

N° d'ordre :

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENNE

USTHB - ALGER

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister

en Sciences Biologiques

Spécialité : Eco biologie et Amélioration Végétales

Par

Naima BENASSEL

Thème

Contribution à la conservation et à la propagation des
plantes rares: étude de la reproduction et de la
multiplication *in vitro* d'une Bignoniaceae
Amphitecna macrophylla (Seem) Miers.

Soutenu le 22 Juin devant le jury composé de :

M ^{elle} F. AID	Professeur –USTHB	Présidente
M ^{me} N. BOUGUEDOURA	Professeur –USTHB	Directeur
M ^{elle} H. HADJ ARAB	Chargée de cours –USTHB	Codirecteur
M ^{me} F. CHAOUCH	Chargée de cours—INES Blida	Examineur
M ^{me} O. ABROUS	Maître de conférence--USTHB	Examineur
M ^{me} N. AMIROUCHE	Chargée de cours –USTHB	Examineur

A mes parents

A mes frères et sœurs

A mes chères amies

Je dédie ce modeste travail

Remerciements

Les travaux rapportés dans ce mémoire ont été réalisés au départ au laboratoire de culture in vitro du jardin d'essai du Hamma d'Alger, puis poursuivis au laboratoire d'écogénétique de la Faculté des Sciences Biologiques (USTHB, Alger).

Au terme de ce travail, il m'est agréable de présenter mes plus vifs remerciements à :

Mademoiselle AID, professeur à l'USTHB de me faire l'honneur de présider le jury qui va examiner ce travail. Qu'elle veuille trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Madame BOUGUEDOURA, professeur à l'USTHB d'avoir bien voulu diriger mes travaux. Je tiens à témoigner ma reconnaissance pour la confiance qu'elle m'a accordée.

Mademoiselle HADJ ARAB, chargée de cours à l'USTHB, qui a bien voulu codiriger ce travail et de m'avoir aidée et orientée. Je la remercie pour le temps qu'elle m'a consacré et pour les documents qu'elle a bien voulu me procurer.

Madame CHAOUCH, chargée de cours à l'INES Blida, qui a gentiment accepté d'examiner ce travail. Qu'elle veuille trouver ici l'expression de mon respect et de ma reconnaissance.

Madame ABROUS, chargée de cours à l'USTHB qui a bien voulu juger ce travail. Qu'elle trouve ici l'assurance de toute ma reconnaissance.

Madame AMIROUCHE, chargée de cours à l'USTHB qui a bien voulu participer à ce jury en tant qu'examinateur. Je tiens à lui exprimer ma gratitude.

Je voudrais également remercier Messieurs HAFFASI et BOUDERA, directeurs du jardin d'essai qui m'ont permis de réaliser mes travaux de recherche au niveau du laboratoire de culture in vitro et au niveau des serres.

Je voudrais associer mes remerciements à tout le personnel du service technique : A. Alia, le premier qui m'a encouragé à travailler sur *Amphitecna macrophylla*, B. Hablal et M. Derouche pour la documentation. Je remercie en particulier Talbine Farid pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté, aux personnes de la bibliothèque et surtout Y. Harik pour la gentillesse avec laquelle il a toujours mis à ma disposition la documentation nécessaire. Je le remercie aussi avec F. Mili. Pour la prise des photos. Mes remerciements vont également aux jardiniers pour leur aide au niveau des serres et sur le terrain.

Enfin je ne saurais oublier mes amies et collègues pour leurs encouragements et leur soutien moral : Samia, Nabila, Hayat, Nassima, Rafika, Soraya, Sadjia, Naima, Farida, Hassina, Souad et Fatty. Je remercie en particulier Kenza qui m'a beaucoup aidée quand à la frappe et la mise en forme de cette thèse.

Liste des tableaux :	pages
Tableau 1 : valeurs maximales, minimales et moyennes de la longueur.....21 et de la largeur des Feuilles de l'arbuste.	21
Tableau 2 : Longueur des différentes pièces florales de l'arbuste.....22	22
Tableau 3 : Valeurs minimales et maximales de la longueur et de.....25 la largeur des fruits mesurés à maturité.	25
Tableau 4 : Caractères morphologiques distinctifs des deux26 genres <i>Crescentia</i> et <i>Amphitecna</i> .	26
Tableau 5 : Comparaison des caractères morphologiques.....27 de l'espèce <i>Amphitecna macrophylla</i> décrite par (Baillon 1882 et Griffiths 1997) et de l'arbuste se trouvant au jardin d'essais du Hamma.	27
Tableau 6 : Date des observations faites sur l'arbuste durant.....30 la floraison des années 2001 et 2002	30
Tableau 7: Taux de nouaison par rapport au nombre de fleurs.....31 produites par l'arbuste durant les années 2001 et 2002.	31
Tableau 8 : Valeurs minimales et maximales de la longueur33 du bouton floral au stade final (stade 5) de son développement pour les années 2001 et 2002.	33
Tableau 9 : temps mis par le bouton floral pour s'ouvrir.....33	33
Tableau 10 : Taux de fructification calculé en été et en35 automne de l'année 2001 et 2002	35
Tableau 11 : Taux de la viabilité pollinique pour38 les deux mois (août et octobre 2002)	38
Tableau 12 : Pourcentage de germination <i>in-vitro</i> du38 pollen des fleurs testées en août et en octobre (2002)	38
Tableau 13 : Adhérence et pénétration mesurés respectivement..... 39 par le nombre de grains de pollen et le nombre des tubes polliniques dans le style des fleurs en fonction du mode de pollinisation	39
Tableau 14 : Taux de fructification obtenu après pollinisation.....40 manuelle de 71 fleurs traitées.	40
Tableau 15 : Influence des téguments sur la germination.....47 des graines de <i>Amphitecna macrophylla</i> .	47

<i>Tableau 16 : Germination des graines de <i>Amphitecna macrophylla</i> à 25° C et à température ambiante (août, septembre et décembre).</i>	48
Tableau 17 : longévité des graines de <i>Amphitecna macrophylla</i> Conservées hors du fruit à température ambiante.	50
Tableau 18 : Longévité des graines de <i>Amphitecna macrophylla</i> conservées dans le fruit à température ambiante.	51
<i>Tableau 19: Effet des désinfectants sur la stérilisation</i>	<i>54</i>
Tableau 20 : Apex, fragments de tige et de collets issus de la fragmentation de 15 plantules mises en culture dans les milieux M1, M2 et M3	59
Tableau 21 : Pourcentage d'explants qui ont réagi dans les trois milieux contenant de la BAP (M1, M2 et M3	59
Tableau 22 : Nombre total de bourgeons développés sur les fragments de tige et de collet cultivés dans les milieux M1, M2 et M3	60
Tableau 23 : Nombre total de bourgeons obtenus par fragmentation de pousses issues de fragments de tige et de collet dans la BAP (0,1 ; 0,5 et 1mg .l ⁻¹)	63
Tableau 24 : Effet des concentrations de la GA3 et de l'AIB sur l'allongement et l'enracinement des pousses issues de bourgeons adventifs	64
Tableau 25: Réaction des embryons dans le milieu de culture MS+ANA (1 mg/l)	65
Tableau 26 : Réaction des cals après 7 mois de mise en culture dans le milieu MS+ANA	67

Liste des figures

pages

Figure 1 : cauliflorie (bouton floraux, fleurs et fruits suspendus.....9 directement sur la branche de l'arbuste)	9
Figure 2 : feuilles groupées à l'extrémité des branches.....21	21
Figure 3 : caractères morphologiques de la fleur23	23
Figure 4 : coupe transversale au niveau de l'ovaire montrant une placentation axile.....24	24
Figure 4 : coupe transversale au niveau de l'ovaire montrant une placentation axile.....25	25
Figure 6 : nombre de fleurs produites mensuellement par l'arbuste.....31 durant toute la période de floraison (année 2002).	31
Figure 7 : les différentes étapes du développement de la fleur.....32	32
Figure 8 : les différents stades de modifications de la fleur qui précèdent la nouaison... 34	34
Figure 9 : pourcentage de chute des boutons floraux, des fleurs et des ovaires.....36 au début de leur transformation en fruits au cours de l'été et l'automne 2001 et 2002.	36
Figure 10: observation en microscopie à fluorescence des grains du pollen et.....41 des tubes polliniques.	41
Figure 11 : graine de <i>Amphitecna macrophylla</i>44 (A : aspect générale ; B : un cotylédon détaché et vu de la face interne).	44
Figure 12 : jeunes plantules.....46	46
Figure 13 : plant âgé de deux ans.....46	46
Figure 14 : plant âgé de 4 ans.....46	46
Figure 15 : influence de la température sur le pourcentage et la vitesse.....49 de la germination des graines de <i>Amphitecna macrophylla</i> .	49
Figure 16 : aspect des graines non viables de <i>Amphitecna macrophylla</i>52	52
Figure 17: les différentes phases de germination de la graine.....53	53
Figure 18 : pourcentage de germination de graines in vitro (dans le milieu MS sans hormones).	53
Figure 19 : obtention de plantules de <i>Amphitecna macrophylla</i> à partir de.....55 graines germées <i>in vitro</i> , dans le milieu gélosé MS sans hormones).	55
Figure 20 : réaction des explants en fonction des trois milieux (M1, M2 et M3).....60	60
Figure 21: bourgeonnement axillaire sur fragment de tige (I) et collet (J).....61 bourgeonnement adventif sur fragment de tige (L) et collet (K)	61
Figure 22 : bourgeonnement adventif.....62 (M : fragments de pousses ; N : bourgeonnement ; O : développement de nouvelles pousses feuillées ; P : pousses feuillées en touffes).	62
Figure 23: enracinement d'une pousse feuillée et obtention d'un vitro plant.....64	64
Figure 24 : Callogenèse(c) et bourgeonnement sur cal (bc).....66	66
Figure 25 : bourgeonnement et rhizogenèse sur cal repiqué.....66 dans de la BAP (0,1 mg.l ⁻¹).	66
Figure 26: bourgeonnement (bg) et enracinement(r) sur cal (c).....67 après 7mois de culture dans de l'ANA (1mg .l ⁻¹).	67

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION.....	1
 CHAPITRE 1 : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	
1- La famille des Bignoniaceae.....	3
1-1- Caractères généraux.....	3
1-2- Systematique.....	4
1-3- Utilisation économique.....	4
2- Le genre <i>Crescentia</i>	5
3- Le genre <i>Amphitecna</i>	5
3-1- Description du genre <i>Amphitecna</i>	5
3-2- <i>Amphitecna macrophylla</i>	6
 CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	
1- Matériel végétal.....	9
2- Méthodes d'étude.....	10
2-1- Identification de l'arbuste.....	10
2-2- Biologie de la reproduction.....	11
2-3- Etude de la germination.....	15
2-4- Essais de multiplication de l'espèce par la technique de culture in vitro.....	19
 CHAPITRE 3 : RESULTATS ET INTERPRETATIONS	
 Partie 1 : Systématique	
1- Identification de l'arbuste se trouvant au jardin d'Essai.....	21
1-1 - Description des feuilles.....	21
1-2- Caractères morphologiques de l'appareil reproducteur.....	22
1-3- Description du fruit.....	24
1-4- Tableaux récapitulatifs.....	26

Discussion et conclusion.....	28
-------------------------------	----

Partie 2 : Biologie de la reproduction

2-1- Etude de la floraison.....	30
2-2- Etude du système de reproduction.....	37
Discussion et conclusion.....	28

Partie 3 : Germination des graines

3-1- Description des graines.....	44
3-2-Germination des graines en conditions non aseptiques.....	45
3-3-Phénomènes morphologiques de la germination.....	52
3-4-Germination des graines en conditions aseptiques.....	53
Discussion et conclusion.....	56

Partie 4 : Essais de multiplication de l'espèce par la technique de culture in vitro

4-1-Organogenèse directe : culture d'apex, de fragments de tiges et de collet.....	58
4-2-bourgeonnement indirecte.....	56
Discussion et conclusion.....	68

CAPITRE 4 : CONCLUSION GENERALE

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les plantes vertes, constituent une ressource génétique importante pour l'homme. Son bien être et celui de l'ensemble des êtres vivants sur terre, dépend largement de la conservation de la diversité végétale.

Actuellement, l'extinction d'espèces végétales se fait à un rythme sans précédent. Ceci est dû aux variations climatiques, à la surexploitation, à l'introduction d'espèces et à la destruction des habitats pour les remplacer par des terres agricoles.

Les conséquences sont plus graves sous les tropiques où la majorité des espèces y vivent. Les forêts tropicales présentent une richesse spécifique tout à fait extraordinaire. Elles constituent aussi une réserve de plantes médicinales qui risquent de disparaître avant même qu'on ne les ait connues. Ainsi les régions du monde qui ont une richesse spécifique la plus élevée possèdent aussi le plus grand nombre d'espèces rares (Purves et al, 1994).

Désormais, un grand intérêt est accordé aux espèces végétales menacées. L'Union Internationale de Conservation de la Nature (UICN), a établi des listes rouges qui classent les espèces en voie de disparition « en danger » et les espèces « menacées » qui pourrait devenir en danger dans un future prévisible. De nombreux pays ont utilisé le modèle des listes rouges pour définir leurs propres approches de la protection des espèces végétales en danger et diverses solutions sont préconisées pour les préserver.

L'une des solutions, est le système de conservation *in situ* et notamment dans les jardins botaniques.

Depuis des siècles, les jardins botaniques constituent les centres d'étude scientifique et de conservation de la diversité végétale.

De nombreux jardins botaniques ont mobilisé leurs ressources afin d'adopter une stratégie pour la conservation des espèces rares et menacées de disparition, s'inspirant du plan mondial de développement durable et de la conservation des ressources vivantes pour les générations futures. Des congrès ont été tenus dans ce sens : le premier congrès international des jardins botaniques pour la conservation a eu lieu à Las Palmas (Grande Canarie) en 1985, le second s'est déroulé dans l'île de la Réunion en 1989.

Le jardin d'Essai du Hamma, qui fut créé en 1832, est parmi les plus beaux jardins du monde. Il abrite une collection d'arbres appartenant à des espèces rares, dont l'habitat va des pays tempérés aux zones tropicales des cinq parties du monde. C'est un véritable musée de plantes : Certaines, présentent un intérêt économique ou ornemental, d'autres un intérêt purement scientifique.

Sa situation topographique lui confère un climat exceptionnel et unique en Afrique du Nord (Carra et Gueit, 1952).

Actuellement, la situation du jardin d'Essai est critique : sa richesse floristique si ancienne et si rare risque de disparaître si aucune mesure de protection n'est prise.

Une étude scientifique, et un programme de recherche pour l'amélioration et la conservation de cette richesse, sont plus que jamais nécessaires. Des programmes ont été mis en place :

multiplication des espèces en voie de disparition sous serre par la voie traditionnelle (semis, marcottage et bouturage) et en laboratoire, par la technique de culture *in vitro*. D'autres travaux sont en cours, il s'agit d'un inventaire des espèces végétales existant actuellement au jardin d'essai.

Parmi les espèces tropicales ayant suscité notre intérêt, se trouve un arbuste appartenant à la famille des Bignoniaceae, et ne se présentant qu'en un seul pied.

Cet unique individu paraissant être atteint d'une maladie cryptogamique risquait d'être perdu. Nous avons été chargé de trouver le moyen de le sauvegarder. Au cours de notre étude préliminaire, nous avons remarqué la très courte période de longévité des graines. Nous avons jugé nécessaire de procéder à la compréhension de la biologie du développement de cette espèce.

Au jardin d'Essai du Hamma cet arbuste est connu sous le nom de *Crescentia nigripes*. Il est mentionné dans un inventaire qui date de 1868 et ne se trouve dans aucun autre inventaire.

L'absence d'une fiche technique et d'un échantillon au niveau de l'herbier du jardin, nous a incité à faire une recherche bibliographique, dans le but de vérifier si cette plante appartient bien au genre *Crescentia* et à l'espèce *nigripes*.

L'étude bibliographique a montré que *Crescentia nigripes* est l'un des synonymes attribués à l'espèce *Amphitecna macrophylla*. De plus cette étude a montré qu'il y a confusion entre les deux genres *Crescentia* et *Amphitecna*. L'identification précise de cette espèce était donc la première étape de notre travail.

En Algérie, cette espèce n'a fait l'objet d'aucun travail scientifique et n'a probablement jamais été multipliée depuis son introduction.

Ce travail représente donc une étape vers la connaissance et la multiplication de cette espèce dans le but de la conserver. IL est présenté en quatre parties :

- 1- Identification et classification de l'arbuste en se basant sur les critères morphologiques.
- 2- Biologie de la reproduction : étude de la floraison et du système de reproduction.
- 3- Etude de la germination des graines.
- 4- Essais de multiplication de l'espèce par la technique de culture *in vitro*.

Chapitre I
DONNEES
BIBLIOGRAPHIQUES

1- La famille des Bignoniaceae

1-1- Caractères généraux

La famille des Bignoniaceae, est connue depuis le Crétacé supérieur. Selon Chadefaud et Emberger (1960), cette famille comprend environ 750 espèces appartenant à plus de 100 genres. Selon Gentry (1982) et Takhtajan (1997) (in Lopes et *al.*, 2002), cette famille comprend 800 espèces et 110 genres. Elle comprend surtout des plantes tropicales bien représentées en Amérique du sud.

Le plus souvent, elles se présentent sous forme de lianes (vrilles foliaires, griffes à ventouses, axes volubiles, racines aériennes), mais aussi d'arbres ou d'arbustes, et très rarement herbacées.

Les feuilles sont généralement opposées, différemment composées : imparipennées, digitées, bipennées, bifoliolées ; rarement simple (*Amphitecna*, *Crescentia*) et sans stipules.

Les fleurs sont solitaires ou disposées en grappes ou en cymes. Elles peuvent être aussi insérées directement par leurs pédoncules sur les branches et sur le tronc (cauliflorie), comme chez les genres *Amphitecna*, *Crescentia* et *Permentiera*.

La fleur est généralement grande, gamopétale, pentamère, zygomorphe, hypogyne et hermaphrodite.

Le calice se présente en plusieurs formes : entonnoir, pentalobé, déchiré inégalement en 2 lobes ou spatiforme. La corolle est formée par 5 pétales soudés en un tube qui se termine par 5 lobes plus ou moins inégaux.

L'androcée est généralement formé par 4 étamines fertiles didynames (2 grandes et 2 petites) et un staminode ; 2 étamines fertiles et 3 staminodes ou bien 4 étamines de taille égale plus un staminode (*Amphitecna*) soudées à la corolle vers la base du tube . L'anthère est formée par deux thèques divergentes dessinant une pointe de flèche.

L'ovaire supère, est surmonté d'un style filiforme qui se termine par un stigmate bilobé.

Il est bicarpellé et pluri ovulé, biloculaire à deux placentas axiaux par loge, biloculaire à 1 seul placenta axial (*Amphitecna macrophylla*) ou uniloculaire à deux ou quatre placentas pariétaux. Les ovules sont nombreux, anatropes ou hémitropes (Spichiger et *al.*, 2002).

Les fleurs des Bignoniacées possèdent un disque nectarifère bien développé autour de l'ovaire (Galletto, 1995 et Rivera, 2000). Cependant, quelques taxons comme *Clytostoma*, *Cydista*, *Phryganocydia* (Gentry, 1982 ; Rivera, 1996 et Lohman, 2002) et *Lundia* (Schumann, 1897 et Gentry, 1982) manquent de disque fonctionnel Dans ce cas, l'attraction du pollinisateur peut avoir lieu par la duperie (mimétisme des fleurs nectarifères (Gentry, 1974a, b). (in Lopes et *a.*, 2002).

Le fruit est souvent une capsule très allongée, septicide ou loculicide, parfois septifrage, plus rarement charnue et indéhiscente (*Crescentia* et *Amphitecna*).

La graine est aplatie, souvent ailée et dépourvue d'albumen (Crété, 1959). Elle peut être aussi poilue ou membraneuse. Chez la tribu des Crescentieae qui comporte les genres *Amphitecna*, *Crescentia* et *Parmentiera*, les graines ne sont pas ailées (Gaussen *et al*, 1982).

1-2- Systématique

Dans les grands systèmes de classification comme ceux de Cronquist (1981) et Dahlgren (1980), la famille des Bignoniaceae est classée dans l'ordre des Scrofulariales. Mais d'après la classification phylogénétique, basée sur les résultats de la biologie moléculaire et publiée par APG II en 2002, cette famille est classée dans l'ordre des Lamiales. Elle est très proche des Gentianales et Solanales (Spechiger *et al*, 2002).

Les Bignoniaceae sont très voisines des Scrofulariaceae dont elles se distinguent par l'absence d'albumen (Crété, 1959).

Selon Gentry (1979), la famille des Bignoniaceae est subdivisée en plusieurs tribus. Parmi lesquelles on peut citer : Bignonieae, Tecomeae et Crescentieae.

Les Bignonieae et les Tecomeae, regroupent des espèces dont le fruit est déhiscent, les graines sont disséminées par le vent et par l'eau. Les Crescentieae, regroupent des espèces dont le fruit est indéhiscent, les graines sont disséminées par les mammifères. Parmi ces espèces, il y a celles qui appartiennent au genre *Amphitecna*.

Les principaux genres qui constituent la famille des Bignoniaceae, sont de différentes origines. Parmi lesquels on peut citer :

Bignonia, *Jacaranda*, *Tabebuia* (Amérique centrale); *Catalpa* (Amérique, Asie orientale); *Tecoma*, *Crescentia* (Amérique tropicale); *Campsis* (Amérique du Nord, Japon); *Kigelia* (Afrique tropicale, Madagascar).

Il est important de signaler que l'étude bibliographique de la famille des Bignoniaceae a montré des ambiguïtés concernant la nomination des espèces. Exemple : *Tabebuia impetiginosa*, cette espèce est connue sous six appellations dans plusieurs pays (Gentry, 1979).

Un autre exemple, est celui de l'espèce *Amphitecna macrophylla* qui est désignée sous différents noms par plusieurs botanistes.

1-3- Utilisation économique

Beaucoup de Bignoniaceae sont de belles plantes ornementales (*Bignonia*, *Campsis*, *Tecoma*, etc.) ou toxiques (Chadefaud et Emberger, 1960). Certaines sont utiles : productrices de bois (*Tabebuia*, *Jacaranda*). D'autres ont un intérêt médical : selon Eberhardt (1927), l'écorce des jeunes branches de *Bignonia copia* est utilisée à la Guyane comme un remède efficace contre la syphilis. Un autre exemple est celui de *Crescentia cujete*, cette espèce contient des principes actifs comme : furanonaphthoquinones (Heltzel *et al.*, 1993), iridoid glucosides (Kaneko *et al.*, 1997). Elle est utilisée à travers le monde comme un laxatif, diurétique, pour nettoyer les blessures et un traitement pour les maux de tête (Murch *et al.*, 2004)

En Algérie, les Bignoniaceae ont été introduites et cultivées en tant que plantes ornementales (*Bignonia unguis* ; *Campsis radicans*; *Dictis bicunatoria* ; *Jacaranda mimogestualité* ; *Catalpa bignoides*, *Paulownia tomentosa* ; *Pyrostegra venusta*). La plupart de ces espèces, se trouvent au jardin d'Essais du Hamma.

2- Le genre *Crescentia*

Selon Chadefaud et Emberger (1960), ce genre comprend cinq espèces originaires de l'Amérique tropicale.

Les fleurs sont solitaires, elles naissent sur le tronc et sur les branches (Nicholson, 1894). Elles sont d'un jaune plus ou moins mélangé de pourpre (Lemmée, 1929).

Selon ce dernier auteur, ce genre est caractérisé par des fleurs formées par :

- Un calice coriace, caduc, déchiré lors de l'anthèse en 2 segments inégaux ou parfois en 5 lobes.
- Une corolle insérée sous le disque, tubuleuse, campanulée, plus ou moins ventrue d'un côté et brusquement élargie en limbe à 2 lèvres à cinq lobes.
- Quatre étamines de différentes longueurs, introrsées à loges divergentes et un staminode postérieur présent ou nul sont insérées sur le tube de la corolle.
- Un ovaire à une loge, ovules sur de nombreux rangs et sur deux placentas pariétaux épais et bilobés.
- Un disque nectarifère au dessous de l'ovaire.

Le fruit est gros, indéhiscent et polysperme. Le péricarpe est d'abord charnu puis induré et rempli de gros placenta pulpeux dans lesquels sont immergées les graines ; celles-ci, ne sont pas ailées.

Les feuilles sont simples ou trifoliées et brièvement pétiolées. Elles sont alternes ou fasciculées sur les noeuds.

L'espèce la plus connue est le *Crescentia cujete*. C'est un arbuste originaire de l'Amérique tropicale et des Antilles (Pandey, 2002). Il est nommé Calebassier à cause de ses gros fruits ligneux dont les indiens fabriquent des ustensiles de ménage.

3- Le genre *Amphitecna*

3.1 – Description du genre *Amphitecna*

Le nom générique de *Amphitecna* date de 1867, il a été donné par le botaniste Miers (in Baillon, 1882).

Selon Lemmé (1929), les espèces appartenant à ce genre sont des arbrisseaux ou des arbustes, peu rameux.

Les fleurs sont solitaires, groupées en cymes sur le vieux bois ou à l'extrémité des rameaux. Elles sont de couleur verdâtre et sont formées par :

- Un calice gamosépale, déchiré inégalement ou à deux lobes.
- Une corolle dressée ou brusquement coudée aux deux tiers de sa longueur. Elle est inégalement déchirée et fibriée sur les bords.
- Un androcée formé par quatre étamines fertiles subégales ou didynames et une cinquième réduite à un staminode. Les anthères sont introrsées, biloculaires et suspendues au connectif.
- Un ovaire formé de deux loges pluri ovulés, à placentation axile. Le style se termine en deux lamelles.

Le fruit selon Griffiths (1997), est ligneux et charnu à l'intérieur. Il est de forme variable : sphérique (comme chez *Amphitecna latifolia*), ellipsoïde, allongé et étroit (*Amphitecna macrophylla*). Les graines ne sont aillées.

Les feuilles sont alternes, rassemblées au sommet des rameaux. Elles sont simples et très brièvement pétiolées.

Parmi les espèces appartenant à ce genre, on peut citer :

Amphitecna macrophylla (Veracruz, Mexique) ; *Amphitecna latifolia* (Equateur jusqu'à costa-rica) ; *Amphitecna donell-smithii* (endémique de peten guatemalco, Mexique).

3-2- *Amphitecna macrophylla*

3-2-1- Localisation géographique

- **Aire naturelle**

Le nom vernaculaire de l'espèce *Amphitecna macrophylla* est « Mistel ». Cette espèce est originaire du Mexique (Veracruz, Oaxaca et Chiapas), elle est distribuée sur des altitudes moyennes entre 700 et 1300 mètres.

Cette plante est classée parmi les espèces vulnérables et en voie de disparition. Elle figure sur la liste rouge établie par l'IUCN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) en 1997.

- **Aire d'introduction**

Introduite en Algérie en 1867, cette plante a été acclimatée au jardin d'essai du Hamma d'Alger et a pu survivre jusqu'à nos jours, grâce à son microclimat favorable à l'implantation des espèces tropicales.

Actuellement cette espèce est conservée dans le jardin botanique de la ville de Bonn (Allemagne).

3-2-2- Description botanique

D'après Griffiths (1997), cette espèce appartient à la strate arbustive. Sa longueur varie de 2 à 7 mètres de long. Les feuilles sont lancéolées, coriaces et glabres. Elles sont très grandes : elles peuvent atteindre jusqu'à 53 cm de long et 13 cm de large.

Les fleurs sont solitaires ou groupés. Le calice est inégalement divisé en deux lobes. La corolle est de couleur blanc vert, de forme tubuleuse, campanulée et à bords fibriés. Sa longueur varie de 3,7cm à 5cm de long. Le fruit est étroit et ellipsoïde il mesure 1,6cm de diamètre.

3-2-3- Systématique et historique

Cette espèce a posé de nombreux problèmes de classification. Selon Gentry (1980), elle a été désignée sous différents noms par plusieurs botanistes. Tous ces noms sont considérés comme des synonymes :

<i>Crescentia macrophylla</i>	Seemann (1854).
<i>Ferdinanda superba</i>	Seemann (1862).
<i>Crescentia nigripes</i>	Linden (1863).
<i>Amphitecna nigripes</i>	(Linden) Baillon (1882).
<i>Amphitecna macrophylla</i>	(Seemann) Miers et Baillon (1882).
<i>Enallagma macrophylla</i>	(Seemann)Lundell (1971).
<i>Dendrosicus macrophyllus</i>	(Seemann) A.H.Gentry (1973).

Actuellement la seule appellation retenue, est celle de *Amphitecna macrophylla*.

Cette espèce a été décrite la première fois par Seemann en 1854 et avait reçu le nom de *Crescentia macrophylla*, quand elle avait fleuri dans les jardins d'Angleterre et notamment à Kew (Baillon, 1882).

Dans les jardins d'Allemagne, le *Crescentia macrophylla* décrite par Seemann, avait reçue le nom de *Ferdinanda superba* à une époque où l'on ne connaissait pas ses fleurs.

Lorsque cette espèce a fleuri à Paris, Baillon observe son gynécée et constate que son organisation diffère de celle qu'on attribue d'ordinaire aux *Crescentia* : ces derniers ont un ovaire à placentation pariétale, tandis que l'ovaire de *Crescentia macrophylla* présente un ovaire à placentation axile.

M. Miers en 1867, écrivant à son tour un mémoire spécial sur ce même groupe, reconnaît que les ovules de *Crescentia macrophylla* ne sont pas insérés pariétalement, comme ceux du *Crescentia cujete* par exemple et que la première de ces deux plantes devait appartenir à un genre distinct, voisin de celui des *phyllarthron* et des *Colea*. Il l'a désigné sous le nom de *Amphitecna*.

Crescentia macrophylla Seemann., devenait donc *Amphitecna macrophylla* Miers. *Crescentia nigripes*, qui a été décrite par Baillon en 1882 et qui devrait aussi appartenir au genre *Amphitecna*, donc s'appeler *Amphitecna nigripes* a été considérée par ce même auteur comme une autre espèce ressemblant à *Amphitecna macrophylla*. Mais d'après Gentry 1980 et Gentry 1982, *Crescentia nigripes* n'est que l'espèce *Amphitecna macrophylla*.

L'espèce *Amphitecna macrophylla* a été introduite au jardin d'Essai du Hamma d'Alger, elle est mentionnée dans un inventaire datant de 1868, mais sous les anciens noms : *Crescentia macrophylla* représentée par deux individus, et *Crescentia nigripes* représentée par un seul individu, au stade de plantules en pots.

Aujourd'hui, il n'existe qu'un seul pied au niveau du jardin désigné toujours sous le nom de *Crescentia nigripes*. Aucun autre inventaire ne cite ces deux noms, même celui de Carra et Gueit qui date de 1952.

Chapitre II
MATERIEL ET METHODES

1-Matériel végétal

1-1-Description de l'arbuste

Notre étude a porté sur une *Bignoniacée* tropicale rare, se trouvant au jardin d'Essais du Hamma d'Alger et ne se présentant qu'en un seul pied.

C'est un très bel arbuste, mesurant environ 4 mètres de long. Il est remarquable par ses grandes feuilles et surtout par ses fleurs en forme de cloches et ses fruits, qui sont suspendus par leurs pédoncules sur les branches. Cette façon dont les fleurs et les fruits sont disposés sur l'arbuste est appelée cauliflorie. Ce phénomène s'appelle aussi la ramiflorie (figure 1).

On reconnaît ces sites cauliflores d'où sortent les bourgeons floraux grâce à des renflements sur la surface générale de l'écorce.

La cauliflorie est extrêmement représentée dans la forêt ombrophile tropicale où elle a été recensée chez environ 1000 essences ligneuses (Boullard, 1997).



Figure 1 : Cauliflorie (boutons floraux, fleurs et fruits suspendus directement sur la branche de l'arbuste)

1-2-Description de la station d'étude

Le jardin d'Essai du Hamma est situé au fond de la baie d'Alger dans sa partie sud (latitude 36° 34' Nord, longitude 3° 5'), à une altitude qui varie de 10 à 100 mètres, depuis les abords immédiats du rivage jusqu'à la colline des arcades.

La proximité immédiate de la mer et la présence de la colline des arcades qui s'oppose au vent du sud en été (siroco), procurent au jardin d'Essai un climat chaud humide en été et frais humide en hiver.

Sa puissante couverture végétale y ajoute son action régulatrice : on peut dire que la température ne s'abaisse jamais au dessous de 2°C et ne s'élève que très rarement au dessus de 35°C.

Selon Carra et Gueit (1952), le jardin d'Essai peut être considéré comme l'un des points du sahel les plus favorables à l'implantation d'espèces tropicales.

2- Méthodes

2-1- Identification de l'arbuste

Pour identifier l'arbuste se trouvant au jardin d'essai, nous nous sommes basée sur les caractères morphologiques suivants :

- caractères des feuilles
- caractères de l'appareil reproducteur : forme de la fleur, type de placentation, forme du fruit et de la graine.

Bien qu'ils soient les plus anciennement employés, les caractères morphologiques sont les plus souvent utilisés par les systématiciens, notamment sur le terrain. Car ils ne nécessitent que des moyens simples et rapides (œil nu et loupe).

2-1-1- Caractères morphologiques des feuilles

La forme des feuilles et leur disposition sur les branches de l'arbuste sont décrites. Nous avons aussi effectué des mesures de longueur et de largeur du limbe de 100 feuilles ramassées en automne.

2-1-2- Caractères morphologiques de l'appareil reproducteur

2-1-2-1- Description de la fleur

Nous avons décrit et mesuré les différentes pièces de la fleur (calice, corolle, androcée et gynécée). Les mesures sont faites sur 32 fleurs.

La structure de la fleur (forme, couleur et disposition des pièces florales) est l'une des données qui permettent de caractériser l'espèce. Son étude précise est donc nécessaire. Elle joue un rôle important dans la détermination et la taxonomie (Genevès, 1992).

2-1-2-2- Détermination du type de placentation de l'ovaire

La placentation est déterminée à partir d'observations sous loupe binoculaire de coupes transversales de l'ovaire.

2-1-3- Description du fruit

Nous avons décrit la forme du fruit et des graines, qui sont aussi des critères importants dans la détermination des espèces.

La longueur, le diamètre, le poids et le nombre de graines ont été déterminés à partir de 47 fruits matures.

2-2- Biologie de la reproduction

N'ayant aucune indication sur la biologie de la reproduction de cet arbuste, nous nous sommes proposée d'étudier la floraison et les différentes étapes du développement de la fleur et du fruit. Puis nous nous sommes intéressée à l'étude du système de reproduction et de quelques paramètres de la biologie florale tels que : la viabilité du pollen et le nombre d'ovules. L'étude a été réalisée durant les années 2001 et 2002.

2-2-1- Etude de la floraison

2-2-1- 1- Détermination de la période et de la durée de la floraison

La période et la durée de la floraison ont été déterminées par des observations et des notations, qui ont concerné :

- les dates respectives de l'apparition des premiers boutons floraux, de l'épanouissement des premières fleurs et de la fin de floraison.
- Le comptage du nombre de fleurs produites par l'arbuste pendant toute la floraison
- Le taux de fructification

Pour l'année 2001, le comptage a été réalisé au cours de la période allant du 25 septembre au 5 novembre

Pour l'année 2002, le comptage a été suivi régulièrement durant les 12 mois de l'année afin de déterminer le début et la fin de floraison, le nombre total de fleurs produites par l'arbuste et la période de pleine floraison.

2-2-1- 2- Etude des différentes étapes du développement de la fleur et du fruit

Le suivi du développement de la fleur a été réalisé depuis le stade bouton floral, jusqu'à l'anthèse (épanouissement de la fleur et déhiscence des anthères) et la formation du fruit.

Pour cela 30 boutons floraux ont été choisis au hasard à un stade très jeune. Ils ont été numérotés et mesurés régulièrement in situ à l'aide du papier millimétré, jusqu'à leur ouverture.

Des modifications de la fleur après l'anthèse ont été également notées :

- chute du périanthe
- chute du style
- début de transformation de l'ovaire en fruit (nouaison).
- croissance et maturation du fruit

Tous ces stades ont été analysés par rapport à des repères chronologiques et morphologiques.

L'expérience est répétée 2 fois pour les deux années (2001 et 2002) : en été (juillet) et en automne (Septembre – Octobre).

2-2-2- Etude du système de reproduction

Dans les conditions du jardin d'essais du Hamma, l'arbuste présente un régime de reproduction autogame, car il produit des fruits contenant des graines viables.

Cependant, au cours de nos observations, nous avons remarqué que le taux de fructification est extrêmement faible par rapport au nombre de fleurs produites (nouaison).

Etant donné que la fructification est en grande partie dépendante du phénomène de pollinisation, nous nous sommes posée la question suivante : est ce que les fleurs qui n'ont pas donné de fruits, n'ont pas été pollinisées ?

Pour répondre à cette question nous avons procédé à l'observation en microscopie à fluorescence des pistils des fleurs autopollinisées manuellement et autopollinisées librement.

Aussi nous avons jugé utile de procéder à l'étude de la viabilité du pollen et le dénombrement des ovules car ce sont des paramètres importants qui interviennent dans le bon déroulement de la pollinisation et de la fécondation.

2-2-2-1- Dénombrement des ovules

Le prélèvement et le comptage du nombre d'ovules ont été effectués sur des fleurs à l'anthèse, sous loupe binoculaire après incision longitudinale de l'ovaire à main levée.

Le nombre d'ovaires ayant fait l'objet de cette étude est de l'ordre de 20.

2-2-2- 2- Etude de la viabilité du pollen

L'estimation de la viabilité du pollen est réalisée par un test cytologique et un test de germination.

- **Test cytologique**

C'est un test colorimétrique basé sur la coloration différentielle des constituants du pollen. Il a pour propriété de colorer la paroi pollinique et le cytoplasme.

Pour notre étude, nous avons adopté le test d'Alexander (1969) (annexe1).

Le colorant d'Alexander, permet de distinguer le pollen viable du pollen non viable : le cytoplasme du pollen viable se colore en rouge et sa paroi éxinique en vert, tandis que le pollen non viable se colore entièrement en vert.

Le procédé expérimental est le suivant :

- choisir des fleurs à l'anthèse (anthères à peine déhiscentes).
- Secouer le pollen sur des lames propres
- Mettre une goutte du colorant d'Alexander et recouvrir d'une lamelle
- Observation des préparations au microscope photonique.

Deux essais ont été réalisés pour l'année 2002 (au mois d'août et au mois d'octobre).

Le pollen de 10 fleurs est prélevé pour chaque essai à raison de 500 grains de pollen par fleur.

La viabilité du pollen est exprimée en pourcentage selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre de grains de pollen viables}}{\text{Nombre total de grains de pollen (Viables et non viables)}} \times 100$$

- **Test de germination du pollen “ in-vitro ”**

La germination du pollen in-vitro a pour but de tester son pouvoir germinatif. Ce test est réalisé dans un milieu nutritif solide ou liquide.

Pour cette étude, le milieu utilisé est celui de Brewbaker et Kwack (1964). (annexe2).

Pour notre expérimentation, nous avons procédé de la manière suivante :

- prélever du pollen des fleurs dès la déhiscence des anthères
- secouer le pollen sur des lames propres

- mettre une goutte du milieu de germination, laisser une demi-heure avant de recouvrir avec une lamelle.
- Observer et compter au microscope photonique

Deux essais ont été réalisés pour l'année 2002 (en Août et en Octobre).

Le pollen de 10 fleurs est prélevé pour chaque essai à raison de 500 grains de pollen par fleur.

2-2-2-3- Observation en microscope à fluorescence des pistils des fleurs autopollinisées manuellement et librement

- **Pollinisation manuelle**

Les pollinisations artificielles sont effectuées manuellement après l'épanouissement de la corolle, en frottant les anthères déhiscentes sur les stigmates des fleurs, de façon à les couvrir de pollen.

- 26 pistils pour l'année 2001 et 31 pour l'année 2002, sont prélevées après 24 heures et conservés dans le FAA [formol (10%)- acide acétique (10%)- alcool éthylique (80%)], pour les observer en microscopie à fluorescence.
- 71 fleurs pollinisées artificiellement en 2002, sont gardées sur l'arbre dans le but d'observer une éventuelle fructification.

- **Pollinisation libre**

Les fleurs non traitées, sont considérées comme étant pollinisées librement. Nous les avons ramassé après leur chute.

Les pistils des fleurs, sont prélevés et conservés dans le FAA, pour une observation en microscopie à fluorescence (34 pistils pour l'année 2001, et 50 pour l'année 2002).

Les résultats sont exprimés comme suit :

- en nombre de tubes polliniques dans le pistil des fleurs pollinisées artificiellement et librement, après observation en microscopie à fluorescence.
- En nombre de fruits produits après pollinisation artificielle.

- **Technique d'observation en microscopie à fluorescence**

Le technique d'observation des tubes polliniques en fluorescence ou ABF (Alinine Blue Fluorescence), permet d'observer les grains de pollen sur le stigmate et de suivre la progression des tubes polliniques dans le style et dans l'ovaire grâce à la callose (β -1-3glucane) qui est présente dans la paroi des tubes polliniques.

Cette technique a été mise au point par Martin (1959), qui a été le premier à observer en fluorescence les tubes polliniques dans le style des espèces du genre *Capsicum*, *Hibiscus* et *Solanum* (annexe 3).

Les procédés expérimentaux sont les suivants :

- Les pistils sont prélevés des fleurs et fixés dans le FAA, puis conservés dans de l'alcool 70° au réfrigérateur.
- Ils sont ensuite rincés à l'eau distillée, puis traités en fin d'après-midi dans la soude (NaOH, 8N) et laissés pendant toute la nuit pour ramollir les tissus pistillaires.
- Un rinçage à plusieurs reprises est indispensable afin d'éliminer toute trace de soude qui peut masquer la fluorescence.
- Par la suite, les pistils traités sont mis dans le colorant du bleu d'Aniline pendant 3 heures. Ces échantillons sont montés entre lame et lamelle dans une goutte de glycérine ou du colorant. Une petite pression est exercée sur la lamelle pour ramollir les pistils et permettre une bonne observation des tubes polliniques. Ces derniers sont dénombrés sous une source lumineuse Ultra violette au microscope à fluorescence, sous filtre UV à 350 – 200 nm.

2-3- Etude de la germination des graines

2-3-1- Description de la graine

La description a concerné la forme, la couleur et les différentes parties qui constituent la graine de cette espèce.

La longueur moyenne de la graine est déterminée par des mesures faites sur 40 graines matures.

2-3-2-Germination des graines en conditions non aseptiques

2-3-2-1-En pots sous serre

Les premiers essais de germination des graines de cette espèce, ont été réalisés sous serre, en 1998. Vingt deux graines ont été mises à germer dans des godets contenant de la tourbe arrosée avec de la solution de Knop.

Le pourcentage de graines germées a été noté, ainsi que le nombre de plantules obtenues.

2-3-2-2-Dans des boîtes de pétri au laboratoire

Dans tous les tests de germination réalisés au laboratoire, nous avons procédé de la façon suivante :

- Les fruits cueillis ou ramassés, sont préalablement lavés à l'eau courante, puis désinfectés à l'aide d'un coton imbibé d'eau de javel 36°.

- Les graines prélevées de ces fruits sont lavées à l'eau contenant quelques gouttes d'eau de javel 12° et mises à germer dans des boites de pétri tapissés de papier filtre et arrosés avec de l'eau ordinaire.

Quelques facteurs influençant la germination sont étudiés :

- Influence des téguments.
- Effet de la température.
- Longévité des graines.

Les paramètres retenus pour exprimer la germination sont :

- La capacité de germination, qui est le taux ou le pourcentage de germination maximal obtenu dans les conditions bien définies.
- La vitesse de germination, qui correspond au temps mis par un lot de graines pour germer. Elle peut être calculée par plusieurs formules. Mais la plus courante est celle dont la formule est la suivante :

$$\text{TMG} = \frac{N1 \cdot T1 + N2 \cdot T2 + Nn \cdot Tn}{N1+N2+N3}$$

TMG : temps moyen de germination.

N1: représente le nombre de graines germées au temps T1.

Nn : représente le nombre de graines germées au temps Tn.

- **Influence des téguments sur la germination des graines**

Les graines sont prélevées des fruits matures cueillis en septembre 2001. Dans le but d'étudier l'influence des téguments sur la germination des graines, le test suivant est réalisé :

30 graines réparties en trois lots, sont mises à germer dans des boites de pétri.

Premier lot : 10 graines avec les deux téguments.

Deuxième lot : 10 graines avec un seul tégument (interne).

Troisième lot : 10 graines sans téguments (les 2 téguments ont été enlevés).

Ces 3 lots de graines sont mis à germer, simultanément à température ambiante (dans les conditions du laboratoire).

- **Effet de la température sur la germination**

L'influence de la température sur la germination des graines de cette espèce, est testée dans une étuve réglée à 25° et à température ambiante.

- Un lot de 10 graines est placé dans une étuve à 25°.
- 3 lots sont mis à germer à température ambiante en août, en septembre et en décembre, contenant respectivement 36, 11, et 18 graines.

L'expérience a été réalisée en 2002.

- **Détermination de la longévité des graines**

Au cours de notre étude, nous avons remarqué que le péricarpe des fruits cueillis ou ramassés qui sont de couleur verte, noircit après quelques jours. Les graines de couleur vert-maron deviennent aussi noires, sèches, très dures et inaptes à germer.

Selon Lafon et al (1998), la durée de vie ralentie des semences a une limite, le métabolisme résiduel pouvant être responsable de leur mort par accumulation de substances toxiques par exemple.

On appelle longévité, la durée de vie des graines dans les conditions naturelles (Lafon et al, 1998).

Dans le cas de notre travail, la longévité des graines de l'espèce étudiée est déterminée par des tests de germination. Il est réalisé en deux étapes :

- Détermination de la longévité des graines conservées hors du fruit.
- Détermination de la longévité des graines conservées dans le fruit.

Première étape : détermination de la longévité des graines conservées hors du fruit

Le but de ce test est de déterminer le temps maximal au bout duquel les graines demeurent viables et capables de germer une fois prélevés du fruit et conservées à température ambiante. 3 essais ont été réalisés au cours de l'année 2002(en août, en septembre et en décembre).

Nous procédons comme suit :

- Les graines sont prélevées des fruits le jour même de leur cueillette.
- Elles sont lavées, séchées à l'air libre et réparties en plusieurs lots.
- Les lots de graines sont mis à germer et arrosés, à des intervalles de temps différents :
 - 53 graines prélevées de fruits cueillis le 12/8/02, sont réparties en 8 lots de 7 à 5 graines par boîte. Les graines du premier lot sont mises à germer le deuxième jour après leur prélèvement du fruit.
 - Les autres lots de graines sont mis à germer consécutivement après chaque jour.
 - 53 graines prélevées de fruits cueillis le 16/9/02, sont réparties en 8 lots de 7 à 6 graines par boîte. Les graines du premier lot, sont mises à germer le 17/12/02, les autres lots sont mis à germer consécutivement après chaque jour.

- 43 graines prélevées des fruits cueillis le 23/12/02, sont réparties en 6 lots de 8 à 7 graines par boîte. Les graines du premier lot sont mises à germer le dixième jour après leur prélèvement des fruits ; les autres lots sont mis à germer chaque jour à partir du 11^{ème} jour.

Deuxième étape : longévité des graines conservées dans le fruit

Le but de ce test est de déterminer le temps maximal au bout duquel les graines peuvent être conservées à l'intérieur du fruit sans perdre leur longévité.

3 essais ont été réalisés au cours de l'année 2002 (en août, en septembre, et en décembre).

Nous avons procédé de la façon suivante :

- Les fruits cueillis, sont numérotés.
- Ils sont conservés à température ambiante, puis décortiqués à des intervalles de temps différents.
- Les graines prélevées de chaque fruit, sont lavées et mises à germer immédiatement.
- La longévité des graines est testée pendant les durées suivantes :

15 jours pour les graines conservées dans les fruits cueillis en août.

19 jours pour les graines conservées dans les fruits cueillis en septembre.

27 jours pour les graines conservées dans les fruits cueillis en décembre.

2-3-3- Germination des graines en conditions aseptiques

Les graines sont mises à germer dans des tubes à essais sur milieu gélosé Murashige et Skoog (1962). (MS).

2-3-3-1- Stérilisation des graines et du matériel

Deux essais sont réalisés pour la stérilisation des graines par trempage dans des solutions désinfectantes à différentes concentrations et à des temps variables.

Essai N°1 : trempage des graines dans le bénomyl ($0,1 \text{ g.l}^{-1}$), pendant 1 heure ; puis transfert dans l'hypochlorite de calcium (4 mg.l^{-1}) pendant 10 minutes.

Essai N°2 : trempage des graines dans l'hypochlorite de sodium 12° pendant 5 minutes.

Les graines désinfectées sont ensuite rincées 3 fois à l'eau distillée stérilisée et mises en culture.

L'eau distillée servant à la préparation des solutions désinfectantes et de rinçage, ainsi que la verrerie et les pinces servant à l'ensemencement des graines, sont stérilisées à l'autoclave à une température de 120° pendant une heure.

2-3-3-2- Mise en culture

Les graines sont mises en culture sous hotte à flux laminaire horizontal dans des tubes à essais, contenant 20 ml du milieu Murashige et Skoog (1962), à raison d'une graine par tube. Ces tubes sont bouchés avec du coton.

Au cours des manipulations, les pinces sont plongés dans de l'éthanol à 70° et flambés régulièrement à la flamme d'un bec benzen.

2-3-3-3- Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour la mise en germination des graines, est constitué de sels minéraux qui correspondent aux macro-éléments MS, aux micro-éléments MS, et aux vitamines MS. La composition de ces sels minéraux et vitamines sont donnés en Annexe.

La source de carbone utilisée est le saccharose, additionné au milieu de culture à une concentration de 30 g.l⁻¹.

La gélification du milieu se fait à l'aide de l'agar-agar (7g.l⁻¹). La stérilisation du milieu de culture est réalisée à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes.

2-3-3-4- Les conditions de culture

Les cultures sont incubées dans une chambre de culture climatisée, à une température de 25° et une photopériode réglée à 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

La lumière diffusée est celle des néons, donnant une intensité lumineuse de 1800 lux.

Les observations réalisées régulièrement, portent sur les critères suivants :

- Taux de contamination.
- Taux de germination.

2-4- Essais de multiplication de l'espèce par la technique de culture *in vitro*

2-4-1- Culture d'apex, de fragments de tige et de collet

Les plantules issues de germination de graines *in vitro* sont fragmentées sous hotte. Les explants mis en culture sont : l'apex, les fragments de tige et les collets.

Ces explants sont mis en culture dans le milieu de base Murashige et Skoog (1962), contenant seulement de la cytokinine (BAP) à différentes concentrations. Ainsi trois milieux différents par la concentration en BAP sont testés (M1, M2, M3).

- ❖ M1: MS + 0,1 mg.l⁻¹ de BAP.
- ❖ M2: MS + 0,5 mg.l⁻¹ de BAP.
- ❖ M3: MS + 1 mg.l⁻¹ de BAP.

Ces milieux ont pour but de provoquer l'initiation de bourgeons.

2-4-2- Culture d'embryons excisés de graines matures

C'est seulement la partie formant la tigelle, gemmule et radicule qui a été isolée et mise en culture dans des boîtes de pétri, contenant le milieu de base MS et une auxine ANA (acide naphthalène acétique), à une concentration de 1mg.l^{-1} .

2-4-3- Conditions de culture

Ces cultures sont réalisées aseptiquement sous hotte, avec du matériel stériles (scalpel, et pinces), et sont incubés dans une chambre de culture climatisés, dans les mêmes conditions déjà décrites, pour l'incubation des graines mises à germer *in vitro*.

Chapitre III
RESULTATS ET DISCUSSIONS

1^{ère} PARTIE
SYSTEMATIQUE

1 - Identification de l'arbuste se trouvant au jardin d'Essai du Hamma d'Alger

1.1 - Description des feuilles

Cette plante est caractérisée par de grandes feuilles, qui peuvent atteindre jusqu'à 53,5 cm de long et 12,2 cm de large. (tableau1). Elles sont verticillées et regroupées en bouquet à l'extrémité des branches.

Elles sont de couleur pourpre à l'état juvénile ; elles prennent une couleur verte à maturité.

Elles sont simples, oblancéolées et à nervation pennée. Le limbe est acuminé à l'apex. Le pétiole est très court, bombé et de couleur pourpre (figure 2).

Tableau 1 : valeurs maximales, minimales et moyennes de la longueur et de la largeur des Feuilles de l'arbuste.

	Longueur (cm)	Largeur (cm)
Valeur minimale	7,6	1,1
Valeur maximale	53,5	12,2
Moyenne	30,22	5,75



Figure 2 : Feuilles groupées à l'extrémité des branches.

1.2 - Caractères morphologiques de l'appareil reproducteur

La floraison est précédée par le développement des boutons floraux, qui au début apparaissent comme des petits dômes verts enfoncés dans le bois des branches et du tronc, puis croissent en développant un pédoncule par lequel ils restent suspendus. Ils sont soit solitaires ou insérés en groupe de 2, de 3 et jusqu'à 4.

Au stade final de leur développement, les enveloppes des boutons floraux (les pièces du calice) s'écartent en laissant apparaître les corolles des fleurs. Ces fleurs, sont solitaires ou groupés en cyme comme les boutons floraux. Les fruits engendrés sont pareillement disposés sur les branches et sur le tronc.

1.2.1 - Description de la fleur

La fleur est zygomorphe, gamopétale, tubulaire et terminée en cloche évasée ou campanulée, à bord frangés et un peu renversés vers l'extérieur (figure 3A).

Le calice est de couleur verte et divisé en 2 lobes. La corolle est de couleur blanc-jaunâtre ou un peu verdâtre, portant 4 étamines de taille égale et un petit staminode un peu enroulé. Les anthères sont formées par deux sacs polliniques qui divergent vers le bas, formant une pointe de flèche et portés par un filet inséré sur la corolle.

L'ovaire est supère ; il est surmonté d'un long style qui se termine par un stigmate partagé en 2 lamelles.

Sous ce gynécée, se trouve un disque nectarifère, sur lequel reposent les pièces florales.

Le tout est porté par un long pédoncule floral (figure 3B).

Les différentes pièces florales, formant le périanthe, l'androcée et le gynécée ont été mesurées. Les valeurs minimales, maximales et les moyennes de la longueur sont illustrées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Longueur des différentes pièces florales de l'arbuste

	Périanthe		Androcée		Gynécée	
	Calice	Corolle	Étamine	Staminode	Style	Ovaire
Longueur minimale (cm)	2,2	4,1	1,6	0,6	3	0,2
Longueur maximale (cm)	3,2	5,6	2	1,5	3,7	0,4
Longueur moyenne (cm)	2,78	4,87	1,71	0,86	3,41	0,3

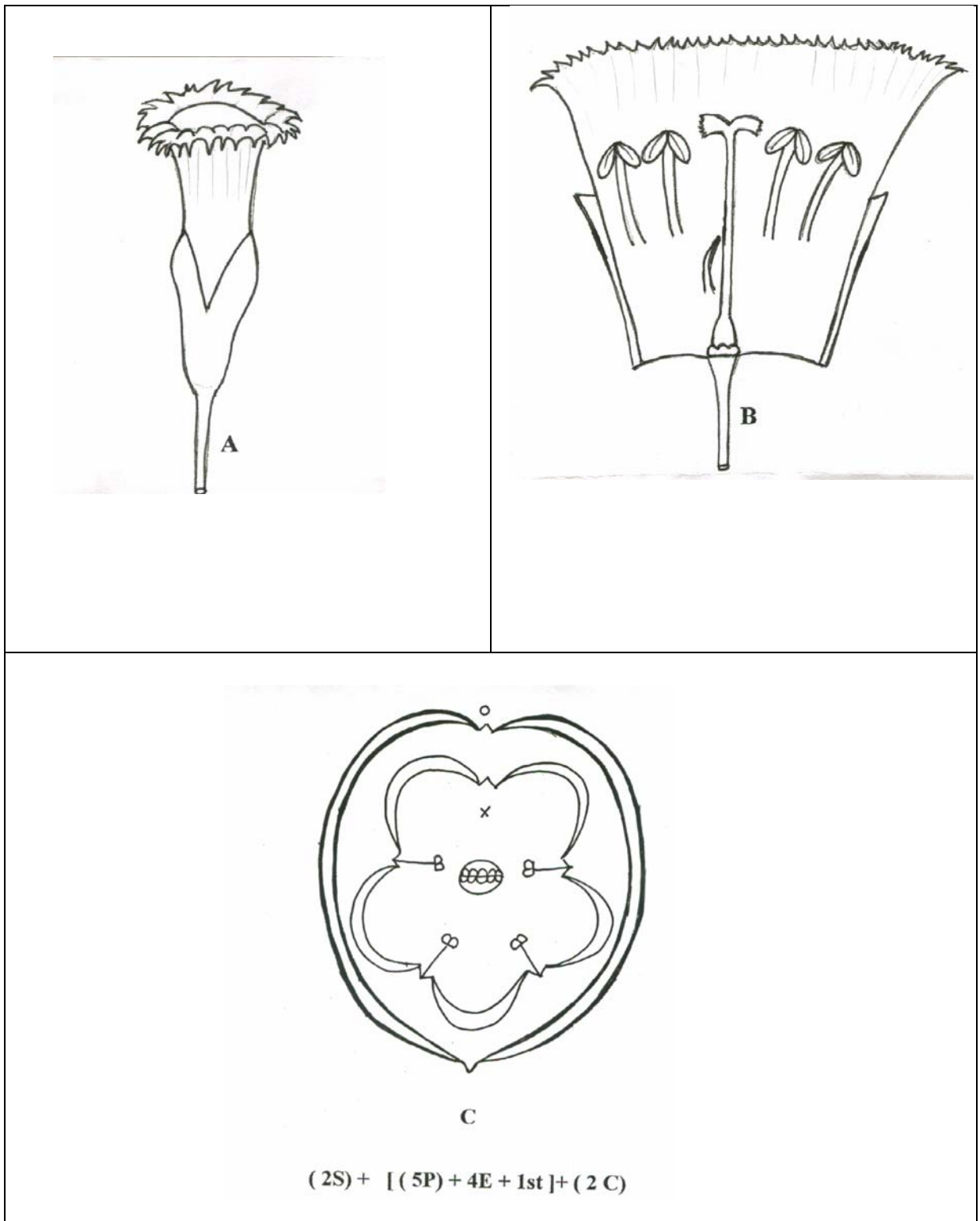


Figure 3 : caractères morphologiques de la fleur.

A : Aspect général de la fleur.

B : Corolle ouverte montrant 4 étamines et un staminode, un gynécée sur un disque nectarifère, formé par un ovaire, un long style et un stigmate divisé en deux lamelles.

C : Diagramme et formule florale.

1.2.2 – Type de placentation de l’ovaire

L’observation d’une coupe transversale au niveau de l’ovaire sous loupe binoculaire, montre deux loges carpellaires et de nombreux ovules insérés sur un placenta en position axile. Chez cette espèce, la placentation est donc axillaire (figure 4).

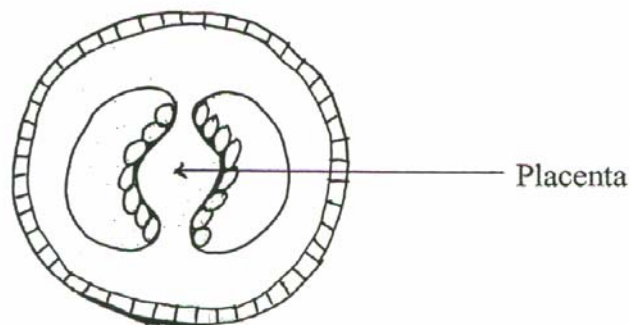


Figure 4 : coupe transversale au niveau de l’ovaire montrant une placentation axile.

1.3 - Description du fruit

Le fruit est une capsule indéhiscente, dont la section est arrondie ou elliptique. Il est de forme allongée ou courbée et acuminée à l’extrémité (figure5).

Il est de couleur verte, puis devient marron ou complètement noir après sa chute.

A maturité, il peut atteindre jusqu’à 22,5 cm de long et 4,32 cm de diamètre. Le poids est en moyenne de 51,34 g et peut atteindre jusqu’à 107,7 g (tableau 3).

A ce stade, l’épicarpe est dur, le mésocarpe est membraneux et l’endocarpe est charnu. Il est formé par une pulpe gorgée d’eau, dans laquelle sont immergées les graines.

Ces dernières sont non ailées, épaisses et présentant deux cotylédons. Le nombre de graines à l’intérieur du fruit varie de 1 à 26 graines ; il est en moyenne de 10,68.



Figure 5 : Aspect du fruit attaché à l'arbuste.

Tableau 3 : Valeurs minimales et maximales de la longueur et de la largeur des fruits mesurés à maturité.

	Longueur (cm)	Diamètre (cm)	Poids (g)	Nombre de graines
Valeur minimale	11,9	2,02	19,1	1
Valeur maximale	22,5	4,32	107,7	26
Moyenne	17	2,82	51,34	10,68

1.4 - Tableaux récapitulatifs

Les caractères morphologiques des deux genres (*Crescentia* et *Amphitecna*) et de l'espèce *Amphitecna macrophylla* sont regroupés sous forme de tableaux (4 et 5) dans le but de les comparer avec ceux de l'arbuste du jardin d'essai que nous avons décrit ci-dessus.

Tableau 4 : Caractères morphologiques distinctifs des deux genres *Crescentia* et *Amphitecna*

	<i>Crescentia</i> [d'après Nicholson (1894) et Lemmée (1929)]	<i>Amphitecna</i> [d'après Lemmée (1929) et Griffiths (1997)]
Feuilles	<p>Simple ou trifoliées. Alternes ou fasciculées</p> <p>Brièvement pétiolées</p>	<p>Simple.</p> <p>Alternes et rassemblées en bouquet au sommet des branches</p> <p>Brièvement pétiolées</p>
Fleurs	<p>Solitaires naissant sur le bois des branches et du tronc</p> <p>De couleur jaune, plus ou moins mélangée de pourpre</p> <p>Corolle tubuleuse, campanulée et à cinq lobes</p> <p>Disque nectarifère</p> <p>Calice formé de deux lobes</p>	<p>Solitaires ou groupées en cymes sur le vieux bois ou à l'extrémité des rameaux</p> <p>De couleur blanc verdâtre</p> <p>Corolle tubuleuse, campanulée et fibriée sur les bords</p> <p>Disque nectarifère</p> <p>Calice divisé en deux lobes</p>
Androcée	<p>4 étamines de longueur différente et 1 staminode, insérés sur la corolle.</p>	<p>4 étamines didynames ou de taille égale et 1 staminode insérés sur la corolle.</p>
Gynécée	<p>Ovaire uniloculaire, pluri ovulé et à placentation pariétale.</p>	<p>Ovaire formé de deux loges, pluri ovulé et à placentation axile.</p>
Fruit	<p>Volumineux, et indéhiscent</p> <p>Charnu.</p> <p>Graines non ailées.</p>	<p>Ligneux de forme différente, sphérique, ellipsoïde, allongé et étroit.</p> <p>Charnu.</p> <p>Graines non ailées.</p>

Tableau 5 : Comparaison des caractères morphologiques de l'espèce *Amphitecna macrophylla* décrite par (Baillon 1882 et Griffiths 1997) et de l'arbuste se trouvant au jardin d'essais du Hamma

	<i>Amphitecna macrophylla</i> (d'après Baillon (1882) et Griffiths (1997))	L'arbuste se trouvant au jardin d'Essais du Hamma (d'après notre description)
Feuilles	<ul style="list-style-type: none"> - Très grandes : peuvent atteindre jusqu'à 53 cm de long et 13 cm de large. - Feuilles oblancéolées, coriaces et glabres. - Limbe allongé et de couleur verte. - Pétiole très court et de couleur pourpre. 	<ul style="list-style-type: none"> - Très grandes : peuvent atteindre jusqu'à 53,5 cm de long et 12,2 cm de large. - Les feuilles sont simples, oblancéolées, verticillées et regroupées en bouquet à l'extrémité des branches. - Le limbe est de couleur verte. - Le pétiole est très court et de couleur pourpre.
Fleurs	<ul style="list-style-type: none"> - De couleur blanc verdâtre. - Solitaires ou regroupées. - De forme tubuleuse, campanulée et à bords frangés. - Le calice est inégalement déchiré en deux lobes - La longueur des fleurs varie de 3,7 à 5 cm de long. 	<ul style="list-style-type: none"> - De couleur blanc jaunâtre ou un peu verdâtre. - Solitaires ou regroupées en cymes. - Zygomorphes, tubuleuses ou campanulées. - Corolle dressée et inégalement fibriée sur les bords. - Calice divisé en deux lobes. - La longueur des fleurs varie de 4,1 à 5,6 cm de long.
Androcée	<ul style="list-style-type: none"> - 4 étamines didynames ou de taille égale, insérés sur la corolle. 	<ul style="list-style-type: none"> - 4 étamines de taille égale en moyenne 1,71 cm et un staminode mesurant en moyenne 0,86 cm de long insérés sur la corolle.
Gynécée	<ul style="list-style-type: none"> - Ovaire à deux loges carpellaires et à placentation axile. 	<ul style="list-style-type: none"> - La longueur du style varie de 3,7 à 3 cm. Il se termine en deux lobes aplatis. - La longueur de l'ovaire varie de 0,2 à 0,4 cm. Il repose sur un disque nectarifère. - L'ovaire est à deux loges carpellaires et à placentation axile.
Fruit	<ul style="list-style-type: none"> - Fruit charnu étroit et ellipsoïde, mesurant 1,6cm de diamètre. - Graines non ailées. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fruit de couleur verte, indéhiscent, à écorce dure et charnu à l'intérieur. - De forme allongée et acuminé à la base. Il est en moyenne 2,82 cm de diamètre. - Les graines non ailées

Discussion et conclusion

Les *Crescentia* et les *Amphitecna*, sont deux genres appartenant à la famille des Bignoniaceae. L'analyse et la comparaison des caractères morphologiques, regroupés dans le tableau 4, révèlent que ces deux genres se ressemblent par la forme des feuilles qui sont simples, alternes et brièvement pétiolées.

Ils se ressemblent aussi par la position des fleurs sur le bois des branches (cauliflorie), par la forme de la corolle qui est tubuleuse, campanulée et par le calice divisé en deux lobes. Mais se distinguent par la forme de la corolle : celle des *Crescentia* est formée par 5 lobes inégaux, dentés et enroulés (exemple : *Crescentia cujete*), tandis que celle des *Amphitecna* est inégalement déchirée et fibriée sur les bords.

Chez les deux genres, le fruit est ligneux, indéhiscent, charnu à l'intérieur et contenant des graines non aillées. Mais leur forme diffère, le fruit des *Crescentia* est volumineux, tandis que celui des *Amphitecna* est allongé.

Le caractère distinctif des deux genres est le type de placentation. Chez les *Crescentia*, l'ovaire est uniloculaire à placentation pariétale, alors que chez les *Amphitecna* l'ovaire est formé de deux loges carpellaires et les ovules sont insérés sur un placenta en position axile.

En se basant sur les caractères morphologiques de *Amphitecna* et *Crescentia* et le type de placentation qui est le caractère distinctif des deux genres et en décrivant l'arbuste se trouvant au Jardin d'essais, nous pouvons dire que ce dernier appartient plutôt au genre *Amphitecna* qu'au genre *Crescentia*. Car nos observations ont montré que l'ovaire de la fleur de l'arbuste est formé par deux loges carpellaires et un placenta sur lequel de nombreux ovules sont insérés en position axile.

Les observations et la description de l'arbuste nous permettent aussi de dire qu'il appartient à l'espèce *Amphitecna macrophylla* par la morphologie de la feuille et de la fleur.

Les feuilles de *Amphitecna macrophylla* sont simples, oblancéolées, coriaces, glabres et regroupées à l'extrémité des branches. Le limbe est de couleur verte et est porté par un pétiole très court, bombé et de couleur pourpre. Elles sont de grande taille, pouvant atteindre jusqu'à 53 cm de long et 13cm de large. Les feuilles de l'arbuste présentent les mêmes caractéristiques.

La fleur de *Amphitecna macrophylla* est tubuleuse, campanulée et dressée. Elle est formée par une corolle à bords inégalement frangés et un calice divisé en deux lobes.

Cependant, si les caractéristiques des fleurs de l'arbuste sont les mêmes que celles de *Amphitecna macrophylla*, elles sont plus grandes (4,1 à 5,6). Ceci peut s'expliquer par les conditions du milieu qui ne sont pas les mêmes.

De même quelques différences sont mises en évidence au niveau de la longueur des fruits : le fruit de l'arbuste est allongé et acuminé à la partie inférieure, il mesure en moyenne 17cm de long et 2,82 cm de diamètre. Le fruit de *Amphitecna macrophylla* décrit par Griffiths (1997), est étroit et ellipsoïde, il mesure 1,6cm de diamètre.

En conclusion nous pouvons dire, sur la base des caractères de l'ovaire principalement, l'arbuste existant au Jardin d'essai du Hamma d'Alger appartiendrait bien à l'espèce *Amphitecna macrophylla*.

Nous pouvons également conclure, que les caractères morphologiques de la feuille ne permettent pas de distinguer les deux genres, ce qui pourrait expliquer que cette espèce ait été désignée sous le nom de *Crescentia macrophylla* dans l'inventaire de 1868. Seuls les caractères de la fleur et principalement le type de placentation permettent de distinguer les deux genres d'où l'importance de l'analyse des parties de la fleur. En effet, il semble que cette espèce ait été inventoriée à un stade juvénile avant floraison.

2^{ème} PARTIE
BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

2-1 – Etude de la floraison

2-1-1– Période et durée de la floraison chez *Amphitecna macrophylla*

Les observations effectuées sur cet arbre pendant deux années successives, révèlent que pour l'année 2001, les boutons floraux sont apparus vers le 14 mai et l'épanouissement des premières fleurs s'est déroulé vers la fin de ce mois. Pour l'année 2002, un décalage de 14 jours a été noté : l'apparition des premiers boutons floraux a été observée vers la fin du mois de mai et l'épanouissement des premières fleurs le 23 juin. La floraison est continue, elle se poursuit pendant tout l'été jusqu'à la fin de l'automne et début de l'hiver. Elle s'achève donc vers la fin de du mois de décembre (tableau 6).

Tableau 6 : Date des observations faites sur l'arbuste durant la floraison des années 2001 et 2002

Année	2001	2002
Apparition des premiers boutons floraux	14/05/01	28/05/02
Epanouissement des premières fleurs	28/05/01	23/06/02
Fin de floraison	Fin décembre	Fin décembre

Le dénombrement des fleurs produites par l'arbuste, réalisé du 25 septembre jusqu'au 5 novembre 2001, est estimé à 2636 fleurs. Le comptage régulier, réalisé pour l'année 2002, révèle que l'arbuste produit au total environ 5918 fleurs pendant toute la floraison.

Les résultats montrent aussi que la floraison est optimum durant les mois de septembre et d'octobre avec plus de 1400 fleurs produites, puis commence à diminuer à partir du mois de novembre. Elle atteint une valeur minimale estimée à 28 fleurs au mois de décembre, qui correspond à la fin de la floraison (figure 6).

Mois	Nombre de fleurs produites
Janvier à Mai	0
Juin	534
Juillet	722
Août	886
Septembre	1428
Octobre	1489
Novembre	831
Décembre	28
Total	5918

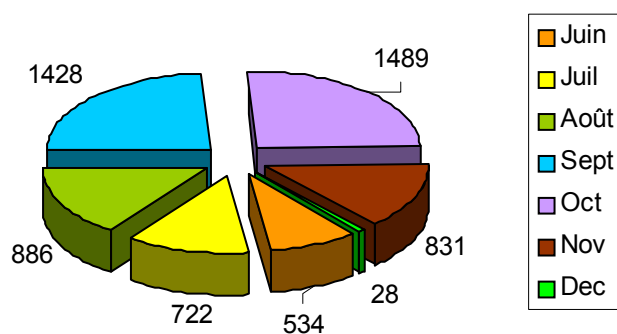


Figure 6 : Nombre de fleurs produites mensuellement par l'arbuste durant toute la période de floraison (année 2002).

Le nombre de fruits formés en fin de floraison pour l'année 2001 est estimé à 36 fruits. Pour l'année 2002, nous avons pu dénombrer jusqu'à 190 fruits. Pour les deux années, le taux de nouaison est très faible par rapport au nombre de fleurs produites par l'arbuste. Il est inférieur à 1,36 % pour l'année 2001, et de 3,21 % pour l'année 2002 (tableau 7).

Tableau 7: Taux de nouaison par rapport au nombre de fleurs produites par l'arbuste durant les années 2001 et 2002.

Année	2001	2002
Nombre de fleurs produites	> 2636	5918
Nombre de fruits formés	36	190
Taux de nouaison (%)	< 1,36	3,21

2-1-2- Les différentes étapes du développement de la fleur

- Développement du bouton floral

Le suivi du développement de la fleur, depuis le stade bouton floral jusqu'à l'épanouissement de la fleur, nous a permis de distinguer 5 stades principaux (figure 7)

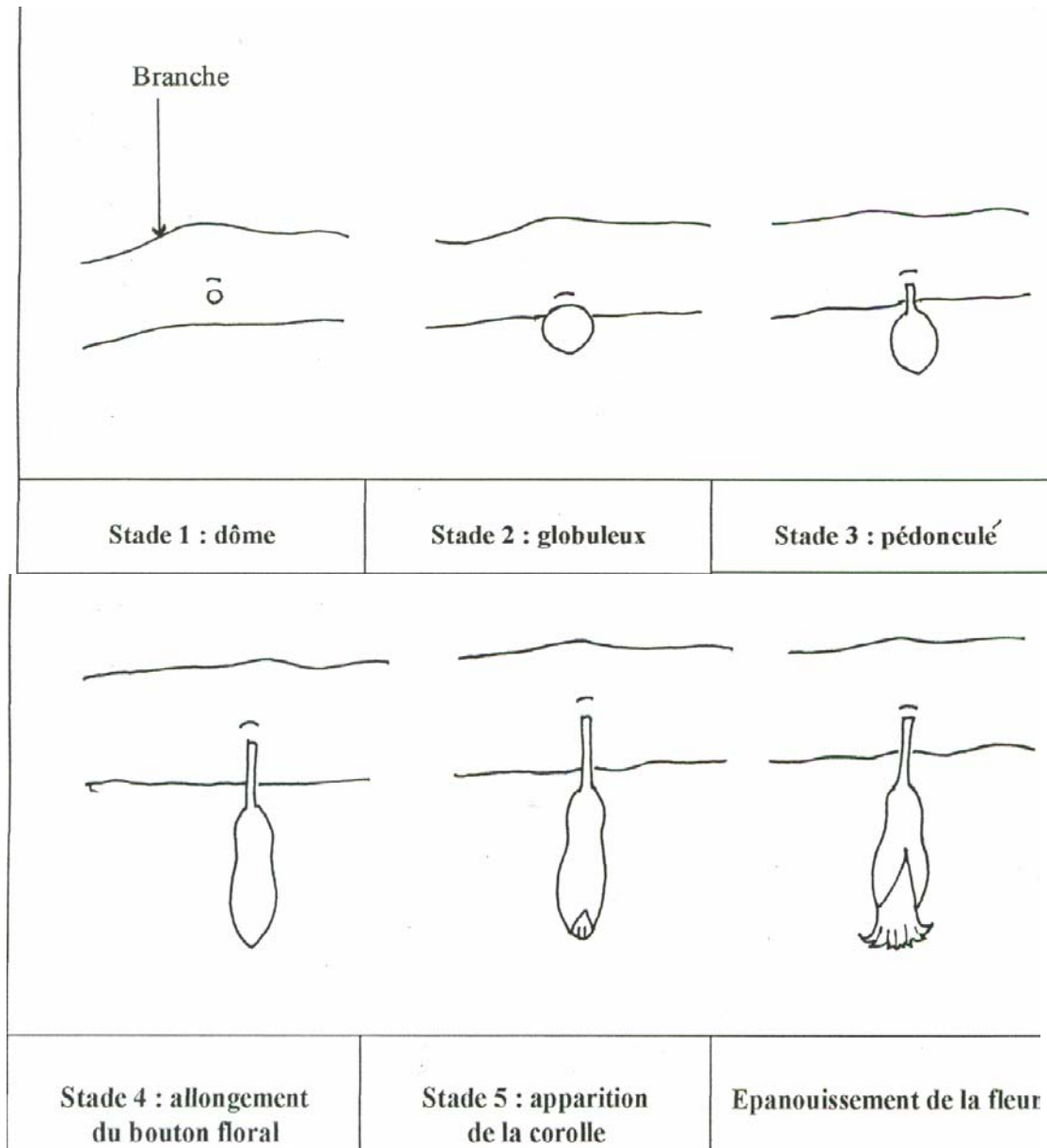


Figure 7 : Les différentes étapes du développement de la fleur

- ♦ **Stade 1** : Le bouton floral apparaît comme un petit dôme vert enfoncé dans le bois des branches de l'arbuste, mesurant environ 0,1 cm
- ♦ **Stade 2** : Quand il atteint une longueur d'environ 0,5 cm, il prend l'aspect d'une masse globuleuse et un peu acuminé à l'extrémité.
- ♦ **Stade 3** : Le bouton floral développe un pédoncule par lequel il est attaché à l'arbuste.
- ♦ **Stade 4** : La croissance du bouton floral se fait en s'allongeant.
- ♦ **Stade 5** : A la fin de son développement, les pointes des sépales du bouton floral s'écartent en deux lobes, laissant apparaître la corolle froissée. Au moment de l'apparition de la corolle, la longueur du bouton floral est variable (annexes 4, 5, 6, 7) et (tableau 8).

Pour l'année 2001, la longueur du bouton floral est en moyenne de 3,2 cm en juillet et de 4,2 cm en septembre – octobre. Pour l'année 2002, la valeur moyenne varie de 3,9 à 4,1 cm.

Tableau 8 : Valeurs minimales et maximales de la longueur du bouton floral au stade final (stade 5) de son développement pour les années 2001 et 2002.

Longueur du bouton floral	2001		2002	
	Juillet	Sept-octobre	Juillet	Sept-octobre
Valeur minimale (cm)	2,3	3	3,5	2,8
Valeur maximale (cm)	4,2	5	5	5
Moyenne (cm)	3,2	4,2	4,1	3,9

La durée ou le temps que met le bouton floral jeune pour atteindre le stade mature est aussi variable : il est en moyenne de 10,2 jours (≈ 10 j) en Juillet 2001 et de 14,66 jours (≈ 15 j) en septembre octobre. Pour l'année 2002, le temps moyen est de 10,3 jours en Juillet et de 16,8 jours en septembre –octobre. Le temps réel est supérieur à ces valeurs, car les premières mesures ont été effectuées sur des boutons floraux dont la longueur varie de 0,1 cm à 0,9 cm. (Tableau 9).

Nous pouvons donc déduire que la croissance du bouton floral est plus rapide en été qu'en automne.

Tableau 9 : durée de la maturation et de l'ouverture du bouton floral.

	Juillet	Sept -Octobre
Année 2001	> 10 j	> 15 j
Année 2002	> 10 j	> 17 j

- ***Epanouissement de la corolle et anthèse***

La fleur s'épanouie : la corolle froissée entre les deux sépales se dresse et la fleur a l'aspect d'une clochette suspendue par le pédoncule sur la branche. Le périanthe est formé par un calice divisé en deux lobes et une corolle tubuleuse à bords frangés. L'épanouissement de la fleur a lieu pendant la nuit ou très tôt le matin.

A ce stade les anthères sont encore fermées, le stigmate est bien visible. Il est formé de deux lamelles écartées. La déhiscence des anthères qui est introrse n'a lieu que 24 heures après l'ouverture de la corolle.

Les deux appareils reproducteurs arrivent à maturité successivement et non simultanément. Les fleurs de cette espèce sont donc protogynes.

Chez la plupart des fleurs de cette espèce l'androcée est au même niveau que le stigmate. Mais des fleurs hétérostyles ont été observées : parmi 37 fleurs, 10 (27,02%) sont longistyles et 2 (5,40%) sont brévistyles.

2-1-3 – Chronologie de la fructification

Après l'anthèse, la fleur subit des modifications qui précèdent la formation du fruit (figure 8) :

- ♦ **Chute du périanthe**

L'ensemble du calice et de la corolle se détache et tombe généralement 2 à 3 jours après l'épanouissement de la fleur. Dans certains cas le périanthe persiste et devient noir.

- ♦ **Chute du style**

Le style commence à noircir et tombe le 4^{ème} ou le 5^{ème} jour après l'épanouissement de la fleur.

- ♦ **Formation du fruit**

Après la chute du style, l'ovaire reste suspendu par le pédoncule sur la branche. Il augmente de taille en s'allongeant pour donner le fruit.

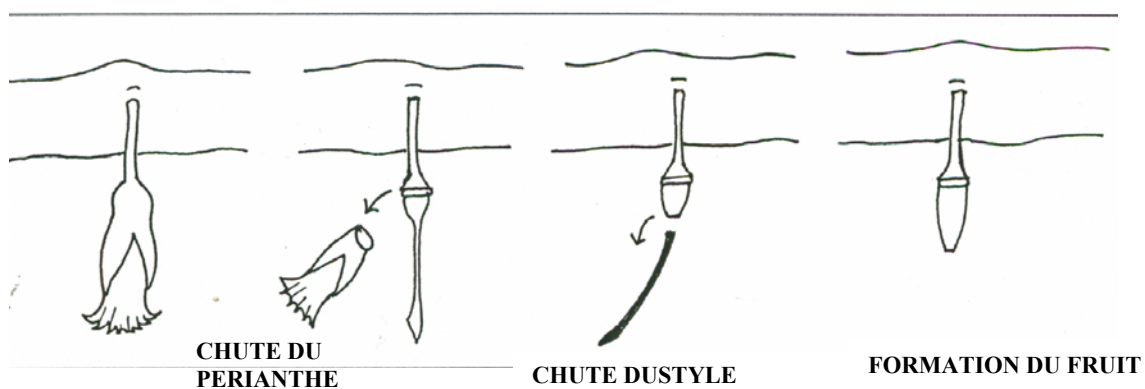


Figure 8 : Les différents stades de modifications de la fleur qui précèdent la nouaison

Le suivi du développement de la fleur, depuis le stade bouton floral jusqu'à la nouaison a permis non seulement d'analyser les différents stades par rapport à des repères morphologiques et chronologiques, mais aussi de constater que le taux de fructification est très faible ou nulle, par rapport au nombre des boutons floraux observés.

D'après les résultats regroupés dans le tableau 10 et figure 10, sur la totalité des boutons floraux observés pendant les deux années, un seul fruit s'est formé. Ceci est dû à :

- La chute des boutons floraux, mais à un taux faible de 23,33 % à 10 % pour l'année 2001 et très faible à nul pour l'année 2002 (3,22 % à 0).
- La chute des fleurs après anthèse dont le taux est un peu élevé en Juillet (46,6 %) et faible en Sept-octobre (16,66 %) pour l'année 2001. Il est nul pour l'année 2002.
- La chute des ovaires au début de leur transformation en fruit dont le taux est élevé en Sept-octobre 2001 (73,33 %), très élevé pour l'année 2002 avec un taux de 93,54 % à 100 %. Le rendement en fruits n'est que de 3,22 %.

L'ovaire tombe généralement au 6^{ème} ou au 11^{ème} jour après l'anthèse à une longueur variant de 0,4 à 0,5 cm.

Nous pouvons déduire que le faible taux de fructification est dû essentiellement à la chute des jeunes fruits.

Tableau 10 : Taux de fructification calculé en été et en automne de l'année 2001 et 2002

	Année 2001				Année 2002			
	Juillet		Sept-octobre		Juillet		Sept-octobre	
Nombre des boutons floraux observés	30		30		31		31	
Chute des boutons floraux	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
	7	23,33%	3	10 %	1	3,22 %	0	0
Chute des fleurs après anthèse	14	46,66%	5	16,66%	0	0	0	0
Chute de l'ovaire au début de sa transformation en fruit	9	30 %	22	73,33%	29	93,54%	31	100 %
Fructification	0	0	0	0	1	3,22 %	0	0

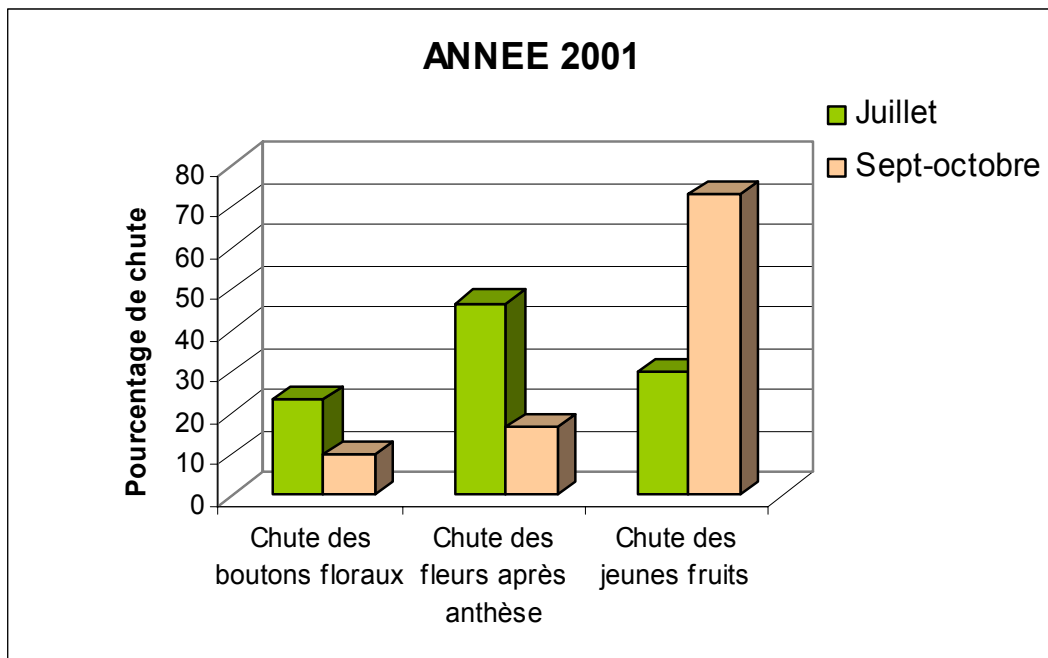
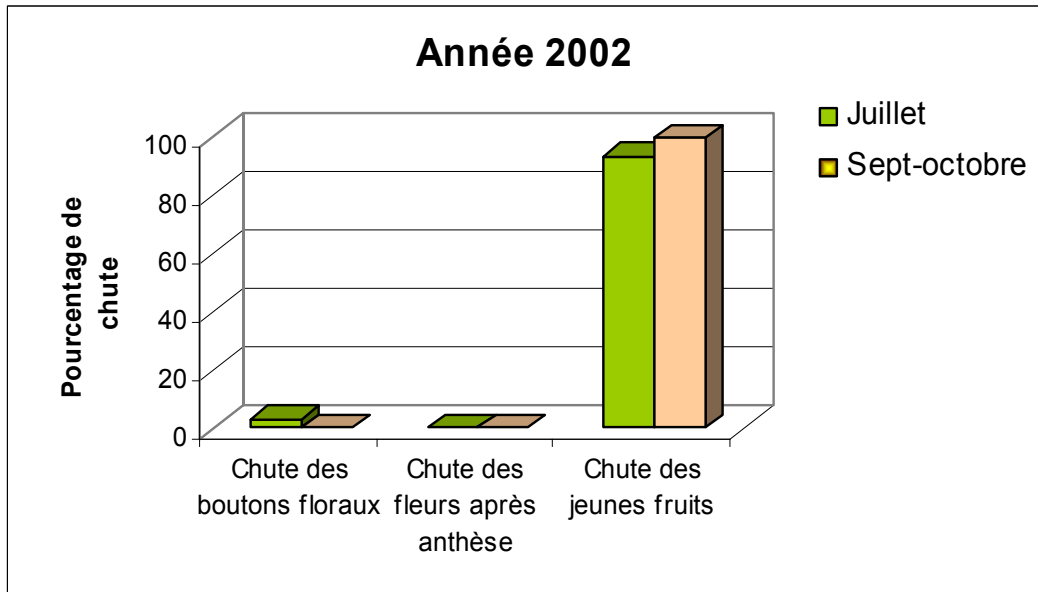


Figure 9 : Pourcentage de chute des boutons floraux, des fleurs et des jeunes fruits au cours de l'été et l'automne 2001 et 2002.

2-1-4 – Croissance et maturation du fruit

A l'anthèse, l'ovaire mesure en moyenne 0,3 cm. A maturité, la longueur du fruit varie de 11,9 à 22,5 cm. La longueur moyenne est de 17 cm. Le diamètre est en moyenne de 2,82 cm et varie de 4,32 à 2,02 cm. Le poids du fruit varie de 19,1g à 107,7g. Le poids moyen est de 51,34 g.

Il existe également une variation du nombre de graines contenues dans les fruits. Le nombre est compris entre 1 et 26 graines, la moyenne est de 10,68 par fruit.

Dans le but d'étudier la croissance des fruits jusqu'à leur maturation 20 jeunes fruits ont été étiquetés et mesurés au cours de l'année 2001. Mais la majorité tombent avant leur maturité. Nous n'avons pu suivre que 4 fruits F₁ et F₂ en été, F₃ en automne et F₄ en hiver.

Nous avons constaté qu'il y avait une variabilité dans les vitesses de croissance. Les fruits F₁ et F₂ atteignent respectivement des longueurs de 18,1 cm en 97 jours et 16,5 cm en 88 jours. Ces fruits sont ramassés après leurs chute, ils sont matures et contiennent chacun 3 graines.

Le fruit F₃, mesuré en automne atteint une longueur de 17,6cm en 39 jours. Ce fruit est mature, il contient 4 graines.

Le fruit F₄ atteint la longueur de 15,5 cm en 184 jours. Ce dernier a été cueilli, il est mature et contient 14 graines.

L'étude a été réalisée sur 4 fruits seulement, nous nous gardons de toute conclusion concernant la croissance des fruits de cet arbuste.

2-2 – Etude du système de reproduction

2- 2-1 – Dénombrement des ovules

Le dénombrement des ovules montre que le nombre moyen d'ovules par ovaire est de 76,1. La valeur minimale est estimée à 53 ovules et la valeur maximale est de 107 ovules.

Le nombre maximal de graines estimé à 26, est très inférieur au nombre moyen d'ovules présents dans l'ovaire de la fleur de cette espèce.

2-2-2 – Etude de la viabilité du pollen

L'estimation de la viabilité pollinique par le test d'Alexander (1960), montre qu'elle est en moyenne de 89,20 % pour les fleurs testées en août, et de 87,59 % pour celles testées en octobre (tableau 11).

Le taux de viabilité des grains de pollen est donc élevé.

Tableau 11 : Taux de la viabilité pollinique pour les deux mois (août et octobre 2002)

Mois	Nombre de fleurs étudiées	Nombre de grains de pollens observés	% de grains de pollen viables
Août	10	1085	89,20 %
Octobre	9	1107	87,59 %

Le taux de germination des grains de pollen dans le milieu Brewbaker et Kwack (1964), est également élevé. Il est en moyenne de 60,42 % pour les fleurs testées en août et de 72,49 % pour celles testées en octobre (tableau 12).

Tableau 12 : Pourcentage de germination in-vitro du pollen des fleurs testées en août et en octobre (2002)

Mois	Nombre de fleurs étudiées	Nombre de grains de pollens observés	% de grains de pollen viables
Août	7	1247	60,42 %
Octobre	10	1249	72,49 %

2-2-3 – Observation en microscopie à fluorescence des pistils des fleurs autopollinisées manuellement et librement

L'utilisation de la microscopie à fluorescence, permet d'estimer l'adhérence et la germination des grains de pollen dans le pistil des fleurs pollinisées manuellement et librement. Les résultats sont exprimés en nombre de grains de pollen au stigmate qui adhèrent au stigmate et des tubes polliniques au niveau de la partie sommitale et basale du style (entrée de l'ovaire) (tableau 13). Il est important de signaler que la pollinisation manuelle est réalisée sur des fleurs à peine épanouies et avant anthèse, c'est-à-dire avant déhiscence des anthères qui n'a lieu qu'après 24heures.

Tableau 13 : Adhérence et pénétration mesurées respectivement par le nombre de grains de pollen et le nombre des tubes polliniques dans le style des fleurs en fonction du mode de pollinisation

			Adhérence	Pénétration			
			Stigmate	Partie supérieure du style		Partie basale du style (entrée de l'ovaire)	
Mode de pollinisation	Année	Nombre de gynécées observés	Nombre moyen de grains de pollen	Nombre moyen de tubes polliniques	Taux de tubes polliniques	Nombre moyen de tubes polliniques	Taux de tubes polliniques
Auto pollinisation manuelle	2001	26	85,53	68	79,50%	22	25,72%
	2002	31	35,48	24,38	68,71%	7,22	20,34%
Auto pollinisation libre	2001	34	46,67	28,47	61 %	6,55	14,03%
	2002	50	78	60,22	77,20%	11,6	14,87%

Les observations montrent qu'il y a une bonne adhérence des grains de pollen sur le stigmate des fleurs pollinisées manuellement et librement et que la majorité du pollen germe et produit des tubes polliniques qui pénètrent dans le style et progressent jusqu'à l'ovaire (figure 10).

Il faut toutefois remarquer que le nombre de tubes polliniques qui pénètrent dans la partie sommitale du style est plus ou moins important par rapport au nombre de grains de pollen adhérents sur le stigmate (plus de 60% des tubes), mais il est plus réduit dans la partie basale c'est-à-dire à l'entrée de l'ovaire.

Ainsi pour les deux années, moins de 30% seulement arrivent à la base du style en pollinisation manuelle et moins de 15% en pollinisation libre.

Pour atteindre les ovules, les tubes polliniques doivent parcourir toute la longueur du style. Celui-ci mesure en moyenne 3,41cm de long. On se demande si les ressources du pollen sont suffisantes pour assurer la croissance de tous les tubes polliniques et parcourir une longueur si importante?

Ce serait principalement les réserves du pollen qui dans un premier temps sont utilisés pour édifier la paroi du tube. Puis, au cours de sa croissance dans le pistil, des métabolites lui sont fournis par les tissus du stigmate et du style (Heslop-Harrison, 1987 in Hadj Arab, 1999).

Les tubes polliniques entrent en concurrence pour ces métabolites. Ce qui expliquerait la réduction progressive de leur nombre depuis le stigmate jusqu'à la base de l'ovaire.

Les résultats obtenus en autopolinisation manuelle, permettent de dire que le stigmate est réceptif dès l'épanouissement de la fleur, alors que les anthères sont indéhiscents et qui ne s'ouvrent qu'après 24 heures. Les fleurs de cette espèce sont donc protogynes, car les deux appareils reproducteurs n'arrivent pas en même temps à maturité.

En pollinisant nous même les fleurs, nous avons remarqué que les deux lamelles du stigmate se referment quelques secondes après frottement des anthères.

Ce phénomène semble ne pas être particulier à *Amphitecna macrophylla*, car il a été également observé par Bittencourt et Semir (2004) chez une Bignoniaceae (*Zeyheria montana*). Ce phénomène est important car il permet de protéger le pollen contre les insectes. Mais les fleurs ne peuvent être pollinisées qu'une seule fois.

En auto pollinisation libre, bien que la majorité des fleurs sont pollinisées, on ignore si elles sont pollinisées avec le pollen de la même fleur ou avec le pollen apporté des autres fleurs par les insectes (abeille domestique, mouche, et surtout des fourmis, dont nous avons observé un grand nombre pénétrant à l'intérieur des fleurs pour récolter le nectar sécrété par le disque nectarifère à la base de l'ovaire.

2-2-4 – Taux de fructification obtenu par pollinisation manuelle

Les résultats du suivi des fleurs pollinisées manuellement révèlent que parmi les 71 fleurs traitées du 7/8/02 au 4/11/02, une seule qui a donné un fruit (soit 1,40 %).

Ceci est dû dans certains cas à la chute des fleurs après anthèse (5,63 %). Mais dans la majorité des cas ce sont les ovaires qui tombent au début de leur transformation en fruits (92,95 %) (Tableau).

Tableau 14 : Taux de fructification obtenu après pollinisation manuelle de 71 fleurs traitées

Nombre de fleurs pollinisées	Chute des fleurs		Chute des ovaires		Fructification	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
71	4	5,63 %	66	92,95 %	1	1,40 %

Les ovaires mesurés juste avant leur chute ont une longueur qui varie entre 0,4 et 1,1 cm. La chute des jeunes fruits est observée 6 à 20 jours après la pollinisation artificielle qui coïncide avec l'épanouissement de la fleur.

L'obtention d'au moins un seul fruit parmi les 71 fleurs pollinisées manuellement avant anthèse, montre que les fleurs pollinisées à ce stade peuvent donner des fruits contenant des graines.

Il est probable que les fleurs soient pollinisées par les insectes, car comme nous l'avons déjà signalé le stigmate est réceptif dès l'épanouissement de la fleur, avant la déhiscence des anthères. Bien qu'elle soit hermaphrodite, la fleur à ce stade fonctionne comme une fleur

male et le dépôt du pollen libre ne peut se faire que par un agent biotique (un insecte) et ne peut se faire par un agent abiotique (le vent, par exemple) car les fleurs sont suspendues vers le bas comme des clochettes.

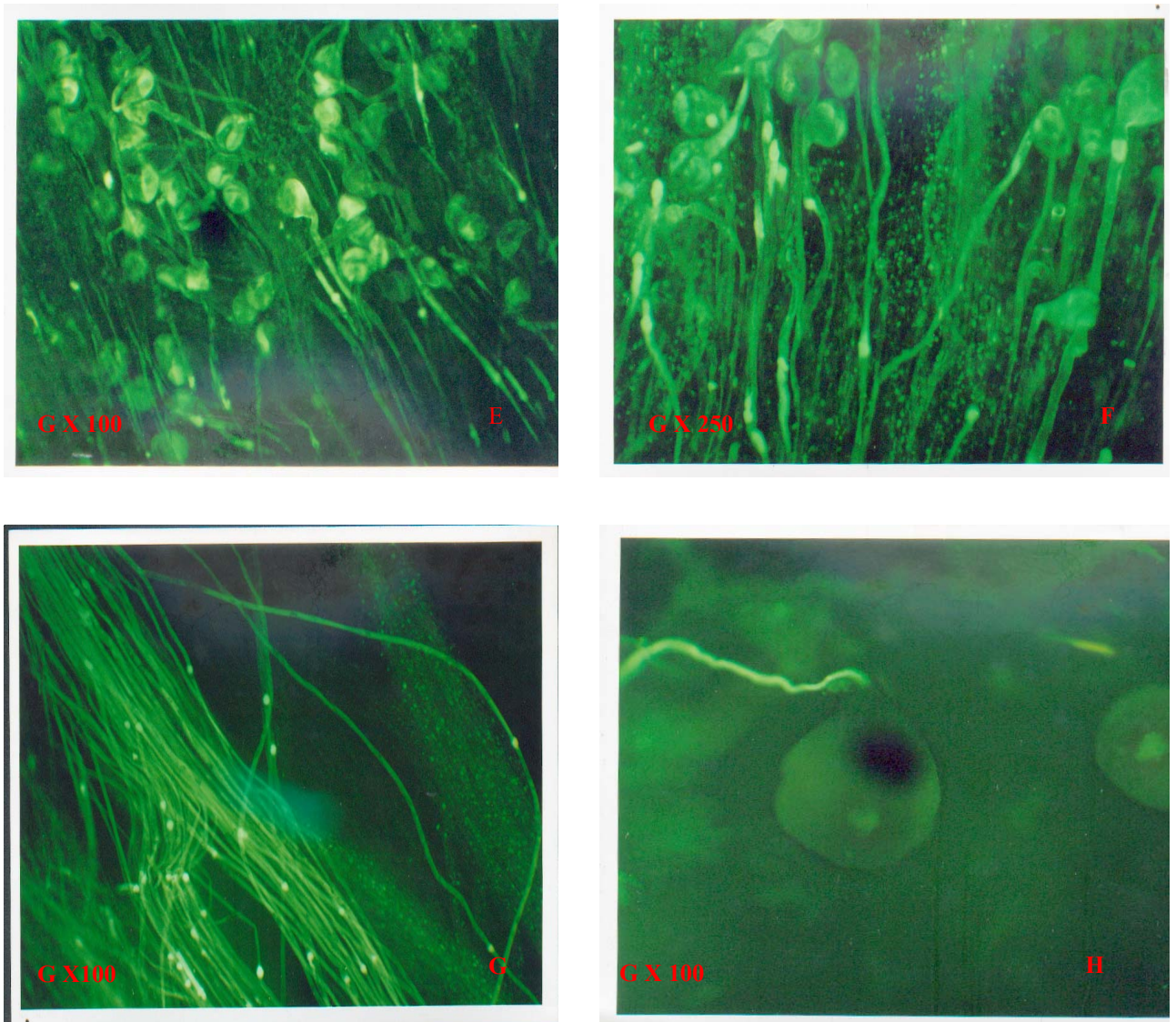


Figure 10: observation en microscopie à fluorescence des grains du pollen et des tubes polliniques.

E et F : germination des grains de pollen au niveau du stigmate.

G : tubes polliniques au niveau du style.

H : tube pollinique pénétrant dans un ovule.

Discussion et conclusion

L'étude menée sur l'arbuste pendant deux années successives (2001 et 2002), montre que la floraison s'installe dès le début de l'été (mois de Juin) et s'étale jusqu'à la fin de l'automne (fin décembre), dans les conditions du Jardin d'essai du Hamma.

Cette étude indique également que cette espèce est caractérisée par une floraison abondante et un taux de fructification très faible. Au cours de l'année 2002, cet arbuste a produit 5918 fleurs et un taux de fructification estimé à 3,21 %.

Ce phénomène semble ne pas être particulier à *Amphitecna macrophylla*, car il se présente chez quelques espèces tropicales même dans leur pays d'origine, comme le cacaoyer (Bezpalý, 1984) et l'avocatier (Le Bellec et Renard, 1999). Selon Pouvreau (1984), le faible taux de fructification est dû à la non pollinisation des fleurs produites.

Chez *Amphitecna macrophylla*, d'après notre étude le faible taux de fructification est dû essentiellement à la chute des ovaires au début de leur transformation en fruits.

Dans le cas de *Amphitecna macrophylla*, le problème de pollinisation ne se pose pas car :

- L'analyse de la qualité du pollen et sa capacité de germination montre que le taux de viabilité est très élevé (> 80 %) ainsi que le taux de germination (> 60 %).
- L'observation en microscopie à fluorescence des pistils de fleurs pollinisées manuellement et librement a montré que les grains de pollen adhèrent au stigmate et produisent des tubes polliniques qui arrivent jusqu'à l'ovaire pour féconder les ovules.

Il faut toute fois signaler que le nombre de tubes polliniques qui arrivent jusqu'à l'ovaire est faible, ce qui est corrélé avec le faible nombre de graines à l'intérieur du fruit.

Le nombre d'ovules au sein des ovaires de cette espèce est très élevé, il est en moyenne de 76,1 ovules. Le nombre de graines à l'intérieur des fruits est faible, il varie de 1 à 26 graines, il est en moyenne de 10,68. Donc, seulement 14,03 % des ovules ont pu être fécondés et donner des graines. Nous avons pu observer à l'intérieur de la majorité des fruits des articles vides (sous forme de pochettes blanches) qui correspondent souvent à des embryons avortés.

En ce qui concerne le système de reproduction, chez les Bignoniaceae il existe des espèces auto compatibles c'est-à-dire autogames comme : *Pyrostegia venusta* (Gobatto-Rodrigues et Stort, 1992) ; *Asthanthus viminalis* (Bullock, 1985) et *Tecoma stans* (Sigh et Chauhan, 1996 ; Dutra et Machado, 2001) et des espèces auto incompatibles donc allogames comme *Zeyheria montana* (Bittencourt et Semir, 2004).

Dans le cas de *Amphitecna macrophylla*, cette espèce présente un régime de reproduction autogame, grâce aux caractères liés à la structure de la fleur :

- Les fleurs sont hermaphrodites.
- La déhiscence des anthères est introrse.
- Les pistils et les étamines sont en même niveau pour la majorité des fleurs.

Dans le cas de cette espèce, l'autogamie est un avantage qui lui a permis de survivre à l'état isolé, loin de son aire naturelle.

Cependant d'autres caractères liés à la structure de la fleur, offre des possibilités au mode de pollinisation allogame :

- La protogynie : Le stigmate est réceptif dès l'épanouissement de la fleur, le gynécée arrive donc à maturité avant l'androcée.
- L'hétérostylie : Nous avons observé des fleurs longistyles à un taux de 24,02 %.

D'autres caractères de la fleur permettent de dire que cette espèce pourrait être entomophile c'est-à-dire pollinisée par les insectes, comme la présence du disque nectarifère. Aussi l'apport et le dépôt du pollen sur le stigmate arrivant à maturité après anthèse avant l'androcée (déhiscence des anthères), ne peut se faire qu'avec un insecte.

Selon Lopez et al. (2002), toutes les espèces appartenant à la famille des Bignoniaceae sont zoophiles et que l'agent pollinisateur principal est l'abeille (Gentry, 1974a, Endress, 1994).

En conclusion, nous pouvons dire que la structure de la fleur de *Amphitecna macrophylla* offre des possibilités d'autofécondation aussi bien que de pollinisation croisée. Ceci nous amène à dire qu'elle pourrait être allogame dans son pays d'origine.

3^{ème} PARTIE
GERMINATION DES GRAINES

3 - Etude de la germination des graines et de la croissance

3.1 – Description de la graine

Les graines de *Amphitecna macrophylla* de forme bombée, ont une couleur qui varie du vert clair tacheté de marron au marron foncé.

A maturité, la longueur des graines varie de 0,8 à 2 cm. La largeur varie de 0,7 à 1,3 cm. Leur poids est aussi variable, il est de 0,27 à 0,48 g.

L'étude de la graine de cette espèce, révèle qu'elle a une structure typique de celle d'une dicotylédone et éxalbuminée comme toutes les graines appartenant à la famille des Bignoniacées. Elle est formée de deux parties : les téguments et l'embryon.

- **Les téguments**

Ils sont en nombre de deux, le plus externe est fin et de couleur blanchâtre. Le plus interne est très fin et transparent. Il est difficile à percevoir, car il est collé à la graine et ne peut être détaché qu'une fois la graine est humidifiée ou imbibée d'eau.

Ces deux téguments constituent l'enveloppe de la graine et protègent l'embryon.

- **L'embryon**

Il est formé de deux cotylédons, bombés et amincis aux deux extrémités. Chaque cotylédon est parcouru par un sillon qui tend à le couper en deux dans le sens de la largeur (figure 11 A).

La tigelle, la gemmule et la radicule, forment une seule masse globuleuse et blanchâtre, mesurant environ 0,2 cm et située à l'extrémité interne du cotylédon. Elle ne peut être visible que si on sépare les deux cotylédons (figure 11 B)

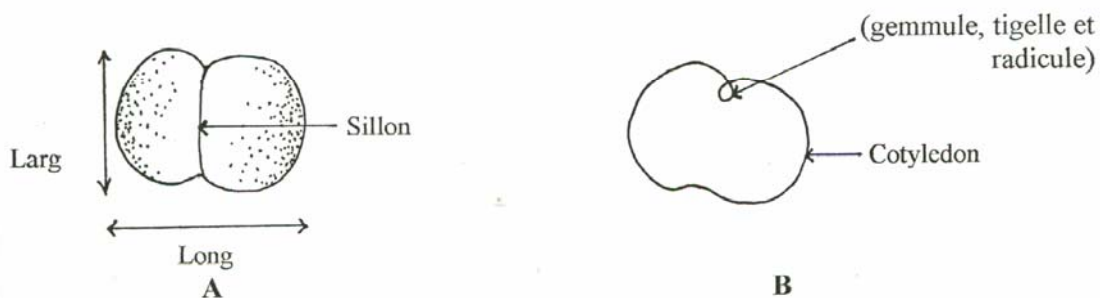


Figure 11 : Dessin de la graine de *Amphitecna macrophylla* (A : aspect générale ; B : un cotylédon détaché et vu de la face interne).

3.2 – Germination des graines en conditions non aseptiques

Les tests de germination des graines ont été réalisés en un premier temps dans des pots contenant un substrat et placés sous serre. Ensuite in vitro dans les conditions du laboratoire.

3.2.1 – Germination des graines en pots sous serre

Le taux de graines germées dans des pots contenant de la tourbe arrosée avec du Knop dans les conditions de la serre, est de 100 %.

Après 8 jours de leur mise en germination, les graines présentent des radicules dont la longueur est d'environ 2 cm.

Les premières plantules au stade de quatre feuilles sont obtenues après 16 jours. Après 36 jours, le taux de graines ayant atteint le stade de croissance est de 100 %. La longueur de la tigelle des plantules varie de 3 à 7 cm (figure12).Après 38 jours, les plantules ayant atteint une longueur d'environ 10 cm et qui sont en nombre de 16, sont repiquées et empotées dans un autre substrat contenant un mélange de terre végétale, terreau, sable et tourbe. Les plantules sont arrosées avec de l'eau ordinaire et mises dans la même serre. A l'arrivée du mois de novembre l'extrémité des feuilles des jeunes plantules commence à noircir puis tombent. Les plantules meurent quelques jours après. Nous avons pensé, que ce phénomène est du probablement au froid, car les serres ne sont pas chauffées. La température est d'environ -2°C la nuit et 20°C pendant le jour. Nous avons tenté de minimiser le taux de mortalité des plantules en procédant de la manière suivante :

- Empotage des plantules dans un mélange de terre végétale, scirure de liège et terreau.
- En minimisant la quantité d'arrosage (une fois par semaine).
- En couvrant les plantules en fin d'après midi par des housses en plastique, afin de les protéger du froid de la nuit.

Cette méthode s'est avérée efficace pour quelques plantules (8 plants ont pu survivre jusqu'à un an), soit 36,36%.

Nous avons essayé de transplanter 3 plants afin de les acclimater dans le sol du jardin, pour cela nous avons choisi deux endroits différents : le premier est exposé au soleil, le deuxième est demi ombragé. Dans les deux endroits, le sol est riche en matière organique.

- Un plant âgé de 2 ans et dont la longueur est d'environ 20 cm (figure 13), planté dans le carré botanique (endroit exposé au soleil).
- Deux plants de 3 ans d'environ 40 cm de long, ont été plantés dans le carré de semis (endroit demi ombragé).

Seuls les deux plants de 3 ans plantés dans le carré de semis, ont pu survivre. Un plant âgé de 4 ans est représenté dans la figure 14.

Les conditions de cet endroit se sont avérées favorables. Nous avons déduit que la croissance des plants nécessitent une terre très riche en matière organique et qu'ils ont besoin d'un endroit demi ombragé, car ils sont très sensibles aux rayons directs du soleil durant l'été. Nous pouvons aussi ajouter que ces plants nécessitent un arrosage abondant en été.

Aujourd'hui ces deux plants ont pu se développer et croître. Un plant mesure 105 cm de long et la taille des feuilles est d'environ 30 cm de long. Le deuxième plant dont la croissance est moins rapide, mesure 65 cm de long et les feuilles environ 15 cm de long.

Donc, parmi 22 plantules deux seulement ont pu survivre et atteindre le stade des plants (soit un taux de 9,09 %)



Figure 12 : jeunes plantules.



Figure 13 : plant âgé de deux ans.



Figure 14 : plant âgé de 4 ans.

3.2.2 – Germination des graines in vitro

Les tests de germination sont réalisés au laboratoire. Les graines sont mises dans des boîtes de pétri et arrosées avec de l'eau ordinaire.

3.2.2.1 – Influence des téguments sur la germination des graines

Dans le but d'étudier l'effet des téguments sur la germination des graines de *Amphitecna macrophylla*, différents essais sont réalisés. Les résultats sont reportés dans le tableau 15 :

Tableau 15 : Influence des téguments sur la germination des graines de *Amphitecna macrophylla*

Lots de graines	Nombre de graines mises à germer	Taux de germination (%)	Temps moyen de germination (jours)
Avec les deux téguments	10	100	7,26
Avec un tégument	10	100	5
Sans téguments	10	100	3

Ces résultats montrent que les graines germent aussi bien en présence qu'en absence de téguments. Pour les trois lots, nous enregistrons un taux de 100 % de graines germées, les téguments ont par contre un effet sur la vitesse de germination. Les graines sans téguments germent plus vite que les graines avec un ou deux téguments.

Ces résultats montrent également que les graines de cette espèce ont une capacité de germination très importante. Elles ne présentent pas de dormance, elles germent peu de temps après leur mise en germination. Dans le cas de ces essais, le temps de latence est de 3 jours.

Notons que les tests de germination qui suivent, sont réalisés avec des graines débarrassées de leurs téguments.

3.2.2.2 – Effet de la température sur la germination des graines

Pour tester l'effet de la température sur la germination des graines de *Amphitecna macrophylla*, nous avons jugé utile de réaliser un test de germination à 25° c et à température ambiante pendant le mois d'août, septembre et décembre.

Les résultats sont donnés dans le tableau 16 et la figure 15.

Tableau 16 : Germination des graines de *Amphitecna macrophylla* à 25° C et à température ambiante (août, septembre et décembre)

	A température ambiante			
	25° c	Août (28°C)	Septembre (26,2°C)	Décembre (16,5°C)
Nombre de graines mises à germer	10	36	7	18
Taux de germination (%)	100 %	100 %	100 %	100%
Temps moyen de germination (jours)	4	6,07	3,1	4,37

Le tableau 16 et la figure 15 montrent que le taux de graines mises à germer à 25°c et à température ambiante pendant les mois d'août, septembre et décembre, est de 100 %.

Ces températures n'ont donc aucun effet sur le taux de germination qui est toujours élevé, par contre elles ont un effet sur la vitesse de germination. En effet, les graines mises à germer en septembre à une température estimée à 26,2°C, germent plus rapidement (3,1jours) que celles mises aux autres températures testées.

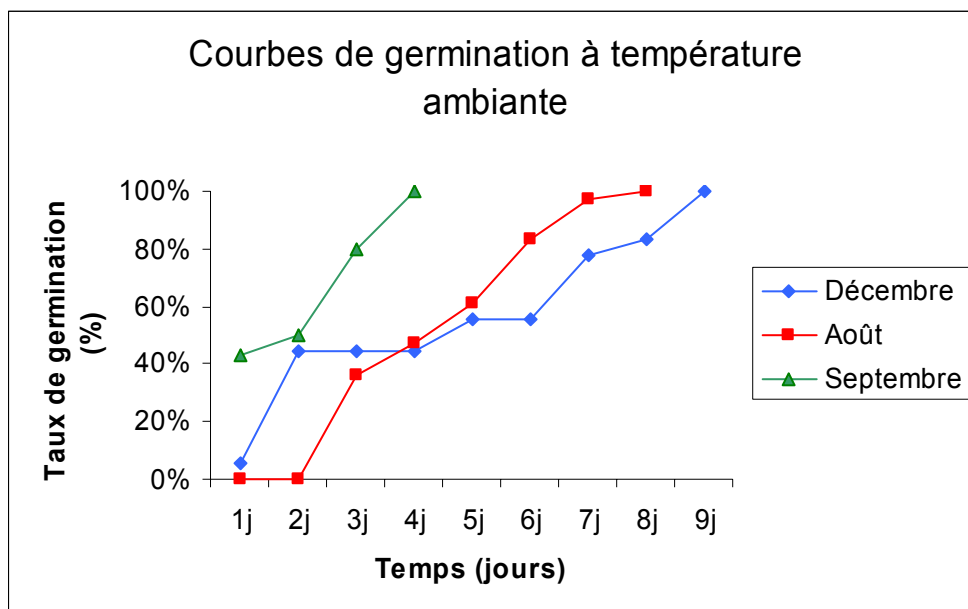
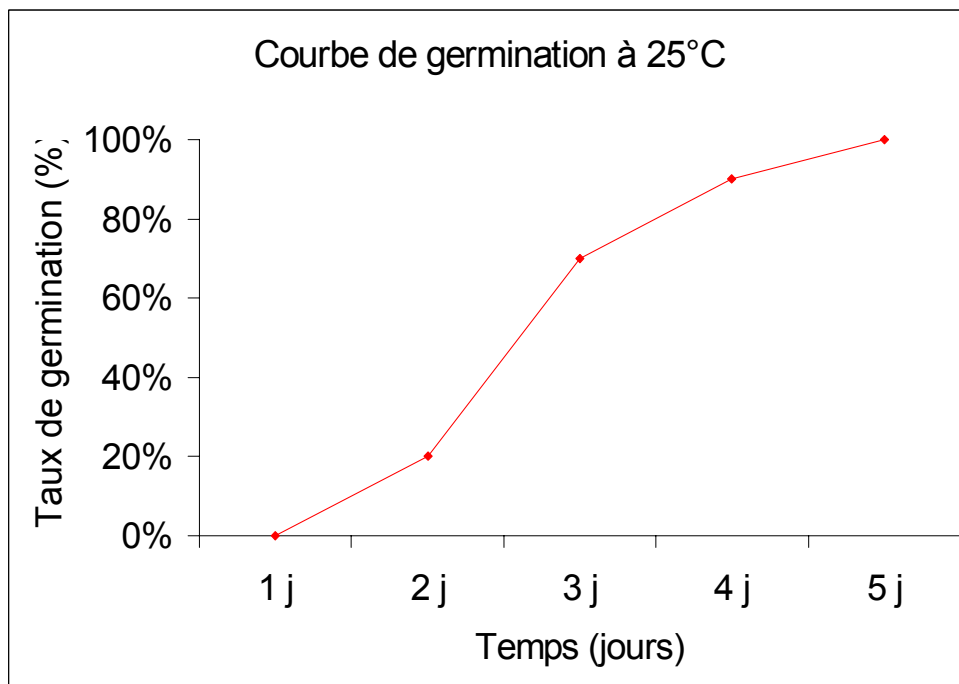


Figure 15 : influence de la température sur le pourcentage et la vitesse de la germination des graines de *Amphitecna macrophylla*.

3.2.2.3 – Détermination de la longévité des graines

La longévité des graines est le temps maximal au bout duquel les graines conservées demeurent viables et capables de germer.

Cette longévité est déterminée par des tests de germinations des graines récoltées à différentes périodes de l'année (août, septembre et décembre). Elle est calculée à température ambiante pour les graines conservées hors du fruit et les graines conservées dans le fruit.

Les résultats sont regroupés dans les tableaux 17 et 18.

Tableau 17 : longévité des graines de *Amphitecna macrophylla* conservées hors du fruit à température ambiante

Date de la récolte des fruits	Lots de graines	Nombre de graines mises à germer	Nombre de jours après le prélèvement des graines du fruit	Pourcentage de germination (%)
Août 2002 (12/ 08/02)	1	7	2	85,71
	2	7	3	100
	3	7	4	100
	4	7	5	100
	5	7	6	100
	6	6	7	0
	7	6	8	0
	8	5	9	0
Septembre 2002 (16/ 09/02)	1	7	2	100
	2	7	3	100
	3	7	4	100
	4	7	5	100
	5	7	6	100
	6	6	7	100
	7	6	8	100
	8	6	9	83,33
Décembre 2002 (23/12/02)	1	7	9	100
	2	7	10	100
	3	7	11	100
	4	7	12	100
	5	8	13	0
	6	7	14	0

Les résultats regroupés dans le tableau 17 montrent que la longévité des graines conservées hors du fruit varie selon la période de l'année :

Les graines prélevées des fruits récoltées au mois d'août ont une longévité estimée à 5 jours. Après cette période, le pourcentage de germination est nul. Les graines ne sont plus viables

Les graines prélevées des fruits récoltées au mois de septembre, sont encore viables jusqu'au neuvième jour. Le taux de germination est important (83,33%).

Les graines prélevées des fruits récoltées au mois de décembre, sont encore vivantes jusqu'au 12^{ème} jour.

En ce qui concerne les graines conservées dans le fruit, leur longévité est supérieure à celle des graines prélevées et conservées hors du fruit (tableau 18) :

Tableau 18 : Longévité des graines de *Amphitecna macrophylla* conservées dans le fruit à température ambiante

Date de la récolte des fruits	Nombre de fruits testés	Nombre de graines/fruit	Nombre de jours après la récolte du fruit	Pourcentage de germination (%)
Août 2002 (12/08/02)	1	13	2	100
	2	6	5	100
	3	3	7	100
	4	12	8	75
	5	7	9	85,71
	6	15	10	86,66
	7	9	12	100
	8	10	13	100
	9	16	14	93,75
	10	13	15	76,92
Septembre 2002 (18/08/02)	1	6	15	100
	2	6	16	33,3
	3	14	17	99,99
	4	9	18	22,2
	5	4	19	25
Décembre 2002 (23/12/02)	1	7	15	100
	2	3	17	100
	3	11	19	100
	4	8	21	100
	5	13	23	100
	6	3	25	0
	7	10	27	0

Les graines conservées dans les fruits récoltées au mois d'août, sont encore vivantes jusqu'au 15^{ème} jour. Le taux de germination est de 76,92%.

Les graines conservées dans les fruits récoltées au mois de septembre, sont encore vivantes jusqu'au 19^{ème} jour. Le taux de germination est de 25%.

La longévité des graines conservées dans les fruits récoltées au mois de décembre, est estimée à 23 jours.

Nous pouvons donc dire, que les graines conservées dans le fruit ont une longévité plus longue par rapport aux graines conservées hors du fruit.

Nous avons remarqué, que les graines qui ont perdu leur pouvoir germinatif, c'est-à-dire qui ne sont plus viables, deviennent noires, dures et ne se gonflent pas quand elles sont hydratées. Nous avons remarqué aussi que l'eau dans laquelle les graines sont mises à germer devient marron après quelques jours (figure16) et les graines pourrissent, en développant une moisissure noire, qui dégage une odeur qui rappelle celle du tabac. Ce phénomène n'a pas été observé pour les graines vivantes.

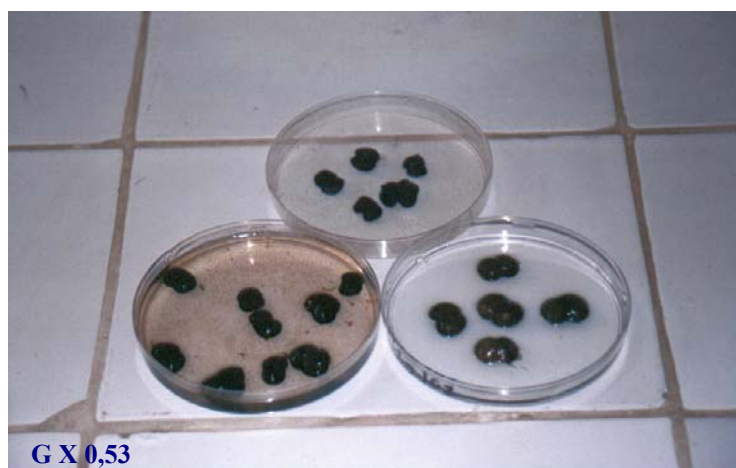


Figure16 : aspect des graines non viables de *Amphitecna macrophylla*

3.3 - Phénomènes morphologiques de la germination

Au cours des expérimentations que nous avons réalisées, nous avons étudié le phénomène de germination de cette espèce.

La germination correspond au passage de l'état de vie ralentie à l'état de vie active. Les réserves qui jusque -là assuraient le métabolisme résiduel de l'embryon vont être métabolisées pour assurer la croissance de la plantule (Lafon *et al*, 1998).

Les différentes phases de germination sont décrites successivement :

❖ Phase d'imbibition : La graine de *Amphitecna macrophylla* est caractérisée par une forte teneur en eau. Une fois hydratée, elle augmente de volume et change de couleur, elle devient complètement verte.

Selon Come (1970), cette hydratation entraîne une augmentation régulière de l'activité respiratoire.

❖ Phase de germination au sens strict : Cette phase, est caractérisée par la sortie de la radicule, qui apparaît au début comme une masse blanchâtre entre les cotylédons.

❖ Phase de croissance de la radicule : La radicule continue de croître jusqu'à ce qu'elle atteigne environ 2 cm de long ; les feuilles embryonnaires vertes apparaissent entre les deux cotylédons qui se sont écartés.

L'axe hypocotylé étant très réduit, les cotylédons ne se soulèvent pas, c'est l'axe épicotylé formé par la gemmule, qui croît pour donner la tige de la jeune plantule.

La germination des graines de *Amphitecna macrophylla*, est donc de type hypogée comme celle du pois (figure 17).



Figure 17: les différentes phases de germination de la graine

3.4 – Germination des graines en conditions aseptiques

Les graines sont préalablement désinfectées et mises à germer dans des tubes à essai contenant un milieu gélosé MS (Murashige et Skoog) et sans hormones.

3.4.1 – Stérilisation des graines

La stérilisation des graines avant leur ensemencement dans des tubes à essai, est indispensable afin d'éviter les contaminations dues aux bactéries et champignons.

Les substances stérilisantes utilisées doivent avoir un double effet :

- Eviter l'infection des graines et des plantules obtenues, dû à la propagation des bactéries et des champignons.
- Eviter le traumatisme éventuel des tissus qui pourrait conduire à leur nécrose et à leur mort.

Deux essais ont été utilisés pour la stérilisation des graines de *Amphitecna macrophylla*.

Les résultats obtenus, sont illustrés dans le tableau 19 :

Tableau 19: Effet des désinfectants sur la stérilisation

	Désinfectant	Temps de stérilisation	Taux de contamination	Taux de germination
1 ^{er} test	Benomyl hypochlorite de calcium	1heure 10 minutes	61,53 %	30,76 %
2 ^{ème} test	hypochlorite de sodium 12°	5 minutes	4,65 %	100 %

Les résultats montrent que le meilleur désinfectant est l'hypochlorite de Sodium 12° pendant 5 minutes, car le taux de contamination est très faible (4,65%) et n'influe pas sur le taux de germination qui est de 100%.

Les premiers désinfectants, se sont avérés inefficaces non seulement pour la désinfection des graines, mais ils provoquent la mort des graines qui deviennent noires et laissent échapper une couleur violette dans le milieu de culture. Le taux de germination n'est que de 30,76%.

3.4.2- Taux de germination des graines in vitro

Le taux de germination des graines placées dans les tubes à essais contenant le milieu gélosé MS dépourvu d'hormones, est de 100% (figure18). Ce taux est atteint en un temps moyen estimé à 6,93 jours.

Les mêmes phénomènes de germination pour les graines mises à germer dans des boîtes de pétri sont observés (figure 19).

- Gonflement des graines
- Ecartement des cotylédons qui deviennent verts.
- Percée et croissance de la radicule dans le milieu de culture.

Les premières plantules au stade 4 feuilles sont obtenues après 12 jours. Après 30 jours, leurs longueurs varient de 2,5 à 10,5 de long.

Les plantules sont plus vigoureuses que celles obtenues en conditions non aseptiques, car leurs tiges sont plus épaisses et leurs feuilles sont plus grandes.

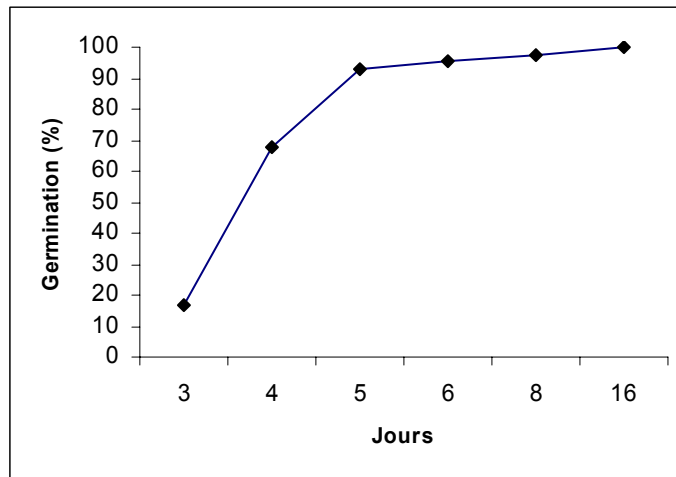


Figure 18 : capacité de germination de graines *in vitro* (dans le milieu MS sans hormones).



Figure 19 : obtention de plantules de *Amphitecna macrophylla* à partir de graines germées *in vitro*, dans le milieu gélosé MS sans hormones).

Discussion et conclusion

L'espèce *Amphitecna macrophylla* se régénère facilement par graines. Les résultats des tests réalisés en conditions non aseptiques (sous serre et dans les boîtes de pétri au laboratoire) et en conditions aseptiques (dans des tubes à essais contenant un milieu artificiel Murashige et Skoog (1962) dépourvu d'hormones), révèlent que le taux de germination est très élevé, il est de 100 %.

Ce taux est obtenu, à condition que les graines soient fraîchement récoltées, car nous avons remarqué que malgré les conditions de germination favorables réunies, les graines ne germent plus au bout de quelques jours. Elles ne sont plus viables et des symptômes morphologiques apparaissent : comme le noircissement, puis le dessèchement et le durcissement des graines. Elles ne sont plus capables d'absorber l'eau de l'arrosage qui devient marron suite probablement à l'excrétion de substances phénoliques, et après quelques jours des moisissures se développent affectant aussi bien les graines que l'eau dans laquelle elles sont mises. Ceci est important à signaler, dans la mesure où les graines viables ne réagissent pas de cette manière. Nous avons donc déduit que les graines de cette espèce ont une longévité très courte. En effet, bien qu'elle soit courte, la longévité de graines varie selon le mode de conservation (hors du fruit à température ambiante et dans le fruit).

La longévité des graines hors du fruit à température ambiante varie selon la période de récolte au cours de l'année. En Août, elle est de 5 jours, en Septembre elle peut aller jusqu'à 8 jours et en Décembre jusqu'à 12 jours.

Pour les graines conservées dans le fruit, leur longévité est plus longue : elles sont viables jusqu'à 14 jours de leurs récolte en Août, en Septembre jusqu'à 18 jours et en Décembre la viabilité des graines ne peut dépasser 23 jours.

Chez la majorité des espèces végétales, les graines peuvent survivre jusqu'à plusieurs dizaines d'années. De telles graines sont appelées semences orthodoxes (Barbault, 1997). Elles se conservent aisément après séchage à 0° C et mieux à -20°C.

On peut donner un exemple qui est celui des graines des céréales qui peuvent conserver leur capacité de germination jusqu'à une centaine d'années. Les graines des *Fabaceae* peuvent germer deux siècles après leur récolte (Boullard, 1997).

Il existe également des espèces dont les graines ont une longévité très courte, comme celles du caféier qui meurent après quelques jours. Ces graines sont qualifiées de semences récalcitrantes. Il s'agit en particulier de grosses graines comme le gland de chêne ou celles de nombreux arbres tropicaux (Barbault, 1997).

Ces graines sont détruites par le froid, ou bien elles n'ont aucune dormance et germent dès qu'elles tombent sur le sol.

Les graines de l'espèce *Amphitecna macrophylla* font partie de cette catégorie. Elles ne se conservent ni dans les conditions normales c'est-à-dire à température ambiante ni dans une chambre froide. Afin d'augmenter le temps de longévité et favoriser une plus longue

conservation, il est possible de recourir à des méthodes de conservation plus élaborées, telle que le maintien dans l'azote liquide (Barbault, 1997).

De plus malgré une germination quasi générale des graines, les plantules obtenues ne vont pas loin dans leur développement. Car elles sont très fragiles au froid, à la sécheresse (en été elles nécessitent un arrosage abondant) et sensibles aux agents pathogènes comme des champignons qui se développent sur les feuilles et sur le substrat.

Les plantules ayant atteint le stade de plants (sont plantées dans le sol du Jardin), nécessitent une terre très riche en matière organique et un endroit semi ombragé car ils sont très sensibles aux rayonnement direct du soleil.

4^{ème} PARTIE
ESSAIS DE MULTIPLICATION
DE L'ESPECE
PAR CULTURE IN VITRO

4 – Essais de multiplication de l'espèce par culture *in vitro* ou micro propagation

Bien que l'espèce *Amphitecna macrophylla* se multiplie facilement par graine et que le taux de germination est très élevé, deux problèmes se posent :

- La très courte longévité des graines.
- Le faible taux de plantules qui survivent jusqu'à un an.

Quelques essais de multiplication végétative, par la voie traditionnelle (bouturage et marcottage), ont été réalisés. Malheureusement ces essais restés sans succès.

Notre recherche s'est donc orientée vers la multiplication végétative dans un milieu artificiel, par la technique de culture *in vitro*.

Dans le cadre de cette recherche, nous avons établi un protocole qui vise à obtenir des bourgeons par la voie directe (développement des bourgeons sans le passage par un cal) et par la voie indirecte (développement des bourgeons par le passage par un cal).

4.1 – Organogenèse directe : Culture d'apex, de fragments de tige et de collet

Nous avons tenté d'obtenir des bourgeons en favorisant le développement des méristèmes préexistants.

Pour cela quinze plantules obtenues par semis *in vitro*, âgées de 5 mois et dont la longueur de la tigelle varie de 8,8 à 13 cm, sont fragmentées en explants :

- **Apex** : Partie sommitale, formée par le bourgeon apical et 2 à 3 bourgeons axillaires.
- **Fragments de tige** : Obtenus par fragmentation de la tigelle en micro boutures de 0,5 à 1 cm de long. Ces fragments contiennent des bourgeons axillaires (de 1 à 2 bourgeons par fragment et parfois 3 à 5 bourgeons quand les entres nœuds sont très rapprochés).
- **Collet** : Partie intermédiaire entre la tigelle et la racine, sur laquelle sont insérés les cotylédons. A l'aisselle de chaque cotylédon existe un bourgeon. Chaque collet isolé et mis en culture contient 2 bourgeons.

La micro propagation par organogenèse directe nécessite le passage par les phases suivantes :

- Bourgeonnement et multiplication du bourgeonnement.
- Elongation.
- Enracinement
- Acclimatation.

4.1.1 – Phase de multiplication du bourgeonnement

Les apex, les fragments de tige et de collet, sont mis en culture dans le milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962), contenant de la cytokinine (BAP) seule à différentes concentrations. Les milieux testés sont :

M1: MS + 0,1 mg.l⁻¹ de BAP.

M2: MS + 0,5 mg.l⁻¹ de BAP

M3: MS + 0,1 mg.l⁻¹ de BAP

Ces milieux sont testés dans le but de provoquer le développement des bourgeons préexistants sur les explants mis en culture.

Le nombre d'explants mis en culture est donné dans le tableau 20.

Tableau 20 : Apex, fragments de tige et de collets issus de la fragmentation de 15 plantules mis en culture dans les milieux M1, M2 et M3

Milieux de culture (MS+BAP)	Nombre d'explants Mis en culture			Nombre total de bourgeons préexistants			Nombre moyen de bourgeons préexistants / explant		
	Apex	Fragments de tige	Collet	Apex	Fragments de tige	Collet	Apex	Fragments de tige	Collet
M1	5	36	5	/	85	10	/	17	2
M2	5	35	5	/	66	10	/	13,2	2
M3	5	30	5	/	42	10	/	8,4	2

4.1.1.1 – Effet de la concentration de la BAP sur le bourgeonnement des explants

Les résultats que nous avons obtenus, sont regroupés dans le tableau 21 et figure 20.

Tableau 21 : Pourcentage d'explants qui ont réagi dans les trois milieux contenant de la BAP (M1, M2 et M3.

Explants mis en culture	Milieu de culture	Nombre d'explants mis en culture	Explants qui ont réagi (%)	Explants qui n'ont pas réagi (%)	Explants nécrosés (%)
Apex	M1	5	100	0	0
	M2	5	80	20	0
	M3	5	80	20	0
Fragments de tige	M1	36	66,6	5,63	27,77
	M2	35	60	40	0
	M3	30	23,3	76,7	0
Collet	M1	5	80	20	20
	M2	5	60	40	40
	M3	5	40	60	60

Ces résultats sont obtenus après 5 mois de culture. Ils montrent que les trois milieux (M1, M2 et M3) sont favorables au développement des bourgeons pour les trois explants (apex, fragments de tige et collet).

Nous constatons que le taux le plus élevé, est obtenu sur le milieu M1 contenant de la BAP à une concentration de 0,1 mg.l⁻¹ et ceci pour les trois sortes d'explants. Sachant qu'en fait ces organes contiennent tous de 1 à 3 bourgeons.

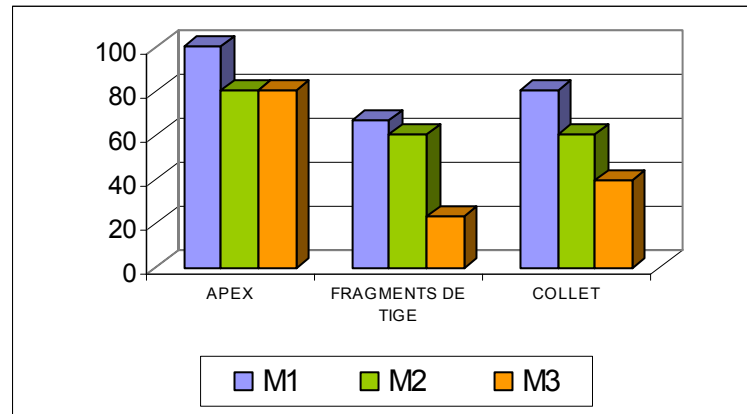


Figure 20 : réaction des explants en fonction des trois milieux (M1, M2 et M3).

Cependant ce sont les apex qui réagissent le mieux avec un taux de 80% à 100% des explants qui réagissent par une croissance normale, sans qu'il y'ait ni développement ou réactivation des bourgeons axillaires.

En ce qui concerne les fragments de tige et de collet, ces dernières réagissent mieux dans les trois milieux : ils développent des bourgeons axillaires et adventifs (figure 21).

Le nombre total des bourgeons obtenus après culture de tige et de collet sont illustrés dans le tableau 22.

Tableau 22 : Nombre total de bourgeons développés sur les fragments de tige et de collet cultivés dans les milieux M1, M2 et M3.

Milieu de culture (MS+BAP)	Fragments de tige		Collet	
	Nombre de bourgeons préexistants	Nombre de bourgeons développés après culture	Nombre de bourgeons préexistants	Nombre de bourgeons développés après culture
M1	68	76	8	14
M2	43	60	6	16
M3	13	21	8	13

Le tableau ci-dessus, montre que le nombre de bourgeons développés est supérieur au nombre de bourgeons préexistants pour les trois milieux et pour les deux explants (fragments de tige et de collet).

Ceci est dû non seulement au débourrement et au développement des bourgeons préexistants (bourgeons axillaires au niveau des nœuds de tige et bourgeons au niveau du collet), mais aussi à la formation de bourgeons adventifs.

Les résultats montrent aussi que c'est le milieu M2 contenant de la BAP à $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ qui est le plus favorable au développement des bourgeons adventifs aussi bien pour les fragments de tiges que pour les collets.

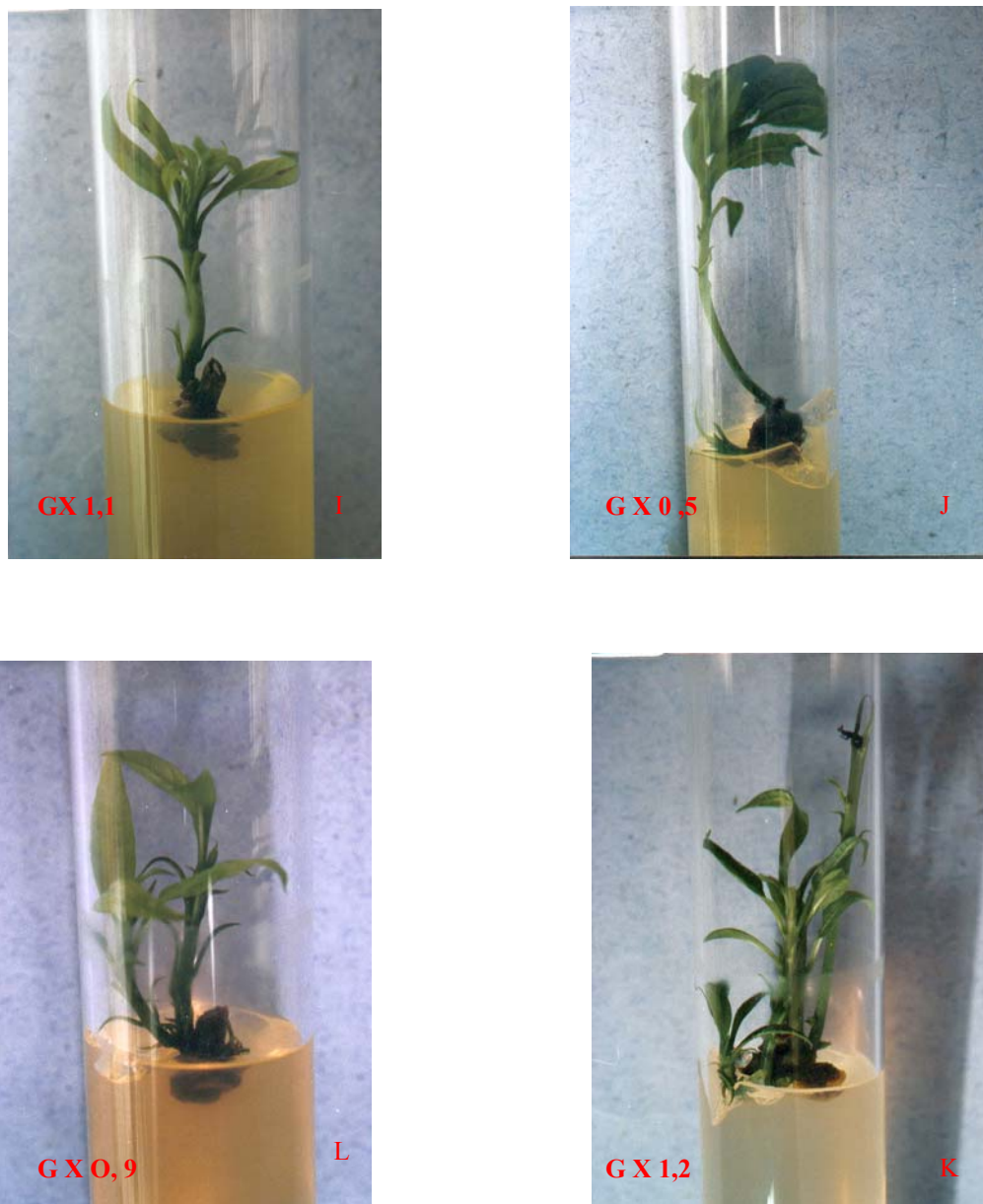


Figure 21: bourgeonnement axillaire sur fragment de tige (I) et collet (J).
Bourgeonnement adventif sur fragment de tige (L) et collet (K).

4.1.1.2 – Multiplication des pousses obtenues à partir de fragments de tige et de collet

Les pousses obtenues à partir de fragments de tige et de collet et dont la longueur varie de 1,5 à 4 cm, sont fragmentées de nouveau en petits nœuds (2 bourgeons par nœud).

Les résultats obtenus, montrent qu'il y a développement d'un très grand nombre de pousses vertes rassemblées en touffes sur un cal vert ou marron, de telle façon qu'on ne peut plus distinguer les bourgeons préexistants des bourgeons adventifs. Le fragment de nœud se transforme en cal à la base des bourgeons (figure 22).

Le nombre total de bourgeons obtenus après 3 mois de culture sur les différents milieux est représenté dans le tableau 23.

Nous constatons que c'est toujours le milieu M2 contenant de la BAP à $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ qui est le plus favorable au développement des pousses feuillées ou de bourgeons adventifs. Nous constatons également que les meilleurs explants sont les nœuds issus de fragments de tige, car ils produisent le plus grand nombre de pousses.

Il faut toutefois signaler que nous n'avons pu compter que les pousses ayant une longueur comprise entre 1 et 5 cm. Les bourgeons qui sont très petits sont regroupés en touffes de telle façon qu'on ne peut les distinguer et les compter.

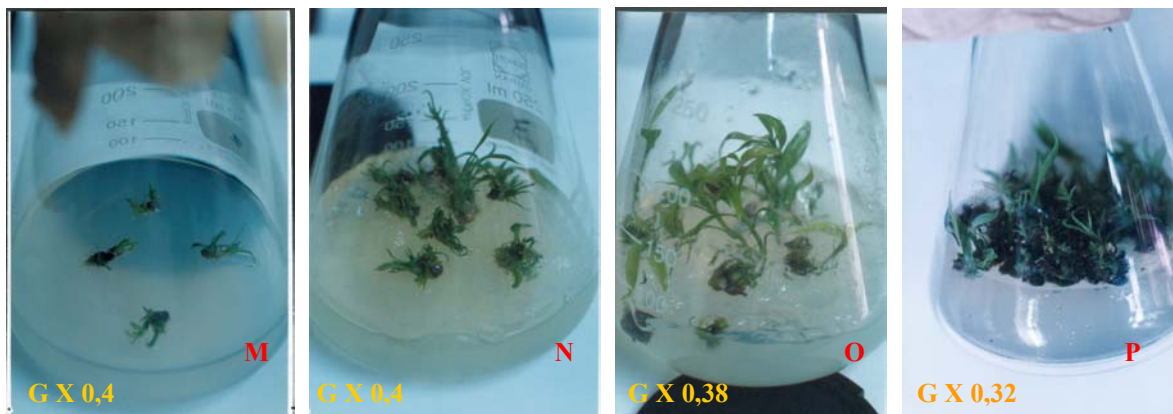


Figure 22 : bourgeonnement adventif (M : fragments de pousses ; N : bourgeonnement ; O : développement de nouvelles pousses feuillées ; P : pousses feuillées en touffes).

Tableau 23 : Nombre total de bourgeons obtenus par fragmentation de pousses issues de fragments de tige et de collet dans la BAP (0,1 ; 0,5 et 1mg .l⁻¹).

Milieux de culture (MS+BAP)	Noeuds issus de bourgeons développés à partir des fragments de tige			Noeuds issus de bourgeons développés à partir de collet		
	Nombre de noeuds mis en culture	Nombre de bourgeons préexistants	Nombre de pousses obtenues	Nombre de noeuds mis en culture	Nombre de bourgeons préexistants	Nombre de pousses obtenues
M1	12	24	> 147	15	30	> 109
M2	12	24	> 380	15	30	> 170
M3	12	24	> 155	15	30	> 150

4.1.2 – Phase d'élongation et d'enracinement

En vue d'un allongement des pousses et de leur enracinement, des milieux contenant différentes concentrations de GA3 ou d' AIB sont testés ainsi qu'un dernier où les deux régulateurs sont présents :

- ***M4**: 0,1 mg.l⁻¹ de GA3
- * **M5**: 0,5 mg.l⁻¹ de GA3
- * **M6**: 1 mg.l⁻¹ de GA3
- * **M7**: 0,1 mg.l⁻¹ de AIB
- * **M8**: 0,5 mg.l⁻¹ de AIB
- * **M9**: 1 mg.l⁻¹ de AIB
- * **M10**: MS/2 + 0,1 mg.l⁻¹ de GA3 + 1 mg.l⁻¹ de AIB

Les résultats sont représentés dans le tableau 24.

Tableau 24 : Effet des concentrations de la GA3 et de l'AIB sur l'allongement et l'enracinement des pousses issues de bourgeons adventifs.

Milieux de culture	GA3 (mg/l)	AIB (mg/l)	Nombre de bourgeons mis en culture	% de bourgeons ayant subi un allongement	% de bourgeons enracinés	% de bourgeons nécrosés
M4	0,1	/	20	0	0	0
M5	0,5	/	26	0	0	46,15
M6	1	/	24	0	0	33,33
M7	/	0,1	12	0	16,66	0
M8	/	0,5	23	0	21,73	0
M9	/	1	24	0	0	16,66
M10	0,1	1	24	0	12,5	87,5

D'après les résultats obtenus, nous constatons que les milieux M4, M5 et M6 contenant de la GA3 à des concentrations respectives de 0,1 ; 0,5 et 1mg.l⁻¹, dans le but d'obtenir l'allongement des pousses feuillues, n'ont aucun effet.

Les milieux M7 et M8 contenant de l'AIB à des concentrations de 0,1 et 0,5 mg.l⁻¹, ont provoqué l'enracinement des pousses (figure 23), mais à un faible pourcentage (16,66 % et 21,73 %).

Le milieu M9 contenant de l'AIB à une concentration plus forte (1 mg .l⁻¹), n'a pas provoqué l'enracinement.

Par contre, cette même concentration additionnée à la GA3 (0,1 mg.l⁻¹) dans le milieu MS/2 dilué à moitié provoque l'enracinement mais aussi à un faible pourcentage, soit 12,5 %.



Figure 23: enracinement d'une pousse feuillée et obtention d'un vitro plant.

4.1.3 – Acclimatation

Les pousses enracinées obtenues *in vitro* ou vitro plants, sont transférées du milieu gélosé vers des godets contenant de la tourbe stérilisée préalablement à 120° pendant 2 heures. Ce substrat est arrosé avec un fongicide (bénomyl) et une solution nutritive (Knop). Ces vitro plants sont placés en mini serre recouverte d'un film en plastique dans le but de maintenir une bonne humidité.

Les essais d'acclimatation n'ont pas abouti à un résultat, car les vitro plants se dessèchent et meurent après quelques jours. Ceci est du probablement aux conditions défavorables de la mini serre et celle du substrat qui est très favorable au développement des champignons.

4.2 – Bourgeonnement indirecte

Le bourgeonnement indirect, est obtenu par la culture des embryons excisés de graines matures.

36 embryons sont mis en culture dans des boites de pétri contenant le milieu MS additionné à une auxine (ANA), à une concentration de 1 mg.l⁻¹.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 25.

Tableau 25: Réaction des embryons dans le milieu de culture MS+ANA (1 mg/l)

Temps (jours)	Callogenèse		Bourgeonnement sur cal		Embryons qui n'ont pas réagi		Embryons contaminés	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
18 jours	2	5,55	0	0	31	86,11	3	8,33
35 jours	21	63,6	6	18,1	6	18,1	0	0

La réaction des embryons, se manifeste par l'apparition de cals verts après 18 jours de mise en culture : le taux est de 5,55 %. Nous avons noté un faible taux d'embryons contaminés par un champignon (8,3 %). Après 35 jours, le taux de Callogenèse augmente, il est de 63,6 % et le bourgeonnement sur cal apparaît, il est de 18,1 % (figure 24).

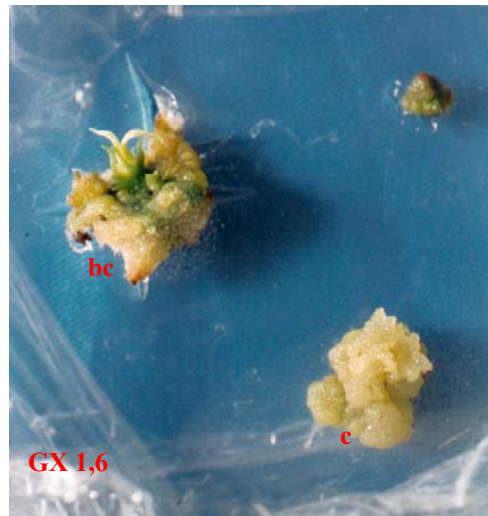


Figure 24 : Callogenèse(c) et bourgeonnement sur cal (bc).

Les embryons qui n'ont pas réagi sont au nombre de 6 soit (18,1 %). Ces derniers se sont nécrosés. Les 6 cals qui ont bourgeonné, sont repiqués dans un milieu neuf, contenant de la BAP à $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ afin de favoriser un bourgeonnement adventif. Nous avons obtenu une croissance de ces bourgeons qui ont produit de nouvelles petites feuilles, seul un cal a donné des racines (figure 25).



Figure 25 : bourgeonnement et rhizogenèse sur cal repiqué dans de la BAP ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$).

Huit cals qui n'ont pas réagi, ont été laissées dans le milieu MS+ANA (1 mg.l^{-1}). Les résultats que nous avons obtenus après 7 mois, sont représentés dans le tableau 26.

Tableau 26 : Réaction des cals après 7 mois de mise en culture dans le milieu MS+ANA

Nombre de cals	Bourgeonnement sur cal	Bourgeonnement et enracinement sur cal	Cals nécrosés
8	4	1	3

Dans le milieu MS+ANA (1 mg.l^{-1}), un cal a donné des bourgeons qui se sont développés en pousses vertes et une longue racine (figure 26).



Figure 26: bourgeonnement (bg) et enracinement(r) sur cal (c) après 7mois de culture dans de l'ANA (1 mg.l^{-1}).

Discussion et Conclusion

Compte tenu de l'absence de travaux de multiplication in vitro de l'espèce *Amphitecna macrophylla*, nous avons tenté d'établir un protocole expérimental en tenant compte des données de base concernant les méthodes, en particulier la composition du milieu de base et les régulateurs de croissance.

Sur la base de leur rôle respectif sur la morphogenèse nous avons choisi d'utiliser une cytokinine au moment du bourgeonnement et une auxine au moment de l'enracinement. Quand à la composition du milieu de base, nous avons d'emblé choisi le plus utilisé à savoir le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962).

Pour se faire, plusieurs types d'explants ont été utilisés. Ils proviennent de plantules issues de semis, dans la mesure où nous ne disposons pas de matériel végétal jeune capables de réagir à ces techniques.

Des explants de natures diverses :

- Des apex, des fragments de tiges et des collets, prélevés de plantules issues de germination de graines in vitro et dont l'âge est de 5 mois.
- Des embryons zygotiques, prélevés de graines matures.

Dans un premier temps, nous avons tenté d'induire un bourgeonnement par la voie directe, en cultivant les apex, les fragments de tiges et de collet, dans les milieux MS contenant de la BAP à différentes concentrations (0,1 ; 0,5 et 1 mg.l⁻¹).

Les résultats obtenus au cours de nos essais montrent que les trois milieux sont favorables au développement des bourgeons.

Les meilleurs explants qui ont induit une caulogénèse sont les fragments de tiges et de collet (bourgeons axillaires et adventifs) cependant le milieu M2 contenant de la BAP à 0,5 mg.l⁻¹ est le plus favorable au développement des bourgeons adventifs.

Selon Margara (1989), le déclenchement ou la stimulation du bourgeonnement en culture in vitro, résulte de l'emploi de cytokinines éventuellement associés aux auxines.

Des travaux sur quelques Angiospermes vont dans ce sens :

D'après les travaux de Maiza (1980), sur l'oranger pineapple, il en résulte que les milieux caulogènes contiennent le milieu de base MS additionné à de la BAP et des auxines tels que le 2,4 D et l'ANA.

Selon Fathi (1987), la cytokinine la plus fréquemment utilisée pour la multiplication de l'Eucalyptus est la benzylaminopurine (BAP). Ces cytokinines sont appliquées en association avec une auxine, généralement l'acide naphthalène (ANA) ou l'acide indole butyrique (AIB).

Selon Hamdani (2001), l'usage des auxines ou des cytokinines seules dans le milieu d'induction est favorable à la caulogénèse sur l'ensemble des explants et cela quelque soit la concentration utilisée. Les meilleures réponses ont été enregistrées avec les combinaisons (2,4D et BAP) pour le *Scorpiurus*.

Cependant, la réponse aux régulateurs de croissance est fort variable selon la plante : dans le cas de l'espèce *Amphitecna macrophylla*, l'utilisation de la cytokinine (BAP) seule est

suffisante pour induire le développement des bourgeons. Un bourgeonnement a été également obtenu dans le milieu MS ne contenant que de la cytokinine (kinetine à $1\mu\text{mol.l}^{-1}$) pour une Bignoniaceae, *Crescentia cujete* (Murch et al., 2004).

La fragmentation des pousses obtenues par néoformation des bourgeons axillaires et adventifs en petits noeuds, a conduit à la néoformation d'un nombre élevé de bourgeons en touffes sur cal.

Au cours de cette phase, c'est aussi le milieu M2 ($0,5\text{mg.l}^{-1}$) qui est le plus favorable à la néoformation de bourgeons adventifs.

Cette méthode semble efficace, car elle permet l'obtention d'un très grand nombre de bourgeons adventifs sans le passage par un cal. Le cal basal résulte de la transformation des nœuds contenant ces bourgeons.

Nous avons tenté quelques essais en vue d'un allongement des pousses en utilisant de l'acide gibbérellique (GA3), à différentes concentrations. En culture de tissus, la GA3 est la plus fréquemment utilisée (Boxus, 1993) pour cette étape de développement. Avec les concentrations utilisées, aucun allongement n'a été observé.

Les essais de rhizogenèse ont abouti en utilisant une auxine seule (AIB). Des pousses enracinées, ont été obtenues à des concentrations de 0,1 et 0,5 mg.l^{-1} . Les taux d'enracinement de 16 et 22% respectivement pour chaque concentration restent faibles. L'utilisation de l'AIB seule à une concentration de 1mg.l^{-1} n'induit pas la formation des racines, mais cette même concentration additionnée de $0,1\text{mg.l}^{-1}$ de GA3 dans un milieu MS dilué de moitié provoque la rhizogenèse.

Selon Margara (1982), les gibbérellines sont assez peu utilisées en culture in vitro. Elles inhibent l'organogenèse. A la lumière, la gibbérelline inhibe la production des racines tandis qu'en association avec l'auxine elle la stimule à l'obscurité.

D'après nos résultats, l'association de l'auxine AIB (1mg.l^{-1}) à la GA3 en faible concentration ($0,1\text{mg/l}$), stimule la rhizogenèse à la lumière.

Les essais d'acclimatation des vitro plants, n'ont pas abouti, car les petites plantules se sont nécrosées dans la tourbe arrosée avec du Knop. Ceci est du probablement aux conditions d'acclimatation qui ne sont pas toutes réunies.

Car chez certaines Bignoniaceae, comme *Crescentia cujete* l'acclimatation des vitro plants est réalisée avec succès selon Murch et al., 2004 .

Les étapes du développement de la jeune pousse de *Amphitecna macrophylla* nécessite, des travaux ultérieurs qui seront envisagés à travers l'utilisation des régulateurs de croissance appropriés. De même que l'acclimatation des vitro plants doit être précisée en testant plusieurs types de substrats et surtout en améliorant les conditions environnementales.

La culture in vitro d'embryons excisés de graines matures dans le milieu contenant une auxine (ANA) à une concentration de 1mg.l^{-1} , conduit à la formation de cals qui bourgeonnement par la suite.

Par cette méthode nous obtenons aussi une caulogenèse, mais par la voie indirecte car les bourgeons se développent après la formation du cal. C'est une source de variation somaclonale qui peut être intéressante à exploiter.

En guise de conclusion, nous pouvons dire, que chez l'espèce *Amphitecna macrophylla*, il est possible d'induire l'organogenèse (caulogenèse et rhizogenèse) par la voie directe et par la voie indirecte. Nous pouvons également dire que cette espèce est caractérisée par une grande capacité au bourgeonnement in vitro et ceci en utilisant seulement de la BAP dans le milieu de culture. Mais son enracinement et son acclimatation demeure l'une des problématiques.

Chapitre IV
CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

L'objectif de ce travail est de préserver un arbuste se trouvant au jardin d'essai du Hamma d'Alger.

L'identification précise de cette espèce, était la première étape de ce travail. Les résultats de l'étude systématique basée essentiellement sur le type de placentation de l'ovaire, montre que cet arbuste appartient à l'espèce *Amphitecna macrophylla*, une Bignoniacée tropicale.

L'identification de l'arbuste est indispensable, car plusieurs synonymes lui ont été attribués. Cette confusion nomenclaturale est due non seulement à l'intervention de plusieurs botanistes à nommer cette espèce, mais aussi à une opération de reclassement dans la systématique à la faveur de nouveaux travaux. En effet, cette espèce a été nommée *Crescentia macrophylla* par Seemann en 1854 et reclassée dans un nouveau genre suite aux travaux de Baillon en 1882 qui constate que l'organisation de son gynécée (placentation axile) diffère de celui des *Crescentia* (placentation pariétale). Sur cette base, elle fut nommée *Amphitecna macrophylla* par Miers en 1867.

Le transfert d'une espèce d'un genre à un autre, démarche scientifique, se traduit dans la nomenclature par ce qu'on appelle une combinaison (Raynal-Roques, 1994).

Cette problématique n'est pas particulière à l'espèce *Amphitecna macrophylla* ni aux espèces appartenant à la famille des Bignoniacées, mais elle est fréquente chez beaucoup d'espèces appartenant à d'autres familles, car selon Raynal-Roques (1994), les documents et observations nouveaux ont amenés souvent les botanistes à modifier la définition des genres.

L'étude de la biologie de la reproduction, qui est la seconde partie de ce travail a montré que la floraison est abondante par rapport à un taux très faible de nouaison.

D'après cette étude, ce faible taux de nouaison n'est pas du à la non pollinisation des fleurs, mais essentiellement à la chute des ovaires au début de leur transformation en fruits.

La croissance des fruits nécessite l'apport d'abondants matériaux trophiques, notamment les glucides. Elle est aussi dépendante des hormones et notamment les auxines. Etant donné que la taille moyenne du fruit est de 17 cm et peut atteindre jusqu'à 22,5 cm ; si chaque fleur donne un fruit, est-ce que l'arbuste trop chargé pourrait mener à terme l'ensemble de ces fruits ? En effet, une grande partie de ces derniers tombe prématurément.

Bien que cette espèce présente un régime de reproduction autogame, les caractères liés à la structure de la fleur offre des possibilités au mode de pollinisation allogame (protogynie et longéstyle). Mais ces deux caractères liés à la présence de disque nectarifère, montre que cette espèce pourrait être entomophile, c'est-à-dire elle nécessite la pollinisation par les insectes.

D'après Gentry (1974a, b) toutes les espèces de la famille des Bignoniacées sont zoophiles et les principaux pollinisateurs sont les abeilles (Gentry, 1974a et Endress, 1994). La pollinisation peut avoir lieu par des chauves-souris comme chez une Bignoniacée *Adenocalymna dichilum*, liane originaire du Nord-Est du Brésil (Machado et Vogel, 2004).

Pour l'espèce *Amphitecna macrophylla* nous n'avons jamais remarqué les traces des griffes sur la corolle des fleurs. Par contre, nous avons remarqué des petites traces de dents sur les fruits.

Des observations et des études ultérieures pourraient confirmer avec précision le mode de pollinisation de cette espèce.

La troisième partie de ce travail se proposait d'étudier la morphologie de la graine et sa germination. Les résultats obtenus, montrent que les graines sont de grande taille (0,8 à 2 cm). Elles ne présentent pas de dormance car elles germent rapidement dès qu'elles sont hydratées. Le taux de germination est très élevé (100 %). Mais les graines ne peuvent être conservées très longtemps, car elles se dessèchent et meurent. Ces caractères sont ceux attribués aux graines des espèces tropicales qualifiées de récalcitrantes qui se trouvent dans les régions où il y a de fortes précipitations (Pritchard et al., 2004). D'autres espèces appartenant à la famille des Bignoniacées présente ce phénomène de courte longévité des graines comme *Tabebuia impetiginosa* (Schleder et al., 2003). La préservation de cette espèce est liée au mode de conservation des graines. Il y a deux méthodes : La cryogénie (conservation dans l'azote liquide) et une autre méthode qui consiste à mettre à germer le maximum de graines fraîches et obtenir le maximum de plantules qu'il faut entretenir dans des serres dont la température est voisine de la température tropicale et les préserver des agents pathogènes car elles sont très vulnérables.

Quand à la dissémination des graines chez le genre *Amphitecna*, elle est réalisée par un mammifère qui est le singe (Zjhra et al., 2004). Au Jardin d'essai à côté de l'arbuste, nous n'avons jamais observé une plantule issue d'un semis naturel. Dans ce cas l'homme reste le seul à jouer ce rôle de dissémination de cette espèce.

Vu les facteurs limitants de la propagation de cette espèce, la quatrième partie est donc consacrée à sa multiplication par les techniques de culture in-vitro. Le matériel d'initiation est issu de plantules obtenues in vitro par germination de graines dans le milieu Murashige et Skoog (1962) dépourvu d'hormones.

Les résultats obtenus lors des essais durant la phase de stérilisation des graines ont permis de déterminer une méthode de désinfection où le taux de contamination est très faible (4,65 %). En ce qui concerne la germination, nos essais ont abouti à un résultat très satisfaisant avec un taux de germination de 100 %.

La multiplication in-vitro par bourgeonnement sur des fragments de tige et de collet, de conclure que :

- Le milieu de culture Murashige et Skoog (MS) s'est avéré efficace dans notre cas.
- Cette espèce est caractérisée par une grande capacité au bourgeonnement dans le milieu MS ne contenant que de la cytokinine (BAP).

Amphitecna macrophylla reste une espèce facile à multiplier par la culture in vitro car le bourgeonnement intense est remarquable. Cependant, il sera utile de mener des travaux plus approfondis afin de mieux cerner les problèmes posés par les phases d'élongation, d'enracinement et d'acclimatation.

L'acclimatation n'est pas un problème insurmontable ; la mise en place d'une serre appropriée suffirait à le solutionner.

Cette étude se proposait de participer à la préservation de l'espèce *Amphitecna macrophylla* par l'étude de sa reproduction et sa multiplication par graines et par culture in-vitro. Si les résultats sont encourageants et ouvrent de belles perspectives, le travail reste néanmoins à approfondir.

La protection des espèces menacées apparaît aujourd'hui comme un impératif catégorique : Le rôle économique majeur que jouent de nombreuses espèces végétales sauvages dans le monde et leur potentialité considérable en matière agronomique ou industrielle représente un argument décisif en faveur de leur protection.

Comme le soulignait l'UICN dès 1980, la sauvegarde de la diversité spécifique est un gage d'avenir et un investissement nécessaire pour maintenir et améliorer la production agricole et forestière (Ramade, 1993).

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Alexander M.P., 1969.** Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol.* **44** (3): 117-122.
- Baillon H., 1882.** Revue horticole. Journal d'horticulture pratique. Paris. **465** : 464-466.
- Barbault R., 1997.** Ecologie générale. Structure et fonctionnement de la biosphère. 4^{ème} édition. Masson. Paris. 277p.
- Bezpalý I., 1984.** Les plante cultivées en Afrique occidentale. Ed. Mir. Moscou. 276 p.
- Bittencourt J.R. et Semir N.S., 2004.** Pollination biology and breeding system of *Zyheria montana* (Bignoniaceae). *Plant. System. Evol.* **247** : 241-254.
- Boullard B., 1997.** Dictionnaire des plantes et champignons. Ed. Estem. Paris. 875p.
- Boxus P., 1995.** Multiplication végétative : micro propagation et embryogenèse somatique in biotechnologies végétales. BV 93, Ed. CNED. AUPELFUREF. 191 p.
- Brewbaker J.L. et Kwack B.H., 1964.** The calcium ion and substances influencing pollen growth. In « pollen physiology and fertilization». Linskeen ed. N.H. Amsterdam. 151p
- Bullock S.H., 1985.** Breeding system in the flora of tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropical.* **17**:287-301.
- Carra P. et Gueit M., 1952.** Le Jardin d'Essai du Hamma. Direct. Agric., Gouv. Algérie, Alger. 114 p.
- Chadefaud M. et Emberger M., 1960.** Traité de botanique systématique. Fascicule II. Ed. Masson et Cie. Paris. 1540 p.
- Champagnat P., Ozenda P. et Baillaud L., 1969.** Croissance, morphogenèse, reproduction. Ed. Masson et Cie. Paris. 241p.
- Come D., 1970.** Les obstacles à la germination. Masson et Cie. Paris 162 p
- Crété P., 1959.** Précis de botanique. Systématique des Angiospermes. T2. Ed. Masson et Cie. Paris. 429p.
- Cronquist A., 1981.** An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia University press. 1262 p.
- Dahlgren R., 1980.** A revised system of classification of the Angiosperms. *Bot. Journ. Linn. Soc.* **80**: 91-124.
- Dutra J.C.S. et Machado U.L.I., 2001.** Entomofauna visitante de *Stenolobiumstans* (Juss) Seem (Bignoniaceae), durante seu periodo de floração Neotropical Entomology.**30** : 43-54.

- Eberhardt P.H., 1927.** Les plantes médicinales et leurs propriétés. Ed. Paul Lechevalier. Paris. 150p.
- Fathi R.A., 1987.** Etude et sélection de jeunes plants d'Eucalyptus tolérants au sel, dans des populations de divers niveaux de variabilité. Thèse de doctorat. Université de Nancy 1. 236 p.
- Gabatto-Rodrigues A.A. et Stort M.N., 1992.** Biologia floral e reprodução de *Perostegia venusta* (Ker Gawl). Miers (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Botanica*. **15**: 37-41.
- Galetto L., 1995.** Nectary structure and nectar characteristics in some Bignoniaceae. *Plant systematics and Evolution*. **196**: 99 – 121.
- Gausson H., Leroy J.F. et Ozenda P., 1982.** Précis de botanique Tome II. Végétaux supérieurs. Ed. Masson. Paris. 200p.
- Geneves L., 1992.** Reproduction et développement des végétaux. Ed. DUNOD. Paris. 150p.
- Gentry A.H., 1974a.** Coevolutionary patterns in Central American Bignoniaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **61**: 728 – 759.
- Gentry A.H., 1979.** Distribution patterns of Neotropical Bignoniaceae some phytogeographic Implications. In: Tropical Botany. 339-354.
- Griffiths M., 1997.** Index of Garden plants. USA. 763p.
- Hadj Arab H., 1999.** Biologie de la reproduction et auto incompatibilité pollinique chez *Brassica oleracea* var botris L. Thèse de Magister. USTHB. Alger. 177p.
- Hamdani F.Z., 2001.** Essai de régénération de plantes entières chez le genre *Scorpiurus* via l'organogenèse et l'embryogenèse somatique. Thèse de Magister. Université de Chlef. 90 p.
- Heltzel C.E., Gunatilaka A.A.L., Glass T.E. et Kinston D.G.I., 1993.** Bioactive furanonaphthoquinones: bioactive compounds with a novel fused ring system from *Crescentia cujete*. *Tetrahedron*. **49**: 675-910.
- Kaneko T., Ohtani K., Kasai R., Yomasaki. et Duc N.M. 1997.** Iridoids and iridoid glucosides from fruits of *Crescentia cujete*. *Phytochemistry*. **46**: 907-910.
- Lafon JP., Tharau-Prayer C. et Levy G., 1998.** Biologie des plantes cultivées. Physiologie du développement génétique et Amélioration. Lavoisier. 145p.
- Le Bellec F. et Renard V., 1999.** Le grand livre des fruits tropicaux. Ed. Orphie. p 163.
- Lemmée A., 1929.** Dictionnaire descriptif synonymique des genres de plantes phanérogames (Tome I). Brest. 400p.

- Lopes AV., Vogel S. et Machado IC., 2002.** Secretary Trichomes, a substitutive Floral Nectar Source in *Lundia A. DC.* (Bignoniaceae), a Genus Lacking a functional Disc. *Ann. Bot.* **90**:169-174.
- Machado I.C. et Vogel S., 2004.** The North-est Brazilian Liana, *Adenocalymna dichilum* (Bignoniaceae) pollinated by bats. *Annals of Botany.* **93** : 609- 613.
- Maiza F., 1982.** Analyse des aptitudes organogénétiques de plusieurs variétés de *Citrus* en vue d'aboutir à leur multiplication végétative in vitro. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle en biologie et pathologie des plantes cultivées. Bordeaux. 84 p.
- Margara J., 1982.** Base de la multiplication végétative. INRA Versailles.262p.
- Murashige T. et Skoog F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* **15**: 473-497.
- Murch S.J., Liu C., Romero. et Saxena P.K., 2004.** In –vitro culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. *Plant cell, tissue and organ culture.* **34** (1) : 63-68.
- Nicholson G., 1893-1994.** Dictionnaire pratique d'Horticulture et du Jardinage Tome II. Ed.VILMORIN – ANORIEX et Cie. 400p.
- Pandey A., 2002.** An less-known edible tee, lauka (*Crescentia cujete* L.) from Uttar Pradesh, India. *Journal of Economic and Taxonomic Botany.* **26(3)**: 622-664.
- Pritchard W. H., Daws M. I., Fletcher. B.J., Gaméné SC., Msanga H .P et O Mondl W., 2004.** Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical African dryland trees. *American Journal of Botany.* **91**: 863- 870.
- Purves W.K., Orians G.H. et H.C.,1994.** Le monde vivant. Traité de botanique.1400p.
- Ramade F., 1993.** Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. Ediscience international. Paris. 822p.
- Raynal – Roques A., 1994.** La botanique redécouverte. Ed. Berlin.512p.
- Rivera G.L., 2000.** Nuptial nectary structure of Bignoniaceae of Argentina. *Darwiniana.* **38** : 227-239.
- Spichiger R.E., Savolainen V.V., Figeat M. et Jeanmonod D., 2002.** Botanique systématique des plantes à fleurs. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne. 413p.
- Singh J. et Chauhan S.V.S., 1996.** Morphological changes in the stigma of seasonally transient sterile *Tecoma stans* L. *Phytomorphology.* **46**: 1-7.
- Schleder E.J.D., Olivera A.K.M. et Favero S., 2003.** Morphological description, practicability and strength of the seeds of *Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl Bignoniaceae. *Ensaio e Ciencia: Serie Ciencias Biologicas, Agrarias, e da Saude.* **7(2)**: 271-282.

Zjhra M.L., Sytsma K.J. et Olmstead R.G. 2004. Delimitation of malagacy tribe Coleae and implications for fruit evolution in Bignoniaceae inferred from a chloroplast DNA phelogeny. *Plant. Syst. Evol.* **245**: 55-67.

ANNEXES

Annexe1 : évaluation de la viabilité pollinique.

Colorant d'Alexander :

Ethanol 95% : 10 ml

Vert malachite (1% dans l'éthanol 95%) : 1ml

Glycérol : 25g

Phénol : 5g

Fushine acide (1% dans H₂ O) : 5ml

Acide acétique glacial : 1 à 4ml

Eau distillée : 50 ml

Annexe 2 : germination in vitro du pollen

Milieu de germination de Brewbaker et Kwack (1964) :

Saccharose: 10mg

Acide borique: 10mg

Ca (NO₃)₂: 30mg

Mg SO₄: 20 mg

KNO₃: 10mg

Eau distillée: 10ml

Annexe 3: observation des tubes polliniques en microscopie à fluorescence.

Solution de Bleu d'Aniline :

Bleu d'Aniline : 0,1g

Phosphate tri potassique : 0,707g

Eau distillée : 100ml

Annexe 4 : Croissance des boutons floraux et leur ouverture en fonction du temps (Juillet 2001)

Date des relevés(jours)	Longueur des boutons floraux (cm)																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
8/7/01	1,2	1	0,8	0,5	0,5	1,2	0,8	x	0,7	x	1,3	1	0,5	x	1,2	x	x	0,5	0,5	0,8	0,5	x	0,3	0,3	0,2	x	0,5	0,5	0,5	0,5	
10/7/01	1,7	1,4	1,2	0,8	0,8	1,7	1,4	0,2	0,9	x noir	1,8	1,3	1	0,3	1,7	0,3	0,5	0,7	0,9	1	0,7	0,2	0,5	0,5	0,5	0,2	0,7	0,7	0,9	1	
15/7/01	3,5	3,0	2,9	1,7	1,8	3,5	2,6	0,4	2,3	/	3,5	2,7	2,1	0,7	3,7	0,3	1,5	2,2	2,3	tombé	2	noir	1,4	0,5	1,2	0,6	1,9	1,8	1,9	2,2	
17/7/01	/	4,2	3,7	2,3	2,6	/	3,7	0,4	3,2	/	/	3,6	3,1	0,7	/	noir	1,9	2,9	3	/	2,7	/	2	0,5	1,9	0,9	2,7	2,6	2,7	3	
21/7/01	/	/	/	/	/	/	/	noir	/	/	/	/	/	noir	/	/	3	/	/	/	/	/	3,5	noir	3,7	1,9	/	/	/	/	
23/7/01	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2,6	/	/	/	/
25/7/01	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3,5	/	/	/	/	

■ Noircissement et chute du bouton floral

■ Longueur du bouton floral au moment de son ouverture (apparition de la corolle)

x Bouton floral enfoncé dans le bois des branches, très petit ($\approx 0,1$ cm) et à peine visible

Valeur minimale = 2,3 cm

Valeur maximale = 4,2 cm

Moyenne = 3,2 cm

Annexe5: Croissance des boutons floraux et leur ouverture en fonction du temps (Septembre octobre 2001)

Date des relevés(jours)	Longueur des boutons floraux (cm)																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
19/9/01	0,9	1,4	1	0,3	0,3	0,9	0,7	0,7	0,9	1,1	2	1,8	1,7	2,3	1,2	2,1	1,7	2,3	1	1,7	1,2	1	1,7	2	1,8	2,6	2,4	1	1,6	2,5
22/9/01	1,1	1,6	1,8	0,6	0,7	1,2	0,9	0,9	1,5	1,5	2,6	2,8	2,8	2,9	1,9	2	2,7	3,2	1,6	2,3	1,8	1,2	2,9	2,7	3	3,6	3,5	2,7	2,1	3,8
24/9/01	1,5	2	1,8	0,9	0,9	1,6	1,2	1,1	1,9	1,7	3,3	3,5	3,5	3,8	2,5	3,6	3,4	4	2,1	3	2,2	1,5	2,9	3,5	3,5	3,7	4,3	2,2	2,8	4,6
26/9/01	2	2,3	2	1,2	1,2	1,7	1,5	1,4	2,5	2,5	4	4,2	4,2	4,4	4	4,2	4	/	2,5	3,3	3,3	2,3	4,1	4,2	4	4,6	4,5	2,5	4	/
30/9/01	3,5	tombé	3,3	tombé	2,5	3,5	1,5	2,5	4,2	3,8	/	/	/	/	tombé	/	/	/	4,5	3,5	5	3	/	/	/	/	/	4	/	/
1/10/01	/	/	/	/	/	3,5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/
2/10/01	4,5	/	3,8	/	2,7	3,5	3,5	3,3	4,3	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/
3/10/01	4,8	/	/	/	/	/	3,5	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
6/10/01	/	/	/	/	3,5	/	4,7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

■ Noircissement et chute du bouton floral

■ Longueur du bouton floral au moment de son ouverture (apparition de la corolle)

Valeur minimale = 3,5 cm

Valeur maximale = 4,7 cm

Moyenne = 4,2 cm

Annexe 7 : Croissance des boutons floraux et leur ouverture en fonction du temps (Septembre octobre 2002)

Date des relevés (jours)	Longueur des boutons floraux (cm)																															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
28/9/02	1,8	2	1,1	1,5	1,5	2,5	1	0,9	1,4	1,2	0,7	1	1,3	1,1	0,5	1,8	1,8	1,5	1,7	0,9	1	1,5	1,7	0,7	1,5	1,5	1,8	1	1	1,5	0,5	
2/10/02	3	3	1,8	2,1	2,3	3,8	1,7	1,5	1,7	1,6	1,5	1,5	2,1	1,7	1,2	2,7	2,8	2,5	2,5	1,5	1,8	2,5	2,6	1,5	2,6	2,8	1,8	1,5	1,5	1,5	1	
9/10/02	4,4	4,5	2,6	3	3,2	4,4	2,3	2,3	2,5	2,2	2,1	2,5	3,0	2,4	1,5	3,8	4	3,6	3,5	2,1	2,8	3,5	3,7	2	3,4	4	2	2,5	2,5	2	1,5	
6/10/02	5	4,5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4,3	/	/	/	/	4	/	/	/	4,7	/	/	/	/	/	/	
7/10/02	/	/	3,3	3,6	3,9	/	2,9	2,7	2,7	2,8	2,6	2,5	3,6	2,6	2	4,5	/	4,5	4	2,5	3	/	4,5	2,2	4	/	2,5	3	2,8	2,5	2	
8/10/02	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4,5	/	4	/	/	/	/	/	/	/	
9/10/02	/	/	3,7	4	4	/	3,5	3,5	2,8	3	3,3	3	4,3	3,5	2,3	/	/	/	/	2,7	4	/	/	3	/	/	3	3,6	3,5	3	2,2	
12/10/02	/	/	4,2	/	/	/	4	4,4	/	3,5	4	3,8	4,6	4	3	/	/	/	/	4	/	/	/	3,7	/	/	4	/	4,2	3,7	3,2	
13/10/02	/	/	/	/	/	/	4,7	5	/	/	4,5	3,7	/	4	3,5	/	/	/	/	4	/	/	/	4	/	/	4	/	5	4,1	3,5	
14/10/02	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3,5	/	/	/	/	4	/	/	/	4	/	/	4,3	/	/	4,1	3,7	
15/10/02	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3,5	/	/	/	/	/	/	/	/	5	/	/	/	/	/	/	/	4
16/10/02	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4,5
19/10/02	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4,6

■ Longueur du bouton floral au moment de son ouverture (apparition de la corolle)

Valeur minimale = 2,8 cm

Valeur maximale = 5 cm

Moyenne = 4,2 cm

Annexe 8: Composition en Macroéléments, microéléments et vitamines du milieu de culture Muraschige et Skoog (1962).

Macroéléments (g.l⁻¹)	microéléments (g.l⁻¹)	vitamines (g.l⁻¹)
NH ₄ NO ₃ : 16,50 Ca cl ₂ ,2H ₂ O : 4,40 MgSO ₄ ,7H ₂ O : 3,7 KNO ₃ : 19 KH ₂ PO ₄ : 1,7	Co cl ₂ , 6H ₂ O: 0,0025 CuSO ₄ , 5H ₂ : 0,0025 Mn SO ₄ ,4H ₂ O: 2,23 KI: 0,083 Na ₂ MoO ₄ ,2H ₂ O: 0,25 ZnSO ₄ ,7H ₂ O: 0,86 H ₃ BO ₃ : 0,62	Thiamine-Hcl: 0,01 Acide nicotinique: 0,05 Pyridoxine Hcl: 0,05 Glycine: 0,2