

Étude histologique de l'embryogenèse somatique de l'olivier *Olea europaea* cv. Picholine marocaine

Najiba BRHADDA^{a*}, Loudyi dou ElMacane WALALI^b, Abdelhadi ABOUSALIM^b

^a Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Laboratoire de Physiologie végétale, Kenitra, Maroc
brhadda@hotmail.com

^b Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Département d'Horticulture, Madinat Al Irfane, Rabat, Maroc

Histological study of the somatic embryogenesis of Moroccan Picholine olive tree *Olea europaea*.

Abstract — Introduction. The olive-tree (*Olea europaea* L.) is the principal fruit-bearing species in Morocco. Until now, the somatic embryogenesis of the Picholine olive-tree was very little studied in spite of the importance of this variety in Morocco. We aimed at studying the effects of various culture media on the induction and the development of Picholine somatic embryos. **Materials and methods.** Whole seed cotyledons of olive-tree were cut after disinfection and explants were put in culture. The embryogenic callus initiation took place on a Murashige and Skoog culture medium, solidified with agar and containing 0.5 mg zeatine·L⁻¹ combined with various concentrations in naphthalene acetic acid (NAA) [(1, 2, 5, 10 and 40) mg·L⁻¹], control cultures being without growth regulators. After 3 weeks, calli were transferred on a medium either liquid, or solidified by agar or gelerite. After 6 weeks on the induction medium, calli were transferred on a medium maintained liquid or solidified by agar or gelerite, and containing 0.5 mg zeatine·L⁻¹, in order to support the development of the somatic embryos and, thereafter, their regeneration in seedlings. Induced callus rate and formed callus average weight were measured after 6 weeks of culture on the induction medium. A histological comparison was carried out between embryogenic calli and non embryogenic calli. **Results.** The callus induction was significantly influenced by the concentration in ANA. The best results were obtained with 2 mg ANA·L⁻¹ for the callus induction (82,3%) and 5 mg ANA·L⁻¹ for the callus development (150 mg). The liquid medium proved to be the best for the callus induction and the agar medium supported the callus development and the seedling regeneration by somatic embryogenesis. Gelerite use did not allow any morphogenesis. Regenerated and acclimatized seedlings presented a normal growth in greenhouse. **Conclusion.** Somatic embryogenesis would be exploitable for the olive-tree micropropagation in Morocco.

Morocco / *Olea europaea* / plant propagation / in vitro culture / micropropagation / somatic embryogenesis / culture media

Étude histologique de l'embryogenèse somatique de l'olivier *Olea europaea* cv. Picholine marocaine.

Résumé — Introduction. L'olivier (*Olea europaea* L.) est la principale espèce fruitière exploitée au Maroc. L'embryogenèse somatique de la Picholine marocaine a été jusqu'à présent très peu étudiée malgré l'importance de cette variété au Maroc. L'objectif de nos recherches a été d'étudier les effets de divers milieux de culture sur l'induction et le développement d'embryons somatiques chez cette variété. **Matériel et méthodes.** Des cotylédons entiers de graines d'olivier ont été excisés après désinfection et mis en culture. L'initiation des cals embryogènes a eu lieu sur un milieu de culture de Murashige et Skoog, solidifié par de l'agar et contenant 0,5 mg de zéatine·L⁻¹ combinée à différentes concentrations en acide naphthalène acétique (ANA) [(1, 2, 5, 10 et 40) mg·L⁻¹], les cultures témoins étant sans régulateurs de croissance. Après 3 semaines, les cals ont été transférés dans un milieu soit liquide, soit solidifié par de l'agar ou de la gélerite. Après 6 semaines sur le milieu d'induction, les cals ont été transférés sur un milieu maintenu liquide ou solidifié par de l'agar ou de la gélerite, et contenant 0,5 mg·L⁻¹ de zéatine, afin de favoriser le développement des embryons somatiques et, par la suite, leur régénération en plantules. Le taux de cals induits et le poids moyens des cals formés sur les différents milieux ont été mesurés après 6 semaines de culture sur le milieu d'induction. Une analyse histologique des cals embryogènes et non embryogènes a été effectuée. **Résultats.** L'induction des cals a significativement été influencée par la concentration en ANA. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec 2 mg ANA·L⁻¹ pour l'induction des cals (82,3 %) et 5 mg ANA·L⁻¹ pour le développement de ces cals (150 mg). Le milieu liquide s'est révélé être le meilleur pour l'induction des cals et le milieu avec agar a favorisé le développement des cals et la régénération de plantules par embryogenèse somatique. L'utilisation de la gélerite n'a permis aucune morphogénèse. Les plantules régénérées et acclimatées ont présenté une croissance normale en serre. **Conclusion.** L'embryogenèse somatique serait exploitable pour la micropropagation de l'olivier au Maroc.

Maroc / *Olea europaea* / multiplication des plantes / culture in vitro / micropropagation / embryogenèse somatique / milieu de culture

* Correspondance et tirés à part

Reçu le 12 mai 2006

Accepté le 29 septembre 2006

Fruits, 2007, vol. 62, p. 115–124
© 2007 Cirad/EDP Sciences
All rights reserved
DOI: 10.1051/fruits:2007005
www.edpsciences.org/fruits

RESUMEN ESPAÑOL, p. 124

1. Introduction

L'olivier (*Olea europaea* L.) constitue la principale espèce fruitière au Maroc. Cet arbre est un élément majeur de l'économie agricole ; ses produits sont appréciés pour leur haute valeur nutritionnelle et médicinale. Cependant, l'olivier est une espèce pour laquelle les résultats de l'amélioration génétique sont encore rares à cause de la phase juvénile très longue de l'arbre (10 à 15) ans] et de son auto-incompatibilité [1]. Une synthèse des travaux réalisés a mis en évidence que les connaissances sur la micropropagation de l'espèce étaient assez sommaires [2].

L'embryogenèse somatique, expérimentée sur un grand nombre d'espèces, présente des perspectives très prometteuses pour la propagation des cultivars récalcitrants et pour la création de nouveaux génotypes. Cette voie offre de grandes potentialités en matière de production industrielle de plants. Les embryons somatiques constituent un matériel de base important pour analyser les événements biochimiques et moléculaires intervenant durant l'induction et la maturation des cals embryogènes.

Si des résultats importants ont été obtenus en embryogenèse somatique chez l'olivier, beaucoup de problèmes n'ont pas encore été résolus dont, principalement, l'apparition fréquente de formes anormales ou teratomeuses, le manque de synchronisation dans le développement des embryons, la difficulté d'entretien des masses embryonnaires ou des cals embryogènes [3].

Quelques travaux achevés sur l'embryogenèse somatique de l'olivier ont abouti à la régénération de plantes chez certains cultivars, notamment Dolce agogia, Leccino, Frantoio, Moraiolo et Picholine [4, 5], Canino [6, 7], l'olivier sauvage var. *sylvestris* [8] et, récemment, chez le cultivar Chalkidikis [9]. Chez la Picholine marocaine, cultivar le plus important au Maroc qui représente près de 98 % des plantations oléicoles, quelques travaux seulement ont porté sur l'embryogenèse somatique [10] ; ils ont mis en évidence un effet du milieu de culture et de l'explant, et ils ont montré la supériorité du milieu de Murashige et Skoog sur d'autres formulations testées. Chez ce cultivar, les facteurs

contrôlant la germination *in vitro* des embryons zygotiques ont été aussi étudiés [5].

Une embryogenèse somatique directe a été observée chez certains cultivars d'olivier et les analyses histologiques ont révélé que, dans le cas d'une embryogenèse somatique secondaire, le deuxième embryon prenait alors naissance à partir de la couche superficielle (épidermique) du premier embryon (primaire) [11]. Une analyse des résultats obtenus chez l'olivier a montré que la réussite de l'embryogenèse somatique dépend de plusieurs facteurs dont, entre autres, le génotype [12], le type d'explant utilisé [13], la composition minérale et hormonale [1, 13] et l'état physique du milieu de culture [6].

L'objectif de nos recherches a été d'étudier les effets de la concentration en acide naphthalène acétique (ANA) et de certains agents solidifiants, ainsi que ceux d'un milieu liquide, sur l'induction et le développement d'embryons somatiques chez la Picholine marocaine. Une comparaison histologique a été effectuée entre les cals embryogènes et les cals non embryogènes.

2. Matériel et méthodes

2.1. Source d'explants et désinfection

Des graines de Picholine marocaine ont été désinfectées pendant 2 min avec de l'éthanol à 70 %, puis trempées durant 15 min dans une solution d'hypochlorite de sodium à 50 % additionnée de deux à trois gouttes de Tween 20 (agent mouillant). Elles ont alors été rincées trois à quatre fois avec de l'eau distillée stérile, puis imbibées sur du papier filtre stérile placé en boîtes de Petri ; l'incubation a eu lieu pendant 24 h à une température de (25 ± 2) °C et à l'obscurité. Les cotylédons entiers ont ensuite été excisés et mis en culture.

2.2. Milieux et conditions de culture

2.2.1. Phase d'induction des cals

Le milieu de culture utilisé a été le milieu Murashige et Skoog (MS) [14] additionné

d'ANA aux concentrations (1, 2, 5, 10 et 40) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, les cultures témoins étant sans régulateurs de croissance. En phase d'induction, les milieux de culture contenant 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de saccharose ont été solidifiés par 0,8 % d'agar (bactériologique, Difco) ; leur stérilisation a été faite par un autoclavage de 20 min à 121 °C, après ajustement du pH à 5,8.

Les cultures ont été maintenues à l'obscurité à (25 ± 2) °C, pendant 3 semaines. Les cals ont ensuite été transférés dans un milieu frais soit liquide, soit solidifié par du bactoagar à 0,8 % ou de la gélerite à 0,2 %.

La culture des cals a lieu dans 20 mL de milieux répartis dans des boîtes de Petri pour les milieux solides ou dans des bocaux pour le milieu liquide. Dans ce dernier cas, les bocaux ont été maintenus en agitation continue durant la culture.

2.2.2. Phase de développement et de régénération

Après 6 semaines sur le milieu d'induction, les cals ont été transférés sur un milieu de développement maintenu liquide ou solidifié par du bactoagar ou de la gélerite, et contenant 0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zéatine (Sigma), afin de favoriser le développement des embryons somatiques et, par la suite, leur régénération en plantules. Au stade régénération, les explants ont été transférés dans des tubes à essai contenant 15 mL de milieu de culture.

La phase de développement et de régénération des plantules a eu lieu à la lumière sous une photopériode de 16 h. La température a été maintenue à (25 ± 2) °C.

Les plantules somatiques obtenues présentant des racines bien développées et au moins deux feuilles ont été repiquées dans des pots contenant un substrat composé de 1 volume de tourbe, pour 0,5 volume de sable et 1 volume de vermiculite, préalablement autoclavé pendant 60 min. L'acclimatation a eu lieu sous serre, en conditions contrôlées.

2.3. Analyses statistiques

Chaque traitement a été appliqué à 20 explants et répété cinq fois. Il y a donc eu 100 explants concernés par traitement. Un dispositif en blocs complètement aléa-

toires a été adopté. Le test de Newman et Keuls [15], au seuil de 5 %, a été utilisé pour le classement des moyennes. Les pourcentages égaux à 0 (absence de cals formés par les explants mis en culture au départ) ont subi la transformation $(1/4 n)$, n étant le nombre d'explants mis en culture, et les pourcentages (P) différents de 0 ont subi la transformation $\arcsin \sqrt{P}$ avant de procéder à l'analyse de variance.

2.4. Histologie

La fixation des cals a eu lieu dans un mélange de trois volumes d'alcool à 95° et d'un volume d'acide acétique pur durant 24 h. Le matériel végétal a été déshydraté par passage dans une série de bains d'alcool à 70°, 95° et 100°, à raison de deux bains par concentration ; la durée de chaque bain a été de 24 h. Après déshydratation complète, le matériel a été transféré dans deux bains successifs de toluène, solvant de la paraffine, de 24 h chacun. L'inclusion a lieu dans trois bains successifs de paraffine maintenue à 80 °C, chaque bain étant de 60 min.

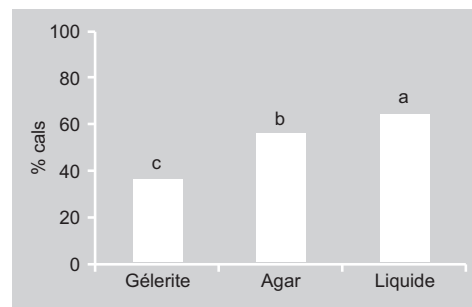
Les coupes de 7 μm d'épaisseur, faite au microtome, ont été étalées sur des lames parfaitement dégraissées. Trois gouttes du liquide d'étalement constitué d'eau gélifiée de Masson (gélatine à 1 % additionnée de quelques gouttes de bichromate de potassium à 2 %) ont été préalablement déposées sur la lame séchée et marquée. Les coupes ont été prélevées dans les parties supérieures, médianes et inférieures de chaque échantillon.

Les lames ont ensuite été séchées pendant 24 h sur une plaque chauffante réglée à 38 °C. Les coupes ont été déparaffinées par passage dans un bain de toluène (5 min), puis trempées dans trois bains successifs d'éthanol à 100°, 90° et 70°, chaque bain étant de 2 min. Les différentes coupes réalisées ont été colorées à la safranine (1 %) pendant 60 min, puis au *fast green* (1 %), pendant quelques secondes.

Les coupes ont été déshydratées dans deux bains successifs d'alcool isopropyle de 5 min chacun. Elles ont été ensuite placées dans un bain de toluène pendant 5 min afin de les éclaircir, puis montées dans du baume de Canada.

Figure 1.

Effet de la consistance du milieu de culture sur l'induction des cals après 6 semaines de culture d'explants cotylédonaux de graines d'olivier. Les pourcentages suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents selon la méthode de Newman et Keuls au seuil de 5 %.



3. Résultats

3.1. Induction des cals

3.1.1. Effet de la consistance du milieu

L'induction des cals a été la meilleure pour les explants mis en culture sur milieu liquide (63,8 %). L'utilisation de gélerite et d'agar a significativement ($P \leq 0,05$) affecté l'induction des cals dont le taux a été, respectivement, de 35,8 % et 55,3 % pour l'un et l'autre de ces agents solidifiants (*figure 1*).

3.1.2. Effet de la concentration en ANA

L'induction des cals a été significativement affectée ($P \leq 0,05$) par la concentration en acide naphthalène acétique du milieu de culture. Les meilleurs résultats (82,3 %) ont été

obtenus avec 2 mg ANA·L⁻¹. Les milieux de culture dosés à (1 et 5) mg ANA·L⁻¹ ont permis d'observer, respectivement, 59,3 % et 58 % de cals formés, alors que la plus forte concentration en auxine testée (40 mg ANA·L⁻¹) et son absence dans le milieu ont induit le plus faible taux de formation de cals (*figure 2*).

3.1.3. Interaction entre la consistance du milieu de culture et sa concentration en ANA

L'interaction entre la consistance du milieu de culture et sa concentration en ANA s'est révélée significative ($P \leq 0,05$). C'est le milieu liquide contenant 2 mg ANA·L⁻¹ qui a permis d'obtenir la meilleure induction de cals (94 %) (*figure 3*).

3.2. Développement des cals

La croissance des cals a été significativement ($P \leq 0,05$) affectée par la consistance du milieu de culture. Le poids moyen le plus élevé (139,7 mg) a été obtenu sur un milieu avec agar, alors que, en milieu liquide, le développement n'a été que de 48,8 mg (*figure 4*).

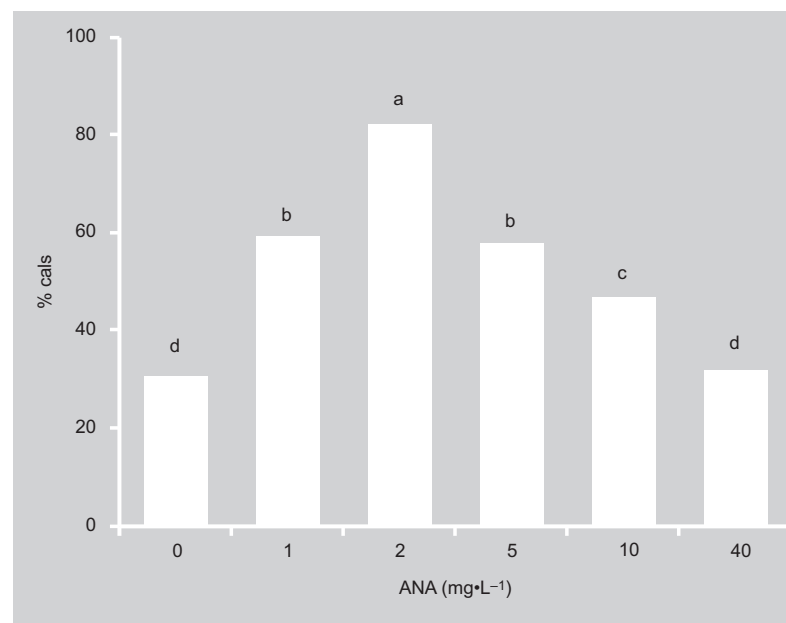
L'agent solidifiant utilisé (gélerite ou agar) a semblé influencer le type, la texture et la coloration des cals. Ainsi, sur milieu avec gélerite, les cals ont été majoritairement mucilagineux, présentant des parties compactes et d'autres friables. En revanche, dans le cas de milieux avec agar ou de milieux liquides, les cals ont été compacts et de couleur blanc-verdâtre.

Les cals embryogènes se sont développés en présence de (1, 2 et surtout 5) mg ANA·L⁻¹ (cals de 150 mg en moyenne), l'effet de la concentration en ANA étant significatif ($P \leq 0,05$) (*figure 5*). Plus la concentration du milieu culture en ANA a été élevée, plus la croissance des cals embryogènes a diminué et la plupart des cals sont alors restés de petite taille (*figure 5*).

L'interaction entre la consistance du milieu de culture et sa concentration en ANA a été significative ($P \leq 0,05$) (*figure 6*). Un brunissement des cals a été observé avec 40 mg ANA·L⁻¹ et cela surtout sur le milieu avec gélerite. Dans ce type de milieu solidifié, la

Figure 2.

Effet de la concentration en ANA dans le milieu de culture sur l'induction des cals après 6 semaines de culture d'explants cotylédonaux de graines d'olivier. Les pourcentages suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents selon la méthode de Newman et Keuls au seuil de 5 %.



croissance des cals a été lente quelle qu'ait été la concentration en ANA utilisée. Les plus faibles développements des cals ont été observés sur milieu liquide (figure 6).

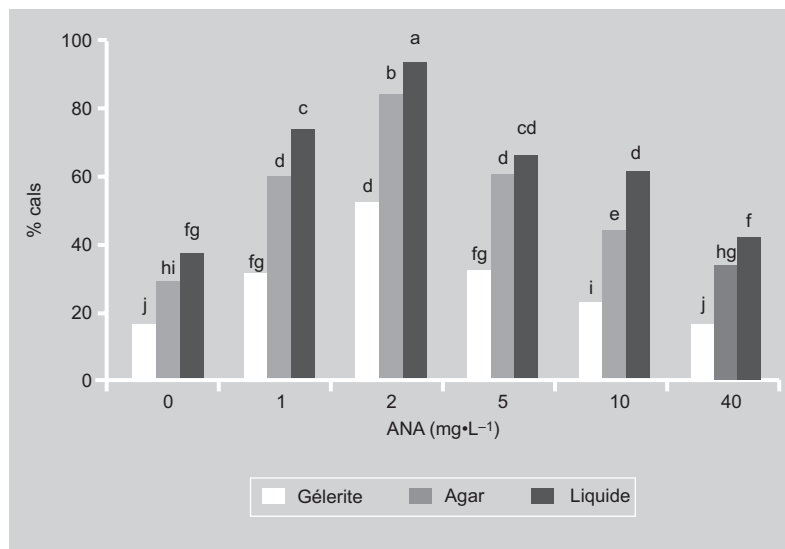
3.3. Résultats d'histologie

Notre étude a porté sur deux types de cals : les cals embryogènes et les cals non embryogènes. Les structures globulaires observées sur les cals d'aspect compact ont été analysées par cytologie, ce qui nous a permis d'identifier des embryons somatiques formés à partir de cals embryogènes présentant des groupements vasculaires et des centres méristématiques. En revanche, l'observation de cals non embryogènes n'a révélé que la présence de lacunes intercellulaires.

L'observation des coupes réalisées au niveau des cals globulaires, compacts et embryogènes a révélé la présence de zones d'activité méristématique intense caractérisées par un groupe d'au moins cinq cellules méristématiques localisées soit dans le cal, soit à sa périphérie. Les centres méristématiques observés se sont révélés être composés de petites cellules sphériques à cytoplasme dense, très peu vacuolées, et renfermant un noyau central bien visible avec un nucléole proéminent. Les cellules situées autour des centres méristématiques sont volumineuses ; elles possèdent un noyau plus petit que celui des cellules méristématiques et leur cytoplasme est transparent. L'analyse des coupes histologiques montre une initiation indirecte des embryons somatiques par l'intermédiaire du cal.

Toutefois, les cals embryogènes produisent des groupements d'embryons somatiques présentant différents stades de différenciation : forme globulaire (figure 7), cordiforme (figures 8 et 9), et cotylédonaire. Les embryons somatiques qui demeurent attachés au cal ont révélé la présence d'un suspenseur.

Plusieurs embryons somatiques ont pu être ainsi initiés sur un même cal. Dans les milieux contenant de l'ANA, plusieurs cals n'ont formé que des racines, alors que l'embryon somatique différencié a permis d'observer la présence d'un pôle apical avec des cotylédons et d'un pôle radiculaire.



3.4. Régénération d'embryons somatiques

Les analyses histologiques ont confirmé la nature embryogène des cals issus des explants cultivés *in vitro*. Aucune régénération n'a été notée par culture de cals sur milieux solidifiés par de la gélerite. En revanche, les cals entretenus sur le milieu solidifié par l'agar et le milieu liquide ont manifesté des régénérations de plantules par embryogenèse somatique en présence de (1, 2 ou 5) mg ANA·L⁻¹ dans le cas du milieu avec agar, et en présence de (2 ou 5) mg ANA·L⁻¹ dans le cas du milieu liquide. Le taux maximal de régénération (37 %) a été observé sur le milieu solidifié par l'agar et contenant 2 mg ANA·L⁻¹. L'interaction [concentration en ANA × consistance du milieu] s'est révélée significative ($P \leq 0,05$) (tableau D).

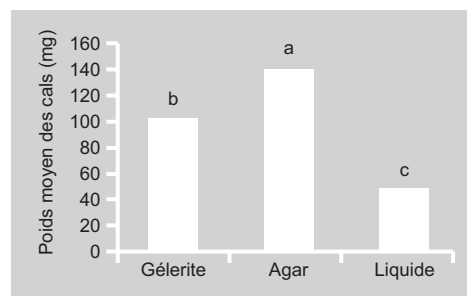


Figure 3. Effet de l'interaction entre la consistance du milieu de culture et sa concentration en ANA sur l'induction des cals après 6 semaines de culture d'explants cotylédonaire de graines d'olivier. Les pourcentages suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents selon la méthode de Newman et Keuls au seuil de 5 %.

Figure 4. Effet de la consistance du milieu de culture sur le poids moyen des cals obtenus après 6 semaines de culture d'explants cotylédonaire de graines d'olivier. Les pourcentages suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents selon la méthode de Newman et Keuls au seuil de 5 %.

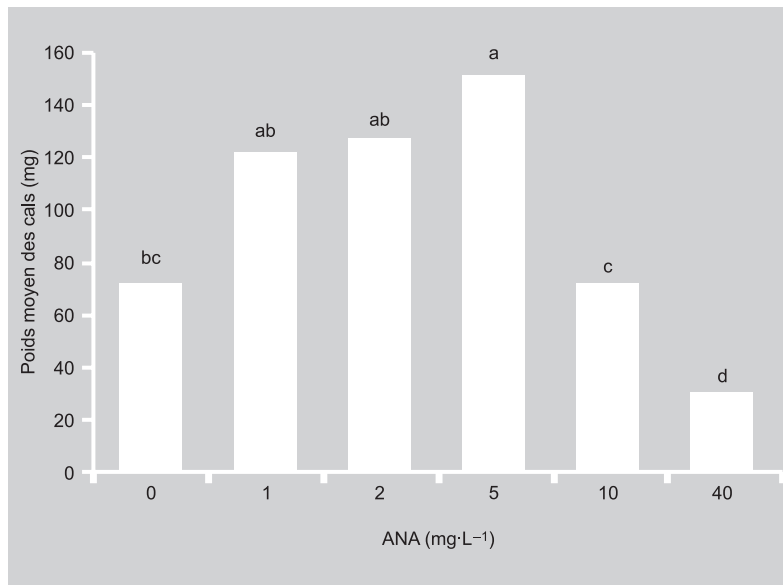
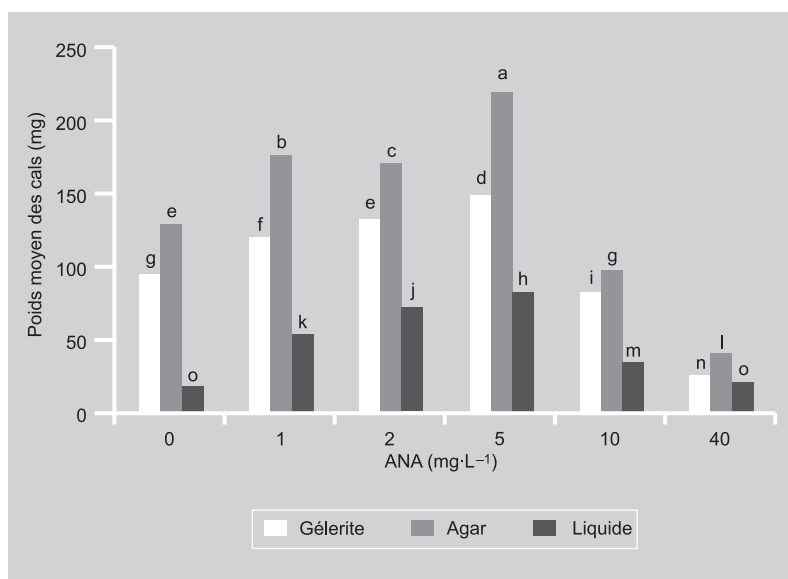


Figure 5. Effet de la concentration en ANA du milieu de culture sur le poids moyen des cals obtenus après 6 semaines de culture d'explants cotylédonaire de graines d'olivier. Les pourcentages suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents selon la méthode de Newman et Keuls au seuil de 5 %.

Figure 6. Effet de l'interaction entre la consistance du milieu de culture et sa concentration en ANA sur le poids moyen des cals obtenus après 6 semaines de culture d'explants cotylédonaire de graines d'olivier. Les pourcentages suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents selon la méthode de Newman et Keuls au seuil de 5 %.



Les plantules régénérées se détachent facilement des cals, cependant certains cals mis en culture dans le milieu solidifié par l'agar n'ont formé que des racines. Le pourcentage d'induction racinaire le plus élevé (50 %) a alors été observé en présence de 2 mg ANA·L⁻¹ (tableau I). En revanche, sur milieu liquide et sur milieu solidifié par de la gélerite, aucun cal ne formant que des racines n'a pu être noté.

Sous serre, en conditions environnementales contrôlées, 84 % des plantules régénérées sur le milieu avec agar et 78 % de celles formées sur milieu liquide ont continué à évoluer ; ces différences de taux ont été significatives ($P \leq 0,05$) et les plantules obtenues ont été morphologiquement identiques aux plantes mères.

4. Discussion et conclusion

Une embryogenèse somatique a été induite et des plantules ont été régénérées à partir de fragments de cotylédons prélevés sur des graines de la Picholine marocaine. Le protocole utilisé pourrait être appliqué à la recherche de variations somaclonales et dans des études de la transformation génétique de l'olivier.

Notre étude a mis en évidence une variation dans l'induction des cals et le développement des embryons somatiques et, par suite, leur régénération en plantules en fonction de la consistance du milieu de culture et de la concentration d'auxine utilisée.

La consistance du milieu de culture est un facteur important puisque, pour certaines plantes, l'échec ou le succès de la culture *in vitro* en dépend [16]. L'induction des embryons somatiques peut s'effectuer soit sur un milieu gélosé, soit en suspension liquide. La culture en suspension liquide présente plusieurs avantages par rapport à celle sur milieu solide. En effet, sur milieu solide, la croissance du cal intact est relativement lente car seule une petite partie est en contact avec le milieu ; l'oxygénation est relativement lente et des gradients peuvent s'établir au sein du cal menant à une différenciation anticipée [17]. En revanche, le milieu liquide permet une meilleure

observation des embryons et facilite le développement des structures embryogènes comme cela a été noté chez *Quercus suber* [18]. Abbot [19] a signalé que l'avantage du milieu liquide résidait dans le fait que toutes les cellules se retrouvent en contact avec le milieu, contrairement au cal compact mis sur milieu gélosé.

Nos expérimentations ont montré que le milieu liquide favorisait l'induction des cals embryogènes alors que le milieu solidifié avec de l'agar était propice au développement ultérieur de ces cals. Le milieu solidifié avec de la gélerite n'a pas été favorable à l'embryogenèse somatique de l'olivier, cultivar Picholine marocaine, mais, chez d'autres espèces tel que le pêcher [20], le manguier [21] et le pin [22], il s'est révélé plus efficace que le milieu avec agar pour l'induction des cals embryogènes, la production et la maturation des embryons somatiques.

Chez l'olivier, cultivar Canino, Rugini et Caricato [6] ont trouvé que la croissance et le développement des cals embryogènes étaient améliorés par l'utilisation de phytagel comme agent solidifiant comparative-ment au bactoagar. Chez le concombre, l'induction des tissus embryogènes et la production d'embryons somatiques ont été meilleures en milieu avec agar, alors que la germination des embryons était optimale sur un milieu avec gélerite [23]. Ces résultats [6, 23] indiqueraient que le facteur génétique serait déterminant dans le choix du milieu de culture à utiliser, d'où la nécessité d'adapter la composition minérale du milieu au cultivar à multiplier. Cette différence serait liée à des exigences nutritionnelles variables selon le génotype [6, 23].

Nos résultats ont également révélé l'importance des régulateurs de croissance dans l'embryogenèse somatique de l'olivier. En effet, la présence de l'auxine exogène (ANA) a été un facteur clé pour l'induction des embryons somatiques. Chez d'autres espèces, l'auxine serait critique pour l'induction des embryons somatiques [4, 24, 25].

Lors de nos travaux, tous les embryons ont été induits à partir de cals. Cependant, chez d'autres cultivars d'olivier comme Dolce agogia, Leccino, Moraiolo et Frantoio, 40 % des embryons somatiques se sont

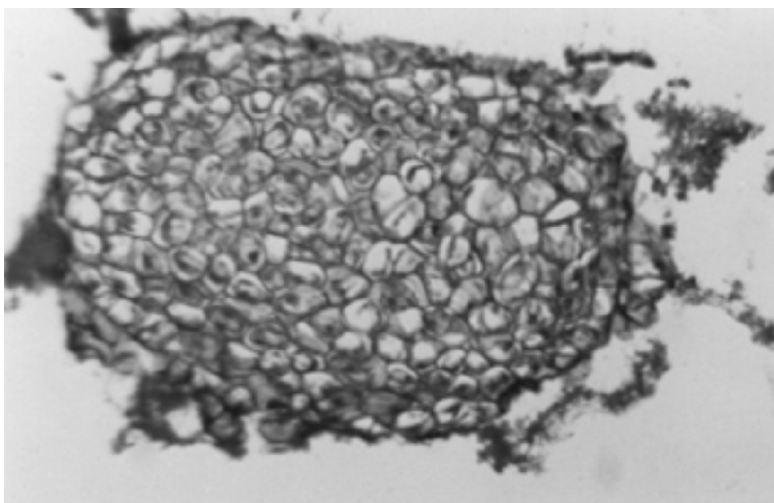
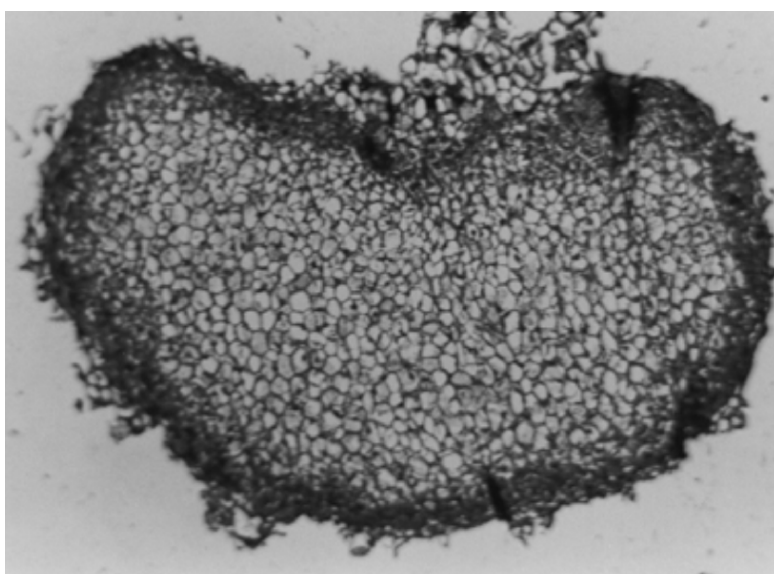


Figure 7. Stade globulaire d'un embryon somatique formé par un cal d'explant cotylédonaire d'olivier (variété Picholine) développé après 6 semaines de culture sur milieu MS liquide additionné de 2 mg ANA·L⁻¹ d'ANA (×100).

développés directement sur les embryons zygotiques immatures et seulement 10 % à partir de cals [4]. Cela étant, les embryons immatures ne sont disponibles que pendant une courte période de l'année, alors que les cotylédons peuvent être facilement obtenus tout au long de l'année.

À noter que des embryons secondaires ont été observés sur certaines structures globulaires. En effet, au cours des transferts, certains cals embryogènes ont continué à former des embryoides qui ont différencié des embryons secondaires qui se sont formés dans la région basale des premiers embryons. Apparemment, la présence des

Figure 8. Stade cœur d'un embryon somatique formé par un cal d'explant cotylédonaire d'olivier (variété Picholine) développé après 7 semaines de culture sur milieu solidifié avec de l'agar et additionné de 5 mg ANA·L⁻¹ d'ANA (×100).



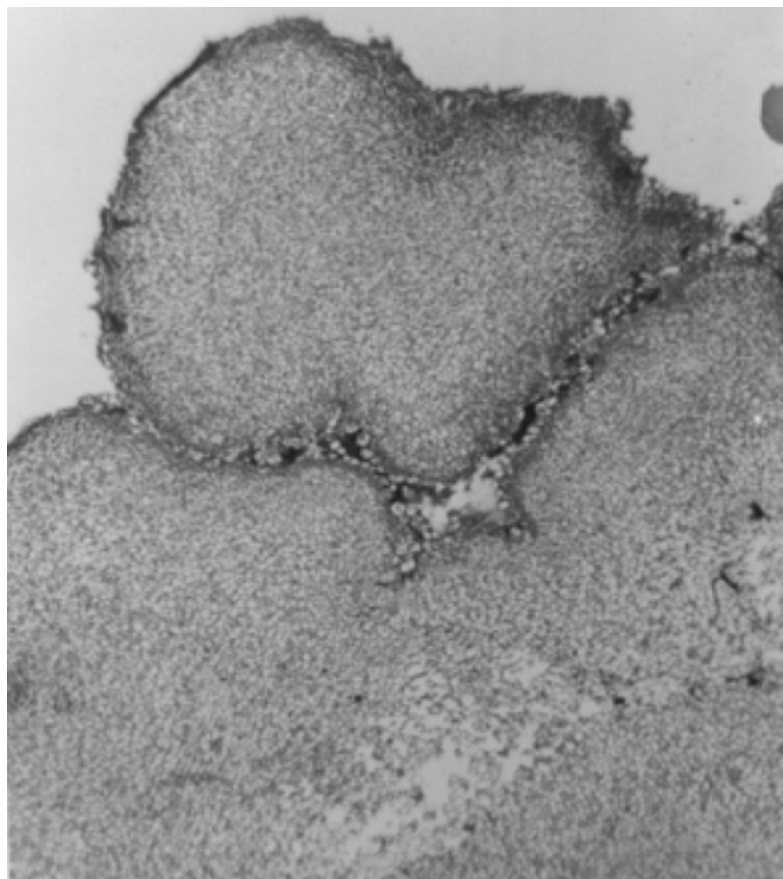


Figure 9. Embryon somatique au stade cœur, formé par un cal d'explant cotylédonaire d'olivier (variété Picholine), développé après 6 semaines de culture sur milieu MS liquide additionné de 2 mg ANA·L⁻¹ d'ANA : observation de primordia cotylédonaire et d'un épiderme bien différencié (×100).

proembryons aurait un effet stimulateur sur la formation de nouveaux embryoides secondaires, comme cela a été avancé par

Staritsky [26], Sondahl et Sharp [27] et Sondahl *et al.* [28] dans le cas du café (*Coffea arabica*).

Certains cals, en présence d'ANA, n'ont formé que des racines. De même, Rubos et Pryke [29] avaient signalé la formation de racines par des cals issus de fragments de cotylédons de Golden délicious, mis en présence d'ANA.

La zone racinaire complète la bipolarité de l'embryon somatique et souvent supporte de nouveaux embryoides. En culture *in vitro*, les cellules des tissus différenciés subissent des modifications profondes de leur structure. À la suite de leur séparation d'avec la plante-mère et de l'activation mitotique provoquée par la blessure, les cellules subissent une différenciation qui les ramène d'un état adulte à un état juvénile. Une fois dédifférenciées, les cellules sont capables de s'orienter différemment, suivant les conditions de culture.

Selon nos résultats, les explants prélevés sur les graines d'olivier et cultivés *in vitro* peuvent produire des embryons somatiques à diverses conditions. Notre procédure permet donc la régénération de plantules d'olivier à partir de fragments de cotylédons, ce qui peut être particulièrement utile pour la régénération des plantes transgéniques. Pour la première fois, une étude histologique des cals embryogènes et non embryogènes de l'olivier a été réalisée au Maroc.

Tableau I.

Effet de l'agent solidifiant et de la consistance du milieu de culture sur la morphogenèse d'explants de cotylédons d'olivier après 3 mois de culture *in vitro*. Aucune racine n'a été formée en milieu liquide, quelle qu'ait été la dose d'ANA ajoutée au milieu, de même aucune racine n'a été formée en absence d'ANA ou avec les doses plus fortes doses d'ANA [(10 et 40) mg·L⁻¹], quel qu'ait été la consistance du milieu.

ANA (mg·L ⁻¹)	Plantules (%)		Racines (%)
	Agar	Milieu liquide	Agar
1	12 d	0	18 c
2	37 a	20 bc	50 a
5	22 b	18 c	30 b

Les pourcentages suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents selon la méthode de Newman et Keuls au seuil de 5 %.

Références

- [1] Revilla M.A., Pacheco J., Casares A., Rodriguez R., *In vitro* reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting, *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* (32) (1996) 257–261.
- [2] Cimato A., Propagation et certification des plants. L'élevage des plants d'olivier en pépinière, in: Actes du séminaire international sur les innovations scientifiques et leur application en oléiculture et oléotechnie, Cons. Oléic. Int. Florence, Florence, Italie, 1999, pp. 1–30.
- [3] Rugini E., Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.), in: Jain S., Gupta P., Newton R. (Eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Netherlands, 2, 1995, 171–189.
- [4] Rugini E., Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.), *Plant Cell Tiss. Org.* 14 (1988) 207–214.
- [5] Brhadda N., Walali L.D.M., Abousalim A., Benali D., Effet de la température et de l'endosperme sur la dormance et la germination des embryons d'olivier (*Olea europaea* L.) variété Picholine marocaine, *Agronomie* 20 (2000) 643–653.
- [6] Rugini E., Caricato G., Somatic embryogenesis and recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) 'Canino' and 'Maraiolo', *Plant Cell Rep.* 14 (1995) 257–260.
- [7] Lambardi M., Capuana M., Sozzi L., Giannini R., Lambardi M., Capuana M., Sozzi L., Giannini R., Factors affecting *in vitro* adventitious bud induction from excised embryos of Swiss stone pine (*Pinus ombra* L.), *For. Genet.* 2 (1995) 49–58.
- [8] Orinos T., Mitrakos K., Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (*Olea europaea* L.) var. *sylvestris* (Miller) mature zygotic embryos, *Plant Cell Tiss. Org.* 27 (1991) 183–187.
- [9] Grigoriadou K., Vasilakakis M., Eleftheriou E.P., *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar Chondrolia Chalkidikis, *Plant Cell Tiss. Org.* 71 (1) (2002) 47–54.
- [10] Brhadda N., Abousalim A., Walali L.D.M., Effets du milieu de culture et la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine marocaine, *Fruits* 58 (3) (2003) 167–174.
- [11] Lambardi M., Caccovale A., Rugini E., Caricato G., Histological observation on somatic embryos of olive (*Olea europaea* L.), *Acta Hort.* 474 (1999) 67–69.
- [12] Leva A.R., Muleo R., Petrucelli R., Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons, *J. Hort. Sci.* 70 (3) (1995) 417–421.
- [13] Mencucini M., Rugini E., *In vitro* shoot regeneration from olive cultivar tissues, *Plant Cell Tiss. Org.* 32 (1993) 283–288.
- [14] Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, *Physiol. Plantarum* 15 (1962) 473–492.
- [15] Dagnelie P., Théorie et méthodes statistiques, application agronomique, Gembloux, vol. 2, Presses Agron., Gembloux, Belgique, 1980, 463 p.
- [16] Waithaka K., Micropropagation techniques and the production of pathogen free, *Plant. Cell Tiss. Org.* 28 (1992) 183–188.
- [17] Pierick R.L.M., *In vitro* culture of higher plants, Dep. Hortic., Agric. Univ., Wageningen, Neth., 1984, 120 p.
- [18] Puigderrajols P., Fernandezguijarro B., Toribio M., Molinas M., Origin and early development of secondary embryos in *Quercus suber* L., *Int. J. Plant. Sci.* 157 (6) (1996) 674–684.
- [19] Abbot A.J., Practice and promise of micropropagation of woody species, *Acta Hort.* 79 (1978) 113–120.
- [20] Scorza R., Cordts J.J., Mante S., Long-term somatic embryo production and plant regeneration from embryo-derived peach callus, *Acta Hort.* 280 (1990) 183–190.
- [21] Dewald S.G., Litz R.E., Moorge G.A., Optimizing somatic embryo production in mango, *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 114 (4) (1989) 712–716.
- [22] Lelu M.A., Gellan gum and abscissic acid improve somatic embryogenesis of pines, *Physiol. Plantarum* 150 (4) (1999) 719–728.
- [23] Ladyman J.A.R., Girard B., Cucumber somatic embryo development on various gelling agents and carbohydrate sources, *HortScience* 27 (2) (1992) 164–165.
- [24] Boulay M., Recherches préliminaires sur l'embryogenèse somatique d'*Eucalyptus gunnii*, *Ann. A.FO.CEL*, France, 1987, 24–37.
- [25] Paul H., Belaizi M., Sangwan N.B.S., Somatic embryogenesis in apple, *J. Plant. Physiol.* 143 (1994) 78–86.

- [26] Staritsky G., Embryoid formation in callus tissues of coffee, *Acta. Bot. Neerl.* 19 (4) (1970) 509–514.
- [27] Sondahl M.R., Sharp W.R., High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L., *Z. Pflanzen-physiol.* 81 (1977) 395–408.
- [28] Sondahl M.R., Evans D.A., Sharp W.R., Coffee cell culture. Growth and somatic embryogenesis, *Newsl. Int. Ass. Plant. Tiss. Cult.* 30 (1980) 2–7.
- [29] Rubos A., Pryke J.A., Morphogenesis in embryonic tissue cultures of apple, *J. Hortic. Sci.* 59 (1984) 469–475.

Estudio histológico de la embriogénesis somática del olivo cv. Picholina marroquí.

Resumen — Introducción. El olivo (*Olea europaea* L.) constituye la principal especie frutal en Marruecos. La embriogénesis somática de la Picholina marroquí se estudió muy poco hasta ahora, a pesar de la importancia de esta variedad en Marruecos. El objetivo de nuestras investigaciones fue estudiar los efectos de diferentes medios de cultivo sobre la inducción y el desarrollo de embriones somáticos en esta variedad. **Material y métodos.** Se extirparon cotiledones enteros de semillas de olivo tras desinfección y se pusieron en cultivo. El inicio de los callos de embriogenes tuvo lugar en medio de cultivo de Murashige y Skoog, solidificado mediante agar y con un contenido de 0,5 mg de zeatina·L⁻¹ combinada con diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) [(1, 2, 5, 10 y 40) mg·L⁻¹], los cultivos testigo no poseían reguladores de crecimiento. Después de tres semanas los callos se transfirieron en un medio o bien líquido, o bien solidificado a través de agar o de gelerita. Tras 6 semanas en medio de inducción, se transfirieron los callos a un medio mantenido líquido o solidificado mediante agar o gelerita, y con un contenido de 0,5 mg·L⁻¹ de zeatina, con el fin de favorecer el desarrollo de los embriones somáticos; y, consecuentemente, su regeneración en plántulas. Se midieron tras 6^o semanas de cultivo en medio de inducción los porcentajes de callos inducidos y los pesos medios de callos formados en diferentes medios. Se llevó a cabo un análisis histológico de los callos embriógenos y no embriógenos. **Resultados.** La inducción de los callos se influenció significativamente por la concentración de ANA. Se obtuvieron los mejores resultados con 2 mg ANA·L⁻¹ para la inducción de los callos (82,3 %) y 5 mg ANA·L⁻¹ para el desarrollo de estos callos (150 mg). El medio líquido resultó ser el mejor para la inducción de los callos, y el medio con agar favoreció el desarrollo de los callos así como la regeneración de plántulas mediante embriogénesis somática. El uso de gelerita no permitió ninguna morfogénesis. Las plántulas regeneradas y aclimatadas presentaron un crecimiento normal en invernadero. **Conclusión.** La embriogénesis somática sería explotable por la micropropagación del olivo en Marruecos.

Marruecos / *Olea europaea* / propagación de plantas / cultivo *in vitro* / micropropagación / embriogénesis somática / medio de cultivo