique ANA (0,1, 1, 2, 3 mg/l) et la Zéatine (5 mg/l)]. Le pH du milieu est ajusté à 5,6 – 5,8 à l'aide de solutions de soude (0,1N) ou d'acide chlorhydrique (0,1N) avant l'autoclavage à 120°C pendant 20 min, à une pression de 1 atm.

### **d. Conditions de culture des explants**

Le repiquage des cultures s'effectuent aseptiquement sous une hotte à flux laminaire dans des tubes à essai (20 ml). Les cultures sont ensuite placées dans une chambre de culture dont les conditions sont les suivantes :

- La température est de l'ordre de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  le jour et de  $19 \pm 1^\circ\text{C}$  la nuit.
- La photopériode est de 16 heures/jour.
- La lumière est fournie par des tubes fluorescents placés à 60 cm au-dessus des cultures.
- L'éclairage est de l'ordre de 6000 lux au voisinage des cultures
- l'hygrométrie est de l'ordre de 80 %.

### **e. Enracinement et développement des néoformations**

Les pousses qui régénèrent au niveau des nœuds, sont excisées puis transférées sur un milieu de croissance et d'enracinement (MS) additionnées de différentes concentrations d'ANA (0,1, 0,8 et 1mg /l).



## f. Méthodes statistiques d'interprétation des résultats

Pour apprécier les potentialités morphogènes des explants mis en culture, nous avons évalué :

- Le nombre moyen d'explants exprimés des bourgeons
- Le nombre moyen de bourgeons par explant. Ce critère est évalué par rapport au nombre total de boutures primaires mis en culture.
- Les paramètres quantitatifs ont été soumis à des analyses de variance à un seul facteur de classification en utilisant le programme SAS (1990). Un test de comparaison des moyennes, le test de Duncun au seuil de 5% (Dagnelie, 1975), a été réalisé, pour classer les différentes moyennes en groupes.

## 4. Résultats

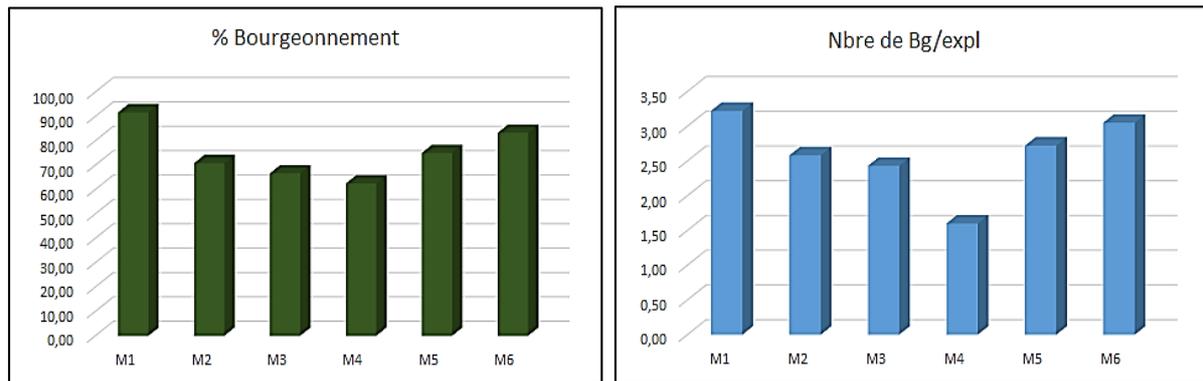
### a. Influence de la nature du milieu de culture sur l'induction des bourgeons axillaires

La composition nutritive riche du milieu de MS amélioré par l'ajout de divers régulateurs de croissance : 6-benzyl-aminopurine, l'acide naphthalène acétique et la Zéatine, induit le débourrement des explants. Nous avons testé le bourgeonnement axillaire des boutures, un gonflement des nœuds d'intensité variable apparaît sur tous les explants mis en culture. Les boutures sont d'abord chlorophylliennes puis vert claire. Les boutures expriment des réactions variables selon les milieux de culture.

Le pourcentage d'explants présentant des pousses varie de 62.50% (milieu MS additionné de 0.1mg/l BAP+1mg/l ANA) à 91.66% (milieu additionné de 2mg/l BAP) (Fig.54).

Le nombre moyen de bourgeons par explant varie selon les milieux de culture. Les milieux les plus favorables à l'organogenèse sont ceux qui induisent le maximum de nombre de bourgeons par explant. Le nombre moyen de bourgeons par explant varie entre 2 et 3.22 sur tous les milieux testés (Fig.55 et 56).

L'analyse de variance montre un effet milieu et un effet hormone hautement significatifs ( $p = 0.0057$ ). Le milieu (MS+2mg/l BAP) est le plus favorable à induire la formation de bourgeons axillaires par explant.



**Figure 54:** Pourcentage de bourgeonnement et nombre de bourgeons par explant

### **b. Influence de la nature de l'hormone de croissance sur l'induction des bourgeons axillaire**

La Zéatine et la BAP utilisées isolément ou additionnés avec l'ANA induisent la formation de bourgeons axillaires. Les pourcentages de bourgeonnement varient entre 62.50% (milieu MS additionné de 0.1mg/l BAP+1mg/l ANA) à 91.66% (milieu additionné de 2mg/l BAP) (Fig. 55).

La BAP semble être la meilleure hormone de croissance inductrice du bourgeonnement axillaire chez le rosier. Elles activent la totipotence végétale et favorisent la prolifération cellulaire des explants avec la concentration de 2mg/l. Nos résultats ont montré qu'à mesure que la concentration de BAP augmente, le nombre de pousses axillaires par explant augmente. Le nombre de bourgeons par explant optimum est obtenu en présence de 2 mg/l de BAP. Les plantes néoformées sont vigoureuses et de morphologie normale.

### **c. Enracinement et développement des bourgeons néoformés**

L'enracinement et la survie des néoformations dépendent généralement, de plusieurs facteurs environnementaux et autres spécifiques à la plante.

Pour obtenir des plantules entières il est nécessaire de repiquer les bourgeons sur un milieu avec des auxines. Dans notre travail un apport d'ANA à stimuler la rhizogénèse. Les bourgeons ayant initié quatre à six feuilles bien étalées ont été séparés et mis en culture sur des milieux de Murashige et Skoog, additionné de 0.5, 0.8, 1 et 2mg/l ANA. Les conditions de culture sont les mêmes que ceux qui ont servi à l'induction du bourgeonnement (température de 22°C, éclairement de 6000 lux à raison de 16 h, par jour).



**Figure 55:** Bourgeons axillaires développés sur boutures de Rosa



**Figure 56:** Développement de bourgeons axillaires de Rosa sur MS additionné de 2 mg BAP

## 5. Conclusions

Nos résultats ont montré qu'à partir de micro boutures, cultivés *in vitro* on peut régénérer des plantes entières. Les potentialités morphogènes des explants sont différentes et tributaires de nombreux facteurs :

- Le milieu de culture des explants et le type de l'hormone de croissance, le pourcentage de réussite atteint 91.66 % sur le milieu de MS additionné de 2mg/l BAP. Le nombre moyen de bourgeons par explant est de 3,22 sur le même milieu.
- Le facteur stimulant l'induction des bourgeons c'est l'hormone additionnée au milieu de Murashige and Skoog (MS). En effet, le milieu contenant la BAP semble être le plus favorable au bourgeonnement.
- Des bourgeons ayant initié quatre à six feuilles bien étalées ont été séparés et mis en culture sur des milieux de Murashige et Skoog, additionné de 0.5, 0.8, 1 et 1mg/l ANA. L'enracinement dépend de l'effet de la concentration de l'auxine et le milieu de culture.