



UNIVERSITE IBN ZOHR

CENTRE DES ETUDES DOCTORALES IBN ZOHR

Formation Doctorale : Science de la Vie et Ressources Naturelles

Faculté des Sciences Agadir

THÈSE

Présentée par

**Rachida EL BOULLANI**

Pour l'obtention de grade de

**DOCTEUR**

Spécialité : Biotechnologies Végétales

**Culture *in vitro* de l'artichaut**

**« *Cynara cardunculus* var. *scolymus* »**

Directeur de thèse : **Mohammed Amine SERGHINI**

Soutenue publiquement le 2 juillet 2013 à 9 H à l'amphi. V, Faculté des Sciences, Agadir, devant  
la commission :

<b>M. Abdelhamid EL MOUSADIK</b>	Professeur à la faculté des sciences, Agadir	<b>Président</b>
<b>Mme Kenza LOUTFI</b>	Professeur à la faculté des sciences, Marrakech	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Mohammed BAAZIZ</b>	Professeur à la faculté des sciences, Marrakech	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme Saida TAHROUCH</b>	Professeur à la faculté des sciences, Agadir	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme Raffaela TAVAZZA</b>	Centre de recherche ENEA, Rome	<b>Examinateur</b>
<b>M. Mohammed Amine SERGHINI</b>	Professeur à la faculté des sciences, Agadir	<b>Directeur de thèse</b>
<b>M. François HANNECART</b>	International Nursery, Ait Amira, Agadir	<b>Invité</b>

---

## FICHE PRESENTATIVE DE LA THESE

**Nom et prénom :** EL BOULLANI Rachida

**Intitulé de la thèse :** Culture *in vitro* de l'artichaut (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.)

**Encadrant :** SERGHINI Mohammed Amine

**Laboratoire et institution :** Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Ressources Naturelles, Faculté de Sciences, Agadir.

**Lieux de réalisation du travail :**

- Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Ressources Naturelles, Faculté de Sciences, Agadir.
- Laboratoire de Biotechnologie végétale, centre de recherche ENEA Casaccia, Rome, Italie.

**Période de réalisation du travail de la thèse :** 2009-2013.

**Président et rapporteurs autres que l'encadrant :**

- M. Abdelhamid EL MOUSADIK
- Mme Kenza LOUTFI
- M. Mohammed BAAZIZ
- Mme Saida TAHROUCH

**Ce travail a bénéficié du soutien financier de la part de :**

- L'Université Ibn Zohr dans le cadre d'appel à Projet de recherche 2010 /CDMT.
- L'International Nursery – Grow Group, Pépinière régionale (2009 - 2011).

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont contribué aux publications et communications orales et affichées suivantes :

### Publications

**El Boullani R., Elmoslih A., El Finti A., El Mousadik A. et Serghini M.A. (2013).** Effect of decapitation and size of explants on *in vitro* multiplication rate of globe artichoke. Acta Hort. (ISHS) 983: 325-329.

**El Boullani R., Elmoslih A., El Finti A., El Mousadik A., Serghini M.A. (2012).** Improved *in vitro* Micropropagation of Artichoke (*Cynara Cardunculus* var. *scolymus* L.). European Journal of Scientific Research 80(4): 430-436.

**El Finti A., El Boullani R., El Ayadi F., Ait Aabd N., El Mousadik A. (2012).** Micropropagation *in vitro* of *Opuntia Ficus-Indica* in south of Morocco. *IJCBS*, 1(2012): 6-10.

---

El Finti A., Belayadi M., **El Boullani R.**, Msanda F., Serghini M.A., El Mousadik A. (2013). Genetic Structure of Cactus Pear (*Opuntia Ficus Indica*) in Moroccan Collection. *Atlas Journal of Plant Biology*, 1(2): 24–28.

El Finti A., **El Boullani R.**, Ait Aabd N., Msanda F., Serghini M.A., El Mousadik A. (2013). *In Vitro* Propagation of Three Moroccan Prickly Pear Cactus *Opuntia* and Plant Establishment in Soil. *Notulae Scientia Biologicae*, 5(1): 39-44.

## Communications en tant que premier auteur

### - Communications orales

**El Boullani R.**, El Finti A., Elmoslih A., El Mousadik A. et Serghini M.A. Effect of Explants Density and Size on the *in vitro* Proliferation of Globe Artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.). The First International American Moroccan Agricultural Sciences Conference (AMAS Conference I) Rabat, Morocco, March 18-19, 2013.

**El Boullani R.**, Askarne L., El Mousadik A. et Serghini M.A. Culture *in vitro* de l'artichaut « *Cynara scolymus* L. ». 5<sup>ème</sup> congrès international sur les plantes aromatiques et médicinales (CIPAM). Fès, 14-16 octobre 2010.

**El Boullani R.**, Askarne L., El Mousadik A. et Serghini M.A. La multiplication *in vitro* de l'artichaut « *Cynara scolymus* L. ». 1<sup>er</sup> Workshop National sur les Biotechnologies au service du développement durable : Enjeux et Opportunités pour le Maroc, organisé par la société marocaine de génétique et biologie moléculaire. Beni Mellal, 25-26 décembre 2009.

### - Communications affichées

**El Boullani R.**, El Finti A., Fallah M., El Mousadik A. et Serghini M.A. Contribution à l'amélioration du taux de multiplication de l'artichaut (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) par la culture *in vitro*. Les "Journées Scientifiques et Culturelles" sous le thème " La Science et la Culture pour Un développement Durable" à la faculté des sciences, Agadir, 2-4 mai 2013.

**El Boullani R.**, El Finti A., Askarne L., El Mousadik A. et Serghini M.A. *In vitro* micropropagation of « *Cynara scolymus* ». 4<sup>ème</sup> Symposium International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales. Mohammedia, 12-13 mai 2011.

**El Boullani R.**, El Finti A., Askarne L., El Mousadik A. et Serghini M.A. Efficient method for micropropagation of artichoke through adventitious buds. Congrès International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales. Cagliari, Italie, 13-15 avril 2011.

**El Boullani R.**, Askarne L., El Finti A., El Mousadik A. et Serghini M.A. Improvement of multiplication rate of '*Cynara scolymus*' by micropropagation. 3<sup>ème</sup> édition du Congrès international Amélioration de la Production Agricole APA3. Settat 17-18 mars 2011.

**El Boullani R.**, El Finti A., Askarne L., El Mousadik A. et Serghini M.A. Development of establishment and proliferation media of artichoke '*Cynara scolymus* L.' for *in vitro* adventitious budding. 3<sup>ème</sup> édition du Congrès international Amélioration de la Production Agricole APA3. Settat, 17-18 mars 2011.

**El Boullani R.**, Askarne L., El Mousadik A. et Serghini M.A. Improved rate of multiplication of the artichoke "*Cynara scolymus* L." by *in vitro* culture. 14th Evolutionary Biology Meeting. Marseilles, 21-24 september 2010.

**El Boullani R.**, Askarne L., Alif N., El Mousadik A. et Serghini M.A. Amélioration du taux de la multiplication *in vitro* de la tomate '*Lycopersicon esculentum* Mill'. 3<sup>ème</sup> Congrès International

---

de biochimie et biologie moléculaire, organisé par la société marocaine de biochimie et de biologie moléculaire (SMBBM). Marrakech, 20-24 Avril **2009**.

**El Boullani R.**, Askarne L., El Mousadik A. et Serghini M. A. Contribution à la culture *in vitro* de la tomate '*Lycopersicon esculentum Mill*'. Workshop organisé par la société marocaine de biochimie et de biologie moléculaire (SMBBM) à la Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia, 05 Juin **2008**.

### Autres communications

El Finti A, **El Boullani R.**, Yamani I., Msanda F. et El Mousadik A. Morphological Characterization of *Opuntia* spp. in Southern Morocco. The First International American Moroccan Agricultural Sciences Conference (AMAS Conference I) Rabat, Morocco, March 18-19, **2013**. (Communication affichée)

Elmoslih A., **El Boullani R.**, El Mousadik A. et Serghini M.A. *In vitro* Rooting of Globe Artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.). The First International American Moroccan Agricultural Sciences Conference (AMAS Conference I) Rabat, Morocco, March 18-19, **2013**. (Communication affichée)

Lagram K., **El Boullani R.**, Ben El Caid M., Fallah M., El Mousadik A. et Serghini M.A. Initiation to Micropropagation of Selected Saffron Cultivars (*Corcus sativus*) of Taliouine. The First International American Moroccan Agricultural Sciences Conference (AMAS Conference I) Rabat, Morocco, March 18-19, **2013**. (Communication affichée).

Lagram K., Ben El Caid M., **El Boullani R.**, Fallah M., El Mousadik A. et Serghini M.A. Valorisation de cultivars locaux du safran par la sélection et la culture *in vitro*. 6<sup>ème</sup> édition du festival du Safran, Taliouine, du 29 Novembre au 02 décembre **2012**. (Communication affichée).

Lagram K., Ben El Caid M., **El Boullani R.**, Fallah M., El Mousadik A. et Serghini M.A. Valorisation de cultivars locaux du safran par la sélection et la culture *in vitro*. III<sup>ème</sup> symposium national sur les agrobiotechnologies (biotechnologies microbiennes et végétales), Rabat, 29-30 octobre **2012**. (Académie Hassan II des Sciences et Techniques). (Communication orale)

Serghini M.A., **El Boullani R.**, Finti A. et El Mousadik A. 'Effect of decapitation and seize of explants on *in vitro* multiplication rate of globe artichoke'. VIII International Symposium on Artichoke, Cardoon and their Wild Relatives. Viterbo, Italie. 10-13 Avril **2012**. (Communication orale)

Askarne L., **El Boullani R.**, Fallah M., Alif N., El Mousadik A. et Serghini M. A. Culture *in vitro* de la tomate '*Lycopersicon esculentum Mill*' : Aspects techniques et applications pratiques. 3<sup>ème</sup> Congrès International de biochimie et biologie moléculaire, organisé par la société marocaine de biochimie et de biologie moléculaire (SMBBM). Marrakech, 20-24 Avril **2009**. (Communication orale)

Askarne L., **El Boullani R.**, Fallah M., El Mousadik A. et Serghini M.A. Contribution à la micropropagation de la tomate '*Lycopersicon esculentum Mill*'. 4<sup>ème</sup> Congrès International de Génétique et Biologie Moléculaire & Biotechnologie, organisé par la société Marocaine de Génétique et Biologie Moléculaire et l'Association Magrébine de Biotechnologie à Ouarzazate, 06-08 Novembre **2008**. (Communication orale)

Askarne L., **El Boullani R.**, Fallah M., El Mousadik A. Cherifi K. et Serghini M.A. Effet du génotype et de la nature de l'explant sur la culture *in vitro* de la tomate. XI JS du Réseau Biotechnologies Végétales et amélioration des Plantes de l'agence universitaire de la francophonie (AUF)/Rennes, 30 Juin au 03 Juillet **2008**. (Communication affichée)

---

## RÉSUMÉ

L'artichaut (*Cynara cardunculus* var *scolymus* L.), plante herbacée de la famille des Asteraceae, est traditionnellement cultivé comme plante maraîchère pour ses capitules. La demande croissante en artichaut rend le développement d'une méthode rapide de multiplication de cette plante nécessaire. La micropropagation *in vitro* est une alternative pour l'obtention de clones uniformes, sains et de haute qualité, nécessaire pour augmenter la surface de culture de cette espèce. Le problème de la contamination et le faible taux de multiplication *in vitro* de cette espèce restent des facteurs limitants. L'objectif de cette étude est la mise au point d'un protocole de la culture *in vitro* de l'artichaut avec un taux de multiplication élevé afin de l'appliquer aux cultivars marocains pour une production à grande échelle.

Une première approche, visant la mise au point d'un protocole de germination des graines d'artichaut, a permis de constater qu'un prétraitement par incubation à 4 °C suivie par l'enlèvement des téguments et la mise en culture sur milieu Murashige et Skoog (MS), améliore le pourcentage de germination des deux accessions Art21 et Art22. En revanche, les résultats de la germination dans de la tourbe de variétés IJ et BR ont montré un effet hautement significatif du génotype sur le pourcentage de germination qui a dépassé 50 %, avec un temps de germination peut être réduit à quatre jours après incubation à 18 °C et un traitement par l'acide gibberellique.

Pour la multiplication *in vitro*, les plantules issues de la germination *in vitro* des graines de l'accession Art21 sans tégument à l'obscurité ont constitué nos explants de départ. Ces plantules, après avoir évolué sur le milieu MS d'établissement contenant 1 mg/l de l'acide indole 3-butyrrique (AIB) et 0,1 mg/l de l'acide gibberellique (AG<sub>3</sub>), ont été découpées et cultivées sur le milieu de prolifération MS contenant 40 mg/l de l'adénine sulfate, 50 mg/l du phosphate monosodique, 1 mg/l de la kinétine et 0,1 mg/l de l'ANA. D'après les résultats, nous avons constaté que la décapsulation de plantules a eu un effet positif sur l'induction des pousses. Le nombre le plus important de pousses régénérées (prolifération des pousses) a été obtenu avec des explants découpés (17 pousses par explant). Le taux de multiplication, obtenu sur douze générations dans ce travail, était 7,56. Ce travail a également porté sur l'étude de l'influence de la taille initiale des explants, de la densité des explants et de la durée de culture sur le taux de bourgeonnement et sur la formation des pousses. Les résultats ont montré qu'une taille de 1-1,5 cm, une densité de quatre explants par 132 cm<sup>2</sup> de surface de culture et une durée de génération de quatre semaines sont optimaux quant à la prolifération chez l'accession Art21.

Les pousses développées au cours de la phase de multiplication ont subi plusieurs protocoles d'enracinement ainsi que d'acclimatation. Dans notre cas, c'est le milieu MS modifié, additionné de 2 mg/l de l'acide naphtalène acétique (ANA) et le charbon actif à 2 g/l qui a donné un pourcentage d'enracinement de 29,03 % et une qualité acceptable des racines néoformées. Les meilleurs taux d'enracinement ont été notés chez les pousses qui proviennent d'un rang de subculture supérieur à 10 et ayant subi une élévation avant d'entamer l'étape d'enracinement. La phase d'acclimatation reste une phase critique pour notre accession Art21, d'où la nécessité de soumettre les plantules à d'autres conditions d'enracinement et d'acclimatation afin d'améliorer le pourcentage de survie des vitroplants et de valoriser les résultats déjà obtenus en phase de multiplication.

Par ailleurs, un protocole de cryoconservation fondé sur la vitrification a été appliqué aux deux variétés italiennes d'artichaut (*Grato* et *Campagnano*), d'après les premiers résultats, nous avons noté que le milieu MS modifié 0,3M est le plus convenable pour ces deux variétés d'artichaut. Ce protocole constitue un point de départ vers une application de la cryoconservation pour la protection et la conservation de germoplasmes d'artichaut.

**Mots clés :** Culture *in vitro*, *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L., Enracinement, Explant, Micropropagation,, Taux de multiplication.

---

## ABSTRACT

Globe artichoke (*Cynara cardunculus* var *scolymus* L.), herbaceous plant belonging to the *Asteraceae* family, is traditionally grown as vegetable for its heads. Growing demand for plants of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) made it necessary to find a rapid method of multiplication for this plant. *In vitro* micropropagation is an alternative for obtaining healthy, high quality and uniform clones, important to increase the cultivation area of this species. The contamination problem and low *in vitro* multiplication rate still remain the limiting factors. The objective of this study is the development of a protocol for *in vitro* cultivation of globe artichoke with a high multiplication rate to apply to the Moroccan cultivars for a large scale production.

A first approach aiming the development of a protocol for seed globe artichoke germination showed that pretreatment by incubation at 4° C followed by removal of coats and culture on Murashige and Skoog medium (MS) improves germination percentage of two accessions Art21 and Art22. In contrast, the results on the germination in peat of varieties IJ and BR showed a highly significant effect of genotype as germination percentages of both varieties exceeded 50% with a germination time reduction to four days with incubation at 18° C and treatment with gibberellic acid.

For *in vitro* multiplication, plantlets derived from *in vitro* germination seeds ‘Art21 accession’ without coats formed our initial explants. These seedlings, after developing on MS establishment medium containing 1 mg/l indole 3-butyric acid (IBA) and 0.1 mg/l gibberellic acid (GA<sub>3</sub>), were decapitated and cultured on MS proliferation medium containing 40 mg/l adenine sulfate, 50 mg/l monosodium phosphate, 1 mg/l kinetin and 0.1 mg/l NAA. Based on the results, we found that the decapitation of seedlings had a positive effect on the shoots induction. The greatest propagation ratio (shoot proliferation) was obtained with ‘decapitated’ explants (17 shoots per explant). The multiplication rate obtained in this work over twelve generations was 7.56. This work has also focused on the study of the influence of the initial size of explants, explants density and culture period on the budding rate and shoots formation. The results showed that a size of 1-1.5 cm, a density of four explants per 132 cm<sup>2</sup> area of culture and a generation time of four weeks are optimum for proliferation in accession Art21.

Shoots developed during the multiplication phase underwent several protocols of rooting and acclimatization. In our case, the modified MS medium supplemented with 2 mg/l naphthalene acetic acid (NAA) and 2 g/l activated charcoal gave a rooting percentage of 29.03% and acceptable quality of newly formed roots. The best rooting rate were noted in shoots coming from a subculture of rank greater than 10 who underwent elongation step before starting rooting. The acclimatization phase is a critical phase for our accession Art21, and other rooting and acclimatization conditions are necessary to improve the survival percentage of plantlets and valorize results already obtained in multiplication phase.

In addition, a cryopreservation protocol based on vitrification was applied to two Italian varieties of globe artichoke (*Grato* and *Campagnano*). According to preliminary results, we noted that the modified MS medium 0.3M is the most suitable for the cryoconservation of these two varieties of globe artichoke. This protocol provides a starting point for application of cryopreservation for the protection and conservation of germplasm artichoke.

**Key words :** *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L., Multiplication rate, Rooting, Micropagation, Explant, *In vitro* culture.

## ملخص

الخرشوف (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) هو نبات عشبي ينتمي إلى عائلة Asteraceae، يزرع تقليدياً بطريقة خضرية للإستفادة من روباته ذات الفوائد المتعددة.

الطلب المتزايد على الخرشوف يستدعي تطوير طريقة سريعة لتكاثر هذه النبتة و تقنية الإكثار الدقيق في المختبر تعد بديلاً يمكن من الحصول على نسخ متشابهة، خالية من الأمراض و ذات جودة عالية، و قادرة على الإسهام في توسيع المساحة المزروعة بهذه النبتة. و يظل معدل تكاثر زراعة الأنسجة بالنسبة للخرشوف محدوداً و معرضًا للإصابة بالأمراض و هي عوامل تحد من التطبيق الموسع لهذه التقنية. تهدف هذه الدراسة إلى تطوير طريقة زراعة الأنسجة للخرشوف بمعدل تكاثر عال و ذلك لتطبيقاتها على الأصناف المغربية من أجل إنتاج واسع النطاق.

المنهج الأول الذي يهدف إلى وضع بروتوكول لإنبات بذور الخرشوف أظهر أن المعالجة التي تعتمد على حفظ البذور تحت 4 درجات مئوية متبوعة بإزالة أغشيتها و زراعتها في وسط زراعة MS يحسن نسبة الإنبات للصففين Art21 و Art22. بالمقابل أظهرت نتائج الإنبات في التربة لنوعين من البذور IJ و BR وجود تأثير كبير للنوع الجيني على نسبة الإنبات و التي تعددت خمسين بالمائة مع إمكانية خفض زمن الإنبات إلى 4 أيام و ذلك بوضع البذور تحت درجة حرارة 18°C و معالجتها بحمض الجبريليك (AG<sub>3</sub>).

بالنسبة لزراعة الأنسجة، شكلت الشتائل التي حصلنا عليها من خلال إنبات بذور الصنف Art21 بدون أغشية في وسط ملائم، مصدر المزدرعات التي انطلقنا منها. هذه الشتائل، بعد نموها على وسط الزراعة MS المنشئ الذي يحتوي على 1 مغ/لتر من AIB و 0,1 مغ/لتر من حمض الجبريليك (AG<sub>3</sub>)، تم قطع أوراقها، قممها و جذورها ثم زراعتها في وسط تكاثر يحتوي على 40 مغ/لتر من سلفات الأدينين، 50 مغ/لتر من أحادي الصوديوم الفوسفات، 1 مغ/لتر من الكنتين (kinétine) و 0,1 مغ/لتر من ANA. من خلال النتائج المحصل عليها، وجدنا أن قطع رؤوس الشتائل له أثر إيجابي على تكون النموات. أكبر عدد من النموات (تكاثر النموات) تم الحصول عليه باستخدام المزدرعات المقطوعة الرأس (17 نموة لكل مزدرعة). و وصل معدل التكاثر المحصل عليه خلال 12 جيلاً إلى 7,56. وركز هذا العمل أيضاً على دراسة تأثير الطول الأولى للمزدرعات، كثافة المزدرعات و مدة الزرع على معدل التبرعم و تكون النموات. وقد أظهرت النتائج أن الطول ما بين 1 إلى 1,5 سنتيمتر، وكثافة أربع مزدرعات في 132 سنتيمتر مربع من مساحة وسط الزرع وأربع أسابيع لكل جيل، تعتبر ظروفًا مثالية لتكاثر الصنف Art21.

النموات المحصل عليها خلال مرحلة التكاثر تم استعمالها في تجارب التجدير و التأقلم. و تم التوصل إلى أن وسط الزراعة MS المعدل و الذي يحتوي على 2 مغ/لتر من ANA و 2 غ/لتر من الفحم المنشط (charbon actif)، أعطى نسبة تجدر تفوق 28% مع تكون جذور بجودة مقبولة. وقد لاحظنا أن أفضل معدل للتجدير تم تسجيله عند النموات التي تتنمي إلى الجيل العاشر فما فوق و التي مرت بمرحلة الإستطالة قبل أن يتم استعمالها في تجارب التجدير. مرحلة التأقلم تبقى مرحلة حساسة بالنسبة للصنف Art21، مما يستدعي إخضاع النباتات لظروف أخرى من التجدير و التأقلم بهدف تحسين نسبة عيش الشتائل و تثمين النتائج المحصل عليها سابقاً في مرحلة التكاثر.

تم تطبيق أسلوب الحفظ بالتبريد المعتمد على التزجيج على صنفين من الخرشوف الإيطالي و هما *Grato* و *Campagnano*. و وفقاً للنتائج الأولية، لاحظنا أن وسط الزراعة MS المعدل 0,3M هو الأنسب لهذين النوعين من الخرشوف. و يشكل هذا العمل نقطة إنطلاق لتطبيق تقنية الحفظ بالتبريد قصد حماية وحفظ الأصول الوراثية للخرشوف.

**الكلمات المفتاحية :** *Cynara cardunculus* var. *scolymus* L. ، معدل التكاثر، تجدر، مزدرعات، الإكثار الدقيق، زراعة الأنسجة النباتية.

---

## REMERCIEMENT

Le présent travail n'aurait pu être réalisé sans la contribution de plusieurs personnes à qui j'adresse mes plus sincères remerciements ainsi que le témoignage de mon plus profond respect.

C'est avec beaucoup de plaisir que je témoigne ici toute ma reconnaissance au Professeur **Mohammed Amine SERGHINI**, mon directeur de thèse, qui a suivi ce travail de très près et avec beaucoup d'intérêt. C'est grâce à ces qualités scientifiques, humaines, ses conseils prodigieux et ses efforts considérables que j'ai pu mener à terme ce travail. Je tiens à lui exprimer ici ma profonde gratitude pour son soutien exemplaire, pour le temps qu'il a consacré à la correction de ce manuscrit et pour ses conseils et sa grande disponibilité des derniers moments.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Abdelhamid EL MOUSADIK**, responsable du laboratoire 'Biotechnologie et Valorisation de Ressources Naturelles' pour avoir veillé au bon déroulement de ce travail tout au long de ces années de thèse, toujours avec beaucoup d'intérêt et d'écoute. Je le remercie également de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je ne sais comment exprimer ma gratitude à ces deux personnes autrement qu'en leur promettant d'agir comme eux avec des étudiants dans ma situation, si un jour l'occasion m'en est donnée.

Je voudrais également exprimer mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. J'adresse toute ma gratitude aux Professeurs Kenza LOUTFI, Saida TAHROUCH et Mohammed BAAZIZ pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce manuscrit. Je remercie chaleureusement Docteur Raffaella TAVAZZA pour sa présence en qualité d'examinateur au sein de ce jury. Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à messieurs Mulder VELDER et François HANNECART de l'International Nursery.

J'adresse de sincères remerciements aux étudiants du laboratoire, et particulièrement, à Fatima, Naima, Latifa, Driss, Jamila et Fayza pour leur amitié, leur soutien et leur bonne humeur de tous les jours. Merci aussi à Meryam, Latifa, Zaina, Rkia, Redoune et tous les autres thésards.

J'ai pu bénéficier d'un rendez-vous annuel avec les différents membres du laboratoire. Les discussions passionnantes et les conseils prodigues, à la suite des exposés intralaboratoire, m'ont apporté une autre vision de mes travaux et ont renouvelé chaque année ma motivation et mon enthousiasme, nécessaires pour avancer. Merci à Madame N. ALIF et à Messieurs les professeurs B. SAADI, E.H. BOUDYACH, F. MSANDA, H. BOUBAKER A., AIT BEN AOUMAR et K. CHERIFI. Un merci particulier à Monsieur le Professeur M. FALLAH pour son aide précieuse, pour sa gentillesse et ses conseils. Merci à tant d'autres pour leur soutien et leur présence.

Merci à l'équipe chaleureuse du laboratoire de biotechnologie au centre de recherche ENEA pour leurs conseils, leurs encouragements et leur collaboration à ce travail, tout

---

particulièrement à **Raffaela TAVAZZA** et **Velia PAPACCHIOLI**. Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein du Laboratoire d'innovation agro-industrielle, et j'en remercie ici tous les membres : **Paola CRINO** et **Anna CIANCOLINI**.

Un grand merci à mes collègues de l'ENEA, M. TAVAZZA, S. LUCRETTI, G. GIULIANO, V. GROSSO, D. GIORGI, A. FARINA, M. PIETRELLA, S. FRUSCIANTE, G. FALCONE, G. DIRETTO, O. DEMURTAS, qui ont contribué à rendre le centre de recherche ENEA comme un espace convivial. Sans oublier Michèle GUEDJ et Carlo PERLA qui ont rendu mon séjour en Italie très agréable.

Merci à l'école doctorale CED Ibn Zohr et plus particulièrement à Madame la Directrice Amina IDRISI HASSANI, pour son suivi rigoureux et ses formations où on est bien nourri. Merci également à Omar HASSNAOUI.

Mes profonds remerciements vont également aux responsables de l'International Nursery et à l'Université Ibn Zohr qui ont financé les travaux de réalisation de cette thèse, qui m'a bénéficié d'un stage de formation sur la culture *in vitro* au laboratoire de biotechnologie au centre de recherche ENEA en Italie.

Je tiens également à remercier les étudiants du Master : Abdelkhaleq EL MOSLIH et Khalid LAGRAM, qui ont participé à rendre cette quatrième année de thèse inoubliable et notamment pour leur aide et leur soutien lors de la rédaction de mon manuscrit! Merci à vous deux et bon courage pour la suite.

J'ai également une pensée reconnaissante envers Farouk GRINE qui m'a rendu beaucoup de services, merci pour ta sympathie, tes conseils et pour le partage des articles. Je te souhaite bonne chance pour la soutenance et beaucoup de bonheur pour la suite.

Je remercie très chaleureusement mes amies qui ont été d'un très grand soutien. Merci à Zaina BOUNA qui est présente pour moi depuis le primaire, merci pour ton amitié et pour tout ce chemin parcouru ensemble depuis si longtemps. Merci également à Asma, Khadija, Fatima, Mina...

Je souhaite aussi remercier infiniment Aissam EL FINTI qui m'a constamment soutenue, rassurée et encouragée durant ces années de thèse (et toutes celles qui ont précédé). Merci pour ta contribution à mes expériences, tes encouragements, ton aide irremplaçable jusqu'à ma période de "nervous breakdown" et au moment de finaliser le manuscrit.

Enfin, pour terminer un grand merci à ma mère, mon père, ma sœur Fatima et mon frère Hassan ainsi que toute ma famille (oncle, tante et cousins) pour m'avoir donné la passion de la connaissance et pour m'avoir soutenu pendant ces longues années d'études. Merci d'avoir été toujours à mes côtés et d'avoir cru en moi dans toutes les circonstances. Sans leurs encouragements et leur soutien moral et affectif, je n'y serais jamais arrivée!

Mes respectueuses reconnaissances à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

“Deux biens sont pour nous aussi précieux que l'eau ou la lumière pour les arbres : la solitude et les échanges.” Christian Bobin

---

## DÉDICACE

*À la mémoire de mon grand-père*

*À mes chers parents*

*À ma soeur et mon frère*

*À la grande famille El Boullani et Blilig*

*À mes amies*

*À tous ceux qui me sont chers*

*À vous tous, je dédie le fruit de ce travail*

---

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>2,4-D</b>	: Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
<b>2iP</b>	: 6(2-isopentenylaminopurine)
<b>ACDV</b>	: Artichoke Curly Dwarf Virus
<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>ADV</b>	: Artichoke Degeneration Virus
<b>AFLP</b>	: Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (Amplified Fragment-Length Polymorphism)
<b>AG<sub>3</sub></b>	: Acide gibbérellique
<b>AIA</b>	: Acide indole-acétique
<b>AIB</b>	: Acide indole butyrique
<b>AILV</b>	: Virus Italien Latent de l'Artichaut
<b>AMCV</b>	: Artichoke Mottled Crinkle Virus
<b>ANA</b>	: Acide naphtalène acétique
<b>ANOVA</b>	: Analyse de la variance (Analysis of Variance)
<b>ArLV</b>	: Virus Latent de l'Artichaut
<b>ARNm</b>	: Acide ribonucléique messager
<b>BAP</b>	: 6-benzylamino purine
<b>BSAA</b>	: Acide 3-benzo-βselenyl acétique
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Dioxyde de carbone
<b>ENEA</b>	: Agence nationale pour les nouvelles technologies, l'énergie et le développement économique durable (Agenzia Nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile)
<b>ET</b>	: Ecart type
<b>EtoH</b>	: Éthanol
<b>FAO</b>	: Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization)
<b>Ha</b>	: Héctaire
<b>HgCl<sub>2</sub></b>	: Chlorure mercurique
<b>HR</b>	: Humidité relative
<b>Kin</b>	: Kinétine
<b>MS</b>	: Matière sèche
<b>MS</b>	: Murashige et Skoog (1962)
<b>NaOH</b>	: Hydroxyde de sodium
<b>ORMVAM</b>	: Office régional de mise en valeur agricole de moulouya
<b>PG1</b>	: Pool génique primaire sauvage
<b>PG2</b>	: Pool génique secondaire sauvage
<b>PVS2</b>	: Plant vitrification solution 2
<b>TSWV</b>	: Tomato Spotted Wilt Virus
<b>VG</b>	: Vitamines de Gamborg
<b>VMS</b>	: Vitamines de Murashig et Skoog
<b>β-CD</b>	: β-Cyclodextrine

---

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Superficie cultivée (Ha), production (tonnes) et rendement (Hg/Ha) de l'artichaut dans le monde (FAOSTAT, 2012).....	15
<b>Tableau 2:</b> Milieux de base et conditions de culture utilisés par différents auteurs pour la cultur <i>in vitro</i> de l'artichaut.....	47
<b>Tableau 3:</b> Sels de Murashige et Skoog .....	53
<b>Tableau 4:</b> Vitamines utilisées par Gamborg .....	53
<b>Tableau 5:</b> Composition du milieu MS modifié décrit par Tavazza <i>et al.</i> (2004) .....	53
<b>Tableau 6:</b> Milieux utilisés en cryoconservation (Réf. Laboratoire de biotechnologie, centre de recherche ENEA, Rome) .....	54
<b>Tableau 7:</b> Préparation des solutions mères des différents constituants des milieux de culture .....	55
<b>Tableau 8:</b> Type de régulateurs de croissance et leurs solvants .....	56
<b>Tableau 9:</b> Récapitulatif des expériences de germination des graines réalisées.....	65
<b>Tableau 10:</b> Comparaison entre les différents protocoles de désinfection effectués sur les graines et le % de germination qui en découle.....	70
<b>Tableau 11:</b> Pourcentage des graines germées des deux accessions après chaque prétraitement .....	71
<b>Tableau 12:</b> Délais en jours entre le semis et la première germination pour chaque traitement .....	72
<b>Tableau 13:</b> Durée moyenne de germination pour chaque traitement.....	73
<b>Tableau 14:</b> Comparaison de la germination des graines avec ou sans traitement par l'AG3 à deux températures .....	77
<b>Tableau 15:</b> Récapitulatif des expériences réalisées au niveau de ce chapitre.....	99
<b>Tableau 16:</b> Milieux de culture utilisés durant les différentes étapes de la culture <i>in vitro</i> de l'artichaut .....	100
<b>Tableau 17:</b> Composition des milieux de culture testés pour l'enracinement de nos pousses .....	104
<b>Tableau 18:</b> Nombre moyen de pousses par explant d'artichaut enregistré durant les 12 générations consécutives sur le milieu de prolifération.....	109
<b>Tableau 19:</b> Nombre de pousses obtenues durant les différentes durées de culture sur milieu de multiplication .....	112
<b>Tableau 20:</b> Comparaison de l'évolution des pousses sur deux milieux d'elongation après deux semaines de culture.....	114
<b>Tableau 21:</b> Comparaison de l'enracinement des pousses de la 17 <sup>ème</sup> génération sur trois milieux différents après 4 semaines de culture.....	115
<b>Tableau 22:</b> Etude de l'enracinement sur le milieu MS et le milieu MS modifié décrit par Tavazza <i>et al.</i> (2004), contenant 2 mg/l de l'ANA après 6 semaines de culture.....	117
<b>Tableau 23:</b> Etude de l'enracinement des pousses de la 23 <sup>ème</sup> génération sur le milieu de Tavazza en absence et en présence du charbon actif (6 semaines).....	118
<b>Tableau 24:</b> Aperçu sur les essais d'enracinement non concluants effectué sur des pousses du rang inférieur au 15 <sup>ème</sup> .....	120
<b>Tableau 25:</b> Pourcentage de survie des apex cryoconservés des variétés d'artichaut 'Grato' et 'Campagnano' .....	143

---

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Capitules de A) l'artichaut, B) le cardon cultivé et C) le cardon sauvage.....	5
<b>Figure 2:</b> Méthode de découpage de la plante d'artichaut à la fin du cycle .....	7
<b>Figure 3:</b> Schéma des principaux stades de croissance des plantes d'artichaut .....	9
<b>Figure 4:</b> Base du plant d'artichaut. Notez deux nouvelles pousses basales découlant de chaque côté de la plante principale. Celles-ci donnent lieu à de nouveaux ensembles de bourgeons. (Photo : A. Bratsch 2009).....	10
<b>Figure 5:</b> Parties consommables de l'artichaut (les termes populaires sont entre parenthèses).....	10
<b>Figure 6:</b> Inflorescence en capitule de l'artichaut et détail d'une fleur .....	12
<b>Figure 7:</b> Pollinisation de l'artichaut par l' <i>Apis mellifera</i> .....	12
<b>Figure 8 :</b> Akènes d'artichaut .....	13
<b>Figure 9:</b> Variation de la superficie de la culture d'artichaut dans certaines régions du monde (FAOSTAT, 2012).....	13
<b>Figure 10:</b> Localisation des zones de production de l'artichaut. En vert, les quantités de production par pays (Moyenne 2000 - 2010) (FAOSTAT, 2012). .....	16
<b>Figure 11:</b> Évolution de la production de l'artichaut au Maroc (FAOSTAT, 2012).....	17
<b>Figure 12:</b> Évolution de la superficie cultivée par l'artichaut au Maroc (FAOSTAT, 2012).....	18
<b>Figure 13:</b> Rendements des cultures d'artichaut enregistrés au Maroc entre 1964 et 2010 (FAOSTAT, 2012).....	18
<b>Figure 14:</b> Quatre groupes d'artichaut classés sur la base de caractères morphologiques des capitules: A) 'Spinoso', B) 'Violetto', C) 'Romanesco', D) 'Catanese' .....	32
<b>Figure 15 :</b> Dégât du <i>Verticillium dahliae</i> sur l'artichaut : a) Flétrissement d'une plante infectée ; b) Brunissement vasculaire sur des sections transversales de la couronne d'artichaut (Amenduni <i>et al.</i> , 2005).....	34
<b>Figure 16 :</b> Dégât de la Mite de Plume d'artichaut ( <i>Platyptilia carduidactyla</i> ) sur les boutons floraux : a) Capitule d'artichaut avec des dommages sur les bractées, b) Nourriture des larves sur bractées d'artichaut, c) Larve s'alimentant sur le capitule d'artichaut, d) Adulte.....	36
<b>Figure 17 :</b> a) Champ d'artichaut entouré de barrières ; b) La mort des plantes causée par la souris du champ ( <i>Microtus savi</i> ).....	36
<b>Figure 18 :</b> Étagères de culture éclairées .....	38
<b>Figure 19 :</b> Étagère de culture éclairée par des lampes à lumière blanche. .....	58
<b>Figure 20 :</b> graines de l'artichaut ; a) variété IJ ; b) variété BR ; c) capitules des deux variétés.....	68
<b>Figure 21 :</b> Graines de l'accession Art21 désinfectées et mises en culture sur du papier whatman dans des boîtes de Pétri ; a) graines désinfectées selon le protocole 1 (totalement	

contaminées) ; b) graines désinfectées selon le protocole 2 (légèrement infectées) ; c) graines désinfectées selon le protocole 3 (pas de contamination).....	71
<b>Figure 22</b> : Graines prétraitées et mises en culture dans des boites de Pétri sur du papier whatman ; a) Graines ayant subi une incubation d'une semaine à 4 °C avant d'être transférées à 25 °C, présentant un début de germination ; b) Graines prétraitées par l'acide sulfurique présentant des graines endommagées par l'acide.....	73
<b>Figure 23</b> : Comparaison du pourcentage de germination des graines des deux accessions avec et sans téguments. (Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan (p=0,05)).....	74
<b>Figure 24</b> : Comparaison du délai de germination des graines des deux accessions avec et sans téguments. (Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan (p=0,05)). .....	74
<b>Figure 25</b> : Graines d'artichaut (accession Art21) mises en culture sur le milieu MS ; a) Germination des graines sans téguments (a <sup>1</sup> : 10 jours, a <sup>2</sup> : 15 jours) ; b) Graines avec tégument sur milieu de culture (15 jours) ; c) Début de germination d'une graine avec tégument sur milieu de culture (29 jours). ....	75
<b>Figure 26</b> : Germination d'une graine d'artichaut (accession Art22) mise en culture sur le milieu MS sans tégument (34 jours) .....	75
<b>Figure 27</b> : Comparaison des pourcentages de germination des deux accessions dans la tourbe et sur milieu de culture MS. (Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan (p=0,05)).....	76
<b>Figure 28</b> : Comparaison des délais de germination des deux accessions dans la tourbe et sur milieu de culture MS. (Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan (p=0,05)).....	76
<b>Figure 29</b> : Germination des graines d'artichaut dans la tourbe ; a) l'accession Art21 (3 jours) ; b) l'accession Art22 (5 jours).....	76
<b>Figure 30</b> : Début de germination des graines de l'artichaut traitées par l'AG <sub>3</sub> et incubées à 25 °C ; a) variété IJ ; b) variété BR.....	80
<b>Figure 31</b> : Évolution des plantules provenant de la germination des graines de l'artichaut à 25 °C ; a) variété BR non traitée par AG <sub>3</sub> (50 jours) ; b) variété IJ non traitée par AG <sub>3</sub> (50 jours) ; c) variété BR traitée par AG <sub>3</sub> (39 jours) ; d) variété IJ traitée par AG <sub>3</sub> (38 jours). .....	80
<b>Figure 32</b> : Évolution des plantules provenant de la germination des graines de l'artichaut à 18 °C âgées de 32 jours ; a) variété IJ traitée par AG <sub>3</sub> ; b) variété IJ non traitée par AG <sub>3</sub> ; c) variété BR traitée par AG <sub>3</sub> ; d) variété BR non traitée par AG <sub>3</sub> .....	81
<b>Figure 33</b> : Schéma récapitulant les différentes étapes de la culture <i>in vitro</i> de l'accession Art21 de l'artichaut. .....	102
<b>Figure 34</b> : Différentes tailles d'explants utilisées pour l'évaluation de l'effet de la taille sur la multiplication des pousses de l'artichaut. ....	103
<b>Figure 35</b> : plantule issue de la graine sur milieu d'établissement; AIB 1 mg/l ; AG <sub>3</sub> 0,1 mg/l J <sup>3</sup> =28 jours .....	107

<b>Figure 36</b> : Parties centrales décapitées de plantules issues de graines sur milieu de prolifération, ANA 0,1 mg.l <sup>-1</sup> /Kin 1 mg.l <sup>-1</sup> ; J <sup>3</sup> =7 jours .....	107
<b>Figure 37</b> : Induction des pousses axillaires de l'artichaut sur le milieu de prolifération contenant 1 mg/l de la kin et 0,1 mg/l de l'ANA, 6 semaines après la subculture (barre=1,5 cm) .....	108
<b>Figure 38</b> : (a) Pousses de la génération (G0) de l'artichaut accession Art21 développées sur le milieu de prolifération ; (b) Touffe de la génération (G1) après quatre semaines de culture de la pousse entourée en (a) utilisée comme explant pour la multiplication (barre=1 cm) .....	109
<b>Figure 39</b> : Effet de la densité des explants sur la prolifération de bourgeons axillaires chez l'artichaut.....	110
<b>Figure 40</b> : Effet de la densité des explants sur le pourcentage de survie des explants chez l'artichaut.....	110
<b>Figure 41</b> : Effet de la taille initiale des explants sur la prolifération des pousses de l'artichaut.....	111
<b>Figure 42</b> : Effet de la taille initiale des explants sur le pourcentage de survie des explants de l'artichaut.....	111
<b>Figure 43</b> : Pousses de la 8 <sup>ème</sup> génération après 5 semaines de culture sur milieu de prolifération.....	112
<b>Figure 44</b> (a, b) : pousses de la 8 <sup>ème</sup> génération après 7 semaines de culture sur milieu de multiplication avec un effet de nécrose.....	113
<b>Figure 45</b> : Pousses développées sur les milieux d'élongation en présence de la kin (0,5 mg/l), l'AIB (0,1 mg/l) et le 2iP (0,01 mg/l) ; (a) Pousses allongées sur milieu ME1 (J <sup>4</sup> =27 jours) ; (b) Pousses allongées sur milieu ME2 (J= 2 semaines).....	114
<b>Figure 46</b> : Pousses sur les différents milieux d'enracinement après 4 semaines de culture. (a) M1 : ANA 0,5 mg/l et Kin 0,05 mg/l ; (b) M2 : AIB 0,1 mg/l ; (c) M3 : ANA 2 mg/l et 2 g/l β-cyclodextrine.....	116
<b>Figure 47</b> : vitroplants d'artichaut après 6 semaines sur le milieu MS (a) et sur milieu MS modifié (b), contenant 2 mg/l de l'ANA.....	118
<b>Figure 48</b> : Enracinement sur le milieu MS modifié (Tavazza <i>et al.</i> , 2004) en présence du charbon actif ; (a) taille des racines formées ; (b) importance du système racinaire développé à la base du bocal (vue de dessous). ....	119
<b>Figure 49</b> : Pousse après un mois d'acclimatation dans la tourbe. ....	121
<b>Figure 50</b> : Schéma général du procédé de cryoconservation des apex de l'artichaut. ....	140
<b>Figure 51</b> : Certaines étapes de la cryoconservation par vitrification.....	141
<b>Figure 52</b> : Apex des deux variétés dix jours après la cryoconservation sur les différents milieux de culture.....	144
<b>Figure 53</b> : Vue sous loupe d'un apex vivant de la variété ' <i>Campagnano</i> ' dix jours après la cryoconservation (barre = 2,5 mm).....	144



---

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé .....	I
Abstract .....	II
ملخص .....	III
Remerciement.....	IV
Dédicace .....	VI
Liste des abréviations .....	VII
Liste des tableaux .....	VIII
Liste des figures.....	IX
Table des matières .....	XIII
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>

---

### **Chapitre I : Étude Bibliographique**

---

1- Origine et histoire de l'artichaut .....	4
2- Taxonomie et nomenclature.....	4
3- Biologie et écologie de l'artichaut .....	6
3-1- Biologie de la plante .....	6
3-2- Conditions écologiques.....	7
4- Description botanique .....	9
5- Répartition géographique.....	13
6- Production de l'artichaut.....	14
6-1- Production mondiale .....	14
6-2- Production de l'artichaut au Maroc .....	16
7- Aspects agronomiques .....	19
7-1- Plantation .....	19
7-2- Fertilisation.....	19
7-3- Irrigation .....	20
7-4- Gestion agricole des plantes .....	20
7-5- Importance de l'application de l'AG <sub>3</sub> .....	21
7-6- Récolte et commercialisation de produits comestibles .....	22
8- Importance économique de l'artichaut.....	22
8-1- Importance économique.....	22
8-2- Utilisation dans l'alimentation.....	24
a- Alimentation humaine .....	24
b- Alimentation pour animaux .....	25
7-3- Usage médical.....	26

---

9- Système de propagation .....	27
9-1- Méthodes conventionnelles de multiplication asexuée ou végétative.....	27
9-2- Méthodes innovantes : Culture <i>in vitro</i> .....	29
9-3- Propagation sexuée .....	30
10- Ressources génétiques d'artichaut .....	31
11- Maladies de l'artichaut.....	33
12- Culture <i>in vitro</i> .....	37
12-1- Généralité.....	37
12-2- Micropropagation de l'artichaut .....	39
12-2-1- Matériel végétal .....	40
12-2-2- Milieux de culture.....	41
12-2-3- Étapes de la culture <i>in vitro</i> de l'artichaut.....	42
12-2-4- Problèmes de la culture <i>in vitro</i> de l'artichaut.....	45
13- Cryoconservation .....	51

---

## **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

---

1- Matériel végétal .....	52
2- Milieux de culture .....	52
2-1- Compositions des milieux de culture .....	52
2-2- Préparation des solutions mères.....	55
3- Stérilisation des instruments et des solutions.....	56
4- Désinfection du matériel végétal.....	57
5- Mise en culture des explants .....	57
6 - Incubation des cultures.....	58
7- Acclimatation <i>ex vitro</i> .....	58
8- Paramètres évalués.....	59
8-1- Germination .....	59
8-2- Multiplication .....	59
8-3- Enracinement .....	59
8-4- Cryoconservation .....	59
8-5- Acclimatation.....	59
9- Analyse statistique .....	59

---

## **Chapitre III : Germination des graines d'artichaut (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.)**

---

Résumé.....	60
Introduction .....	61

---

I- Matériel et méthode .....	65
1- Désinfection des graines .....	65
2- Milieu de germination.....	66
3- Germination de l'accession Art21 et Art22.....	66
3-1- Traitements prégerminatifs (prétraitements).....	66
3-2- Germination sur milieu de culture des graines avec et sans téguments .....	67
3-3- Germination dans la tourbe et sur milieu de culture .....	67
4- Germination des variétés IJ et BR.....	68
4-1- Germination dans la tourbe avec et sans traitement par l'AG3 à deux températures différentes.....	68
4-2- Germination sur milieu de culture .....	69
5- Observations et analyses statistiques .....	69
5-1- Accession Art21 et Art22 .....	69
5-2- Variété IJ et BR .....	69
II- Résultats .....	70
1- Désinfection des graines .....	70
2- Germination de l'accession Art21 et Art22.....	71
2-1- Traitements prégerminatifs (prétraitements).....	71
2-2- Comparaison de la germination sur milieu de culture des graines avec et sans téguments.....	73
2-3- Comparaison de la germination dans la tourbe et sur milieu de culture .....	75
3- Germination des variétés IJ et BR.....	77
3-1- Pourcentage de germination.....	78
3-2- Délai de germination.....	78
3-3- Durée de germination.....	78
3-4- Taux de germination (graines/jour) .....	79
III- Discussion .....	82
Conclusion.....	92

---

## **Chapitre IV : Multiplication *in vitro* de l'artichaut (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.)**

---

Résumé .....	93
Introduction .....	94
I- Matériel et méthodes .....	99
1- Préparation des milieux de culture .....	99
2- Source d'explants et désinfection.....	100
3- Établissement de la culture.....	101
4- Induction des pousses et prolifération.....	101

---

4-1- Décapitation et amélioration du taux de multiplication .....	101
4-2- Effet de la densité d'explants sur le bourgeonnement .....	102
4-3- Effet de la taille de l'explant sur le bourgeonnement .....	102
4-4- Effet de la durée de culture sur le bourgeonnement .....	103
5- Élongation des pousses multipliées.....	103
6- Enracinement des vitroplants .....	103
6-1- Enracinement sans passage par le milieu d'élongation.....	104
6-2- Enracinement après passage par le milieu d'élongation .....	104
7- Acclimatation.....	105
8- Paramètres observés et analyse statistique.....	105
II- Résultats .....	107
1- Établissement de la culture.....	107
2- Prolifération .....	107
2-1- Décapitation et amélioration du taux de multiplication .....	107
2-2- Effet de la densité d'explants sur le bourgeonnement .....	109
2-3- Effet de la taille de l'explant sur le bourgeonnement .....	111
2-4- Effet de la durée de culture sur le bourgeonnement .....	112
3- Élongation des pousses multipliées.....	113
4- Enracinement .....	114
4-1- Enracinement sans passage par le milieu d'élongation.....	114
4-2- Enracinement après passage par le milieu d'élongation .....	116
5- Acclimatation .....	121
III- Discussion .....	122
Conclusion.....	134

---

## **Chapitre V : Cryoconservation de l'artichaut (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.)**

---

Résumé .....	135
Introduction .....	136
I- Matériel et méthodes .....	139
1- Matériel végétal.....	139
2- Méthodes.....	139
2-1- Excision des apex .....	139
2-2- Cryoconservation par vitrification .....	139
3- Estimation des taux de survie des apex après la cryoconservation .....	142
II- Résultats .....	143
III- Discussion .....	145

---

Conclusion.....	148
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>149</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>152</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>174</b>

---

## Introduction Générale

---

## **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

---

L'artichaut (*Cynara cardunculus* L. var. *Scolymus* L.) est une plante herbacée vivace, originaire de la région méditerranéenne, qui est aujourd'hui largement cultivée dans le monde entier. L'artichaut apporte une contribution importante à l'économie agricole méditerranéenne. Sa culture mondiale est principalement concentrée dans cette région, où environ 78 % de la production mondiale est cultivée (environ 93.000 ha). L'Italie est le plus grand producteur mondial avec plus de 33 % de la production totale ([FAOSTAT, 2012](#)). Du point de vue économique, le Maroc contribue à hauteur de 3,14 % à la production mondiale de l'artichaut avec une superficie de l'ordre de 3710 ha et un rendement qui avoisine les 12 T/ha.

Au début de la culture de l'artichaut, à la fois la propagation végétative et la multiplication par graine ont été utilisées. Depuis le XVIIe siècle, la multiplication végétative a été le principal moyen de propagation, ce qui entraîne des clones avec des capacités d'adaptation différentes et souvent caractérisés par une hétérogénéité. De nos jours, les cultivars d'artichaut à semences, commercialisés par des firmes de semences, sont cultivés aux États-Unis, en Israël et en France ([Pecaut, 1993](#)) et gagne de plus en plus de pays.

Les inconvénients de la propagation végétative et par graine sont nombreux. Par conséquent, la plantation du matériel de multiplication exempte d'agents pathogènes est un préalable pour maintenir des rendements élevés adéquats. L'artichaut peut se propager dans des conditions *in vitro* et ce type de propagation a été étudié et développé pour certains cultivars de *Cynara*. La micropropagation est une technique utilisée pour la production de plantules et implique la culture aseptique de petites sections de tissus et d'organes dans les récipients avec un milieu de culture défini et des conditions environnementales contrôlées. Elle est devenue un outil de plus en plus important pour les applications scientifiques et commerciales. Elle est le fondement sur lequel repose toute la recherche biotechnologique, puisque la quasi-totalité des utilisations de la biotechnologie végétale en fin de compte, exige la culture réussie des cellules de plantes, de tissus ou d'organes.

Cette technique présente de nombreux avantages par rapport à la multiplication végétative classique, par exemple la propagation d'un grand nombre de plantes exemptes d'organismes pathogènes dans un temps court avec une grande uniformité.

Le succès de la micropropagation implique plusieurs facteurs, comme la composition du milieu de culture, l'environnement de culture et le génotype. Le développement rapide des procédures de micropropagation clonale d'artichaut conduit à des applications commerciales à

l'échelle industrielle. Des techniques de culture de tissus devraient minimiser le temps nécessaire à l'introduction de nouveaux cultivars sur le marché et donc l'usage des plantes avec des caractéristiques horticoles améliorées (Bressan *et al.*, 1982).

La méthode de culture tissulaire appliquée pour résoudre les problèmes sanitaires d'artichaut a débuté en Espagne en 1974 (Pena-Iglesias et Ayuso-Gonzales, 1974) et s'est poursuivie en Tunisie, où la mise en place d'une méthode rapide et efficace de la propagation en masse et l'éradication du virus par culture de méristèmes a été rapportée (Harbaoui et Debergh, 1980). D'autres tentatives utilisant des tissus non méristématiques, tel que le réceptacle, comme explant de départ ont échoué en raison du taux élevé de contamination et le brunissement des tissus causés par les phénols (Ancora, 1986). Les résultats obtenus jusqu'à présent en micropropagation d'artichaut diffèrent beaucoup selon les cultivars employés (Cavallaro *et al.*, 2004). Les cultivars tardifs montrent un plus grand potentiel de propagation *in vitro* que les cultivars précoces (Ancora *et al.*, 1981 ; Tavazza *et al.*, 2004). L'enracinement *in vitro* et l'acclimatation de l'artichaut sont des étapes cruciales et différents protocoles pour réussir ces étapes ont été développés (Morone-Fortunato, 2007).

Pour contribuer au développement d'un protocole fiable de la multiplication *in vitro* de l'artichaut, nous avons entamé une étude de l'influence de différentes conditions culturales sur la prolifération et l'amélioration du taux de multiplication *in vitro*. Une attention particulière a été portée à la qualité des vitroplants en vue de réussir les étapes de l'enracinement et de l'acclimatation. Les principaux objectifs du présent travail étaient :

— Évaluer la capacité germinative de deux accessions et deux cultivars d'artichaut par différentes approches et établir un protocole de germination des graines d'artichaut *in vitro* et *in vivo*.

— Réussir les différentes étapes de la micropropagation chez l'artichaut (établissement, multiplication, enracinement et acclimatation) et tester les techniques et les conditions de culture *in vitro* de l'artichaut en vue d'améliorer le taux de prolifération, d'enracinement et d'acclimatation et la qualité des pousses obtenues.

Cette thèse est structurée en cinq chapitres :

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur l'espèce *Cynara cardunculus* var. *scolymus* ou artichaut, sa taxonomie, sa répartition géographique, ses propriétés, ses intérêts et les techniques utilisées dans sa propagation ainsi que les études de sa diversité. Au sein de cette partie, nous présenterons ensuite une description relativement détaillée de la technique de la culture *in vitro* et ses applications. Elle sera suivie d'une brève description de l'application de la micropropagation chez l'artichaut.

Dans la deuxième partie, une description générale du matériel utilisé et les méthodes suivies dans la totalité du travail ainsi que les outils d'analyse employés.

La troisième partie a pour objectif, d'une part, la mise au point d'une méthode de germination rapide des graines de l'artichaut à travers l'essai des meilleurs protocoles tirés de la littérature et d'autre part, l'évaluation des facteurs en relation avec une bonne germination de nos cultivars d'artichaut, afin d'optimiser les conditions de germination *in vitro* et *in vivo* des graines d'artichaut comme source d'explants sains pour l'établissement de la culture *in vitro*. Il était en effet indispensable d'avoir une idée précise sur la germination des graines *in vitro* et *in vivo* avant de pouvoir engager une étude de micropropagation.

La quatrième partie sera consacrée à l'étude de la micropropagation de l'artichaut, en particulier de l'accession Art21, à travers ses différentes étapes : initiation, multiplication, enracinement et acclimatation, dans le but d'élaborer un protocole efficace pour la multiplication à grande échelle de notre cultivar.

La cinquième partie a abordé la cryoconservation des apex de deux variétés italiennes d'artichaut : ‘*Grato*’ et ‘*Campagnano*’, technique que nous avons acquise au niveau d'un stage au laboratoire de biotechnologie au centre de recherche l'ENEA en Italie et que nous souhaitons vulgariser et diffuser à travers ce mémoire.

Enfin, nous présenterons les principales conclusions tirées de ce travail, ainsi que des perspectives tracées par la présente étude.

---

## Chapitre I

---

### Étude Bibliographique

---

## **Chapitre I : Étude Bibliographique**

---

### **1- Origine et histoire de l'artichaut**

L'artichaut appartient à la famille des Asteraceae et son origine est souvent associée aux Arabes, qui ont dominé la Méditerranée pendant le Moyen Âge et qui ont contribué au processus de domestication de son ancêtre sauvage le cardon, aussi appelé artichaut sauvage. Le cardon est largement répandu dans le centre et l'Ouest du bassin méditerranéen et il est considéré comme l'ancêtre de toutes les formes cultivées d'artichaut ([Cointry, 2001](#)).

Le nom de "artichaut" (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.) est dérivé de l'arabe "Al Kharshuf", qui signifie réceptacle avec des épines. Dans la région méditerranéenne, la plante a été connue sous le nom "Alcaciela", mot grec qui signifie artichaut sauvage. Elle s'est trouvée dans la quasi-totalité de l'Europe comme "artichaut sauvage" ou "Cardum" (cardon) ([Bianco, 1990](#)). Le cardon sauvage est une plante épineuse, originaire de la zone méditerranéenne qui a donné par des évolutions successives l'artichaut. Le nom scientifique *Cynara*, mot grec, dériverait de "cendre" pour rappeler la couleur claire des feuilles, alors que "*scolymus*" signifie en grec épineux et pointu.

Selon [Robles \(2001\)](#), le centre d'origine de l'artichaut s'étend de l'Asie Mineure à l'Afrique du Nord, faisant partie du bassin méditerranéen, y compris les îles Canaries, la mer Égée et le sud de la Turquie et la Syrie, où ont vécu les trois espèces sauvages primitives (*Cynara cardunculus*, *C. sibthopiana* et *C. Syriaca*), consommées depuis 2000 à 2500 ans avant JC. Il paraît que seules les tiges florales et les nervures des feuilles ont été consommées, parce que les inflorescences étaient très petites, épineuses et avaient un goût désagréable.

L'artichaut [*Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus* (L.) Fiori] a été décrit comme une forme cultivée d'artichaut sauvage (*Cynara cardunculus* L.) ([Grau, 1982](#)). Il ne fait aucun doute que les peuples de la Méditerranée utilisaient l'artichaut sauvage comme aliment depuis des siècles, principalement en raison de ses qualités nutritionnelles ([Bianco, 1990](#)).

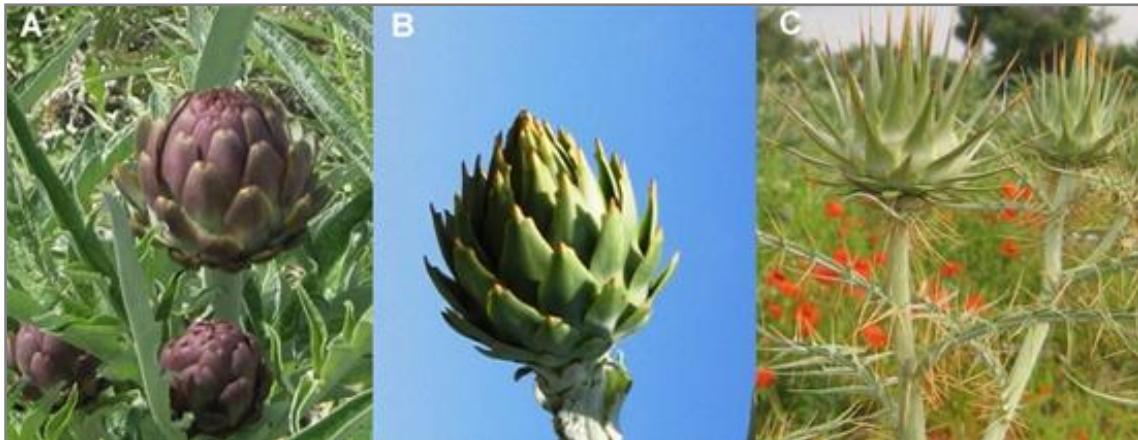
[Borrego \(1986\)](#) souligne que le grand nombre de cultivars d'artichaut dans le monde est le résultat des études effectuées au Moyen Âge en Italie, qui a la plus grande collection du matériel génétique d'artichaut dans le monde à la fois *in situ* et *ex-situ*.

### **2- Taxonomie et nomenclature**

L'artichaut [*Cynara scolymus* L. = *Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus* (L.) Fiori], angiosperme dicotylédone diploïde ( $2n=2x=34$  chromosomes), appartient à l'ordre Asterales, familles Asteraceae, sous-famille des Tubuliflorae et à la tribu de Cynareae ([Bianco, 1990](#)).

Le genre *Cynara* comprend le cardon sauvage (*Cynara cardunculus* var. *Sylvestris* (Lamk) Fiori), l'artichaut (*Cynara cardunculus* var. *Scolymus* (L.) Fiori) et le cardon cultivé (*Cynara cardunculus* var. *Altilis* DC) (**Fig. 1**) (Basnizki et Zohary 1994; Rottenberg et Zohary 1996 et 2005; Sonnante *et al.*, 2007 b ; Mauro *et al.*, 2009). Le cardon sauvage est l'ancêtre des deux sous-espèces cultivées, c'est-à-dire l'artichaut et le cardon cultivé. Toutes les trois sous-espèces forment des hybrides entièrement fertiles, bien que des études génétiques ont montré que le cardon sauvage est plus étroitement lié au cardon cultivé qu'à l'artichaut (Sonnante *et al.* 2002, 2004, 2007a). En 1753, Linné a donné le nom de *Cynara scolymus* L. à l'artichaut, mais, eu égard aux autres *Cynareae* liées, sa position taxonomique a été assez discutable. La controverse, de savoir si les trois *Cynareae* (artichaut, cardon cultivé et sauvage) doivent être classés comme des espèces différentes ou comme des sous-espèces de *C. cardunculus* L., n'a pas été résolue depuis longtemps.

Le genre *Cynara* comporte en plus, sept autres espèces sauvages : *C. syriaca* Boiss. *C. cornigera* (Lindely) (syn. *C. sibthorpiana* Boiss.), *C. algarbiensis* Cosson, *C. baetica* (Sprengel) Pau (syn. *C. alba* Boiss.), *C. humilis* L., *C. cyrenaica* et *C. tournefortii* Boiss. (Maire et Weiller) (Wiklund, 1992 ; Rottenberg et Zohary, 1996 et 2005 ; Mauro *et al.*, 2009).



**Figure 1:** Capitules de A) l'artichaut, B) le cardon cultivé et C) le cardon sauvage.

Selon Rottenberg *et al.* (1996), les barrières de reproduction séparent l'ensemble *C. cardunculus* des espèces sauvages, de telle sorte que les intersections entre *C. cardunculus* et *C. syriaca*, *C. algarbiensis*, *C. baetica* ou *C. humilis* produisent peu de graines et les hybrides sont généralement stériles. Selon Rottenberg et Zohary, (1996) et Rottenberg et Zohary (2005), ces quatre espèces sauvages de *Cynara* sont considérées comme comprenant le pool génétique secondaire sauvage (PG2) de l'artichaut cultivé et le cardon.

Les espèces sauvages sont toutes vivaces et caractérisées par de grandes feuilles épineuses et des capitules. *Cynara algarbiensis*, *C. baetica*, *C. humilis*, et *C. tournefortii* sont principalement distribuées dans la Méditerranée occidentale, tandis que *C. cornigera*, *C. cyrenaica*, et *C. syriaca* proviennent de la partie orientale de la région méditerranéenne. *Cynara cardunculus*, présent dans presque tout le bassin méditerranéen, est rapporté contenir deux sous-espèces sauvages à savoir, la subsp. *Cardunculus* et la subsp. *Flavescens* Wiklund, qui diffèrent à la fois par la répartition géographique et les caractères des bractées. La première est répartie de Chypre à la Grèce, Italie centrale et méridionale, en Sicile et en Sardaigne, tandis que la seconde se trouve dans la Péninsule Ibérique et la région Macaronésienne ([Wiklund, 1992](#)). Les différences morphologiques se réfèrent notamment à la couleur des bractées et la forme des épines, la subsp. *Cardunculus* possède des épines plus longues et plus aiguës et la subsp. *flavescens* possède une marge jaunâtre située au milieu des bractées de l'involucré.

De Candolle a suggéré pour la première fois que l'artichaut dériverait de l'espèce *C. cardunculus* L. var. *sylvestris* (Lamk) Fiori et cela en se basant sur des données morphologiques. Les études fondées à la fois sur les programmes d'hybridation et l'utilisation de marqueurs enzymatiques ont démontré que ces deux formes de *C. cardunculus* sont entièrement inter-compatibles, et donnent des hybrides inter-variétaux fertiles ([Basnizki et Zohary, 1994](#)). Le pool génique primaire sauvage (GP1) de l'artichaut cultivé est représenté par celui du cardon sauvage (*C. cardunculus* L. var *sylvestris*) ([Rottenberg et Zohary, 1996](#)), qui est également considéré comme l'ancêtre sauvage du cardon cultivé ([Bianco, 1990; Basnizki et Zohary, 1994; Rottenberg et Zohary, 1996](#)).

### **3- Biologie et écologie de l'artichaut**

#### **3-1- Biologie de la plante**

L'artichaut est une plante vivace qui a une hauteur de 90-180 cm. Au cours de chaque saison de croissance, des rejets émergent d'un rhizome permanent, à la base de la tige. Le nombre de rejets varie en fonction de l'âge de la plante, les jeunes plantes produisent un seul rejet, tandis que les vieilles plantes de 3-4 ans peuvent produire une douzaine ou plus de rejets. Chaque rejet forme un groupe (cluster) de grandes feuilles basales, au centre duquel croissent les tiges florifères. Les bourgeons comestibles sont produits à la fois à l'extrémité de ces tiges allongées et à leurs rameaux.

Normalement, un nouveau cycle de culture commence quand la plante est découpée légèrement en dessous de la surface du sol (**Fig. 2**) pour stimuler le développement de

nouveaux rejets (De Vos, 1992). Si les bourgeons ne sont pas enlevés, ils se développent en des fleurs pourpres concentrées, semblables au cardon avec des capitules de 10-15 cm de diamètre. La production est continue tout au long de l'année, mais environ 70 % de la culture sont récoltés dans une période spécifique de l'année. Les champs avec les cycles hiver-printemps produisent les rendements les plus élevés, et sont continuellement récoltés à partir de septembre à mai. La précocité des types à floraison multiple est souvent perdue à cause d'un phénomène souvent considéré comme une “dégénérescence” de la culture.



**Figure 2:** Méthode de découpage de la plante d'artichaut à la fin du cycle

### **3-2- Conditions écologiques**

La production d'artichaut nécessite des conditions climatiques appropriées. La température minimale est comprise entre 7-9 °C, tandis que la létale est inférieure à -10 °C (Bianco, 1990). Les plantes sont tolérantes à des températures élevées (> 30 °C) qui, toutefois, tendent à diminuer la qualité des capitules comestibles. Les températures de 20-22 °C de la journée et 12-14 °C la nuit représentent les valeurs optimales pour obtenir des capitules de bonne qualité et des rendements élevés pendant une période prolongée. Il s'agit donc d'une culture de saison fraîche bien adaptée à une large gamme de température de croissance. L'artichaut est une plante à jours longs avec une photopériode critique de 10,5 heures. Chez les individus provenant de semences, la transition du stade végétatif au stade reproductif dépend de l'interaction entre les trois facteurs suivants (Basnizki et Mayer 1985) : 1) l'atteinte de la plante d'une taille critique (généralement une rosette de sept à huit feuilles) par la plantule provenant de semis ; 2) les basses températures ; 3) la photopériode. Différents cultivars varient dans leurs exigences de température, normalement pour l'induction florale, ils ont besoin de 200-250 heures de températures dans une gamme de 7-10 °C (Pécaut et Foury, 1992).

La germination optimale des graines est généralement atteinte à des températures de 15-20 °C (Bianco, 1990). Une grande variation dans le taux de levée et le pourcentage de germination a été démontrée. Cependant, les caractéristiques de germination sont négativement influencées par les températures supérieures à 25 °C ; cette condition est généralement enregistrée au cours de la saison des semaines, donc une thermodormance temporaire peut être induite dans les semences (Damato et Calabrese, 2007). Certaines techniques permettent la germination rapide des graines dans des conditions environnementales défavorables, telles que l'amorçage qui est une méthode jugée efficace pour surmonter la thermodormance dans plusieurs espèces végétales (Damato et Calabrese, 2007). Un exemple est représenté par le conditionnement osmotique qui, cependant, influence négativement sur les caractéristiques de germination des graines (Damato et Calabrese, 2007).

Une large gamme de types de sols peut être mise à profit pour la production commerciale d'artichaut. Cependant, la productivité optimale a été obtenue sur des sols profonds, fertiles et bien drainés de textures loam sableux à loam argileux (Saleh, 2003), avec un pH optimum compris entre 6,4 et 7. La plante est profondément enracinée et doit être plantée sur des sols qui offrent un espace adéquat pour le développement des racines. Quand les conditions climatiques côtières et pédologiques sont satisfaisantes, la plantation peut être également faite sur les collines à faible pente. Cependant, les sols des collines nécessitent généralement plus d'engrais et une gestion prudente de l'eau d'irrigation pour être aussi productifs que ceux qui sont bien plafonnés.

L'artichaut exige des irrigations fréquentes au cours de sa période de croissance. Les besoins saisonniers en eau de l'artichaut correspondent à 4 000-5 000 m<sup>3</sup> par hectare et par an, avec des exigences plus élevées en eau au cours de la formation des capitules (Bianco, 1990). Une carence de l'humidité, pendant cette période, se traduit par une qualité inférieure des capitules. L'irrigation peut être réalisée en arrosant avec des installations fixes et mobiles. Cependant, l'utilisation de gouttes à basse pression locales tend à se généraliser, en particulier lorsque les exigences d'évapotranspiration sont élevées et les réserves d'eau sont limitées.

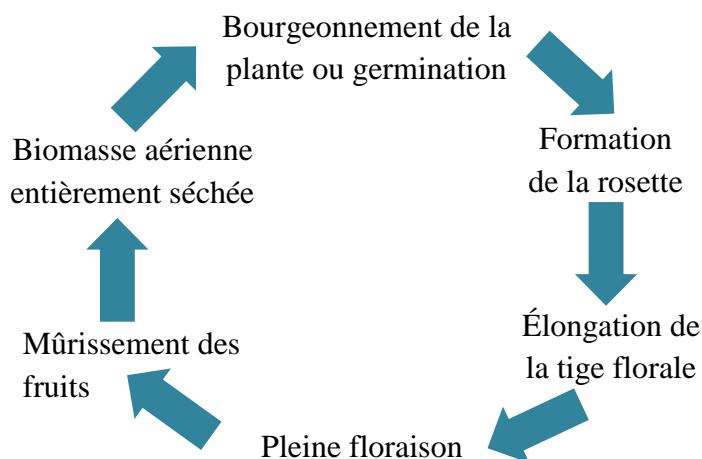
L'artichaut est sensible à la salinité et intolérant à l'engorgement prolongé, c'est pour cette raison que l'irrigation est effectuée lorsque l'humidité du sol atteint 25-30 % de la capacité du champ. Enfin, dans les climats tempérés et froids, l'irrigation est importante pour le rejeton jaillissant pour anticiper la production tandis que, dans les climats chauds, elle est nécessaire en particulier pour la levée des cultivars précoces.

Pour une croissance optimale de l'artichaut, les plantes ont besoin d'une quantité suffisante d'éléments nutritifs (Bianco, 1990). Cependant, après la récolte des capitules, la

majorité des parties végétatives de la plante peut retourner au champ comme résultat d'un recyclage des nutriments. Les besoins en éléments nutritifs supplémentaires ne sont généralement pas très élevés.

#### **4- Description botanique**

L'artichaut est une plante herbacée vivace et diploïde avec  $2n = 2x = 34$ . Il est considéré comme une plante hivernale, son cycle de développement, décrit par [Melilli et Raccuia \(2007\)](#) et [Raccuia et Melilli \(2010\)](#), est schématisé dans la figure 3 dont les principales étapes sont : germination en septembre-octobre, formation de la rosette en novembre, élongation de la tige en avril,-mai, la pleine floraison en juin, mûrissement des fruits en juillet, dessèchement de la biomasse aérienne en août ([Melilli et Raccuia, 2007](#) ; [Raccuia et Melilli, 2010](#)).



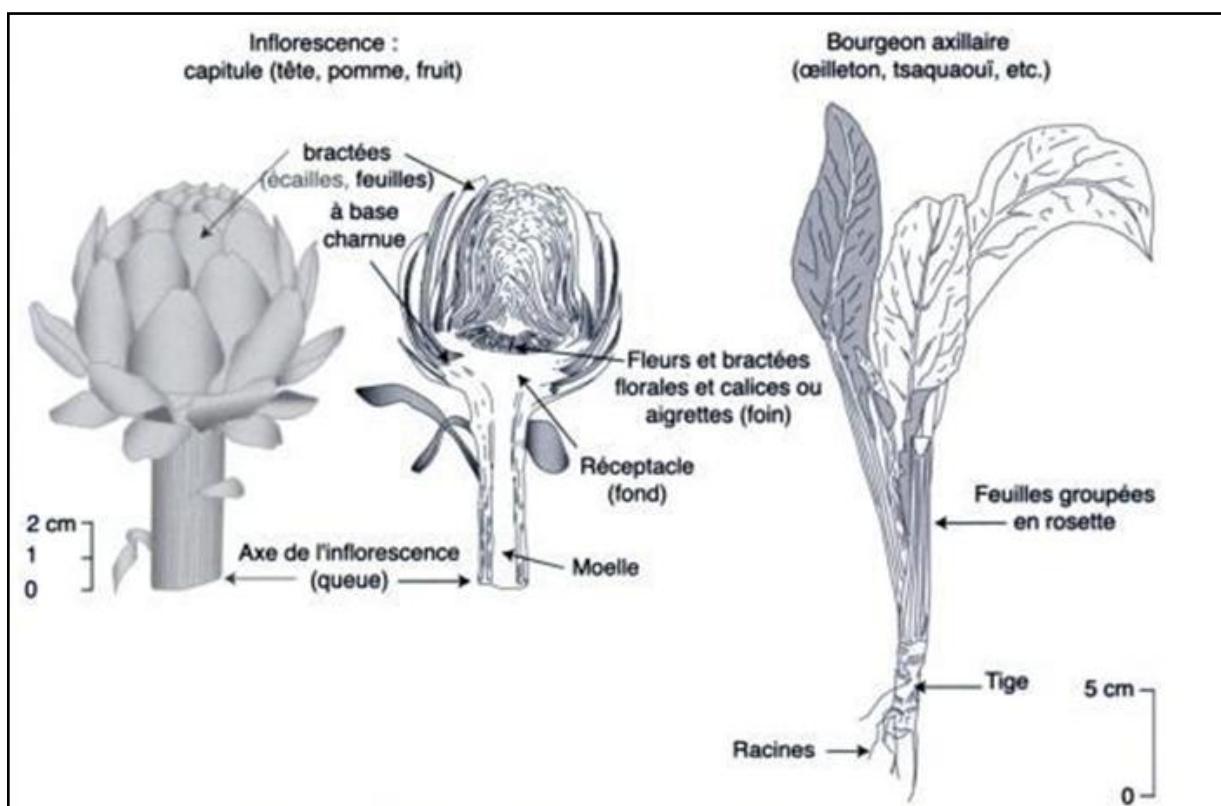
**Figure 3:** Schéma des principaux stades de croissance des plantes d'artichaut

Les plantes multipliées par semences ont une germination hypogée des graines et produisent un remarquable appareil racinaire, épais, charnu et pivotant. Au cours de la croissance végétative, la plante produit une rosette de grandes feuilles profondément lobées ou divisées, pubescentes et de couleur vert-grisâtre attachées à une tige compressée. Les feuilles diffèrent sensiblement entre les cultivars pour leur marge, la couleur, la forme, la longueur, la présence/absence d'épines. La forme des feuilles et la taille dépendent du génotype et du stade de croissance.

La base de la tige produit des bourgeons axillaires à partir desquels les rejets (drageons) peuvent croître en un nombre variable (**Fig. 4 et 5**), en fonction à la fois de la variété et son attitude envers la multiplication végétative. Chaque rejet produit des racines adventives qui sont initialement pour la plupart fibreuses et épaissies et, au cours de la première année de croissance, elles se différencient en organes de stockages charnus (rhizomes).



**Figure 4:** Base du plant d'artichaut. Notez deux nouvelles pousses basales découlant de chaque côté de la plante principale. Celles-ci donnent lieu à de nouveaux ensembles de bourgeons. (Photo : A. Bratsch 2009).



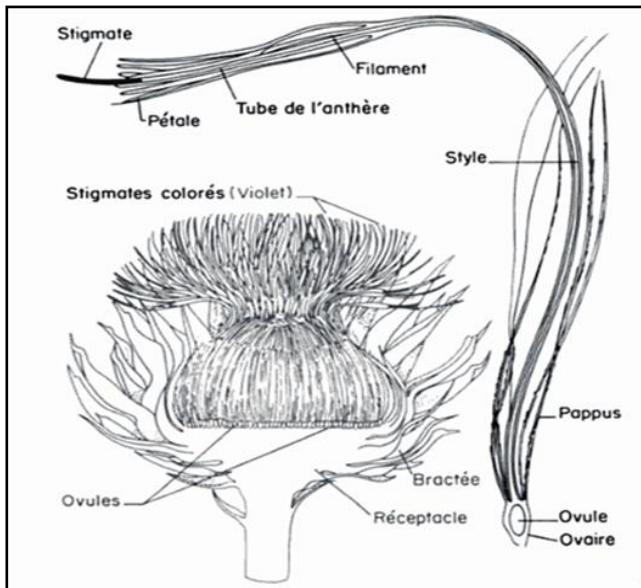
**Figure 5:** Parties consommables de l'artichaut (les termes populaires sont entre parenthèses

Après l'hiver, un bourgeon apical ou primaire apparaît au-dessus de la rosette de feuilles. Le développement d'une tige florale se fait après une période d'induction qui dépend de la température et de la photopériode pour atteindre une hauteur de plus de 1 m. La tige florale est dressée, de forme cylindrique et de couleur gris-vert. Les bourgeons secondaires, tertiaires, et d'ordre supérieur se développent sur les ramifications de tiges à partir de l'axe des feuilles de la tige principale. Cette dernière et les autres tiges de différents ordres (primaire, secondaire, tertiaire et d'ordre élevé) se terminent à l'apex avec un bourgeon floral. Le

bourgeon terminal primaire atteint la plus grande taille, celle-ci baisse séquentiellement pour les autres bourgeons floraux.

Le capitule est composé d'un pétiole et un réceptacle charnu, où plusieurs rangées de bractées sont insérées dans la partie externe, tandis que dans l'interne, plusieurs fleurons sont inclus. Une tête bien développée peut contenir environ 800-1200 fleurons. Les bractées sont épaisses et charnues dans les parties basales et progressivement plus minces dans les parties supérieures. Elles sont différentes en couleur, allant du vert au violet, et en forme (elliptiques ou allongées, plus ou moins incisées) ; généralement, elles sont plus grandes et plus fibreuses à l'extérieur, mais plus petites et plus tendres à l'intérieur ([Bianco et Calabrese, 2009](#)). Les parties tendres intérieures du réceptacle forment le “cœur” de l'artichaut (**Figure 5**). En général, l'artichaut n'a pas des épines sur les bractées.

Les fleurons sont hermaphrodites de couleur bleue ou violet-rougeâtre avec des pétales soudés à la base, qui forment une corolle tubulaire (**Figure 6**). Les fleurons périphériques de la fleur progressent de façon centripète au cours des deux ou trois jours suivant la floraison. L'androcée est composé par des anthères réunies pour former un tube à travers lequel s'étend le style. Les anthères libèrent le pollen dans le tube, et comme le style s'allonge, il pousse le pollen vers le haut hors du tube, en le mettant à la disposition d'insectes polliniseurs. Les zones stigmatiques du style sont situées sur deux branches de l'extrémité de style et ces branches se séparent après l'élongation. L'autopollinisation est évitée par la protandrie des fleurs, en fait, les surfaces stigmatiques mûrissent deux ou trois jours après la libération du pollen. L'ovaire est infère et uniovulé. Le pollen est de couleur ivoire, fortement visqueux et réuni dans de petites masses compactes. Les cultivars varient considérablement en quantité et en qualité de leur pollen. Le nectar est collecté dans le bulbe nectarifère, la sécrétion du nectar et les visites d'abeilles commencent par la déhiscence des anthères et quand le style fane ([Basnizki et Zohary, 1994](#)). Dans les conditions du champ, le pollen reste viable deux ou trois jours. Selon [Foury \(1967\)](#), les échantillons de pollen peuvent être conservés viables à 2-4 °C jusqu'à huit à dix jours.



**Figure 6:** Inflorescence en capitule de l'artichaut et détail d'une fleur

Chez l'artichaut, la pollinisation est de type entomophile. Dans le bassin méditerranéen, le principal pollinisateur est l'abeille domestique *Apis mellifera* (**Figure 7**). Cette pollinisation par les insectes garantit l'allogamie de l'espèce. Xylocopes (*Xylocopa* sp.), Osmies (*Osmia* sp.), Andrenes (*Andrena* sp), les abeilles solitaires et bourdons également visitent les fleurs d'artichauts ([Morison et al., 2000](#)).



**Figure 7:** Pollinisation de l'artichaut par l'*Apis mellifera*

Plusieurs facteurs influencent la production de semences (**Figure 8**) par capitule et la rendent considérablement variable pour chaque variété. En vertu de la pollinisation libre, la gamme observée entre les cultivars est représentée par 150-700 graines par capitule ([Bianco, 1990](#)). Le poids de 100 graines varie de 2,5 à 7,0 g. La production de graines est également influencée par les conditions climatiques durant la floraison. Les meilleurs résultats sont obtenus sous des conditions météorologiques sèches. Il y a également une nette différence entre la production des graines pour les capitules primaires, et celle des capitules secondaires et tertiaires. Dans les plantes bien développées, les capitules primaires relativement peu

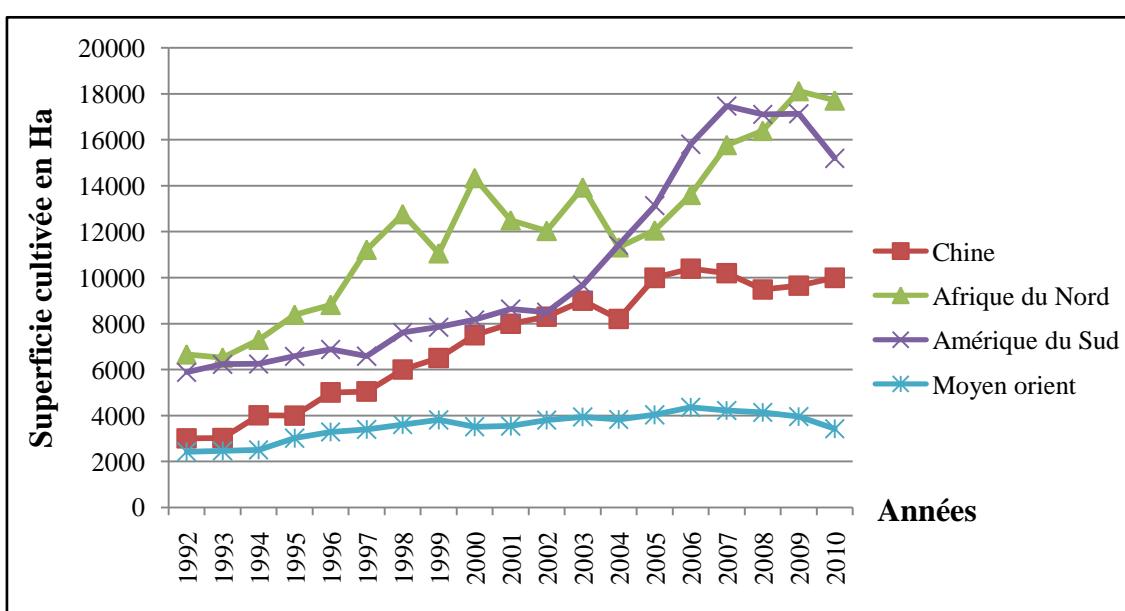
nombreux représentent souvent 50 % du rendement en graines ([Basnizki et Zohary, 1994](#)). Le fruit est représenté par un akène typique de forme elliptique et de couleur gris, marron ou noir avec un poids allant de 30 à 70 mg ([Bianco et Calabrese, 2009](#)). Les akènes ont une remarquable aigrette soyeuse qui contribue à la dispersion par le vent.



**Figure 8 :** Akènes d'artichaut

## 5- Répartition géographique

La superficie cultivée par l'artichaut dans le monde est d'environ 125000 hectares, dont environ 75 % est située dans la région méditerranéenne, et en particulier, en Italie (50321 ha), l'Espagne (13200 ha), l'Égypte (8909 ha), la France (8690 ha) et le Maroc (3710 ha). Au cours de ces dernières années, certaines régions du monde, notamment l'Amérique du Sud (le Pérou 6848 ha, le Chili (4651 ha), l'Argentine (3700 ha) et la Chine (9500 ha), ont augmenté de manière significative les zones de culture d'artichaut (**fig. 9**) et sont en train de devenir des producteurs importants d'artichaut ([FAOSTAT, 2012](#)).



**Figure 9:** Variation de la superficie de la culture d'artichaut dans certaines régions du monde ([FAOSTAT, 2012](#)).

Les principales zones de production italienne sont situées dans le sud (Pouilles 16 525 ha, Sicile 14 765 ha, Sardaigne 13 267 ha) et les régions centrales (Latium, Sardaigne, Campanie, Toscane), où l'artichaut est généralement planté à partir de juillet à septembre.

La culture de l'artichaut s'est étendue également aux États-Unis avec plus de 2900 ha. La Californie produit tout l'artichaut commercial cultivé aux États-Unis ; en particulier, dans les quatre régions de la côte centrale (Monterey, San Mateo, Santa Cruz, Santa Barbara), où le climat est particulièrement favorable pour la production d'artichaut. La région côtière centrale de la Californie représente la localisation de 84 % la superficie réservée pour la culture d'artichaut aux États-Unis. La partie restante est cultivée dans la région du Sud-Est.

Les cultures intensives d'artichaut ont débuté dans les pays sud-américains : le Pérou a maintenant plus de 6848 hectares, dont la plupart sont couvertes de plantes issues de graines, le Chili a 4651 hectares de plantes cultivées à partir des rejetons de la variété Blanca de Tudela, et l'Équateur dispose de 500 hectares de variétés propagées par semences. En Chine, toutefois, la culture de cette plante est beaucoup plus récente, elle a commencé seulement en 1993 avec de nouvelles plantations composées entièrement de plantes propagées par graines couvrant environ 1000 hectares à la région Kunming et 200 hectares dans et autour du territoire de Wuhan. L'expansion rapide de cette culture dans des domaines complètement nouveaux est due à l'utilisation de semences. Cela permet à un grand nombre de plantes d'être cultivées dans une courte période de temps, contrairement à l'utilisation des méthodes traditionnelles de multiplication végétative limitant le nombre de nouvelles plantes. Les variétés cultivées dans presque tous ces nouveaux pays sont Imperial Star, Lorca ou A-106 ([Macua, 2007](#)). Les zones choisies pour la production ont des conditions météorologiques douces et une longue saison de croissance, ceci conduit à un degré élevé de la productivité (20-30 t/ha). En ce qui concerne le bassin méditerranéen, la situation s'est améliorée dans certains pays du sud tel que l'Égypte et le Maroc, ou à une moindre mesure, la Turquie.

## **6- Production de l'artichaut**

### **6-1- Production mondiale**

La culture d'artichaut est largement distribuée dans le monde ([Fig. 10](#)). La production mondiale en 2010, estimée par la FAO, avoisine 1,45 million de tonnes ([FAOSTAT, 2012](#)) sur une superficie d'environ 125 000 hectares. 60 % des superficies mondiales en artichaut sont localisées en Europe et produisent 49 % de la production mondiale. 33 % de la production mondiale est localisée en Italie qui représente 67 % de la production européenne.

Le bassin méditerranéen produit à lui seul 78 % de la production mondiale en artichaut (**tableau 1**).

**Tableau 1:** Superficie cultivée (ha), production (tonnes) et rendement (Hg/ha) de l'artichaut dans le monde ([FAOSTAT, 2012](#)).

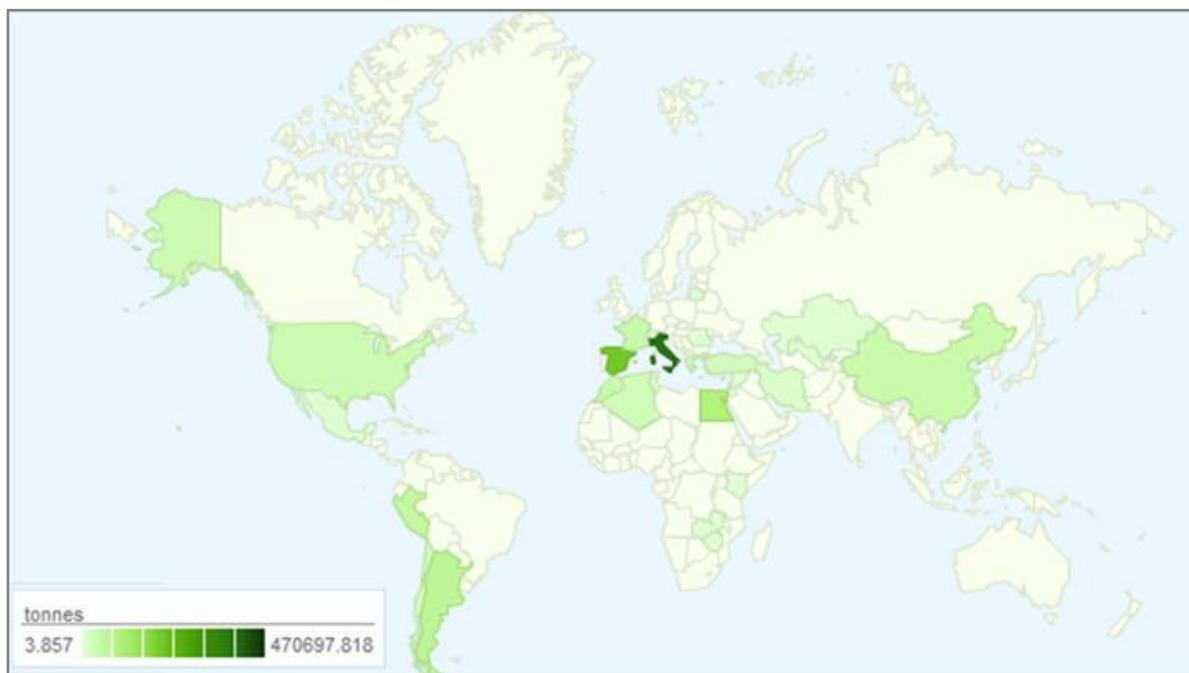
Pays	Production en tonnes	Superficie en ha	Rendement hg/ha	% de production	% superficie
<b>Monde</b>	<b>1449394,69</b>	<b>125066</b>	<b>115890,39</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Italie</b>	480112	50321	95409,87	33,12	40,23
<b>Égypte</b>	215534	8909	241928,39	14,87	7,12
<b>Espagne</b>	166700	13200	126287,88	11,50	10,55
<b>Pérou</b>	127323	6848	185927,28	8,78	5,48
<b>Argentine</b>	84800	3700	229189,19	5,85	2,96
<b>Chine</b>	70000	10000	70000	4,83	7,70
<b>Maroc</b>	45460	3710	122533,69	3,14	2,97
<b>France</b>	42153	8690	48507,48	2,91	6,95
<b>Algérie</b>	39200	2700	145185,19	2,70	2,16
<b>États-Unis d'Amérique</b>	39190	2910	134673,54	2,70	2,33
<b>Chili</b>	35000	4651	75252,63	2,41	3,72
<b>Turquie</b>	29070	2400	121125	2,01	1,92
<b>Grèce</b>	20400	2100	97142,86	1,41	1,68
<b>Tunisie</b>	19000	2400	79166,67	1,31	1,92
<b>Iran</b>	15800	870	181609,2	1,09	0,70
<b>Syrie</b>	6100	510	119607,84	0,42	0,41
<b>Chypre</b>	2760	121	228099,17	0,19	0,10
<b>Israël</b>	2637,69	330	79930	0,18	0,27
<b>Ouzbékistan</b>	2200	220	100000	0,15	0,18
<b>Mexique</b>	1626	133	122255,64	0,11	0,12
<b>Malte</b>	1566	180	87000	0,11	0,14
<b>Zambie</b>	750	0	0	0,05	0,00
<b>Liban</b>	670	60	111666,67	0,05	0,05
<b>Roumanie</b>	500	50	100000	0,03	0,04
<b>Zimbabwe</b>	270	20	135000	0,02	0,02
<b>Réunion</b>	250	-	-	0,02	-
<b>Kazakhstan</b>	200	20	100000	0,01	0,02
<b>Lituanie</b>	100	10	100000	0,01	0,01
<b>Kenya</b>	20	-	-	0,00	-
<b>Suisse</b>	3	3	10000	0,00	0,00

Dans la région méditerranéenne, l'Italie (480 112 t), l'Égypte (215 534 t) et l'Espagne (166 700 t), sont les leaders mondiaux comptabilisant près de 59 % de la production mondiale d'artichaut. Dans les dernières années, le Pérou (127 323 t), l'Argentine (84 800 t), la Chine (70 000 t) ainsi que le Maroc (45 460 t), l'Algérie (39 200 t), les États-Unis (39 190 t), le Chili

(35 000 t) et la Turquie (29 070 t) fournissent des productions élevées ([FAOSTAT, 2012](#)). La production est restée stationnaire ou a diminué dans certains pays où l'artichaut est une culture typique tandis que, dans certains pays émergents, elle a montré une tendance croissante. La Chine et certains pays d'Amérique du Sud (ex. : Pérou, l'Argentine et le Chili) confirment cette tendance.

En Italie, la majorité de la culture d'artichaut est située dans le centre et le Sud. En règle générale, dans le sud de l'Italie, l'artichaut est cultivé pendant l'automne-hiver, et récolté au début du printemps alors que, dans le centre de l'Italie, il est cultivé uniquement pour la production ne pouvant débuter qu'au printemps ([Ciancolini, 2012](#)).

La Californie produit 100 % de tous les artichauts cultivés commercialement aux États-Unis qui occupent le dixième rang mondial pour la production d'artichaut. En Californie, les variétés d'artichaut multipliées par graines comprennent l'Imperial Star et l'Emerald, tandis que la multiplication végétative est représentée par la variété Green Globe. Les États-Unis exportent l'artichaut au Canada, Japon, Mexique et en Europe.



**Figure 10:** Localisation des zones de production de l'artichaut. En vert, les quantités de production par pays (Moyenne 2000 - 2010) ([FAOSTAT, 2012](#)).

## 6-2- Production de l'artichaut au Maroc

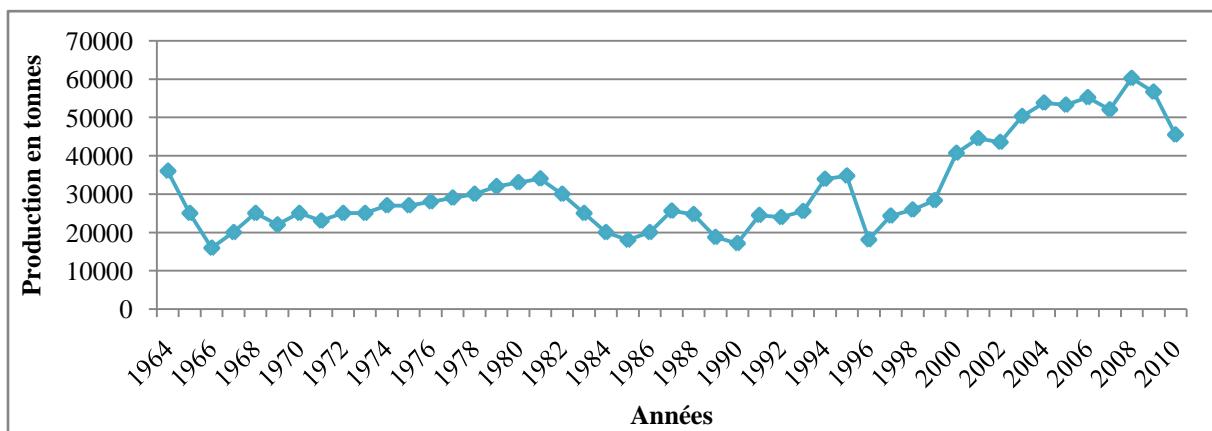
La production de l'artichaut au Maroc a dépassé les 40 000 tonnes par an cette dernière décennie (**fig. 11**). Elle se concentre principalement dans les régions suivantes : Le Gharb, la Basse Moulouya, Saïs et le Haouz. La production au niveau de la région du Gharb est répartie essentiellement sur deux provinces : Kenitra et Sidi-Kacem. Le Maroc se place au deuxième

rang des producteurs nord-africains d'artichauts, mais reste encore loin derrière l'Italie (480112 tonnes) et l'Égypte (215 534 tonnes).

Les principales variétés d'artichaut utilisées au Maroc sont :

- le Blanc hyérosis planté dans le périmètre du Gharb, c'est un cultivar précoce à cycle de production essentiellement automnal et dont 90 % de la production provient de la hampe florale. Les 10 % restants sont récoltés sur les rejets au printemps ;
- le violet d'Alger domine la production dans la région de Berkane, c'est une variété hâtive et très productive. Le capitule est de forme allongée et teinté de violet à la base des écailles ;
- l'impérial Star est une variété à forte croissance, aux feuilles vert foncé et aux larges cardes blanches. Les inflorescences se forment la deuxième année et sont récoltées encore fermées ;
- le Salanquet, qui est une variété française récemment introduite en vue d'améliorer la production printanière. C'est une variété à production tardive, résistante au froid, vigoureuse et productive. La plante produit de 8 à 10 capitules de poids moyen de 450 à 500 g pour le capitule aîné et 300 à 350 g pour les ailerons. Cette variété a été recommandée en plantation annuelle avec des densités de 6000 à 8000 plants/ha.

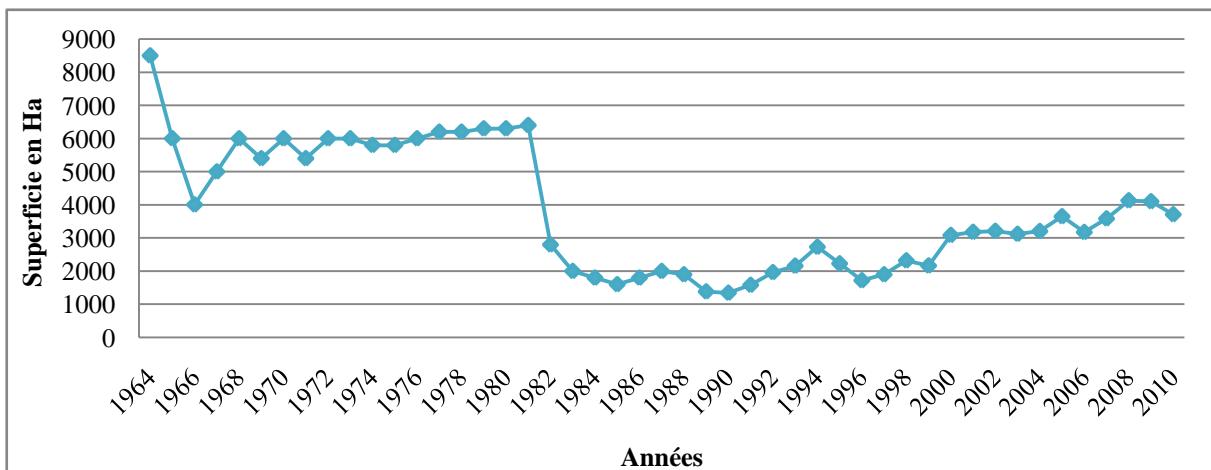
La production est généralement asexuée, sauf pour l'impérial Star qui se multiplie par graines et le nombre de graines par gramme de semence est de 20 à 25.



**Figure 11:** Évolution de la production de l'artichaut au Maroc (FAOSTAT, 2012).

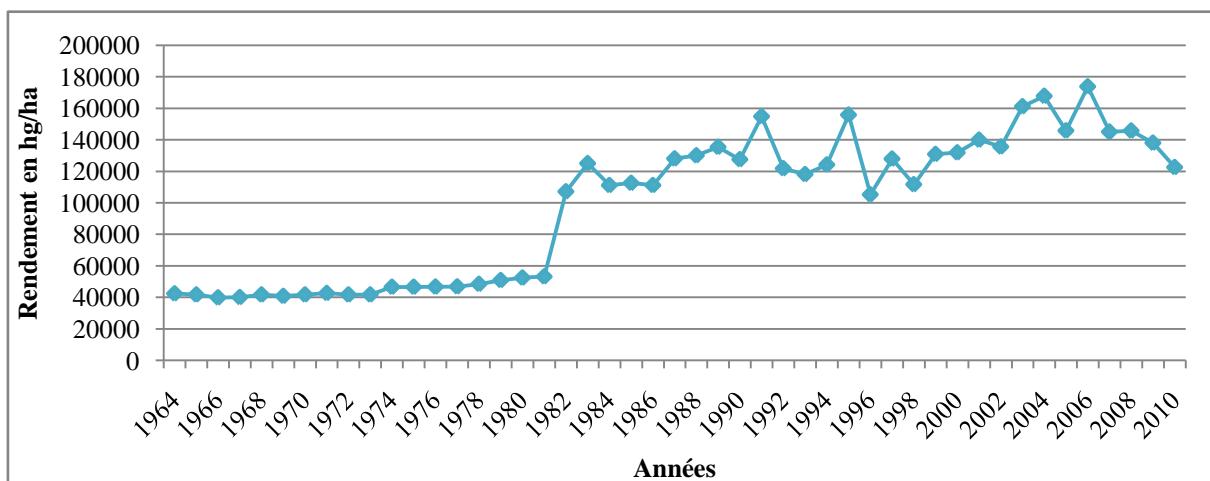
Au cours des années 60 et 70 du siècle dernier, la superficie de la culture de l'artichaut au Maroc a été entre 4000 et 6000 ha, au début des années 80 cette superficie a connu une nette chute passant de 6400 ha en 1981 à 2800 ha en 1982, ce qui a été expliqué selon le rapport de l'ORMVAM (1994) par la réduction des exportations, la baisse des prix sur le marché local et par la sécheresse qui a provoqué la dégénérescence des plants. En 2010, la

superficie destinée à cette culture au Maroc a été de 3710 ha (**fig. 12**), ce qui représente 2,97 % de la superficie et 3,14 % de la production mondiale de l'artichaut (**tableau 1**).



**Figure 12:** Évolution de la superficie cultivée par l'artichaut au Maroc ([FAOSTAT, 2012](#)).

Les rendements ont augmenté légèrement en 2006, passant de 14,5 t/ha à 17,3 t/ha. Ces dernières années, on note une réduction de ce rendement qui n'a été que de 12,2 t/ha en 2010 (**fig. 13**). D'après [Schrader et Mayberry, \(1997\)](#), le potentiel de production des cultivars cultivés au Maroc est de 25 t/ha ce qui reflète que les rendements enregistrés restent très faibles par rapport à ce potentiel. La faible maîtrise de la conduite de la fertilisation, de l'irrigation et de la protection phytosanitaire, ainsi que le manque de plants de bonne qualité lors des plantations, sont les principaux facteurs intervenant dans la baisse de productivité en hectare au Maroc ([Elattir et al., 2009](#)).



**Figure 13:** Rendements des cultures d'artichaut enregistrés au Maroc entre 1964 et 2010 ([FAOSTAT, 2012](#))

À ces problèmes de production de l'artichaut, s'ajoutent ceux de la commercialisation surtout à partir du mois de mars. Le développement du secteur de l'artichaut au Maroc est obstrué par le manque de débouchés tels que l'export, la transformation, autres que le marché local, sachant que ce dernier reçoit la majorité de la production d'artichaut en frais (Elattir et al., 2009). Les exportations en artichaut ont été de 6300 t en 2010/2011 ce qui représente 13,8 % de la production, on peut dire que les industriels l'ont quasiment abandonné face à la concurrence.

## **7- Aspects agronomiques**

### **7-1- Plantation**

Généralement, pour les génotypes à multiplication végétative et dans certains cas aussi pour ceux propagés par semence, la transplantation en plein champ se fait après un labour et un nivelingement du sol. En général, la transplantation est effectuée manuellement dans un système de culture non spécialisé et, dans des cas peu fréquents, mécaniquement pendant la saison printemps-été, en fonction du choix de la variété et les conditions climatiques, dans un système spécialisé. La densité de plantation est comprise entre 7000 et 10 000 plants par hectare, en utilisant des distances intra et inter-rangs de 0,8-1,0 m et 1 à 1,4 m, respectivement (Calabrese, 2009). Pour les génotypes reproduits par semences, le semis direct est largement utilisé, notamment dans les systèmes de culture spécialisés (ex : dans les déserts Sud de la Californie) même si, dans de nombreux cas, la transplantation est préférée en raison de la non-uniformité de la germination des graines.

### **7-2- Fertilisation**

Les besoins de l'artichaut en éléments nutritifs, au cours d'une saison de croissance, sont estimés à 286, 44, 368, 178, 157 et 28 kg/ha de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O, Ca, Na et Mg respectivement (Bianco, 1990). Les taux d'applications proposées par Tesi (1994) pour l'artichaut, en particulier les cultivars italiens, sont 100-150 kg/ha de N, 150-200 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> et 150 kg/ha de K<sub>2</sub>O, avec une application supplémentaire de l'urée (150-200 kg/ha) en hiver. Alors que Bianco (1990) a suggéré des taux d'application de 200 kg/ha de N, 150 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> et 50-150 kg/ha de K<sub>2</sub>O. Ces quantités devraient être augmentées pour les cultivars à long cycle culturel, en raison de l'utilisation accrue des éléments nutritifs par les plantes d'artichaut. En Californie, les producteurs appliquent 112-224 kg/ha de N, 56-112 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 34-112 kg/ha de K<sub>2</sub>O. Dans les champs irrigués par goutte-à-goutte, 34-56 kg/ha de N et de la moitié de la P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> et K<sub>2</sub>O sont répartis en deux bandes de 5-10 cm de distance et environ 15 cm au-dessous de la ligne de transplantation. Le reste d'engrais est appliqué en quantité

égale par semaine pendant toute la saison. L'artichaut nécessite moins d'engrais que les autres cultures de légumes pour produire des rendements supérieurs et un excès d'engrais réduit le rendement et la qualité des capitules. Les applications d'engrais doivent être faites selon les informations récentes d'analyse du sol.

### **7-3- Irrigation**

L'artichaut nécessite une irrigation fréquente au cours de la période de croissance. Selon [Bianco \(1990\)](#), le volume d'irrigation pour l'artichaut est d'environ 4000-5000 m<sup>3</sup>/ha. La productivité de l'artichaut est fortement influencée par la quantité d'eau d'irrigation, dans ce sens [Husain \(2003\)](#) a montré qu'une irrigation constante permettait d'obtenir un rendement total plus élevé qu'une irrigation variable. En générale, l'irrigation débute pendant l'été et elle est appliquée en juillet pour les génotypes précoces et en août pour les tardifs et cela pour anticiper la production des capitules dans le système de culture italienne spécialisée. Cette opération est fondamentale pour aider la croissance de la plante et obtenir de bons rendements. Pour une bonne gestion de l'irrigation, la consommation d'eau de la culture devrait être connue. Pour cette raison, certains auteurs ont calculé l'évapotranspiration de la culture d'artichaut pendant la saison de croissance. L'artichaut rentre dans la catégorie des plantes modérément tolérantes au sel, en particulier pendant la phase végétative ([François, 1995](#)). Toutefois, comme l'a observé François (1995), la croissance végétative de l'artichaut était plus tolérante au stress salin que la production de bourgeons. En effet, l'auteur et dans une étude réalisée dans la région désertique irriguée du sud de la Californie, a indiqué que la salinité jusqu'à 6,1 dS.m<sup>-1</sup> (conductivité électrique de l'extrait du sol saturé) n'affecte pas le rendement des bourgeons, mais chaque unité au-dessus de 6,1 dS.m<sup>-1</sup> baisse le rendement de 11,5 %.

### **7-4- Gestion agricole des plantes**

De nombreuses pratiques culturales sont adoptées dans la gestion agricole de l'artichaut. L'élimination des ramifications latérales est l'une de ces pratiques, c'est une opération manuelle nécessitant beaucoup de main-d'œuvre et constitue 30 % des coûts totaux de culture ([Bianco, 1990](#)). Le nombre de ramifications peut varier entre 1 et 3, selon le cultivar, l'âge des plantes et la méthode de propagation. En particulier, les génotypes précoces produisent plus de ramifications que les tardifs. Le nombre des ramifications restantes par plante (1 pour le type Romanesco et 3-4 pour les variétés à floraison multiple) dépend de la typologie d'artichaut. Cette opération réduit le nombre de capitules par plante, mais offre un avantage important pour l'optimisation de la taille du capitule.

L'enlèvement de la tige est une pratique commune pour les génotypes d'artichaut à multiplication végétative. Elle consiste à couper la partie supérieure des plantes 4 cm sous le niveau du sol à la fin de la saison de croissance lorsque la partie aérienne des plantes est complètement sèche (en juin dans le bassin méditerranéen) (Bianco, 1990). Comme résultat, l'artichaut rentre dans une dormance estivale et n'est pas productif pendant une courte période (environ 30-50 jours). Cette opération permet l'élimination des bourgeons présents sur la partie superficielle du rhizome. Ces bourgeons sont déjà différenciés et, s'ils sont laissés sur le rhizome, donneront lieu à de nombreuses ramifications, après la dormance estivale. Ces ramifications doivent être allégées pour obtenir une production satisfaisante et précoce (Bianco, 1990).

#### **7-5- Importance de l'application de l'AG<sub>3</sub>**

La production de l'artichaut peut être très rentable sur le plan commercial si les capitules sont obtenus au cours des mois d'hiver plutôt qu'au printemps. Une application correcte de l'acide gibbérellique (régulateur de croissance végétale) peut augmenter la précocité et l'uniformité du développement du capitule d'artichaut sans aucun dommage significatif pour le développement des plantes ou la réduction du rendement (Mauromicale et Ierna, 1995 ; Garcia *et al.*, 1999 ; Calabrese et Bianco, 2000). Les effets de l'application d'AG<sub>3</sub> concernaient la levée de la dormance apicale et la stimulation de la formation du capitule. Mais les chercheurs ont rapporté des résultats différents sur l'application d'AG<sub>3</sub>. Par exemple, Foury (1977) a appliqué différentes concentrations d'AG<sub>3</sub> à des mois différents. Il a indiqué que seule la première pulvérisation est d'une importance pratique, car elle a avancé la date à laquelle les bourgeons ont changé de couleur de 37 jours et le début de la récolte de 18 jours. Calabrese et Bianco (2000) ont mené une étude dans le but d'obtenir une production précoce et d'évaluer le rendement et la qualité des nouvelles variétés multipliées par semences traitées avec AG<sub>3</sub>. Ils ont rapporté, sur une moyenne de dix-neuf récoltes effectuées chaque année entre les mois d'octobre et de mai, que le poids moyen des bourgeons primaires a atteint 150 g chez tous les cultivars qu'ils ont utilisés. Pour la production annuelle, un traitement comprenant 2 à 3 pulvérisations foliaires, par le régulateur de croissance, devrait être appliqué à intervalle de deux semaines. Pour les productions pérennes, les traitements à l'acide gibbérellique sont pulvérisés sur les plants 6 semaines avant la première récolte attendue.

Les effets des traitements avec AG<sub>3</sub> sur le temps de la récolte et la qualité du rendement des plantes reproduites par semences ont été soigneusement étudiés (Esteva *et al.*, 2004 ; Paradiso *et al.*, 2007 ; Miguel *et al.*, 2004, Schrader 2005 ; Maroto, 2007). En fait, tous les cultivars propagés par semences produisent, sans aucun traitement avec l'AG<sub>3</sub>, à la fin de

l'hiver et au printemps en fonction de la date de transplantation (été ou au début de l'automne) ([Basnizki et Goldshmidt, 1994](#)).

#### **7-6- Récolte et commercialisation de produits comestibles**

Compte tenu de toutes les typologies, la production de capitules peut survenir tout le long de l'année, rendant ainsi l'artichaut bien adapté aux conditions climatiques et les besoins du marché. En fonction de ces besoins, les capitules doivent être récoltés, avec environ 10 cm de la tige, lorsque les fleurons primordiaux sont rudimentaires, et les capitules sont frais, compacts, propres et exempts de défauts tels que des rayures, des ecchymoses et les bractées cassées. Toutefois, les capitules produits par la plante ne sont pas récoltés et commercialisables en totalité ; les petits capitules sont souvent utilisés en transformation. La commercialisation des capitules d'artichaut se fait selon les normes qui les classent en trois catégories (extra, première et deuxième catégorie commerciale) sur la base des caractères morphologiques et les normes de qualité (ex. : calibre, homogénéité, etc.). Le développement séquentiel de capitules dans chaque plante rend la récolte mécanique de l'artichaut impossible. Cela pourrait être permis dans les plantations issues de graines. En général, la température peut fortement influencer la fréquence de récolte.

Pour conserver toutes ses qualités, les capitules doivent être manipulés soigneusement durant les opérations de récolte, d'emballage et de refroidissement. Après la récolte, les capitules doivent être rapidement stockés à 0 °C et 90-95 % de H.R. (le potentiel de stockage de l'artichaut est généralement inférieur à 21 jours) et examinés visuellement pour retirer ceux avec des blessures d'insectes, dégâts mécaniques, ou des défauts esthétiques. Les capitules commercialisables, classés en fonction de leur taille, doivent être emballés à la main dans des boites en carton ondulé enduites de cire. L'emballage doit respecter les normes d'hygiène et l'étiquetage avec des informations sur l'origine de la culture ([Piazza et Caccioni, 2009](#)). Les capitules doivent être conservés à 4 °C lors du transport à travers les circuits de distribution. Ils ont une faible sensibilité à l'éthylène exogène. Ce dernier n'est pas considéré comme un facteur important dans la manutention après la récolte et la distribution.

### **8- Importance économique de l'artichaut**

#### **8-1- Importance économique**

L'artichaut présente certains avantages dus à sa valeur économique et à la stabilité de revenu qu'il génère. L'importance économique de l'artichaut est justifiée par ses utilisations différentes, comme dans l'alimentation humaine, en forme fraîche ou industrialisée (conserve, congelé, liqueur et crèmes), dans l'industrie pharmaceutique et dans la coagulation du lait

(fleur de l'artichaut sauvage). Il présente, tout de même, une forme potentielle d'utilisation comme fourrage (l'extrait frais, ensilage, farine déshydratée et alimentation), la biomasse pour la production d'énergie, la fibre pour la cellulose (tige de l'artichaut), la graine pour la production d'huiles et de protéines, extraction de l'inuline et de fructose, et comme plante ornementale.

*Cynara cardunculus* spp. a été également considéré comme une culture dont la biomasse est importante notamment pour des fins énergétiques (Foti *et al.*, 1999 ; Fernández *et al.*, 2006 ; Angelini *et al.*, 2009 ; Mantineo *et al.*, 2009 ; Ierna et Mauromicale, 2010 ; Ierna *et al.*, 2012). Son application en tant que biocarburant solide a été étudiée par plusieurs auteurs dans le cadre de projets européens (Foti *et al.*, 1999 ; Piscioneri *et al.*, 2000 ; Curt *et al.*, 2002 ; Angelini *et al.*, 2009) principalement pour la production de chaleur ou d'énergie. La valeur calorifique de la biomasse lignocellulosique aérienne de *Cynara* est très intéressante et peut aller de 4083 à 3795 kcal kg<sup>-1</sup> MS selon Fernández *et al.* (2006) et de 15 MJ kg<sup>-1</sup> selon Angelini *et al.* (2009).

Les différentes technologies de transformation, telles que la combustion, la pyrolyse et la gazéification ont été étudiées pour l'exploitation de la biomasse (Encinar *et al.*, 2001 ; Gonzàles *et al.*, 2004 ; Damartzis *et al.*, 2011). La production moyenne de biomasse est de 20 t/ha par an. Son maximum peut atteindre 30 à 35 t/ha par an. La répartition de cette matière est d'environ 40 % des tiges, 25 % des feuilles et 35 % des capitules (Fernandez, 1992 ; Dalianis *et al.*, 1996). Les principaux avantages de l'utilisation de *Cynara* spp. comme culture énergétique sont liés à la productivité élevée de biomasse ; à la faible teneur en humidité et au pouvoir calorifique élevé. Il est important de prendre en compte que la biomasse et le rendement énergétique, comme rapporté par Ierna *et al.* (2012), est fortement affectée par le génotype, la gestion agricole et les conditions environnementales.

De plus, le potentiel de *Cynara* spp. comme culture de biomasse pour la production de pâte à papier a été largement étudié par plusieurs auteurs (Anthunes *et al.*, 2000 ; Gominho *et al.*, 2001 ; Fernández *et al.*, 2006 ; Gominho *et al.*, 2009), en particulier, Gominho *et al.* (2001) ont évalué l'anatomie et la composition chimique des tiges de la plante et trouvé des propriétés de résistance intéressantes notamment en matière de résistance à la traction. Le rendement de tige en pâte est de 46 % avec une faible teneur en lignine résiduelle (Gominho et Pereira, 2006). Aussi, l'utilisation de poils et Pappi de capitules comme nouvelle matière première pour produire du papier a été étudié (Gominho *et al.*, 2009).

L'intérêt pour cette culture a augmenté ces dernières années aussi pour l'extraction de l'inuline principalement à partir des racines (Raccuia et Melilli, 2004, 2010). En effet, dans la

famille des Asteraceae, la réserve de glucides est représentée par l'inuline qui est un polysaccharide linéaire ([Raccuia et Melilli, 2004, 2010](#)). L'inuline est stockée dans les organes de réserve (c.-à-d. rhizome et racines pivotantes) et elle est décomposée pendant la phase de dormance estivale, avant la croissance de la plante.

L'inuline couvre également les demandes de floraison et la maturation des graines. L'accumulation de ce polysaccharide est renforcée par l'augmentation des conditions de la photosynthèse (longue photopériode) ([Raccuia et Melilli, 2010](#)). L'inuline de *Cynara* spp. est caractérisée par un haut degré de polymérisation ([Ronkart et al., 2007 ; Hellwege et al., 2000](#)). La composition d'inuline et le rendement dépendent du génotype, de la date de récolte, les conditions environnementales et les processus d'extraction. L'intérêt croissant dans la culture de *Cynara* spp. pour l'extraction de l'inuline est principalement dû à la grande disponibilité de la matière première (racines) et les rendements d'inuline. En ce qui concerne le rendement, [Raccuia et Melilli \(2004\)](#), ont enregistré un rendement moyen de 9,8 t/ha MS dans les racines, avec un rendement moyen de l'inuline de 3 t/ha.

L'inuline a également été reconnue comme un ingrédient alimentaire bénéfique. En effet, l'industrie alimentaire a augmenté au cours des dernières décennies, l'utilisation de ce polysaccharide comme ingrédient nutritionnel, et en particulier comme substituant de la matière grasse et comme agent prébiotique. L'inuline est également utilisée dans le yaourt et les préparations de glaces. En effet, elle forme un gel, quand elle est émulsionnée avec de l'eau qui est similaire à la texture de grasse, mais avec beaucoup moins de calories ([Raccuia et Melilli, 2004](#)).

En outre, l'utilisation de la culture comme espèces ornementales a été également proposée par certains auteurs ([Lanteri et al., 2012 ; Ciancolini et al., 2012](#)).

## **8-2- Utilisation dans l'alimentation**

### **a- Alimentation humaine**

Depuis les temps anciens, l'artichaut a été utilisé pour ses inflorescences immatures (capitules) qui peuvent être vendus entiers pour la consommation en frais ([Garcia et al., 2005](#)) ou pour la transformation industrielle. Dans la consommation en frais, la partie comestible est les bractées charnues du réceptacle floral. Pour la production des aliments transformés, les capitules encore fermés sont utilisés pour la préparation de conserves. En particulier, les pétioles des feuilles charnues des plantes jeunes, au stade végétatif, sont utilisés dans l'alimentation humaine dans les pays méditerranéens ([Fernández et al., 2006](#)). En Italie, l'artichaut est également utilisé dans la fabrication d'une liqueur, populaire et très amère.

Selon [Bianco \(1990\)](#), l'utilisation dans l'alimentation humaine est justifiée par la présence de bonnes caractéristiques organoleptiques, la haute valeur nutritive et la teneur en substances fonctionnelles.

Selon [Robles \(2001\)](#), l'artichaut présente une quantité modérée de vitamines et de minéraux, une faible quantité de protéines et de lipides, une valeur modérée en glucides et une teneur élevée en eau. Dans 100 g de la partie comestible, on trouve 86,5 % d'eau, 2,8 g de protéines, 0,2 g de lipides, 9,9 g de glucides, 1,8 g de cendres, 3,4 g de fibres, 0 g de cholestérol, 51 mg de calcium, 69 mg de phosphore, 1,1 mg de fer, 30 mg de sodium, 310 mg de potassium, 10 mg de magnésium, 150 mg de vitamine A, 8 mg de vitamine C, 0,07 mg de vitamine B, 0,04 mg de vitamine B2, 0,85 mg de vitamine B3, 42,10 mg de lutéoline, 837,01 mg d'acide 1,5-O-dicaféylquinique et 1 544,91 mg d'acide 5-O-caféylquinique.

[Maccarone et al. \(1999\)](#) ont étudié les possibilités d'utilisation de l'huile extraite des génotypes de *Cynara* (Artichaut cultivé, cardon cultivé et sauvage). Ils ont constaté que les espèces les plus prometteuses en qualité et quantité d'huile étaient les cardons, en particulier les génotypes sauvages. Les triglycérides sont les constituants dominants, avec une quantité très faible de phospholipides et des glycolipides. La répartition des phytostérols est typique de l'huile des Asteraceae. En fait, la teneur élevée en acides oléique et linoléique et la faible quantité d'acides gras libres et saturés et peroxydes assurent une bonne qualité alimentaire. Le grand contenu en  $\alpha$ -tocophérol offre une garantie de la stabilité contre l'oxydation.

Depuis les temps anciens, les fleurs de *Cynara* ont été traditionnellement utilisées comme préserve naturelle pour la production de fromage de brebis typique d'une certaine région du Portugal et d'Espagne ([Veríssimo et al., 1995](#)). En particulier, ces propriétés coagulantes sont liées à la composition d'enzyme et la spécificité protéolytique des protéases cardosine A et cardosine B ([Vieira et Barbosa, 1972](#)). En fait, ces enzymes sont similaires, en matière de spécificité et d'activité, à la chymosine et à la pepsine ([Veríssimo et al., 1995](#) ; [Ordiales et al., 2012](#)).

#### **b- Alimentation pour animaux**

La possibilité d'utiliser la biomasse de *Cynara* spp. comme fourrage vert pour l'alimentation des ruminants en hiver a été proposée par [Fernández et al. \(2005\)](#) avec un rendement de 6,5 t de MS/ha. Aussi, l'utilisation de la graine pour l'alimentation des ruminants a été évaluée par [Cajarville et al. \(2000\)](#). Les résultats obtenus dans la littérature ont montré une réelle possibilité d'utiliser cette culture pour l'alimentation des ruminants.

Après une analyse des études antérieures sur la valeur nutritive des feuilles et des bractées de l'artichaut (*Cynara scolymus*), il est suggéré que, malgré des teneurs relativement

faibles d'acides aminés, les bractées d'artichaut peuvent être utilisées en tant que composant de l'alimentation des bovins laitiers et de boucherie. Dans les régimes alimentaires des bovins, les bractées d'artichaut ont une valeur nutritive comparable à celle de l'ensilage de maïs (Galvano et Scerra, 1983). D'autre part, les feuilles, les déchets de l'industrie de transformation de l'artichaut sont utilisés pour l'alimentation du bétail (Pécaut, 1992).

L'importance des feuilles d'artichaut dans l'alimentation des animaux a été également étudiée chez les poussins (Bonomi et al., 1998 ; Stoev, 1998), les lapins (Bonomi, 1999) et les canards (Bonomi et al., 1999) et une amélioration nette du poids a été remarquée en utilisant la farine de feuilles d'artichaut déshydratées dans l'alimentation.

### **7-3- Usage médical**

L'espèce est essentiellement cultivée pour couvrir les besoins pharmaceutiques, il a été utilisé en médecine traditionnelle pour ses effets thérapeutiques reconnus (hépatoprotecteur, anticarcinogène, cholérétique, antioxydant, antibactérien, diurétique, hypcholestérolémiant, hypoglycémiant) (Gebhardt, 1997 ; Kraft, 1997 ; Clifford, 2000 ; Saénz Rodriguez et al., 2002 ; Coinu et al., 2007 ; Rondanelli et al., 2011 ; Fantini et al., 2011). Ces dernières années, l'intérêt pour les antioxydants naturels pour la nourriture ou les applications pharmaceutiques est en hausse aux dépens de l'utilisation des antioxydants synthétiques (Llorach et al., 2002 ; Falleh et al., 2008).

Aujourd'hui, les extraits secs de *Cynara* spp. sont déjà commercialisés en tant que médicaments, principalement pour le traitement des maladies cholérétiques et du foie (Lattanzio et al., 2009). Plusieurs études, à la fois *in vivo* et *in vitro*, ont été menées pour démontrer les effets favorables pour la santé des extraits de l'artichaut. En particulier, les extraits de feuilles sont bénéfiques pour diminuer les taux de cholestérol avec une réduction de sa synthèse dans le foie et une diminution de l'accumulation de graisses dans les autres tissus (Kraft, 1997). Également, des propriétés hépatoprotectrice et cholérétique ont été démontrées pour les extraits d'artichauts (Adzet et al., 1987). Ces propriétés favorables à la santé sont principalement liées à la forte teneur en composés polyphénoliques, qui comprend les acides mono et dicaféoylquiniques et les flavonoïdes (Wang et al., 2003 ; Fratianni et al., 2007 ; Lattanzio et al., 2009 ; Lombardo et al., 2010 ; Menin et al., 2010 ; Pandino et al., 2010, 2011a, 2011 b, 2011c, 2012). Dans les dérivés caféiques, l'acide chlorogénique (acide 3-O-caféoylquinique) est l'élément le plus abondant et représente environ 39 % du contenu total des dérivés de l'acide caféoylquinique (Lattanzio et al., 2009). Les autres grands dérivés de l'acide caféoylquiniques, trouvés dans les extraits de feuilles et dans le capitule de l'artichaut, sont représentés par l'acide 1,5-O-dicaféoylquinique, l'acide 3,4-O-

dicaféoylquinique et la cynarine ou l'acide 1,3-O-dicaféoylquinique, ces acides représentent respectivement 21 %, 11 % et 1,5 % du total des acides caféoylquiniques (Lattanzio *et al.*, 1994, 2009). Cependant, il est important de noter que, dans les tissus végétaux, la teneur en composés phénoliques est fortement liée aux stades physiologiques, au génotype, aux organes parties de plantes, aux conditions environnementales, à la gestion agricole et aux conditions de postrécolte (Lattanzio et Morone, 1979 ; Fratianni *et al.*, 2007 ; Lattanzio *et al.*, 2009 ; Lombardo *et al.*, 2010 ; Negro *et al.*, 2011 ; Pandino *et al.*, 2011a, 2011 b, 2011c, 2012).

## **9- Système de propagation**

En dehors de la nécessité de produire de nouveaux clones améliorés, l'un des problèmes non encore totalement résolus est celui de la production de matériel génétique qui se prête bien à la multiplication.

En fait, étant donné que la multiplication par graines est un objectif qui reste à atteindre, la multiplication végétative associée à la nécessité de rajeunir l'artichaut au bout de 4-5 ans après l'implantation, pose le problème de la production de matériel de multiplication qualifié (exempts de pathogènes) et éventuellement de faible coût.

### **9-1- Méthodes conventionnelles de multiplication asexuée ou végétative**

La multiplication végétative est la méthode la plus commune pour l'artichaut (De Vos, 1992). Selon Morison *et al.* (2000), l'artichaut est actuellement multiplié principalement par voie végétative via ‘ovolo’ (pousses souterraines dormantes), rejetons ou drageons, éclat de souches ou les pousses séchées. Pour obtenir une haute performance productive, le renouvellement des plantations d'artichaut est souhaitable tous les deux à trois ans, pour faire suite à la perte de la vigueur des plantes et à l'engorgement de la zone racinaire après un certain nombre d'années de croissance et de régénération (Ciancolini, 2012). Selon Mauromicale, (1984), les plantes d'artichaut destinées à la production des capitules sont elles-mêmes la source du matériel de propagation végétative (ovolo et rejetons) ; le potentiel de multiplication des plantes d'artichaut, dans ce cas, se trouve considérablement réduit.

Les agriculteurs utilisent souvent les rejetons dans le système de propagation asexuée de l'artichaut. Les ramifications proviennent de bourgeons souterrains présents sur le rhizome des plantes et régénèrent de nouvelles plantes capables de s'enraciner, sachant que le pourcentage d'enracinement dépend du matériel d'origine (Calabrese, 2009). Les pousses, présentant environ quatre feuilles et un système racinaire bien développé, sont qualifiées comme de bonne qualité pour ce genre de propagation (Bianco, 1990 ; Elia et Miccolis, 1996). L'utilisation de ce système de propagation est largement répandue à partir de l'automne

jusqu'au printemps. Si la transplantation est faite en automne, les plantes commenceront à produire seulement pendant la deuxième année (Bianco, 1990). Afin d'améliorer le rendement des plantes, Eser *et al.* (2005) ont vérifié les effets de décapitation des pousses enracinées avant la plantation afin d'augmenter le rendement total. Ils ont noté que le nombre de pousses sur les plantes augmente avec la décapitation. Ils ont également constaté que le rendement total a augmenté avec la décapitation, bien qu'il n'ait pas d'incidence sur le rendement précoce. En général, la technique des rejetons n'est pas très spécialisée et présente un pourcentage élevé de pertes de plantes.

Les ‘ovolo’ sont des branches dormantes insérées sur le rhizome et qui n'ont pas achevé le développement en raison des températures élevées et des déficits d'eau, ils ont un bourgeon terminal et plusieurs bourgeons latéraux. Ils présentent un autre système de propagation asexuée pour l'artichaut (Bianco, 1990). Généralement de forme cylindrique, les ‘ovolo’ peuvent atteindre 13-14 cm de hauteur et de 1,0 à 3,5 cm de diamètre. Une plante peut produire plus de 20 ‘ovolo’, mais ils ne sont pas tous adéquats. L'élimination du bourgeon apical augmente la production des ‘ovolo’ et leur taille. Les ovolos sont collectés à partir des plantes mères en repos entre la fin de juillet et mi-août (Miccolis, 1996), après avoir passé une période de repos assez longue (environ deux mois). Ils sont placés dans des couches de paille pour la pré-germination dans des conditions chaudes et humides, permettant ainsi le développement du système racinaire. Après une semaine, ils deviennent prêts à être transplantés en plein champ (Bianco, 1990). Le développement des plantes à partir de ‘ovolo’, en plus d'être influencé par l'environnement de la culture, dépend aussi du degré d'évolution atteint par ‘ovolo’ sur la plante mère (Rey Muñoz, 2005). Il est à noter, enfin, que les ‘ovolo’ sont prélevés de l'artichaut de l'année en choisissant des plantes saines, précoces, productives et le plus possible, morphologiquement uniformes.

Un système de propagation asexuée non spécialisé utilisé dans certaines régions de cultures traditionnelles d'artichaut implique l'utilisation des souches. Les souches sont collectées à la fin du cycle de production, puis elles sont divisées en petites portions appelées *zampe* en langue italienne. Chaque partie des souches présente des racines et dispose d'un certain nombre de bourgeons qui régénèrent de nouvelles plantes. Cette méthode d'implantation est toutefois utilisée dans de petites parcelles, en particulier dans les régions froides, où les ‘zampe’ sont laissés sur le terrain pendant l'hiver et transplantés en avril (Tesi, 1994). Cette technique donne des plantes hétérogènes caractérisées par une production tardive des capitules avec beaucoup de problèmes phytosanitaires (Bianco, 1990).

Les systèmes de multiplication végétative ne sont pas très spécialisés et présentent de nombreux problèmes phytosanitaires. En outre, cette multiplication utilisant des techniques traditionnelles, présente plusieurs inconvénients tels que le faible taux de multiplication, le pourcentage élevé de pertes de plantes, le coût de main-d'œuvre élevé et la plantation tardive (Ancora *et al.*, 1981). L'efficacité de cette procédure est très limitée et constitue un obstacle sérieux au développement de l'artichaut comme une culture moderne. En 2004, Mauromicale *et al.*, ont développé une procédure de pépinière pour la production de plantules d'artichaut ; le planning est composé de trois phases : 1) l'obtention des rejetons du même âge de la plante mère, élevés dans la pépinière, en enlevant l'apex et la partie épicéa de la plante ; 2) la préparation des rejetons pour la transplantation ; 3) transplantation des rejetons et production des plantules en pépinière. Cette technique, augmente le pourcentage de plantules des rejetons transplantés, réduit le temps de la production de plantules, permet d'obtenir des plantules pendant toute l'année rendant ainsi le calendrier cultural plus souple (période de la plantation).

## **9-2- Méthodes innovantes : Culture *in vitro***

La propagation *in vitro*, et malgré les coûts élevés qu'elle engendre a résolu de nombreux problèmes de maladies associées à la propagation végétative traditionnelle chez de nombreuses espèces. Le développement des techniques de cette méthode a conduit De Leo et Greco à essayer de mettre au point, en 1973, un protocole de culture *in vitro* pour l'artichaut, basé sur la prolifération des bourgeons de méristèmes apicaux. De Leo et Gréco en 1976, puis dans les années 1980, Ancora *et al.* (1981), Ancora, (1986) et Pécaut *et al.* (1983), ont développé les premières techniques de multiplication *in vitro* pour l'artichaut avec des résultats satisfaisants. Les explants utilisés pour la micropropagation de l'artichaut étaient les segments de racines (De Leo et Greco, 1976), les graines (Benoit et Ducreux, 1981) et les apex des pousses (Ancora *et al.*, 1981). En général, la multiplication *in vitro* de l'artichaut a résolu les principaux problèmes phytopathologiques causés par des champignons et des bactéries et a permis la réduction du coût du travail et la simplification de la gestion culturelle (Saccardo et Ancora, 1985). La production de plants indemnes de virus en utilisant la micropropagation semble être liée à la dimension primaire de l'apex qui ne doit pas dépasser 0,8 mm de diamètre (Bianco, 1990). En Italie, Ancora *et al.* (1981), Ancora, (1986) et Morone-Fortunato *et al.* (2005) ont développé la technique de propagation *in vitro* pour l'artichaut Romanesco et les typologies précoces. Une technique de multiplication végétative, en conservant les avantages de la multiplication *in vitro* (des plantes indemnes de maladies, l'uniformité des plantes) et la réduction des coûts pour les producteurs de plantes, a été développée par Cardarelli *et al.* (2005a et b). Cette technique consiste à utiliser des plantes

micropropagées exemptes d'agents pathogènes, cultivées en pots sous serre, en tant que plantes mères pour obtenir des ramifications pour les transplantations en plein champ. Afin de promouvoir la production de ramification, les plantes mères sont périodiquement soumises à un traitement chimique avec un régulateur de croissance, la 6-benzylamino purine (BAP) et une opération de réduction de la taille au niveau du collet. Les rejetons ainsi obtenus, sont stockés à froid après la récolte (3 récoltes par an) et, au printemps, sont cultivés dans des plateaux multi-composants, dans des conditions d'humidité élevée pour l'enracinement et la transplantation en été.

### **9-3- Propagation sexuée**

Une amélioration considérable en termes de quantité et de qualité de la production pourrait être atteinte par la propagation par graines. Dans les dernières années, la propagation de l'artichaut par graines (akènes) a été examinée pour surmonter les problèmes mentionnés ci-dessus liés à la propagation asexuée. Le développement de cultivars reproduits par semences représente un objectif important dans le programme de reproduction de l'artichaut ([Bernal et al., 2005](#)) et dans la modernisation de sa culture ([Lo Bianco et al., 2012](#)). Les cultivars reproduits par graines deviennent populaires dans certains pays comme Israël, les États-Unis et l'Espagne, mais peu d'entre eux ont une uniformité commercialement acceptable ([Lanteri et al., 2001, 2006](#)). Les cultivars multipliés par semences présentent les avantages majeurs suivants ([Basnizki et Zohary, 1994](#)) :

- La possibilité d'introduire la culture d'artichaut dans de nouveaux domaines ;
- La réduction des coûts de main-d'œuvre et de la gestion agricole ;
- La plus grande flexibilité du cycle de cultures et la possibilité d'inclure l'artichaut dans les rotations de cultures annuelles ;
- La production de plantes indemnes de virus et la prévention de la transmission et la diffusion pathogènes du sol ;
- Le développement de longues racines pivotantes verticales, qui utilisent plus efficacement l'humidité du sol et la teneur en engrais ([Foti et al., 2005](#)) ;
- La possibilité de mécaniser les opérations agronomiques de semis et de la récolte.

La propagation sexuée peut être effectuée en utilisant les génotypes à pollinisation libre, les lignées consanguines, les hybrides F1 et les variétés synthétiques. La majorité de cultivars multipliés par semences a été produite au cours des 25 dernières années en Israël et aux États-Unis. Le premier était Talpiot au début des années 80. Ce cultivar consanguin a été obtenu après cinq générations d'auto-pollinisation ([Basnizki et Zohary, 1987](#)). En fait, il y a d'autres cultivars consanguins et à pollinisation libre multipliés par semences dont les plus importants

sont : Imperial Star, Emerald, Green Globe et Colorado. En Italie, comme un exemple de nouveau clone, on trouve Terom, dérivé de pollinisation libre de Violetto di Toscana ([Tesi, 1981; Basnizki et Zohary, 1994](#)). Les hybrides F1 comme HU # 044, HU 137, et HU #223 ont été développés depuis les années 1980 par [BASNIZKI ET ZOHARY, \(1994\)](#). D'autres hybrides tels que Romano, Napoleone, Romolo, Orlando, Madrigal, Simphony, Harmony, Concerto, Opal, Tempo, Nun 4021 F1 et Nun 4051 F1, présentent de nombreux avantages pour surmonter les problèmes de consanguinité et montrent des effets positifs de l'hétérosis qui est responsable de la vigueur, la précocité et la productivité des jeunes plants ([Lo Bianco et al., 2012](#)).

De nombreuses recherches sur ces hybrides ont été lancées au cours de ces 15 dernières années, non seulement dans les pays où l'artichaut est traditionnellement cultivé, mais aussi dans d'autres où cette espèce est encore peu connue ([Pesti et al., 2004 ; Bucan et al., 2005 ; Jani et al., 2005](#)). À l'heure actuelle, les recherches sur les hybrides F1 visent principalement à l'optimisation des techniques culturales, l'évaluation du rendement ainsi que la qualité de la production et la composition biochimique ([Calabrese et al., 2005a, b](#)). La plupart des cultivars multipliés par graines et mis sur le marché ont été produits en Israël et aux États-Unis "Imperial Star" ([Rey Muñoz, 2005](#)).

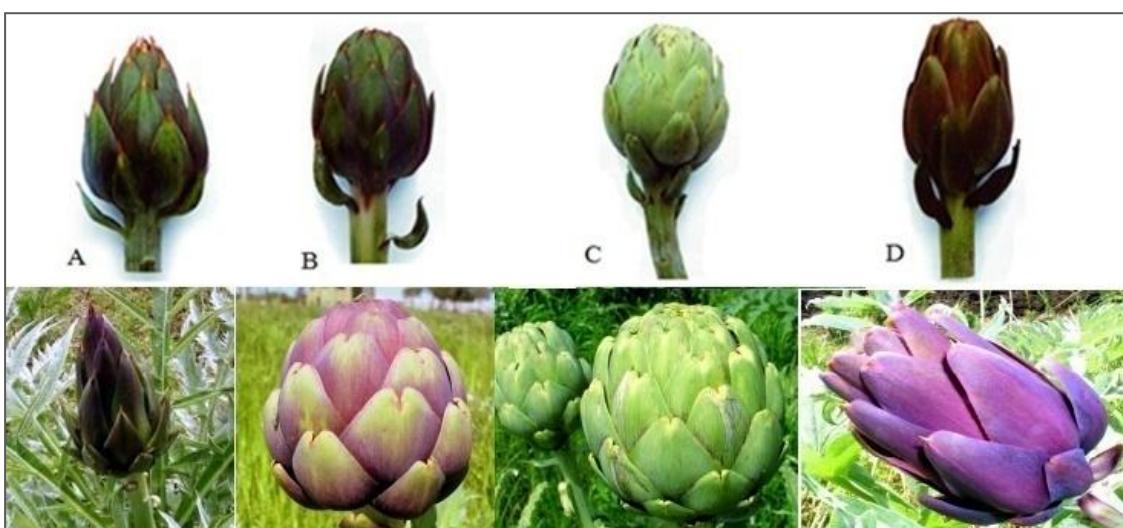
Enfin, la multiplication de l'artichaut (*Cynara scolymus* L) par graines offre beaucoup d'avantages par rapport à la multiplication par voie végétative : diminution des frais de plantation, homogénéité du développement des plantes, garantie phytosanitaire, facilité et rapidité de diffusion des nouvelles variétés, obtention du rendement maximal des plantes dès la première année et réduction de l'utilisation d'engrais et de pesticides ([Mauromicale et Ierna, 1995](#)).

## **10- Ressources génétiques d'artichaut**

Le nombre de cultivars d'artichauts cultivés dans le bassin méditerranéen et dans d'autres parties du monde ne peut pas être facilement déterminé. Un cultivar à un seul endroit est souvent connu sous d'autres noms dans d'autres localités (ex. : environ 14 noms sont employés pour indiquer l'artichaut 'Catanese' ; ([Bianco, 1990](#))). Par conséquent, le nombre de noms dépasse celui des cultivars réels. La composition des cultivars en Italie, en Espagne, et en France a été largement étudiée, mais elle est beaucoup moins connue dans les autres pays méditerranéens. L'Italie est le pays possédant la plus importante collection de germoplasmes autochtones d'artichaut (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) avec de nombreux groupes variétaux distincts bien adaptés aux différents environnements locaux ([Mauromicale et Ierna, 2000 ; Lanteri et al., 2001, 2004 b ; Ciancolini, 2012](#)).

Même si 100-120 génotypes sont actuellement caractérisés, seulement 11-12 d'entre eux peuvent être considérés comme ayant une grande importance commerciale ([Basnizki et Zohary, 1994; Mauro et al., 2009](#)). Bien que le nombre de cultivars soit assez limité, ils diffèrent nettement les uns des autres par de nombreux traits. En se basant sur la collection mondiale d'artichaut assemblée à Bari (Italie), [Dellacecca et al. \(1976\)](#) ont décrit l'intervalle de variation dans 20 différents traits morphologiques et productifs et ont préparé un ensemble de descripteurs pour la variation trouvée. La collection d'artichaut à Bari a également été soumise à une étude détaillée de divergence des génotypes sur la base des caractères morphologiques des capitules par une analyse multivariée ([Porceddu et al., 1976](#)). Cette analyse a montré que la majorité des accessions analysées entrent dans les quatre typologies suivantes (**Figure 14**) :

- A) ‘Spinoso’, caractérisé par la présence de longues épines pointues sur les bractées et les feuilles ;
- B) ‘Violetto’, avec des capitules de taille moyenne, violets et moins épineux ;
- C) ‘Romanesco’, avec des capitules sphériques ou sub-sphériques non épineux ;
- D) ‘Catanese’, avec des capitules relativement petits, de forme allongée et non épineux.



**Figure 14:** Quatre groupes d'artichaut classés sur la base de caractères morphologiques des capitules: **A)** ‘Spinoso’, **B)** ‘Violetto’, **C)** ‘Romanesco’, **D)** ‘Catanese’

Sur la base de la période de récolte des capitules, les ressources génétiques d'artichaut sont classées en groupes variétaux précoces ou tardifs ([Acquadro et al., 2010 ; Ciancolini, 2012](#)). Le type de floraison précoce produit les capitules entre l'automne et le printemps, après avoir arrosé les ovulos durant l'été (ex. : Spinoso sardo, Spinoso di Palermo, Violetto di Sicilia). Le type à floraison tardive produit en printemps et au début de l'été et comprend les génotypes de Romanesco et violetto di Toscana ([Saccardo, 2009](#)).

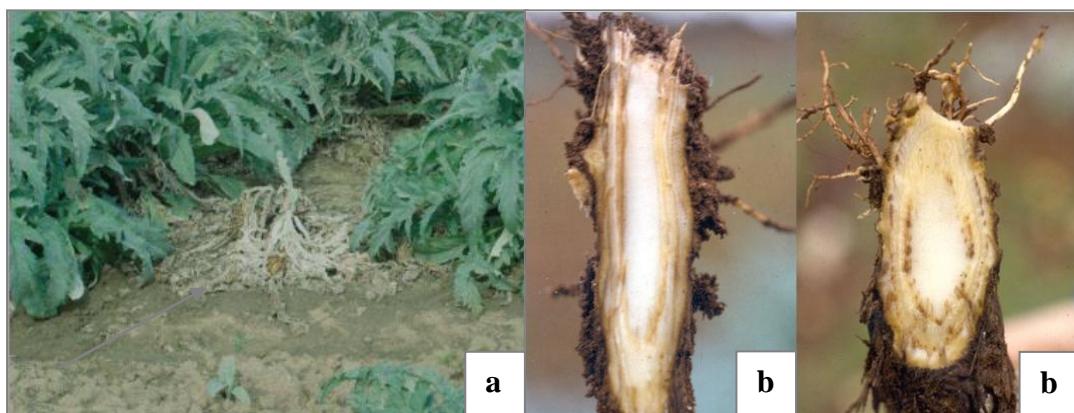
Dans des études récentes par les marqueurs moléculaires AFLP ([Sonnante et al., 2002](#) ; [Lanteri et al., 2004a ; 2006](#) ; [Crinò et al., 2008](#)), un accord cohérent entre les classifications génotypiques et phénotypiques basées sur les caractères des capitules a indiqué que les morphotypes cultivées jouent un rôle important dans la détermination de la variation au sein des espèces.

D'autres génotypes, dont le cv. Tudela d'Espagne ([Dellacecca et al., 1976](#) ; [Porceddu et al., 1976](#)), appartiennent à un groupe intermédiaire tandis que le germoplasme français a été classé en deux principaux groupes : 1) la typologie de la Bretagne, caractérisée par de grands capitules verts (ex. : Camus de Bretagne, Caribou, Camerys) et 2) la typologie Midi, qui comprend les génotypes provenant du Sud de la France (ex. : Violet de Provence et Violet Hyères) caractérisé par les capitules violets ([Saccardo, 2009](#)).

## **11- Maladies de l'artichaut**

La plante d'artichaut est attaquée par plusieurs agents pathogènes et parasites ([Pasquini et Barba, 2000](#)). Les principaux agents pathogènes de la partie aérienne de la plante d'artichaut sont les suivants : l'oïdium (*Leveillula taurica*), l'ascocytose (*Ascochyta cynarae*), le mildiou de composées (*Bremia lactucae*), la verticilliose (*Verticillium dahliae*) et la pourriture grise (*Botrytis cinerea*). *Leveillula taurica* peut attaquer sérieusement la partie aérienne de la plante provoquant un flétrissement des feuilles, ce qui réduit la production de capitules. Les spores sont transmises d'un champ à l'autre par l'air, ce qui rend la propagation de la maladie difficile à contrôler. Aucune pratique culturale n'a été identifiée afin de ralentir le développement de l'oïdium sur l'artichaut. Les graves épidémies de flétrissement, causées par le pathogène des racines *Verticillium dahliae*, ont été fréquemment observées sur les appareils racinaires dans différentes régions chaudes de plantation d'artichaut tels que le Sud de l'Italie ([Ciccarese et Cirulli, 1985](#)), le Chili ([Fernandez et Bertrand, 1988](#)), et l'Est de l'Espagne ([Armengol et al., 2005](#)). L'utilisation de souches infectées aurait grandement contribué à la diffusion de l'agent pathogène dans toutes les zones de culture de l'artichaut en Espagne, où de graves dommages ont été observés sur le cv. Blanca de Tudela, ainsi que sur cv. Imperial Star reproduits par semences ([Armengol et al., 2005](#)). En général, la maladie se produit sur quelques plantes et se propage ensuite à travers l'ensemble du champ ([Cirulli et al., 1994](#)) avec des symptômes qui se composent des retards de croissance, le jaunissement, le flétrissement et le brunissement des vaisseaux de la tige (**Figure 15a,b**) ([Cirulli et al., 1994](#) ; [Amenduni et al., 2005](#)). La stratégie de lutte contre la verticilliose de l'artichaut est basée sur la plantation sur des sols non infestés, sur l'utilisation de rejetons indemnes de maladie et à une rotation à long terme avec des espèces non-hôtes ([Ciccarese et al., 1985](#)). La sélection de

génotypes tolérants ou résistants pourrait être la stratégie la plus efficace pour le contrôle de la verticilliose (Cirulli *et al.*, 1994). Au champ, l'infection par *Verticillium* peut favoriser le développement de Pythium et les attaques bactériennes. Les attaques de *Verticillium albo-atrum*, *Sclerotinia* sp., *Sclerotium* sp. et *Rhizoctonia solani* pourraient devenir importantes sous des conditions élevées de température et de l'humidité (Tesi, 1994).

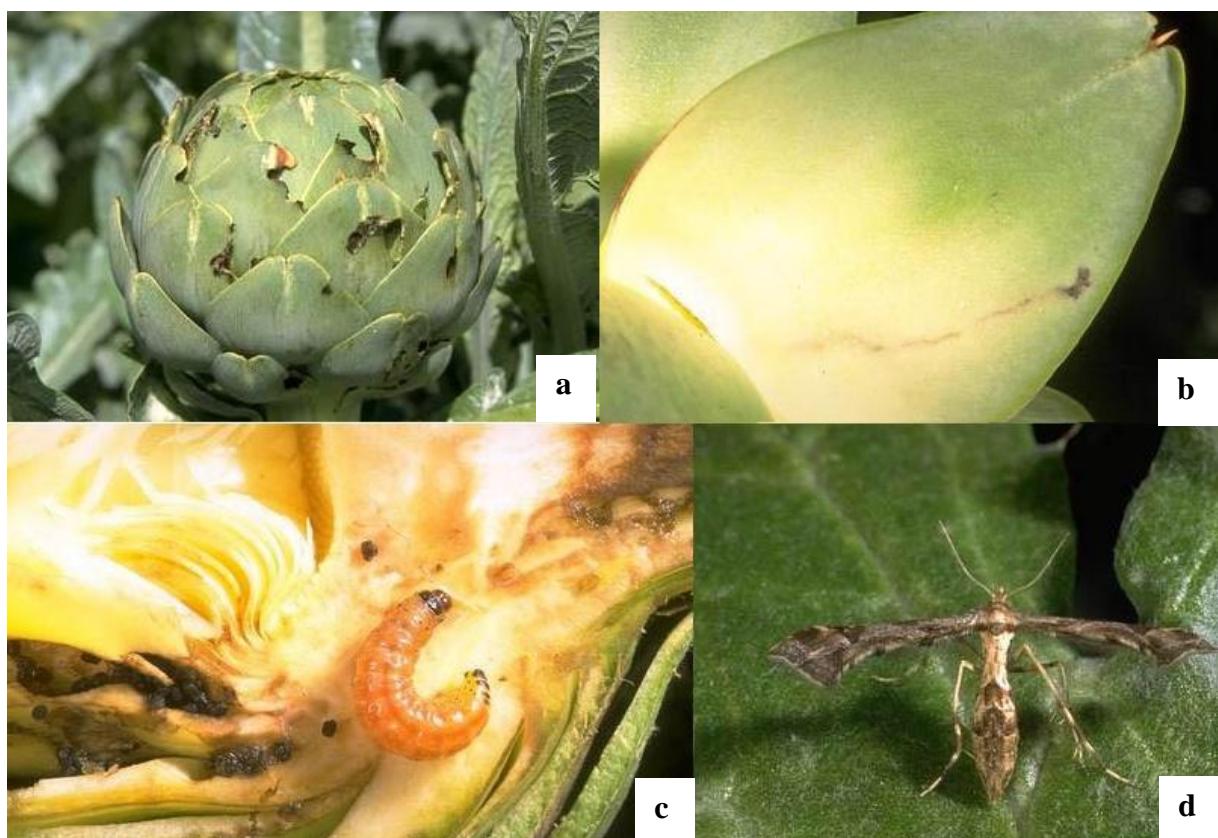


**Figure 15** : Dégât du verticillium dahliae sur l'artichaut : **a)** Flétrissement d'une plante infectée ; **b)** Brunissement vasculaire sur des sections transversales de la couronne d'artichaut (Amenduni *et al.*, 2005).

Les virus, isolés à partir de l'artichaut, sont capables d'extérioriser les symptômes ou de rester latents, ce qui réduit la croissance des plantes (Martelli *et al.*, 1979). Ils sont transmis principalement par les pucerons, les nématodes et le matériel de propagation infecté. Cependant, la plupart des 23 virus, qui se trouvent en Europe ainsi que dans le bassin méditerranéen sur cette culture, constituent de graves menaces pour l'artichaut (Gallitelli *et al.*, 2004). Les techniques de micropropagation pour l'obtention des plantes d'artichaut indemnes de virus sont élaborées par Babes *et al.* (2004) sur les types "romanesco". L'utilisation de matériel indemne de virus provenant de la culture de méristème apical représente un outil important pour le contrôle de l'infection virale et permet une augmentation significative de la productivité (Gallitelli *et al.*, 2004). Par contre, la multiplication par semences ne garantit pas l'obtention de plantes indemnes de virus. En fait, certains artichauts infectés par les virus tels que le Virus Italien Latent de l'Artichaut (AILV) et le Virus Latent de l'Artichaut (ArLV) sont transmis à la fois par les semences et le pollen (Bottalico *et al.*, 2002 ; Acquadro *et al.*, 2010). Bien que les dommages n'ont jamais été quantifiés, les virus les plus dangereux sont représentés par AMCV (Artichoke Mottled Crinkle Virus), pour lequel une méthode efficace de contrôle du matériel de multiplication est toujours nécessaire, par ArLV, ACDV (Artichoke Curly Dwarf Virus), TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus) et ADV (Artichoke Degeneration Virus) (Lumia *et al.*, 2003 ; Pasquini *et al.*, 2004). Au Maroc, c'est

principalement AMCV et ArLV qui attaquent les artichautières dont le premier est transmis dans le sol infecté et le deuxième par les insectes ([Gallitelli et al., 2004](#)).

Plusieurs insectes et autres ravageurs limitent souvent la production de l'artichaut dans certaines zones et exigent des mesures de contrôle de la part des producteurs. Le Pterophoridae ou la Mite de Plume d'Artichaut (*Platyptila carduidactyla*) est le ravageur le plus grave de la culture pérenne, en Californie. Les dommages économiques se produisent lorsque les larves se nourrissent sur les boutons floraux en les rendant invendables (**Figure 16 a, b, c, d**). De nombreuses espèces de lépidoptères montrent une activité trophique sur l'artichaut dans le bassin méditerranéen ; les pucerons et les larves de lépidoptères qui creusent des galeries à la fois dans les feuilles et les tiges (ex. : *Depressaria erinaceella* et *Gortynia xanthènes*) provoquent des dommages graves à la production dans le sud de l'Italie ([Ancora, 1986](#)). D'autres parasites animaux sont *Larynus cynarae* et *Agromyza andalusiaca* ([Tesi, 1994](#)). En ce qui concerne les parasites d'origine animale, les dommages remarquables causés par les souris et les escargots doivent être rappelés. En Italie, les agriculteurs construisent des barrières de sécurité autour du terrain (**Figure 17a**) pour limiter l'accès de la souris du champ (*Microtus savi*) qui provoque d'énormes dégâts qui s'expriment par la mort des plantes attaquées (**Figure 17b**) ([Calabrese, 2012](#)).



**Figure 16 :** Dégât de la Mite de Plume d'artichaut (*Platyptilia carduidactyla*) sur les boutons floraux : **a)** Capitule d'artichaut avec des dommages sur les bractées, **b)** Nourriture des larves sur bractées d'artichaut, **c)** Larve s'alimentant sur le capitule d'artichaut, **d)** Adulte.



**Figure 17 :** **a)** Champ d'artichaut entouré de barrières ; **b)** La mort des plantes causée par la souris du champ (*Microtus savi*).

La gestion des mauvaises herbes est un problème, non seulement parce que les mauvaises herbes utilisent les nutriments de la plante cultivée, mais aussi parce qu'ils fournissent un habitat pour les insectes nuisibles, réduisant ainsi l'efficacité de la pulvérisation par les produits antiparasitaires. Les champs d'artichaut sont des hôtes à un large spectre de mauvaises herbes, y compris l'ortie, la moutarde, le mouron des oiseaux, et oxalis. Le contrôle est possible par le traitement chimique, alors il n'y a pas de contrôles biologiques connus pour la gestion des mauvaises herbes dans les champs d'artichaut où la culture mécanique et le binage à la main sont pratiqués.

## **12- Culture *in vitro***

### **12-1- Généralité**

La culture *in vitro* est la culture d'explants de plantes, sur un milieu nutritif, en espace réduit, dans un environnement contrôlé et en conditions stériles. C'est donc, une façon pour conserver et cultiver indéfiniment des plantes ou des cellules sur des milieux nutritifs artificiels (Zryd, 1988). La culture et la régénération de plantes sont basées sur la totipotence de la cellule végétale, contenant l'information génétique nécessaire à la régénération d'une plante entière (Toute, 1998).

Les explants utilisés diffèrent d'une plante à l'autre et peuvent être des parties d'organes ou d'organes entiers (tige, feuille, racine, fleurs, etc.), des tissus, des pièces florales, des graines ou des embryons, des bourgeons, des apex ou des méristèmes, des cellules somatiques ou sexuelles, des cellules végétales débarrassées de la paroi ou protoplastes. Le choix de l'explant se fait en fonction de la technique utilisée, de l'objectif tracé, mais aussi de l'espèce étudiée.

La culture *in vitro* nécessite des conditions d'asepsie qui regroupent généralement les explants, les milieux, les récipients et l'endroit du travail. Elles sont obtenues par un ensemble d'opérations qui permettent de protéger l'explant à multiplier et son milieu contre toute contamination microbienne. Pour se faire, les explants sont désinfectés, les milieux et les récipients stérilisés à l'autoclave et les opérations de mise en culture se font sous hotte à flux laminaire ou à côté d'un bec benzène.

La culture se fait généralement dans un environnement contrôlé, c'est-à-dire un endroit où la température, l'éclairage (durée et intensité) et l'humidité relative sont bien déterminés (Auge *et al.*, 1989). L'espace est réduit, car les plantes sont miniaturisées, cultivées dans des récipients posés sur des étagères éclairées (**Figure 18**), ce qui rend la replantation des hectares de terrain possibles à partir de plants cultivés sur quelques mètres carrés. Toutes les étapes de

développement des plantes, de l'initiation à l'enracinement, peuvent être reproduites *in vitro* (Bànfalvi *et al.*, 1997).



**Figure 18 :** Étagères de culture éclairées

L'établissement d'une espèce, un cultivar ou une variété *in vitro*, nécessite quatre étapes principales. Une première étape d'initiation de la culture est essentielle : c'est la phase la plus sensible qui consiste à désinfecter les explants (racine, bourgeon, etc.) ou les graines, avant de les placer sur un milieu de culture approprié. Viennent ensuite les étapes de multiplication, d'enracinement et enfin d'acclimatation. L'acclimatation est le passage des conditions de laboratoire aux conditions *in situ*. Cette phase s'avère souvent critique, car les plantes en tubes ont toujours leurs stomates ouverts et peuvent sécher si le changement d'environnement se fait trop brusquement. Le passage, d'un environnement peu éclairé à la lumière de l'extérieur à forte intensité, doit également s'effectuer en douceur.

Selon Dodds et Roberts (1985), la culture de tissus végétaux apporte une contribution importante à l'agriculture et à l'industrie. Parmi les principales applications, il y a la production de plantes haploïdes, la propagation des plantes à grande échelle (micropropagation), l'obtention de plantes indemnes de virus, la production de métabolites secondaires, la préservation *in vitro* des ressources génétiques par le maintien des banques de gènes et la production de plantes transgéniques. Cependant, le plus grand succès en termes d'applications pratiques et commerciales réside dans la micropropagation (multiplication clonale *in vitro*).

La micropropagation est une technique biotechnologique qui s'intéresse à la culture *in vitro* de petites propagules (des explants), comme les apex, les semences, les embryons immatures, les sections de feuilles, de fleurs, de racines et d'autres organes. Parmi ses objectifs, on peut citer l'obtention de plantes génétiquement identiques à la plante mère et

exempt de maladies, notamment les virus, et à la production de plants tout au long de l'année (Semal, 1998).

Les plantes propagées par des techniques classiques, infectées par des champignons, des bactéries ou des virus, transmettent ces agents pathogènes aux générations suivantes, provoquant ainsi une diminution progressive des rendements. Une technique de culture de tissus, connue sous le nom de l'assainissement clonale, permet d'obtenir des plants sains à partir des plantes infectées. Cette technique est basée sur l'enlèvement d'un petit segment de la région de croissance de la plante, le méristème, et sa culture *in vitro* (Toute, 1998).

Bien que généralement coûteuses, les techniques de la culture *in vitro* présentent une très grande capacité de production, avec des résultats fiables. Donc, elles ont été préférées par les producteurs et les pépinières commerciales (Tomes *et al.*, 1982).

## **12-2- Micropagation de l'artichaut**

Les premières bases de la multiplication *in vitro* de l'artichaut ont été rapportées par les travaux de De Leo et Greco (1976), suivis par ceux d'Ancora *et al.* (1981) et Moncousin (1981) produisant ainsi des taux de multiplication plus élevés que les méthodes traditionnelles. Mais, le plus grand succès, soit en termes de taux de multiplication ou d'enracinement et d'acclimatation, n'a été achevé que dans ces dernières années avec les travaux de Dridi (2003), Tavazza *et al.* (2004), Schneider, 2005 et Elia *et al.* (2007). Le tableau 2 (page 47) résume les principaux travaux réalisés sur les différents cultivars de l'artichaut à travers le monde, en donnant la composition des milieux, les combinaisons hormonales et les conditions de cultures adoptées.

Les plantes d'artichaut obtenues à partir des plantules *in vitro*, présentent une plus grande vigueur et une productivité accrue. En étudiant la micropropagation de trois clones d'artichaut cv. Spinoso Sardo, Frau *et al.* (2004) ont conclu la supériorité productive du matériel provenant de plantes micropropagées en quantité et en qualité. Dans le même temps, les problèmes qui se posent dans l'élaboration de protocoles efficaces pour la phase d'enracinement *in vitro* ont entravé la production *in vitro* de certaines variétés d'artichaut. L'enracinement se produit à des taux qui sont beaucoup trop faibles pour atteindre une production rentable de plantes micropropagées (Rossi et De Paoli, 1990). En général, les cultivars d'artichaut tardifs montrent un plus grand potentiel pour l'enracinement *in vitro* que les cultivars précoces (Ancora *et al.* 1981 ; Tavazza *et al.*, 2004).

Pour faire face à cette problématique, l'étude de l'amélioration de l'enracinement des vitroplants, pour presque tous les cultivars d'artichaut, a fait l'objet de plusieurs travaux (Dridi, 2003 ; Tavazza *et al.*, 2004 ; Schneider, 2005 ; Elia *et al.*, 2007 ; Bedini *et al.*, 2012).

Ces études ont été basées soit sur le changement de la composition hormonale des milieux de culture comme il a été rapporté par les travaux de Morzadec et Hourmant (1997) ou même sur le changement de la composition minérale des milieux de culture (Tavazza *et al.*, 2004 ; Elia *et al.*, 2007). D'autres chercheurs ont testé des composants alternatifs tels que les cyclodextrines (Brutti *et al.*, 2000 ; Dridi, 2003). Le recours aux mycorhizes a été rapporté par Morone Fortunato et Ruta (2003). Les effets des modifications physiques dans le microenvironnement des récipients, sur les processus d'enracinement, ont également été étudiés (Pacifici *et al.*, 2007).

Le succès de la micropagation dépend de la composition du milieu de culture, des conditions de culture et du génotype (Schneider, 2005).

### **12-2-1- Matériel végétal**

Le matériel végétal, utilisé pour la culture *in vitro* de l'artichaut, diffère selon l'objectif fixé. D'une manière générale, les feuilles (Menin *et al.*, 2010), le disque foliaire et les bractées (Kchouk *et al.*, 1994) servent à produire le cal. Toutefois, ce dernier n'est pas utile que dans les approches génétiques visant la transformation génétique de la plante. En plus, l'artichaut est qualifié de plante récalcitrante pour la callogenèse (Menin *et al.*, 2010). Cependant, Devos *et al.* (1975), furent partis du cal pour obtenir une différenciation de bourgeons et de racines, mais seulement d'une manière occasionnelle. Par contre, les graines, le méristème apical et les segments de rhizome sont utilisés dans l'organogénèse directe de la plante.

Les graines sont utilisées dans la culture *in vitro* de l'artichaut pour contourner les difficultés de désinfection du matériel végétal provenant du champ (De Leo et Greco, 1976), pour se débarrasser des infections virales rarement transmises par les graines et pour sélectionner des lignées hybrides de haute performance. Benoit et Ducreux (1981) prenaient les graines comme explants primaires pour multiplier *in vitro* l'artichaut. Cependant, la phase d'enracinement a toujours posé des problèmes puisqu'ils n'ont obtenu que 1 % d'enracinement. Trois ans après, Moncousin et Ducreux (1984) ont pu cultiver *in vitro* des plantules d'artichaut issues de graines, ils ont ajouté de l'ergocalciférol au milieu de culture pour stimuler la formation de racines. Lauzer et Vieth (1990) ont eux aussi développé une méthode de micropagation à partir de graines, 65 % des plantules ont été enracinées et transférées au sol.

La culture des segments de rhizome peut aboutir à la formation des bourgeons rhizomateux sur un milieu de culture avec l'acide naphtalène acétique (ANA) à faible dose

(inférieur à 1 mg/l) (De Leo et Greco, 1976), ou à la formation des plantes entières sur un milieu additionné de 1 mg/l de kin et 0,5 mg/l de l'ANA (Dridi, 2003).

Toutefois, les méristèmes restent les plus utilisés (Castiglione *et al.*, 2007). En fait, la seule méthode pour éradiquer les virus chez des espèces envahies est la culture du méristème apical, surtout ceux en voie de différenciation florale (Martin, 1985). Depuis Peña-Iglesias et Ayuso (1974), Bedini *et al.* (2012), en passant par les travaux de Dridi (2003), Tavazza *et al.* (2004), Schneider (2005), Elia *et al.* (2007) et autres, la plupart des programmes de culture *in vitro* de l'artichaut qui ont vu le jour étaient basés sur l'utilisation des méristèmes apicaux. Il faut signaler cependant que l'enracinement présentait toujours un handicap pour la culture *in vitro* de l'artichaut.

### **12-2-2- Milieux de culture**

Le principal milieu de culture utilisé pour la micropropagation de l'artichaut est celui de Murashig et Skoog (Murashig et Skoog, 1962) complet (Lauzer et Vieth, 1990) ou modifié (Tavazza *et al.*, 2004), car il est favorable pour la plupart des plantes et variétés et contient tous les éléments essentiels pour leur croissance. Cependant, certains chercheurs ont essayé la micropropagation de cette espèce avec d'autres types de milieu, à savoir le milieu de Nitsch et Nitsch (Nitsch et Nitsch, 1969), le milieu de Heller (Heller, 1953) et/ou le milieu de Tendille et Lecerf (Tendille et Lecerf, 1974). Selon Elia *et al.* (2007), les cultivars précoces nécessitent une réduction dans les concentrations en éléments minéraux et en hormones, pour conserver leur précocité et améliorer leur taux de multiplication. C'est ainsi que certains chercheurs ont développé des milieux de culture spécifiques, dont les concentrations sont largement réduites par rapport à celles de MS, à savoir Brutti *et al.* (2000) et Morone Fortunato et Ruta (2003). Pour les vitamines et d'après la littérature, les plus utilisées sont les vitamines de Murashig et Skoog, les vitamines de Linsmaier et Skoog (Linsmaier et Skoog, 1965) et les vitamines de Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968). En outre, les régulateurs de croissance diffèrent selon l'étape de culture *in vitro* et selon le cultivar. Généralement, les cytokinines, dont la kinétine, la BAP et le 2iP sont recommandées pour la multiplication ; leur effet principal dans la culture *in vitro* est l'enlèvement de la dominance apicale et la stimulation de la division cellulaire, alors que les auxines, dont l'AIA, l'ANA, l'AIB et le 2,4-D, sont valorisées pour leur effet rhizogène et callogène.

L'agar et/ou le phytigel sont utilisés comme agent gélifiant du milieu de culture, le phytigel est avantageux grâce à sa transparence qui permet à l'examinateur de suivre et de contrôler le développement des racines.

### **12-2-3- Étapes de la culture *in vitro* de l'artichaut**

#### **a- Initiation**

C'est la mise en culture primaire des explants, qui vise à établir une culture saine et à adapter l'explant aux conditions de la culture *in vitro*. Les explants utilisés dans cette phase peuvent être les graines, les méristèmes apicaux ou des segments de plantes contenant le méristème et autres parties de la plante. Quant aux hormones les plus utilisées dans l'établissement d'une culture primaire de l'artichaut, elles sont généralement une combinaison des cytokinines et des auxines, citant à titre d'exemple la combinaison : BAP et AIB ([Tavazza et al., 2004](#) ; [Bedini et al., 2012](#)), AIA, 2iP et AG<sub>3</sub> ([Harbaoui, 1982](#)), AIB et AG<sub>3</sub> ([Moncousin, 1982](#) ; [Lauzer et Vieth, 1990](#)) et Kinétine, 2iP et ANA ([Brutti et al., 2000](#)). Cette phase d'initiation dure, selon les auteurs, de trois ([Morone Fortunato et al., 2005](#)) à six semaines ([Lauzer et Vieth, 1990](#)) et nécessite dans les deux premiers jours, de travailler dans l'obscurité en enrobant les bocaux dans du papier aluminium pour éviter l'oxydation par la lumière des explants surtout lors de l'utilisation de la partie apicale comme explant primaire ([Bedini et al., 2012](#)).

#### **b- Multiplication**

Cette étape est basée sur l'utilisation des cytokinines qui ont pour effet la stimulation de la division cellulaire et le développement des bourgeons axillaires ([Jouanneau, 1975](#)). D'une manière générale, la BAP est utilisée pour les plantes herbacées, alors que la Kin est utilisée pour les plantes ligneuses, quoique certains chercheurs l'utilisent pour la multiplication de l'artichaut. Certaines cytokinines comme la méta-topoline sont utiles pour améliorer la qualité des pousses axillaires ([Dridi, 2003](#)), ce qui a un bon impact sur l'étape d'enracinement qui suit. Selon [Schneider \(2005\)](#), la combinaison entre l'ANA et le 2iP ne peut pas être recommandée pour la multiplication de l'artichaut, surtout en comparaison avec d'autres combinaisons (ANA/BAP et ANA/kinétine).

Pour améliorer le taux de multiplication, certains auteurs ont eu recours à l'ajout du paclobutrazol au milieu de multiplication [Dridi \(2003\)](#). Cette substance est connue pour sa capacité de contrôler l'effet d'hyperhydricité, d'améliorer la qualité des vitroplants et d'augmenter l'effet inducteur du bourgeonnement ([Ziv et al. \(1994\)](#) ; [Werbrouck et Debergh, 1996](#)). Alors que, d'autres auteurs ont essayé la dilution des sels de MS pour améliorer le taux de multiplication, surtout chez les cultivars précoce ([Elia et al, 2007](#)).

Harbaoui *et al.*, (1982) ont défini le taux de multiplication comme étant le nombre de pousses obtenues d'un explant après un cycle de culture et utilisables comme unités de multiplication pour la subculture suivante.

### **c- Enracinement**

L'artichaut a toujours présenté des difficultés d'enracinement *in vitro*. Les pousses utilisées dans cette phase doivent avoir une taille de 2 à 3 cm. Une bonne qualité des pousses est aussi fortement recommandée pour assurer de bons résultats. Dans cette phase, on se base sur l'effet des auxines, dont la stabilité (Kaldewey et Scott, 1984), la force et la spécificité vis-à-vis des espèces différent d'un type à l'autre. Néanmoins, leur présence n'est obligatoire que pour induire les racines, alors qu'au cours de leur émergence, la présence d'auxine n'est plus nécessaire, elle est plutôt défavorable. Cela impose une élimination de l'auxine juste après l'induction racinaire, ce qui peut être atteint par l'addition de la riboflavine munie d'un passage à la lumière. On peut également accéder à un transfert des pousses vers un deuxième milieu de culture qui est dépourvu d'auxine, après les avoir transplantés sur un milieu avec auxines destiné à l'induction des racines (Dridi, 2003).

Pour la plupart des études réalisées sur l'artichaut afin de réussir l'enracinement, les meilleurs résultats étaient obtenus par l'ANA avec des concentrations modérées, généralement de 2 à 5 mg/l (Ancora *et al.*, 1981 ; Morzadec et Hourmant, 1997 ; Le Guen-Le Saos et Hourmant, 2001 ; Dridi, 2003 ; Apostolo *et al.*, 2005), ou bien encore par l'AIA avec des concentrations relativement élevées, généralement 10 mg/l (Iapichino, 1996; Morone Fortunato *et al.*, 2005), et qui sont associées ou pas à d'autres substances pour améliorer l'enracinement. Les résultats rapportés par la plupart des chercheurs restent peu brillants, quoique Tavazza *et al.* (2004) ont obtenu un taux d'enracinement de 90 %, en utilisant l'AIA à 10 mg/l, mais cela en changeant les concentrations des éléments minéraux. Selon Dridi (2003), l'ANA et BSAA (l'acide 3-benzo[β]selenyl acétique) s'avèrent plus efficaces que l'AIA et l'AIB dans l'induction de la rhizogenèse chez l'artichaut.

Autre que le BSAA susmentionné, les chercheurs utilisent une multitude de substances afin d'améliorer l'enracinement. Dridi (2003) et Apostolo *et al.* (2005) par exemple, sont arrivés à améliorer le taux d'enracinement *in vitro* de l'artichaut en additionnant de la β-cyclodextrine à 2 g/l au milieu de culture.

D'autres auteurs ont utilisé des milieux rhizogènes additionnés de charbon actif, dont l'effet sur le taux d'enracinement et sur la qualité des pousses était nettement positif (Bigot et Foury, 1984 ; Morzadec et Hourmant, 1997 ; Le Guen-Le Saos et Hourmant, 2001).

En ce qui concerne l'effet de la dilution des macroéléments au stade d'enracinement, les résultats obtenus par certains chercheurs confirment l'importance de cette dilution ([George et al., 2008](#)) tandis que d'autres n'ont pas noté d'effets importants ([Dridi, 2003](#)).

L'enracinement des vitroplants d'artichaut est contrôlé par plusieurs facteurs :

- Taille de l'explant : Le fait que les pousses d'artichaut dont la taille est supérieure à 2 cm s'enracinent plus facilement que celles ayant une taille inférieure était déjà connu depuis l'année 1982, grâce aux travaux de Harbaoui.

- Rang de subculture : Le rang de subculture a un effet primordial sur l'enracinement *in vitro* de l'artichaut. Plus on avance dans le rang de subculture, plus les pourcentages d'enracinement obtenus sont élevés ([Druart, 1997](#)). Ceci est probablement dû à un rajeunissement du matériel végétal au cours des subcultures. Ce phénomène devient plus clair après la 15<sup>ème</sup> subculture ([Moncousin et Ducreux, 1984](#)). Récemment Dridi ([2003](#)) a pu améliorer le pourcentage d'enracinement de cultivar 'Violet d'Hyères' en utilisant des pousses d'un rang de subculture supérieur à 10.

- Température : Elle influence sur le temps d'émergence des racines, le taux d'enracinement et la qualité des pousses. Son effet peut être différent selon la variété. Mais d'une manière générale, les meilleurs résultats sont obtenus sous 25 °C. Des températures inférieures à 20 °C retardent l'émergence racinaire ([Schneider, 2005](#)).

#### **d- Acclimatation**

Cette phase consiste à familiariser les pousses avec les conditions du champ, en les soumettant à des conditions intermédiaires dont le degré d'humidité est en régression progressive, contrairement à l'intensité lumineuse. En effet, sous les conditions de la culture *in vitro*, les feuilles des vitroplants ont une couche cireuse sur l'épiderme qui diffère de celle d'une plante *ex vitro*. De plus, la morphologie et la densité des stomates sont modifiées et leur fonctionnement est altéré. Les cellules palissadiques sont moins abondantes et contiennent moins de chlorophylle. Toutes ces modifications anatomiques au niveau des feuilles exposent les vitroplants au problème de perte excessive d'eau par transpiration ([Apostolo et al., 2005](#)). L'exposition des vitroplants à des conditions de température, lumière et humidité relative proches de celles auxquelles ils étaient exposés au laboratoire, particulièrement les premiers jours qui suivent leur sortie des récipients de culture, amoindrit ce risque.

D'une manière générale, la réussite de cette phase est mesurée par le taux de survie, ce dernier dépend du taux d'enracinement au cours de la phase précédente. Plus ce taux est

grand, plus le taux de survie est important. Il augmente également avec le nombre des racines par pousses enracinées ([Morone Fortunato et al., 2005](#)).

Selon [Apostolo et al. \(2005\)](#), l'acclimatation est favorisée par l'utilisation des auxines et des cyclodextrines, ainsi que par la réduction des concentrations en cytokinines pendant l'étape d'enracinement.

Certains chercheurs ont utilisé la mycorhization pour mieux réussir cette phase. Selon [Morone Fortunato et al. \(2005\)](#), la symbiose mycorhizienne favorise le développement des racines ainsi que l'absorption de l'eau, d'éléments minéraux et la résistance contre les agents pathogènes, ce qui a un impact positif sur la survie des pousses au cours de l'acclimatation. Ces mêmes chercheurs ont rapporté que la mycorhization augmente le taux de survie de 30-35 % à 90-95 % pour les pousses enracinées, et de 0 % à 60 % pour les pousses non enracinées, et que les plantes non mycorhizées souffrent d'une réduction dans le nombre des feuilles, et présentent certains signes de stress après 30 jours de transfert au champ, à l'inverse des pousses mycorhizées. La mycorhization augmente également le poids sec et frais des racines améliorant ainsi l'efficacité du système racinaire, et augmente l'uniformité morphologique et productive des plantes.

#### **12-2-4- Problèmes de la culture *in vitro* de l'artichaut**

D'une manière générale, les pousses d'artichaut mises en culture *in vitro* possèdent des chloroplastes de taille réduite, une cuticule très mince et des stomates ouverts. Ces troubles physiologiques et anatomiques sont dus à une humidité relative élevée, une grande fluctuation diurne de la concentration en CO<sub>2</sub> et une accumulation des substances toxiques. L'humidité relative très élevée engendre également une croissance rapide des pousses, avec une déformation des feuilles ([Apostolo et al., 2005](#)). En plus, chaque étape de la culture *in vitro* de l'artichaut présente des problèmes spéciaux.

Au cours de l'initiation ou l'établissement, c'est surtout la difficulté de désinfection du matériel végétal qui pose un grand problème et cela à cause de la contamination de la plante d'artichaut par les microorganismes telluriques. Également, les feuilles de l'artichaut sont riches en polyphénols, comme le lutéoline et les acides dicaféylquiniques (cynarine) ([Sonnante et al., 2007](#)) qui, par leur effet毒ique, empêchent les méristèmes de se développer au cours de l'initiation.

La multiplication des pousses par induction du développement des bourgeons axillaires, se trouve souvent limitée par le faible taux de multiplication et l'hyperhydricité qui est un phénomène qui survient lors de la multiplication et qui donne des vitroplants de mauvaises qualités. Selon [Apostolo et al. \(2005\)](#), l'utilisation des cytokinines au cours de cette phase est

responsable de la non-fonctionnalité des stomates, celles-ci restent alors ouverts, ce qui expose l'explant à une perte excessive de l'eau lors du transfère au sol. [Pécaut et Martin \(1990\)](#) ont rapporté que les cultivars précoces perdent leur précocité après la multiplication *in vitro*, avec une fréquence qui augmente avec le nombre de subcultures, ce qui désavantage l'usage de la culture *in vitro* pour certaines variétés précoces, comme le violet de province.

L'artichaut se caractérise par de grandes difficultés d'enracinement et d'acclimatation des vitroplants. Le milieu le plus utilisé dans la culture *in vitro* de l'artichaut est celui de Murashige et Skoog ; or sa forte concentration en sels surtout en azote peut inhiber la croissance des racines, même en présence d'auxines dans le milieu de culture ([Schneider, 2005](#)). La difficulté de l'acclimatation est due à la non-fonctionnalité des stomates et au faible développement de la cuticule épidermique, ce qui expose l'explant à une forte déshydratation ([Apostolo \*et al.\*, 2005](#)).

La diffusion de cette technique à grande échelle se heurte au coût élevé des plantules d'artichaut produites par culture de méristèmes et à la difficulté que les chercheurs trouvent dans l'utilisation des cultivars précoces ([Mauromicale et Ierna, 2000](#)), qui donnent, avec une fréquence élevée, la formation de mutants tardifs ([Pécaut et Martin, 1993](#)).

**Tableau 2:** Milieux de base et conditions de culture utilisés par différents auteurs pour la culture *in vitro* de l'artichaut

Auteurs	Milieux	Photopériode et température	Macroéléments	Microéléments	Vitamines	Saccharose	Agar	Régulateurs de croissance	Autres composés
<b>Ancora et al. (1981)</b>	Prolifération	16 h – 25 °C	MS + NAH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50mg/ml	MS	L-tyrosine 100mg/l	40 g/l	7 g/l	AIA 0,5 mg/l Kin 10 mg/l	Adénine 40 mg/l m-inositol 100 mg/l
	Enracinement 84%	16 h – 25 °C	MS/2	MS	Thiamine HCl 1 mg/l	20 g/l	7 g/l	ANA 2 mg/l	m-inositol 100 mg/l A. ascorbique 10 mg/l
<b>Harbaoui et al., (1982)</b>	Établissement	16 h – 22±2 °C	MS	MS (Fer remplacé par NaFeEDTA 35mg/l)	MS	20 g/l	7 g/l	AIA 1 mg/l 2iP 1 mg/l AG <sub>3</sub> 0,025 mg/l	
<b>Moncousin (1982)</b>	Établissement		MS	MS	Thiamine HCl 0,4 mg/l	30 g/l	7 g/l	AIB 1 mg/l AG <sub>3</sub> 0,1 mg/l	Inositol 100 mg/l
<b>Bigot et Foury (1984)</b>	Initiation	16 h 25 °C/jour 22 °C/nuit	MS	MS	MS	30 g/l	7 g/l	ANA 0,1 mg/l kin 1 mg/l	phosphate monosodique 50 mg/l sulfate d'adénine 40 mg/l
	Enracinement 77%	16 h N : 22 °C ; J : 25 °C	MS/2					ANA 0,1 mg/l	charbon actif 2 g/l
<b>Lauzer et Vieth (1990)</b>	Établissement		MS	MS	Thiamine HCl 0,4 mg/l	30 g/l	7 g/l	AIB 1 mg/l AG <sub>3</sub> 0,1 mg/l	Inositol 100 mg/l
	Multiplication	16 h – 24 °C	MS	MS	Thiamine HCl 0,4 mg/l	30 g/l	7 g/l	Kin 1 mg/l ANA 0,5 mg/l	Inositol 100 mg/l phosphate monosodique 50 mg/l sulfate d'adénine 40 mg/l
	Enracinement	16 h – 24 °C	MS/2	MS	Inositol	20 g/l	7 g/l	ANA 1 mg/l	

	65%				100 mg/l Thiamine HCl 0,4mg/l				
<b>Pecaut et Martin (1993)</b>	établissement		1,66 milieu K <sub>3</sub> NO (Tendille et Lecerf, 1974)		Morel et Wetmore, (1951)	20 g/l		Kin 0,1 mg/l AG <sub>3</sub> 0,1 mg/l	
	Prolifération		MS		Thiamine 0.4 mg/l,	30 g/l		Kin 0,5 mg/l 2iP 0,5 mg/l ANA 0,1 mg/l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 85 mg/l, adénine sulfate 40 mg/l, mésoinositol 100 mg/l,
	Enracinement		1,66 milieu K <sub>3</sub> NO		Morel et Wetmore, (1951)	30 g/l		ANA 0,5 mg/l	
<b>Morzadec et Hourmant (1997)</b>	Prolifération	16 h – 23±1 °C	MS	MS	Linsmaier et Skoog 1965 Fe-EDTA	30 g/l	7 g/l	Kin 0,5 mg/l 2iP 0,5 mg/l ANA 0,1 mg/l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 85 mg/l Sulfate d'adénine 40 mg/l
	Enracinement 92,3%	16 h – 23±1 °C	MS/2	MS	Linsmaier et Skoog 1965 Fe-EDTA	30 g/l	7 g/l	ANA 0,5 mg/l GA <sub>3</sub> 14,4 µM	charbon actif 2 g/l
<b>Brutti <i>et al.</i> (2000) Brutti <i>et al.</i> (2002) Apostolo <i>et al.</i> (2005)</b>	Établissement	16 h – 24±2 °C	MS avec ½ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ½ KNO <sub>3</sub>	Heller (1953)	Gamborg <i>et al.</i> , (1968)	30 g/l	8 g/l	Kin 2 mg/l 2 iP 1 mg/l ANA 0,1mg/l	Sulfate d'adénine 80 mg/l
	Prolifération	16 h – 24±2 °C	MS avec ½ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ½ KNO <sub>3</sub>	Heller (1953)	Gamborg <i>et al.</i> , (1968)	30 g/l	8 g/l	Kin 2 mg/l 2 iP 10 mg/l ANA 0,5 mg/l	Sulfate d'adénine 80 mg/l
	Pré-enracinement (3 semaines)	16 h – 24±2 °C	MS avec ½ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ½ KNO <sub>3</sub>	Heller (1953)	Gamborg <i>et al.</i> , (1968)	30 g/l	8 g/l	-	
	Induction	16 h – 24±2 °C	MS avec	Heller (1953)	Gamborg <i>et al.</i> ,	20 g/l	6 g/l	ANA 3 mg/l	

	racinaire (1 semaine) 21%		$\frac{1}{2}$ NH4NO3 $\frac{1}{2}$ KNO3		(1968)			$\beta$ -Cyclodextrine 2 g/l	
	Prolifération racinaire (3 semaines) 60%	16 h – 24±2 °C	MS avec $\frac{1}{2}$ NH4NO3 $\frac{1}{2}$ KNO3	Heller (1953)	Gamborg <i>et al.</i> , (1968)	20 g/l	6 g/l	ANA 3 mg/l $\beta$ -Cyclodextrine 2 g/l	
<b>Dridi, (2003)</b>	Initiation	16 h – 22±2 °C	MS	MS	MS	20 g/l	7 g/l	AIA 1 mg/l 2iP 1 mg/l GA <sub>3</sub> 0,025 mg/l	
	Multiplication	16 h – 22±2 °C	MS	MS	MS	20 g/l	7 g/l	AIB 0,1 mg/l Méta-topaline 0,5 mg/l Paclobutazol 2 mM	
	Enracinement 100%	16 h – 22±2 °C	MS/2	MS	MS	20 g/l	7 g/l	ANA 2 mg/l + $\beta$ -cyclodextrine 2 g/l)	
<b>Tavazza <i>et al.</i>, (2004)</b>	Initiation		MS modifié	MS modifié	MS modifié	30 g/l	7 g/l	BAP 0,8 mg/l AIB 0,2 mg/l	
	Prolifération		MS modifié	MS modifié	MS modifié	30 g/l	7 g/l	Kin 2 mg/l AIB 0,1 mg/l	
	Enracinement 90%		MS modifié	MS modifié	MS modifié	30 g/l	7 g/l	AIA 10 mg/l	
<b>Morone Fortunato <i>et al.</i> (2005)</b>	Établissement	16 h – 24± 1 °C	MS	Nitsch et Nitsch (1969)	Thiamine HCl 0,4 mg/l	20 g/l	7 g/l	2iP 1 mg/l AIA 1 mg/l AG <sub>3</sub> 0,025 mg/l	FeEDTA 25 mg/l Myo-inositol 100 mg/l
	prolifération	16 h – 24± 1 °C	MS	Nitsch et Nitsch	Thiamine HCl 0,4 mg/l	20 g/l	7 g/l	BAP 0,5 mg/l	FeEDTA 25 mg/l Myo-inositol 100 mg/l
	Enracinement 95%	16 h – 22± 1 °C	MS	Nitsch et Nitsch	Thiamine HCl 0,4 mg/l	30 g/l		AIA 10 mg/l	Fe-EDTA 25 mg/l Myo-inositol

									100 mg/l
<b>Schneider (2005)</b>	Enracinement 32%	16 h – 24± 1 °C	MS	MS	MS	30 g/l	6 g/l	ANA 0,5 mg/l	
<b>Bedini et al., (2012)</b>	Induction	16 h - 22±1 °C	MS modifié ¼ KNO <sub>3</sub> et ¼ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	MS modifié	MS modifié (Tavazza <i>et al.</i> , 2004)	30 g/l	7,5 g/1	BAP 0,8 mg/l AIB 0,2 mg/l	
	prolifération	16 h - 22±1 °C	MS modifié ¼ KNO <sub>3</sub> et ¼ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	MS modifié	MS modifié (Tavazza <i>et al.</i> , 2004)	30 g/l	7,5 g/1	BA 0,03 mg/l AG <sub>3</sub> 0,05 mg/l	
	Pré-enracinement	16 h - 22±1 °C	MS modifié KNO <sub>3</sub> et NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	MS modifié	MS modifié (Tavazza <i>et al.</i> , 2004)	30 g/l	8 g/1	AIA 0,5mg/l paclobutrazol 1 mg/1	
	Enracinement	16 h - 22±1 °C	MS modifié KNO <sub>3</sub> et NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	MS modifié	MS modifié (Tavazza <i>et al.</i> , 2004)	30 g/l	8 g/1	ANA 2 mg/l β-cyclodextrin 2 mg/l	

### **13- Cryoconservation**

La perte alarmante de la biodiversité végétale à la fois dans la nature et au sein des systèmes agricoles a conduit la communauté des biologistes végétaux à chercher des alternatives à la conservation *in situ*. Bien que la cryoconservation ne soit pas une panacée pour la perte mondiale de biodiversité, elle est un outil utile pour le maintien à long terme du germoplasme végétal. Cette technique, qui consiste à maintenir le matériel végétal sélectionné dans l'azote liquide (-196 °C), est la seule technique actuellement disponible pour assurer une conservation à long terme sûre et rentable du matériel génétique d'espèces menacées, y compris les espèces à semences non orthodoxes et les plantes à multiplication végétative ([Engelmann, 2012](#)). Par ailleurs, les cultures sont stockées dans un faible volume, à l'abri de toute contamination, nécessitant peu d'entretien.

Le développement des techniques de cryoconservation des plantes pour les cultures cellulaires en 1968 ([Quatrano, 1968](#)) a conduit aujourd'hui les chercheurs à un stade où la cryoconservation des tissus organisés est une réalité. Les recherches menées, chaque année à travers le monde, arrivent à de nouvelles cryobanques de matériel végétal concernant différents types d'explants (graines, embryons somatiques, apex, cals, suspensions cellulaires, plantules...) ([Sakai et Engelmann, 2007](#)).

---

---

## **Chapitre II**

---

### **Matériel et Méthodes**

---

## **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

---

Afin d'étudier la micropropagation ainsi que l'influence des différentes conditions de culture sur ce processus chez l'espèce *Cynara cardunculus* var. *scolymus* L., plusieurs expériences ont été réalisées sous des conditions environnementales contrôlées (température, humidité de l'air et intensité lumineuse) en chambre de culture.

Dans ce chapitre, nous présentons d'une manière générale, le matériel et les méthodes relatifs aux différentes expérimentations réalisées dans les trois chapitres ; ensuite, et pour chaque chapitre nous décrirons d'une manière précise, le matériel et les méthodes qui lui sont spécifiques.

### **1- Matériel végétal**

L'étude de la germination a été réalisée sur les graines suivantes : l'accession Art21 et l'accession Art22 fournies par l'international Nursery (pépinière de la région) et la variété IJ et la variété BR fournies par Rusty JORDAN (BHS, Brawley, Californie, USA).

Le matériel végétal, utilisé dans la multiplication *in vitro*, provient des plantules issues de germination des graines de l'accession Art21 *in vitro*. Alors que celui utilisé en cryoconservation, partie de thèse réalisée en Italie, dérive de deux variétés italiennes d'artichaut : 'Grato' et 'Campagnano' et c'est principalement l'apex qui est cryoconservé.

### **2- Milieux de culture**

#### **2-1- Compositions des milieux de culture**

La germination, l'établissement et la multiplication ont été réalisés sur le milieu de culture composé des sels de MS ([Murashige et Skoog, 1962](#)) (**tableau 3**) additionné de vitamines B5 ([Gamborg et al., 1968](#)). Ces deux produits sont commercialisés par Sigma Aldrich ; les sels de MS sont sous forme de poudre incluant l'ensemble des macro et microéléments décrits par [Murashige et Skoog \(1962\)](#) et le deuxième est une solution commerciale 1000 fois concentrée dont la composition est décrite au tableau 4.

Afin de déterminer les conditions nutritives les plus favorables à l'enracinement des explants, nous avons choisi les milieux suivants : sels de MS supplémentés par les vitamines B5 et/ou les sels de MS modifiés supplémentés par les vitamines de MS modifiées ([Tavazza et al., 2004](#)) (**tableau 5**).

Au cours des différentes étapes de la cryoconservation, différents milieux de culture ont été testés. Le **tableau 6** regroupe ces milieux ainsi que l'étape de leur utilisation.

**Tableau 3:** Sels de Murashige et Skoog

<b>Macroéléments</b>	<b>Concentration (mg/l)</b>
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Microéléments</b>	
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KI	0,83
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8

**Tableau 4:** Vitamines utilisées par Gamborg

<b>Composants</b>	<b>Concentration mg/l</b>
Acide nicotinique	1
Pyridoxine HCl	1
Thiamine HCl	10
Inositol	100

**Tableau 5:** Composition du milieu MS modifié décrit par [Tavazza et al. \(2004\)](#)

	<b>Produit</b>	<b>Quantité en mg/l</b>
<b>Macroélément</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400
	KNO <sub>3</sub>	800
	MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	370
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	CaCl <sub>2</sub>	150
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	1000
<b>Microélément</b>	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,6
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
	MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	20
	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,25
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25
	CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025
	KI	0,83
	FeEDTA	36,7
<b>Vitamines</b>	Myo-inositol	200
	Thiamine	1
	Pyridoxine HCl	0,5
	Acide nicotinique	0,5
	Glycine	2

**Tableau 6:** Milieux utilisés en cryoconservation (Réf. Laboratoire de biotechnologie, centre de recherche ENEA, Rome)

Milieu	Etape d'utilisation
PVS2 liquide (plant preservation solution)	Osmoprotection- déshydratation
MS 0,03M de saccharose	Régénération
MS 0,3M de saccharose	Régénération
MS modifié 0,3M de saccharose	Préculture - Régénération
MS modifié 0,09M de saccharose	Régénération
MS 1,2% se saccharose liquide	Déchargement

La source de carbone est le saccharose dont la concentration varie de 2 à 3%. À l'exception du milieu de germination, tous les autres milieux ont été enrichis par les régulateurs de croissance et la solidification a été faite à l'aide du phytogel (Sigma Aldrich).

Les régulateurs de croissance utilisés sont :

- Pour la phase d'établissement : l'acide indole butyrique (AIB) et l'acide gibbérellique ( $AG_3$ ). Ce dernier favorise l'elongation cellulaire et l'allongement des entre-nœuds ;
- Pour la multiplication : l'acide naphtalène acétique (ANA) et la kinétine (Kin) qui est connue par son effet favorisant la ramification des pousses et s'opposant à la dominance exercée par le bourgeon apical sur les méristèmes axillaires ;
- Pour l'elongation : le 6-( $\gamma,\gamma$ -diméthylallylamino) Purine (2iP), la Kin et l'AIB.
- Pour l'enracinement, ce sont principalement les auxines connues par l'induction de la rhizogénèse, tels que l'acide indole butyrique (AIB), l'acide naphtalène acétique (ANA) et l'acide indole-acétique (AIA) qui sont utilisés et nous avons employé également la Kin à une faible concentration combinée à l'ANA.
- Pour la cryoconservation : la Kin et l'AIB.

L'ajout des régulateurs de croissance au milieu de culture, avant ou après autoclavage, prend en considération la stabilité de ces derniers à des températures élevées. Le pH du milieu a été ajusté à 5,6 pour le milieu de germination et à 5,7 pour les autres milieux par addition de NaOH (1N) ou HCl (1N) à l'exception du milieu d'enracinement décrit par [Tavazza et al. \(2004\)](#) où le pH a été ajusté à 5,8.

En outre et à l'exception du milieu de germination, tous les autres milieux de culture ont été supplémentés avec de l'acide ascorbique (10 mg/l) pour inhiber l'oxydation des composés phénoliques. Comme autres additifs au milieu d'enracinement, nous avons utilisé : le charbon actif la  $\beta$ -cyclodextrine.

Une description, de chaque milieu de culture, est détaillée dans le chapitre concerné.

Les solutions mères pour les macronutriments (10 fois concentrés) ainsi que pour les microéléments (200 fois concentrés) ont été utilisées pour la préparation du milieu de culture. Les solutions mères des autres composants (par exemple Fe-EDTA et les vitamines) ont été également préparées et stockées à 4°C.

## **2-2- Préparation des solutions mères**

La préparation d'un milieu de culture demande une certaine précision surtout pour les éléments dont la concentration est de l'ordre de milligramme, c'est pour cette raison que la préparation des solutions mères devient une nécessité à la fois pour bien ajuster les concentrations, faciliter le travail et pour gagner du temps. Le tableau ci-dessous résume la méthodologie de préparation des solutions mères des milieux de culture.

**Tableau 7:** Préparation des solutions mères des différents constituants des milieux de culture

	<b>Produit</b>	<b>Concentration finale en mg/l</b>	<b>Solution mère en mg (Stock)</b>	<b>Volume utilisé pour 1L de milieu</b>
<b>Macroélément (MS modifié)</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400	400x10=4000/ 1 L	100 ml Macro 10x concentrée
	KNO <sub>3</sub>	800	8000	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	3700	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1700	
	CaCl <sub>2</sub>	150	1500	
<b>Microélément (MS modifié)</b>	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6x200=1720/ 1 L	5 ml Micro 200x concentrée
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2		
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	20		
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,25		
	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25		
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025		
<b>KI</b>	KI	0,83	0,83x50= 41,5 mg/50 ml d'ED	1 ml d'une solution 1000x
<b>FeEDTA</b>	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O EDTA,2Na,2H <sub>2</sub> O	27,8 37,3	27,8x 100= 2780 /1L 3730	10 ml d'une solution 100x
<b>Acides aminés et vitamines (MS modifié)</b>	Thiamine	1	50 mg/50 ml d'ED*	1 ml d'une solution 1000x
	Pyridoxine HCl	0,5	50 mg/50 ml d'ED	0,5 ml d'une solution 2000x
	Acide nicotinique	0,5	50 mg/50 ml d'ED	0,5 ml d'une solution 2000x
	Glycine	2	50 mg/50 ml d'ED	2 ml d'une solution 500x
<b>PGR</b>	Kénitine	1- 0,5- 0,05	10 mg/10 ml d'ED	Selon la concentration désirée
	2iP	0,01	10 mg/10 ml d'ED	10 µl d'une solution 100000x
	ANA	2- 0,5- 0,1	10 mg/10 ml d'ED	Selon la concentration désirée
	AIB	1- 0,1	10 mg/10 ml d'ED	Selon la concentration désirée

	AG <sub>3</sub>	0,1	10 mg/10 ml d'ED	100 µl d'une solution 1000x
<b>Acide ascorbique</b>	Acide ascorbique	10	100 mg/10 ml d'ED	1 ml d'une solution 1000x
<b>Sulfate d'adénine</b>	Sulfate d'adénine	40	400 mg/100 ml d'ED	10 ml d'une solution 100x
<b>Phosphate monosodique</b>	Phosphate monosodique	50	500 mg/10 ml d'ED	1 ml d'une solution 1000x

\* Eau distillée

Lors de la préparation des solutions mères, les différents éléments sont apportés dans l'ordre décroissant de leur concentration afin d'éviter tout risque de précipitation. Ensuite, toutes les solutions mères sont étiquetées, puis conservées au froid (4 °C) et à l'abri de la lumière jusqu'au moment de leur utilisation. Les solutions des macro et microéléments et le FeEDTA ont été stérilisés à 121 °C pendant 20 min avant leur conservation. Le prélèvement des volumes nécessaires à partir de ces trois solutions se fait sous la hotte.

Il est à noter que les régulateurs de croissance, vu leur insolubilité éventuelle dans l'eau, ont été dissous préalablement dans quelques gouttes d'éthanol, de NaOH (1N) ou de HCl (1N), avant leur dilution dans de l'eau distillée. Le tableau 8 donne le type de solvant convenable pour chaque régulateur.

**Tableau 8:** Type de régulateurs de croissance et leurs solvants

<b>Les régulateurs</b>		<b>Les solvants</b>
Auxines	AIA	EtOH ou 1N NaOH
	AIB	EtOH ou 1N NaOH
	ANA	1N NaOH
Cytokinines	Kénitine	1N NaOH
	2iP	1N NaOH
Gibberellines	AG <sub>3</sub>	EtOH

### **3- Stérilisation des instruments et des solutions**

La conduite des cultures en conditions aseptiques sous-entend la stérilisation des milieux de culture, des instruments de manipulation et de dissection, d'eau de rinçage, etc.

Pour la stérilisation, toute la verrerie (Béchers, tubes de culture, boîtes de Pétri...) est placée dans des sachets en plastique, alors que les instruments métalliques (pinces, scalpels...) sont enrobés d'abord avec du papier aluminium puis mis dans des sachets en plastique ou dans des boîtes étanches inoxydables et autoclaver à une température de 121°C pendant 20 min. Au cours des manipulations, les instruments métalliques (scalpels et pinces) qui sont ainsi stérilisés, sont trempés dans l'alcool puis flambés et déposés sur un support métallique stérile (il faut toujours doubler les instruments de travail, pour permettre le refroidissement de l'un lorsque l'autre est utilisé).

Les solutions (eau distillée, milieux de culture...) sont également stérilisées à l'autoclave pendant 20 min (30 min pour la tourbe).

#### **4- Désinfection du matériel végétal**

La culture de tissus végétaux se heurte à des problèmes de contaminations par divers agents (bactéries, champignons...) ce qui exige l'utilisation de solutions stérilisantes, dont la concentration diffère selon le degré d'infection des explants. Dans notre travail et afin d'initier la culture à partir de graines, ces dernières ont été désinfectées selon trois protocoles avec une solution d'eau de Javel 1%, le chlorure mercurique ( $HgCl_2$ ) à 0,5% et l'éthanol à 70% qui est utilisé souvent pour de courtes durées justes comme agent mouillant (chapitre I).

La préparation de la solution d'eau de Javel se fait juste au moment de l'utilisation puisqu'elle perd rapidement de l'efficacité. Il est à noter que l' $HgCl_2$  est une substance très毒ique qui doit être manipulée avec certaines précautions sous une hotte chimique.

#### **5- Mise en culture des explants**

La culture *in vitro* nécessite des précautions aussi bien pour le manipulateur que pour l'environnement du travail. Avant de commencer la manipulation, les mains sont lavées avec du savon antiseptique suivi de l'alcool à 70°. La hotte est désinfectée avec de l'alcool après la mise en marche de la ventilation. Tout le matériel est vaporisé à l'alcool 70° et placé à l'intérieur de la hotte pour être stérilisé par les UV pendant 15 min (ces UV sont nécessaires à la fois pour la hotte et le matériel) avant de commencer la manipulation des explants.

Sous la hotte à proximité du bec benzène, nous avons réalisé toutes les opérations : le coulage de milieu, la désinfection du matériel végétal, la mise en culture des explants, le transfert d'un milieu à l'autre... La mise en culture des explants sur les milieux de culture est effectuée à l'aide de pince stérilisée et près de la flamme du bec benzène, tout en flambant l'ouverture du tube avant et après l'opération.

La germination des graines a été effectuée à la fois dans des tubes à essai (hauteur 15 cm, diamètre 2,5 cm) contenant 20 ml de milieu MS et fermés avec du coton et du papier aluminium et/ou dans des boîtes de Pétri sur du papier Whatman ; les explants, au cours des autres étapes de la micropropagation, ont été cultivés dans des bocaux contenant 30 ml du milieu de culture (hauteur 12 cm, diamètre 7 cm).

Il est à noter que dans le cas de l'initiation de la culture à partir de la partie apicale ( $> 1 \text{ cm}$ ), l'enrobage du bocal de culture par du papier aluminium pour travailler dans un milieu obscur, est nécessaire et constitue une protection des explants durant les deux premiers jours qui suivent la mise en culture.

## **6 - Incubation des cultures**

Pour la germination en tourbe, les alvéoles sont placées soit dans une chambre de culture à 25 °C ou bien dans un incubateur réglé à 18 °C, alors que la germination sur milieu de culture ou dans les boîtes de Pétri a été effectuée à 25 °C à l'abri de la lumière jusqu'au début de germination, puis les récipients sont transférés à la lumière avec une photopériode de 16 h.

Les bocaux contenant les explants ont été conservés dans une chambre de culture conditionnée. Les cultures ont été maintenues à environ  $25 \pm 1$  °C sous une photopériode de 16 h pour une intensité de  $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . La lumière artificielle a été fournie par des tubes fluorescents parallèles à lumière blanche installés au-dessus des cultures (**Figure 19**).



**Figure 19 :** Étagère de culture éclairée par des lampes à lumière blanche.

Pour la cryoconservation, les conditions de culture diffèrent d'une étape à l'autre. La préculture a été effectuée à 4 °C ; l'osmoprotection et la déshydratation à 0 °C ; le stockage ou la conservation à -196 °C ; la décongélation ou le réchauffement à +40 °C ; le déchargeement à température ambiante ; la plantation à 19 °C pour une journée puis le transfert à 25 °C.

## **7- Acclimatation *ex vitro***

Les pousses qui ont passé 6, voire 8 semaines sur le milieu d'enracinement, sont transférées dans un substrat (tourbe seule ou mélangée avec la perlite en proportion égale), et placées dans une enceinte couverte à forte hygrométrie. Le couvercle sert à conserver cette humidité à un niveau proche de celui présent dans les récipients de la culture *in vitro*, pendant les premiers jours du transfert. Puis, le couvercle est enlevé peu à peu, pour éviter toute déshydratation rapide des plantules et permettre une diminution progressive de l'humidité jusqu'à ce qu'on atteint les mêmes conditions de l'humidité à l'extérieur.

## **8- Paramètres évalués**

### **8-1- Germination**

Le pourcentage, le temps et le délai de germination sont les principaux paramètres notés au cours des essais de germination.

### **8-2- Multiplication**

Au cours de la multiplication, c'est principalement le nombre moyen de pousses néoformées dans chaque génération qui a été suivi pour déterminer le taux de multiplication.

### **8-3- Enracinement**

Afin d'évaluer l'importance des traitements appliqués au cours de la phase de l'enracinement, les paramètres suivants ont été notés :

- Le nombre de pousses enracinées ;
- Le nombre moyen de racines par pousse enracinée ;
- La taille moyenne de la racine la plus longue ;
- Le nombre moyen de racines secondaires par pousse ;
- Le pourcentage d'enracinement.

### **8-4- Cryoconservation**

L'évaluation de l'importance des milieux de culture, utilisés en cryoconservation, a été basée sur le comptage du nombre des apex viables et la détermination du pourcentage de survie en post-cryoconservation pour chaque milieu.

### **8-5- Acclimatation**

En acclimatation, nous avons noté le nombre de vitroplants survécus au niveau des deux substrats testés.

## **9- Analyse statistique**

Pour le traitement de nos résultats, nous avons utilisé des méthodes statistiques à savoir :

- Analyse de la variance (ANOVA).
- Test de Duncan (au seuil de 5 %) pour la séparation des moyennes ([Duncan, 1955](#)).

Le programme informatique utilisé est le logiciel statistica version 10 ([Anonyme, 2010](#)). Les résultats obtenus (les moyennes  $\pm$  les écarts types) sont ensuite représentés sous forme de tableaux ou de graphiques en fonction des paramètres étudiés et cela à l'aide du logiciel EXCEL ([Microsoft Office 2007](#)).

---

---

## Chapitre III

---

**Germination des graines  
d'artichaut (*Cynara  
cardunculus* var.  
*scolymus* L.)**

---

**Chapitre III :**  
**Germination des graines d'artichaut (*Cynara cardunculus* var.  
*scolymus*)**

---

**Résumé**

Étant donné les difficultés de propagation de l'artichaut limitée par la voie végétative et les problèmes de germination des graines d'artichaut rapportés par plusieurs travaux, nous avons examiné, dans une étude préalable, le comportement germinatif de cette plante afin d'envisager par la suite la propagation *in vitro* à partir de semences.

Dans ce contexte et afin d'améliorer la germination des graines d'artichaut de l'accession Art21 et Art22 et d'éliminer le problème de l'inhibition tégumentaire, nous avons d'abord essayé différents prétraitements chimiques (acide sulfurique) et physiques (scarification, de l'eau bouillante). Par conséquent, nous avons réussi à établir les conditions optimales pour la germination et puis nous avons utilisé ces résultats afin d'évaluer la capacité de germination de l'espèce en présence et en absence de téguments. À cet effet, nous avons testé la germination des graines avec et sans téguments sur le milieu de culture. Ainsi, l'incubation des graines à 4 °C et leur immersion dans l'acide sulfurique concentré pendant 30min ont montré une amélioration nette de la vitesse et le taux de germination. En outre, l'étude de l'effet des téguments sur la germination a montré qu'une élimination des téguments permet d'améliorer le temps moyen de germination ainsi que son taux. La comparaison du comportement germinatif de l'artichaut dans la tourbe avec celui sur milieu de culture a mis en évidence un effet substrat significatif seulement sur le temps moyen de germination et non pas sur le taux de germination. En effet, l'utilisation de l'acide sulfurique et l'incubation à 4 °C dans le cadre de cette étude ont permis de réduire le délai entre le semis et la première germination et la durée de germination des graines. Dans tous les cas, le pourcentage de germination n'a pas dépassé 40 %.

Dans un deuxième temps et pour évaluer l'effet du génotype sur la germination de l'artichaut, nous avons essayé la germination de deux nouvelles variétés dans la tourbe en testant l'effet de la température et du traitement par l'AG<sub>3</sub> sur le pourcentage, le délai et la durée de germination. Les résultats ont montré un effet du génotype très significatif puisque les pourcentages de germination des deux variétés ont dépassé les 50 % avec des délais de germination pouvant se réduire à 4 jours avec l'incubation à 18 °C et un traitement par l'acide gibberellique.

## **Introduction**

L'artichaut (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.), espèce appartenant à la famille des Asteraceae, est une culture herbacée, typique du bassin méditerranéen (Barba et al., 2004). Les inflorescences d'artichaut sont très appréciées pour la consommation fraîche ou la transformation industrielle. L'utilisation de l'artichaut comme plante médicinale a haussé l'intérêt pour cette plante et la demande en ses composants (Eich et al., 2005).

Historiquement, les champs d'artichaut ont été cultivés végétativement (Sims et al., 1977) et de nos jours cette forme de propagation demeure la plus répandue dans les pays où il est cultivé pour une production précoce et pour reproduire en toute sécurité les caractéristiques de la plante mère (Cardarelli et al., 2005a). Ce mode de propagation occasionne des problèmes comme le faible taux de multiplication (Harbaoui et Debergh, 1980; Pecaut et al., 1983), le manque de vigueur et l'hétérogénéité du rendement (La Malfa et Foury, 1971), l'intensification de la diffusion des maladies fongiques (Moncousin, 1982), bactériennes et virales et des coûts d'implantation élevés (Dridi, 2003). Tous ces inconvénients peuvent être surmontés par l'utilisation de la reproduction sexuée qui a de nombreux avantages tels que la possibilité de semis mécanique, la réduction des coûts de main-d'œuvre et la rotation avec d'autres espèces, pour lutter contre les maladies et les nématodes (BASNIZKI et ZOHARY, 1987, 1994).

Cependant, les graines de cette espèce montrent une grande variation du taux de levée, ce qui réduit l'uniformité des plantules, particulièrement lorsque la température est supérieure à 25 °C (Chaux et Foury, 1994 ; Khan, 1992). Selon la littérature, la production et la capacité à germer des akènes d'artichaut sont fortement influencées par l'année de production, l'âge de la plante mère, l'âge des akènes et les conditions environnementales lors de la formation de l'akène (Foury et al., 1978; Foury, 1989; Damato et Sarli, 2000). Des recherches antérieures (Damato et Calabrese, 1991 et 1992) ont montré que le pourcentage de germination est d'environ 65 % et il est plus faible chez les cultivars à pollinisation libre que dans les hybrides.

Par ailleurs, la multiplication par graines de l'artichaut issues d'une pollinisation incontrôlée ne peut pas être recommandée, car elle ne reproduit pas exactement les caractères de la plante mère, donnant de nombreuses plantes épineuses avec des capitules non comestibles, similaires au cardon (Ciancolini, 2012). Les variétés d'artichaut sont très hétérozygotes, lorsqu'elles sont multipliées par graines (BASNIZKI et Mayer, 1994). La possibilité d'obtention de variétés à propagation par graines a été ces derniers temps l'objectif de plusieurs recherches (Mauromicale et Ierna, 2000).

Dans ce sens et pour cerner les problèmes posés par les méthodes traditionnelles de multiplication de l'artichaut, la micropropagation est fortement recommandée. Cependant, l'application de cette technique pour l'artichaut a rencontré quelques difficultés, comme le taux élevé de contamination des explants (Lauzer et Vieth, 1990). En générale et durant la micropropagation, des pertes importantes se produisent en raison d'une contamination par des micro-organismes présents sur la surface des explants ou endophytes (champignons, bactéries) (Çölgeçen et al., 2011). Chaves et al. (2005) ont confirmé que l'un des obstacles les plus importants dans les cultures *in vitro* est la difficulté d'obtenir des tissus exempts de contamination ou lorsque l'asepsie est difficile à réaliser en raison des caractéristiques de l'explant ou sa proximité au sol, comme dans le cas de l'artichaut (Mauromicale, 1984). C'est pour ces raisons que nombreux auteurs ont remédié à la germination *in vitro* des graines comme point de départ pour la multiplication de l'artichaut (Benoit et Ducreux, 1981 ; Lauzer et Vieth, 1990 ; De Moraes et al., 2010).

La germination des graines *in vitro* est une technique alternative qui peut être utilisée pour produire des plantules indemnes d'infestations ou comme point de départ pour l'obtention des explants sains (plantules) pour un repiquage postérieur (De Moraes, 2007). Les graines fonctionnent généralement comme un “filtre” dans la propagation des maladies, en particulier les virus. Le processus de germination *in vitro* a été utilisé pour plusieurs espèces, par exemple les orchidées (Vasudevan et Van Staden, 2010), le pêcher (*Prunus persica* batsch) (Navarro et al., 1983 ; Rizzo et al., 1998) et le pois cultivé (*Pisum sativum* L.) (Cook et al., 1988).

Cependant, la difficulté de germination *in vitro* de graines d'artichaut et la contamination élevée des graines sont parmi les contraintes rencontrées au niveau de la micropropagation d'artichaut via la graine. La contamination *in vitro*, par des champignons, des bactéries ou des levures, est l'un des problèmes les plus graves de laboratoires de plantes commerciales et de recherche en culture de tissus. L'incapacité de contrôler les niveaux de contamination est la principale raison des échecs dans les laboratoires commerciaux (Niedz et Bausher 2002). La mise en place d'une culture *in vitro* nécessite l'élimination des contaminants fongiques et bactériens dans le matériel de plantation. Certaines études antérieures ont montré que la solution d'hypochlorite de sodium à différentes concentrations a été efficace dans la désinfection des semences d'espèces diverses.

La majorité des protocoles de désinfection des graines d'artichaut, décrite dans la littérature, a été basée sur l'utilisation de l'alcool ou l'éthanol (70°) suivi de l'hypochlorite de sodium à diverses concentrations (Benoit et Ducreux, 1981 ; Lauzer et Vieth, 1990 ; De

Moraes *et al.* 2010) ou l'hypochlorite de calcium filtré à 100 g/l (Bigot et Foury 1984) et cela pour une durée de 10 min. Étant donné que le développement d'un protocole de désinfection n'était pas le principal objectif de la majorité de ces travaux, nous n'avions aucune idée sur le degré de leur réussite. En testant plusieurs protocoles, De Moraes *et al.* (2010) sont arrivés à un pourcentage de contamination inférieur à 17% après l'utilisation de l'alcool (70°) et une solution contenant 2% de chlore actif.

Le tégument des graines offre une résistance physique ou chimique qui peut s'opposer à leur germination. L'enveloppe peut : être imperméable à l'eau (ex. : trèfle, luzerne) ; limiter l'entrée de l'oxygène (ex. : laitue, pommier) ; contenir des inhibiteurs de germination ; opposer une résistance mécanique (les téguments, trop durs, empêchent l'expansion de l'embryon et la sortie de la plantule, ex. : amarante).

Pour de nombreuses espèces à tégument dur comme c'est le cas pour l'artichaut (Vallée et Bilodeau, 1999), un prétraitement spécifique des graines est indispensable pour obtenir un taux de germination satisfaisant. D'après Ahoton *et al.* (2009), un prétraitement des graines ne les fait pas germer, mais il les rend capables de germer par la suite lorsque toutes les conditions nécessaires sont réunies. Debroux *et al.*, (1998) ont défini le prétraitement comme étant le traitement appliqué avant, durant ou après la conservation, afin d'éliminer la dormance par des effets différents (chimiques, mécaniques ou physiologiques) isolés ou associés. Les différents prétraitements appliqués aux semences pour favoriser leur germination sont constitués par des actions physiques (scarification, froid, chaleur sèche, exposition au soleil...), des actions chimiques (trempage dans un acide) et des actions mixtes (immersion dans l'eau bouillante). La plupart de ces prétraitements ont pour but de diminuer la résistance des téguments à la pénétration de l'eau dans la graine.

L'un des traitements chimiques utilisés pour favoriser la germination est l'application de certains régulateurs de croissance, tels que l'acide gibbérellique (AG<sub>3</sub>) (Baskin et Baskin, 1998). Les applications externes de l'AG<sub>3</sub> améliorent la germination des graines (Roychowdhury *et al.*, 2012). Durant le processus de germination, l'AG<sub>3</sub> est libéré de l'embryon et stimule les gènes spécifiques de la transcription de l'ARNm par l'α-amylase (Taiz et Zeiger, 2002).

Durant la germination, la racine principale pousse à travers les téguments de l'akène le deuxième ou le troisième jour. Une élongation rapide de la racine principale a lieu en premier, puis l'hypocotyle s'allonge et soulève les cotylédons, partiellement enfermés dans l'akène, au-dessus du sol. Les cotylédons se développent rapidement et fonctionnent comme des feuilles

charnues photosynthétiques pendant plusieurs jours avant que les premières feuilles n'apparaissent (Phillips, 1937).

Dans le but d'optimiser les conditions de germination *in vitro* et *in vivo* des graines d'artichaut et d'augmenter les explants sains pour l'établissement de futures cultures *in vitro*, cette étude a été menée. Plusieurs expériences ont été réalisées pour évaluer la germination *in vitro* et la contamination des graines de deux accessions d'artichaut (Art21 et Art22) avec des conditions différentes, dans le milieu de culture et dans la tourbe. L'étude de l'effet du génotype sur le taux de germination a fait l'objet d'une deuxième étude sur deux autres variétés (IJ et BR) dans la tourbe avec deux températures différentes (18 et 25°C) avec et sans traitement des graines par l'acide gibbérellique.

## I- Matériel et méthode

Toutes les tentatives d'initialisation de la culture *in vitro* à partir d'explants ont fini par donner des infections à cause probablement de la présence de microorganismes endogènes. Toutes nos prochaines expériences ont donc été réalisées à partir de germinations de graines en conditions aseptiques.

Les semences utilisées dans nos tests étaient : l'accession Art21 et Art22 et les variétés IJ et BR.

Pour récapituler les cinq expériences, qui seront dûment décrites, un résumé des procédures exécutées est présenté dans le tableau 9.

**Tableau 9:** Récapitulatif des expériences de germination des graines réalisées.

Numéro de l'expérience	Variété	Intérêt de l'expérience	Traitement	Présence ou absence du tégument	Substrat
1	Art21	Protocole de désinfection	P1/P2/P3*	Présence	Milieu MS**
2	Art21/Art22	Prétraitements germinatifs	P3	Présence	Milieu MS
3	Art21/Art22	Effet du tégument	P3	Absence/Présence	Milieu MS
4	Art21/Art22	Effet du substrat	P3	Présence	MS/tourbe
5	IJ / BR	- Effet du traitement par l'AG <sub>3</sub> (absence/présence) - Effet de température : 18 et 25 °C	-	Présence	Tourbe

\* : les protocoles utilisés (P1, P2 et P3) sont décrits en (I-1)

\*\* : la composition du milieu utilisé est décrite en (I-2)

### 1- Désinfection des graines

Au niveau de cette partie, nous avons testé trois protocoles de désinfection visant l'élimination de toute sorte de contamination que peuvent contenir nos graines. Vu que nous avons reçu en premier lieu les graines de l'accession Art21 avant l'accession Art22, les essais de désinfection ont été effectués avec seulement Art21. Avant chaque désinfection, les graines ont été maintenues immergées dans l'eau pendant une période de 24 heures pour ramollir les téguments (Lauzer et Vieth, 1990).

**Protocole 1 :** La démarche d'asepsie a consisté l'immersion des graines dans la solution d'eau de Javel à 1 % plus trois gouttes de l'agent mouillant Tween 20<sup>(1)</sup> pendant 15 min et trois lavages de 10 min avec l'eau distillée stérile.

<sup>1</sup> : Tween 20 est un mouillant offrant un bon effet émulsifiant favorisant la désinfection

**Protocole 2 :** Les graines sont immergées dans l'éthanol 70 % pendant 30 min puis trempées dans la solution d'eau de Javel à 1 % avec le Tween 20 pendant 10 min suivie de trois lavages de 10 min avec l'eau distillée stérile.

**Protocole 3 :** Les graines ont été désinfectées par un passage dans une solution de  $\text{HgCl}_2$  (0,5 %) pendant 5 min, suivi par un lavage de 5 min dans l'eau distillée stérile et une immersion dans la solution d'eau de Javel à 1 % avec trois gouttes de Tween 20 pendant 15 min. Ensuite, les graines ont été rincées trois fois à l'eau distillée stérile.

Après la désinfection, les graines ont été placées dans des boites de Pétri contenant du papier filtre "Whatman" imbibé d'eau distillée stérile avant d'être placer dans la chambre de culture.

L'incubation des boites à Pétri a été effectuée dans une chambre sous une température de  $25 \pm 1$  °C à l'abri de la lumière. La germination des graines sur papier filtre "Whatman" en boite de Pétri est suivie par le transfert des plantules obtenues dans des tubes stériles contenant 20 ml du milieu MS, afin de poursuivre leur croissance.

Les paramètres enregistrés après deux mois de culture étaient le nombre de graines germées et celles contaminées.

## **2- Milieu de germination**

Durant toutes les expériences de germination et quand le semis est effectué sur le milieu de culture, nous avons utilisé le milieu décrit par [Lauzer et Vieth \(1990\)](#) qui contient les sels de Murashige et Skoog ([Murashige et Skoog, 1962](#)), 30 g/l de saccharose et 0,3% de phytigel à la place de 8 g/l de l'agar. Le pH de ce milieu est ajusté à 5,6 avec NaOH 1N, avant d'être autoclavé à 121 °C pendant 20 min et coulé soit dans des tubes à raison de 20 ml par tube (3 cm de diamètre) ou dans des bocaux à raison de 30 ml par bocal (6,5 cm de diamètre).

## **3- Germination de l'accession Art21 et Art22**

### **3-1- Traitements prégerminatifs (prétraitements)**

Les graines de l'artichaut présentent des téguments durs, ce qui nous a incités à tester l'effet de plusieurs traitements inspirés de la littérature (Acide sulfurique,  $\text{AG}_3$ , basse température, papier abrasif...) sur les graines des deux accessions Art21 et Art22. Ces traitements ont été essayés pour d'autres espèces ayant des graines à tégument dur comme celui de l'artichaut.

Des lots de semences de *Cynara cardunculus* var. *scolymus* ont été soumis à cinq traitements prégerminatifs avant d'être placées dans des boites de Pétri sur du papier

Whatman imbibé d'eau stérile : (1) Incubation pendant une semaine à 4°C ; (2) Trempage dans l'acide sulfurique concentré (95-97°) pendant 30 min ; (3) ébouillantage dans de l'eau chaude pendant 15 minutes ; (4) Immersion de 24 h dans l'eau distillée stérile avec 3 mg/l de l'acide gibberellique ; (5) Scarification manuelle des graines à l'aide de papier abrasif stérilisé (Jaouadi *et al.*, 2010). Les résultats de ces traitements ont été comparés à un témoin non traité.

Le premier traitement a été précédé par une désinfection des graines selon le protocole 3 comme décrit précédemment (I-1), tandis que pour les quatre autres traitements, les graines ont été désinfectées, selon le même protocole, après avoir été prétraitées.

Après ces prétraitements, les graines ont été placées dans des boîtes de Pétri contenant le papier Whatman imbibé d'eau distillée stérile à raison de 5 graines par boîte. Elles sont incubées en chambre de culture à l'obscurité sous une température de 25 °C et une fois germées, les graines sont transférées par la suite dans des bocaux contenant le milieu de germination MS sous éclairage pour continuer leur croissance.

### **3-2- Germination sur milieu de culture des graines avec et sans téguments**

Cette expérience a été réalisée afin de comparer l'effet de l'absence et la présence du tégument sur la germination de nos graines. Après la désinfection des graines de l'accession Art21 et Art22 suivant le 3<sup>ème</sup> protocole (I-1), une partie de ces graines a été cultivée sur le milieu de germination MS sans l'enlèvement du tégument. La deuxième partie des graines a subi un enlèvement des téguments puis une nouvelle désinfection par la solution d'eau de javel (1 %) pendant 5 min suivie de trois lavages rapides et enfin la mise en culture sur le milieu de germination. La désinfection après l'enlèvement des téguments a été réalisée suite à un recours à l'élimination manuelle de ces derniers difficilement manipulables par les pinces et le scalpel.

Les graines dépourvues ou non de téguments ont été cultivées dans des tubes à raison d'une graine par tube. Ces derniers ont été maintenus dans la chambre de culture à 25 °C à l'abri de la lumière jusqu'à la germination des graines, puis éclairés avec une photopériode de 16 h.

### **3-3- Germination dans la tourbe et sur milieu de culture**

Dans cette expérience, nous avons testé la germination des graines de l'accession Art21 et Art22 à la fois sur le milieu de culture et dans la tourbe. L'expérience a été réalisée sur des graines désinfectées selon le protocole 3. Le semis a été effectué dans des alvéoles remplis de tourbe stérilisée à l'autoclave à 121 °C pendant 30 min. En parallèle, d'autres graines des

deux accessions ont été mises en culture sur le milieu de germination MS. Nos cultures ont été gardées dans la chambre de culture à 25 °C.

Après 30 jours de semis, nous avons évalué le pourcentage de graines germées dans les deux essais ainsi que le délai de germination.

#### **4- Germination des variétés IJ et BR**

La réception décalée des graines de la variété IJ et BR (**Fig. 20 a, b, c**) nous a obligés de faire les essais de germination de ces deux variétés séparément de ceux de l'accession Art21 et Art22. Les conditions de germination dans la tourbe de BR et IJ nous ont été recommandées par le fournisseur.



**Figure 20 :** graines de l'artichaut ; **a)** variété IJ ; **b)** variété BR ; **c)** capitules des deux variétés.

##### **4-1- Germination dans la tourbe avec et sans traitement par l'AG3 à deux températures différentes**

Les graines sont rincées trois fois à l'eau distillée stérile pendant 20 min, puis, elles sont incubées à 4 °C dans l'eau distillée stérile, avec et sans l'acide gibbérellique à 0,6 %. Après une semaine d'incubation, les graines sont séchées puis semées dans la tourbe à une profondeur comprise entre 1 et 2 cm. Enfin, les alvéoles sont placées dans deux chambres séparées dont la température est maintenue à 25 °C dans l'une et à 18 °C dans l'autre. Un bon arrosage est nécessaire surtout pour les alvéoles placées à 25 °C. Après la germination, les plantules ont été transplantées dans des pots plus grands, contenant un substrat formé par un tiers d'argile et deux tiers de sable, et placées sous serre afin de poursuivre leur croissance.

Un suivi journalier de la germination a été effectué avec l'enregistrement des paramètres suivants : début et fin de germination, nombre de graines germées. Quarante graines de chaque variété ont été utilisées dans chaque traitement avec quatre répétitions.

#### **4-2- Germination sur milieu de culture**

Afin d'évaluer la réactivité des graines de BR et IJ sur le milieu de culture et d'en avoir directement des vitroplants, ces dernières ont été cultivées sur le milieu MS contenant 30 g/l de saccharose. Les bocaux contenant les graines sont placés à 25 °C et à 18 °C.

Avant la mise en culture, les graines ont été désinfectées selon le protocole 3 par l'utilisation de l'HgCl<sub>2</sub> à 0,5% et la solution d'eau de Javel à 1% (voir I-1).

Quarante graines de chaque variété avec quatre répétitions ont été utilisées dans cette expérience.

### **5- Observations et analyses statistiques**

#### **5-1- Accession Art21 et Art22**

Pour les accessions Art21 et Art22, chaque traitement a été réalisé avec trois répétitions à raison de 10 graines par répétition réparties dans deux boîtes (5 graines/boîte).

Les données relatives à chaque essai ont fait l'objet d'une analyse de variance à un seul facteur à l'aide du programme Statistica (v 10) puis, si nécessaire, un classement des moyennes a été effectué à l'aide du test de Duncan. Il s'agit, selon les cas, de l'effet prétraitement (à savoir : incubation à basse température ; eau bouillante, immersion en AG3 ; scarification manuelle et acide sulfurique par comparaison au témoin), de l'effet tégument (présence ou absence) et de l'effet substrat (milieu ou tourbe).

#### **5-2- Variété IJ et BR**

Les paramètres suivants ont été déterminés :

- Pourcentage de germination :  $P = (G/N) * 100$ , avec G= nombre de graines germées, N= nombre de graines mises à germer par traitement.
- Délai de germination (délai d'attente) : temps écoulé entre le jour du semis et le jour de la première germination ;
- Durée de germination : délai ou temps écoulé entre la première et la dernière germination ;
- Taux de germination journalier ou vitesse de germination :  $T = G/d$  avec G= nombre de graines germées et d= la durée de germination ;

Les valeurs moyennes, les pourcentages et les écarts-types des paramètres examinés ont été calculés. La différence entre les valeurs enregistrées a été mesurée par une analyse de la variance (ANOVA) et par le test de Duncan pour le classement des moyennes ([Duncan, 1955](#)).

## II- Résultats

### 1- Désinfection des graines

Le tableau 10 regroupe les différents résultats obtenus concernant le pourcentage de germination ainsi que celui de contamination pour les différents essais de développement d'un protocole de désinfection efficace pour nos graines.

Le pourcentage de contamination, contrairement à la germination, était assez élevé (**tableau 10**). Selon l'analyse de la variance, il y avait un effet hautement significatif du type de protocole sur le pourcentage de graines contaminées évaluées ainsi que le pourcentage de germination (**tableau 10**).

Le pourcentage de contamination des semences après 25 jours, varie de 0% dans le cas du protocole 3, à 33% dans le cas du 2<sup>ème</sup> protocole et à 66% dans le cas du 1<sup>er</sup> protocole (**Figure 21 a, b**). Dans ces deux protocoles de désinfection, la contamination des semences était plus grande que dans l'expérience 3. Ceci devrait probablement être dû à l'incapacité de la solution d'eau de Javel pour assurer la désinfection des semences. L'utilisation de l'HgCl<sub>2</sub>, au niveau du protocole 3, a montré une nette efficacité contre les contaminations présentant sur les graines utilisées (**Figure 21 c**).

**Tableau 10:** Comparaison entre les différents protocoles de désinfection effectués sur les graines et le % de germination qui en découle.

Protocole de désinfection	% de contamination	% de germination
Protocole 1 <sup>*</sup>	66,6 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>
Protocole 2 <sup>**</sup>	33,3 <sup>ab</sup>	5 <sup>b</sup>
Protocole 3 <sup>***</sup>	0 <sup>b</sup>	12 <sup>a</sup>

\* : Solution d'eau de Javel 1 % pendant 15 min ; trois lavages de 10 min.

\*\* : Éthanol 70 % pendant 30 min ; Solution d'eau de Javel 1 % pendant 10 min ; trois lavages de 10 min.

\*\*\* : HgCl<sub>2</sub> 0,5 % pendant 5 min ; lavage de 5 min ; Solution d'eau de Javel 1 % pendant 15 min ; trois lavages de 10 min.

Les moyennes suivies de la même lettre au sein des colonnes ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan (p=0,05).



**Figure 21 :** Graines de l'accession Art21 désinfectées et mises en culture sur du papier whatman dans des boîtes de Pétri ; **a)** graines désinfectées selon le protocole 1 (totalement contaminées) ; **b)** graines désinfectées selon le protocole 2 (légèrement infectées) ; **c)** graines désinfectées selon le protocole 3 (pas de contamination).

## 2- Germination de l'accession Art21 et Art22

### 2-1- Traitements prégerminatifs (prétraitements)

#### a- Influence des traitements prégerminatifs appliqués sur le pourcentage de germination

Les résultats obtenus en ce qui concerne les pourcentages de germination des lots de graines ayant subi les différents traitements prégerminatifs sont présentés dans le tableau 11.

**Tableau 11:** Pourcentage des graines germées des deux accessions après chaque prétraitement

Prétraitement	% de germination	
	Art21	Art22
Témoin sans prétraitement	9 <sup>c</sup>	11 <sup>c</sup>
Incubation pendant une semaine à 4 °C	29 <sup>a</sup>	33 <sup>a</sup>
Trempe dans l'acide sulfurique concentré pendant 30 min	15 <sup>b</sup>	19 <sup>b</sup>
Ébouillantage dans de l'eau chaude pendant 15 min	0,00 <sup>d</sup>	0,00 <sup>d</sup>
Immersion de 24 h dans l'eau distillée stérile avec 3 mg/l de l'acide gibberellique	0,00 <sup>d</sup>	0,00 <sup>d</sup>
Scarification manuelle des graines à l'aide du papier abrasif stérilisé	0,00 <sup>d</sup>	0,00 <sup>d</sup>

Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan ( $p=0,05$ ).

L'examen du tableau 11 montre qu'un lot de graines n'est pas homogène et entre 9 % et 11 % des graines Art21 et Art22 sont aptes à germer sans prétraitement. Ce tableau montre également que certains prétraitements ont affecté significativement le pourcentage moyen de germination des graines de l'artichaut. Les taux de germination obtenus sont systématiquement plus élevés dans le cas de l'incubation des graines à 4 °C (**Figure 22 a**). Par contre, un faible taux de germination a été noté après un trempage de 30 minutes des graines dans l'acide sulfurique concentré, ceci s'expliquerait par le fait que la majorité des

embryons des graines seraient détruits après la longue durée d'immersion des graines dans l'acide sulfurique concentré (**Figure 22 b**).

Les différents taux nuls, observés au niveau de certains prétraitements, montrent que ceux-ci ne favorisent pas la germination des graines des deux accessions de l'artichaut. De même, la chaleur humide reçue par les graines au cours de leur traitement par ébouillantage dans de l'eau chaude n'a pas ramolli le tégument des graines.

#### **b- Délai de germination**

Le tableau 12 donne le délai moyen de germination (nombre de jours entre le semis et la première germination) en fonction des traitements appliqués.

À travers l'analyse des données de ce tableau, il ressort de cela que les prétraitements effectués ont permis aux graines d'avoir un temps d'attente plus réduit par rapport à celles non traitées. Le meilleur temps moyen de germination est noté pour le prétraitement de l'incubation pendant une semaine à 4 °C : 9 jours et 11 jours pour Art22 et Art21 successivement (**Tableau 12**). Cette incubation à 4 °C a permis d'avoir un démarrage plus rapide de la germination, comparativement avec les autres prétraitements testés et ceux pour les deux accessions (Art21 et Art22). Ces résultats sont confirmés par l'analyse de la variance qui a révélé un effet prétraitement très hautement significatif sur les temps moyens de germination ( $p=0,05$ ). De ce fait, l'incubation pendant une semaine à 4 °C des graines a été un atout pour le déclenchement de la germination de celles-ci.

**Tableau 12:** Délais en jours entre le semis et la première germination pour chaque traitement

Prétraitement	Délai moyen de germination en jours	
	Art21	Art22
Témoin sans traitement	27,33 <sup>a</sup> ± 1,12	25,33 <sup>a</sup> ± 1,23
Incubation pendant une semaine à 4 °C	10,67 <sup>c</sup> ± 0,98	9 <sup>c</sup> ± 1,09
Trempe dans l'acide sulfurique concentré pendant 30 min	17,33 <sup>b</sup> ± 1,06	15 <sup>b</sup> ± 1,33

Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan ( $p=0,05$ ).

#### **c- Durée moyenne de germination**

Le tableau 13 présente la durée moyenne de germination des graines en fonction des traitements réalisés.

De l'analyse de données, nous constatons que l'échelonnement de germination des graines varie de 13 à 41 jours (**Tableau 13**). La durée moyenne des germinations est très longue au niveau du témoin (graines non traitées), 41 et 34,67 jours pour Art21 et Art22

respectivement, alors qu'elle est clairement plus courte au niveau des graines traitées (13-15 jours pour Art21 et Art22 successivement). L'analyse statistique montre l'existence d'une différence très hautement significative entre les traitements. Les graines ayant subi une incubation à 4 °C comme prétraitement avant la mise en culture ont des durées moyennes de germination plus courtes.

**Tableau 13:** Durée moyenne de germination pour chaque traitement, en jours.

Prétraitement	Durée moyenne de germination en jours	
	Art21	Art22
Témoin sans traitement	41 <sup>a</sup> ± 1,12	34,67 <sup>b</sup> ± 1,21
Incubation pendant une semaine à 4 °C	15 <sup>de</sup> ± 1,53	13 <sup>e</sup> ± 1,44
Trempeage dans l'acide sulfurique concentré pendant 30 min	27 <sup>c</sup> ± 1,66	19 <sup>d</sup> ± 0,98

Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan (p=0,05).



**Figure 22 :** Graines prétraitées et mises en culture dans des boîtes de Pétri sur du papier whatman ; **a)** Graines ayant subi une incubation d'une semaine à 4 °C avant d'être transférées à 25 °C, présentant un début de germination ; **b)** Graines prétraitées par l'acide sulfurique présentant des graines endommagées par l'acide.

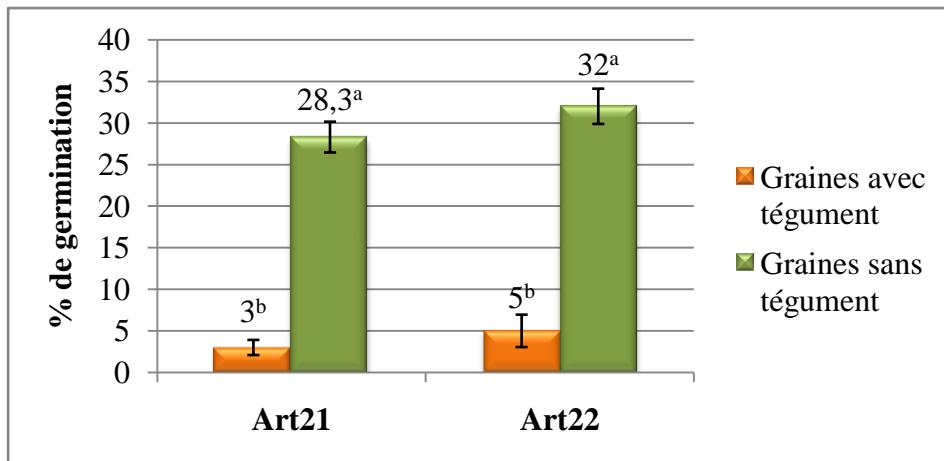
## 2-2- Comparaison de la germination sur milieu de culture des graines avec et sans téguments

Le pourcentage de graines germées de chaque accession, en présence ou en absence du tégument, est représenté dans la Figure 23. Alors que la figure 24 représente le délai requis par ces graines pour commencer la germination.

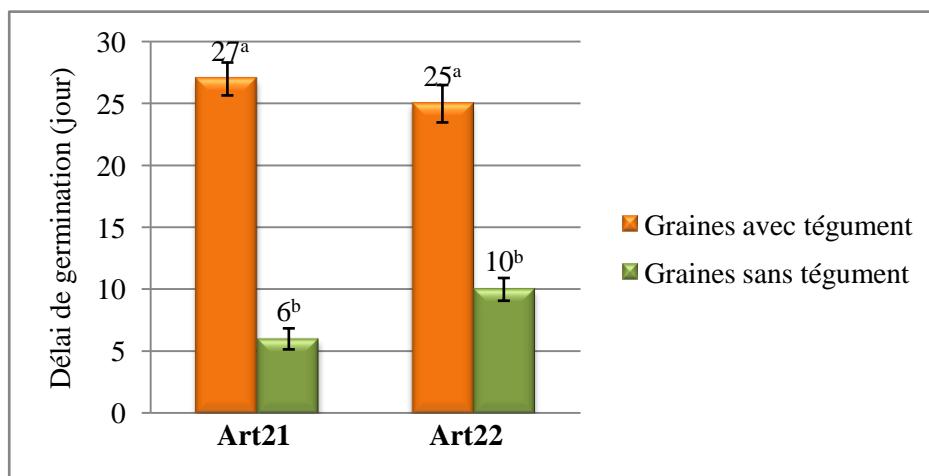
Le pourcentage de graines avec une rupture du tégument n'a pas été satisfaisant, allant en moyenne de 3 % pour Art21 à 5 % pour Art22 (**fig. 23**). Bien que les différences soient hautement significatives, une tendance à de meilleurs résultats en éliminant les téguments n'a

pas été observée, car les pourcentages obtenus n'ont pas dépassé 35% et ceux pour les deux accessions (28,3% pour Art21, à 32% pour Art22) (**fig. 23**).

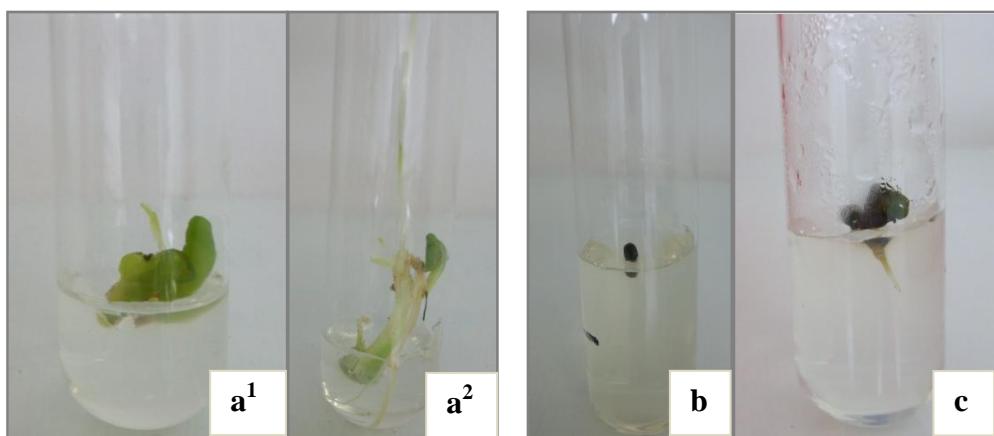
Au moment où les graines avec téguments prennent plus de 20 jours pour commencer la germination, avec les graines sans téguments, le délai de germination a significativement diminué de 27 à 6 jours pour Art21 et de 25 à 10 jours pour Art22 (**fig. 24, 25a et b et 26**).



**Figure 23:** Comparaison du pourcentage de germination des graines des deux accessions avec et sans téguments. (Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan ( $p=0,05$ )).



**Figure 24:** Comparaison du délai de germination des graines des deux accessions avec et sans téguments. (Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan ( $p=0,05$ )).



**Figure 25 :** Graines d'artichaut (accession Art21) mises en culture sur le milieu MS ; **a)** Germination des graines sans téguments (a<sup>1</sup> : 10 jours, a<sup>2</sup> : 15 jours) ; **b)** Graines avec tégument sur milieu de culture (15 jours) ; **c)** Début de germination d'une graine avec tégument sur milieu de culture (29 jours).

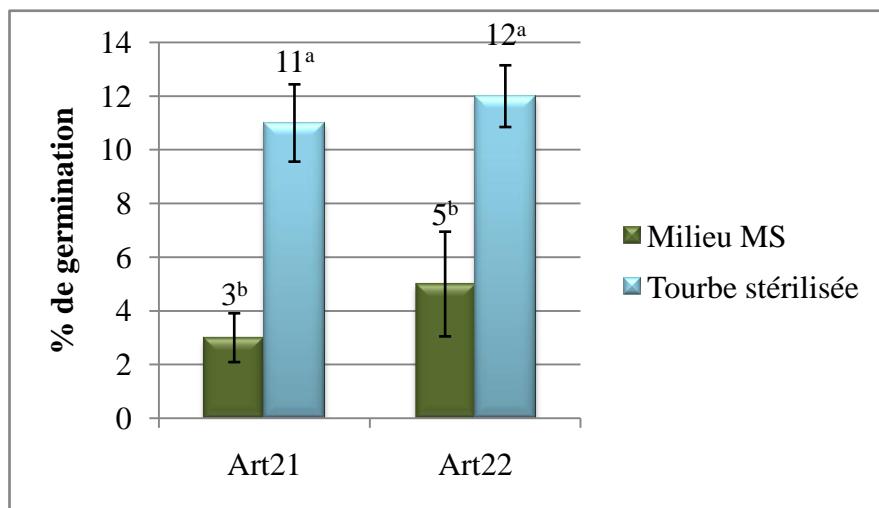


**Figure 26 :** Germination d'une graine d'artichaut (accession Art22) mise en culture sur le milieu MS sans tégument (34 jours)

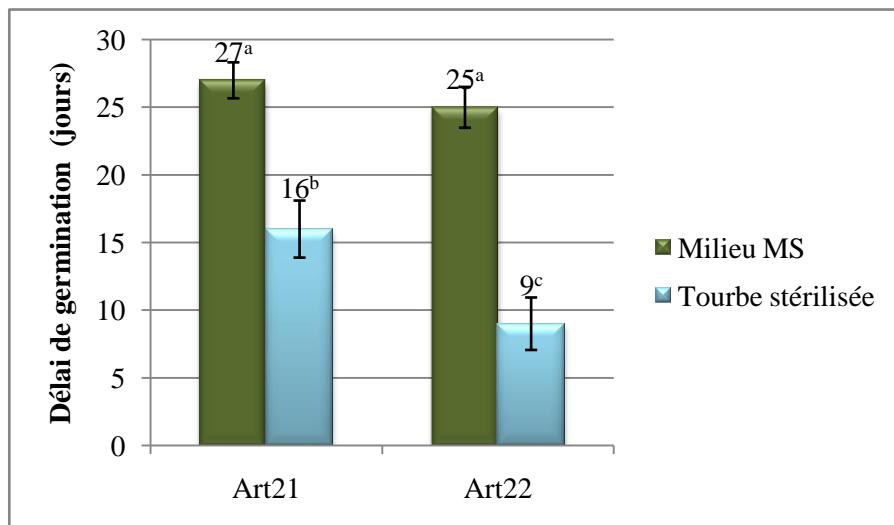
### 2-3- Comparaison de la germination dans la tourbe et sur milieu de culture

En réponse au faible pourcentage de germination obtenu dans les expériences précédentes, nous avons essayé dans cette partie, la germination dans la tourbe pour comparer les résultats à ceux de la germination sur milieu de culture. Les figures 27 et 28 ci-dessous illustrent les pourcentages ainsi que le délai de germination pour les deux accessions.

Les résultats montrent qu'il y a une différence hautement significative pour les deux accessions en ce qui concerne le pourcentage de germination dans la tourbe et sur milieu. Les pourcentages obtenus dans la tourbe sont significativement élevés par rapport à ceux sur milieu, mais ils restent encore faibles et ne dépassent pas 50% (**fig. 27**). De même pour le délai de germination, une différence très hautement significative a été remarquée pour les deux accessions et les meilleurs délais ont été notés dans le cas de l'utilisation de la tourbe pour la germination de nos graines, 16 et 9 jours pour l'accession Art21 et Art22 contre 27 et 25 jours successivement (**fig. 28 et 29**).



**Figure 27:** Comparaison des pourcentages de germination des deux accessions dans la tourbe et sur milieu de culture MS. (Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan ( $p=0,05$ )).



**Figure 28:** Comparaison des délais de germination des deux accessions dans la tourbe et sur milieu de culture MS. (Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan ( $p=0,05$ )).



**Figure 29 :** Germination des graines d'artichaut dans la tourbe ; **a)** l'accession Art21 (3 jours) ; **b)** l'accession Art22 (5 jours).

### 3- Germination des variétés IJ et BR

Pour étudier l'effet du génotype sur la germination des graines de l'artichaut et afin de cerner les problèmes de la viabilité, la vigueur et l'inhibition tégumentaire rencontrés précédemment, un deuxième lot de semences a été testé. Ce lot est composé des graines de l'année de deux variétés codées IJ et BR, fournies par Rusty JORDAN (BHS, Brawley, Californie, USA).

Suite à l'absence de réactivité des graines des deux variétés sur milieu de culture, que ce soit à 18 °C ou à 25 °C, nous allons développer dans cette partie seulement les résultats de la germination des graines de BR et IJ dans la tourbe.

Les graines de ces deux variétés ont subi un traitement par l'acide gibbérellique pendant une semaine à 4 °C pour être comparées à des graines non traitées par l'AG<sub>3</sub>. La germination a été effectuée dans la tourbe sous deux températures différentes (18 et 25 °C), afin de déduire l'effet de la température sur la germination des graines étudiées. Les résultats de cette étude sont présentés au niveau du tableau 14.

**Tableau 14:** Comparaison de la germination des graines avec ou sans traitement par l'AG<sub>3</sub> à deux températures

Traitemen t	Graines non traitées avec l'AG <sub>3</sub>		Graines traitées avec l'AG <sub>3</sub>	
	T 18 °C	T 25 °C	T 18 °C	T 25 °C
<b>% de germination</b>				
IJ	47,5 <sup>abc</sup> ± 9,57	60 <sup>ab</sup> ± 16,33	65 <sup>a</sup> ± 19,15	17,5 <sup>d</sup> ± 9,57
BR	55 <sup>abc</sup> ± 5,77	37,5 <sup>c</sup> ± 17,08	57,5 <sup>abc</sup> ± 17,08	40 <sup>bc</sup> ± 0,00
<b>Délai moyen de germination (jours)</b>				
IJ	10,24 <sup>a</sup> ± 1,34	7,89 <sup>a</sup> ± 3,25	9,08 <sup>a</sup> ± 0,48	6,63 <sup>a</sup> ± 0,48
BR	7,78 <sup>a</sup> ± 1,46	9,42 <sup>a</sup> ± 4,52	7,45 <sup>a</sup> ± 0,86	9 <sup>a</sup> ± 3,54
<b>Durée moyenne de germination (jours)</b>				
IJ	4,75 <sup>a</sup> ± 2,36	12,5 <sup>a</sup> ± 13,67	4 <sup>a</sup> ± 2,16	6,25 <sup>a</sup> ± 0,96
BR	4 <sup>a</sup> ± 2,83	10 <sup>a</sup> ± 4,08	5 <sup>a</sup> ± 4,69	11,75 <sup>a</sup> ± 8,38
<b>Taux de germination journalier (graines/jour)</b>				
IJ	1,12 <sup>abc</sup> ± 0,34	0,91 <sup>bc</sup> ± 0,55	2,15 <sup>a</sup> ± 1,30	0,29 <sup>c</sup> ± 0,15
BR	1,88 <sup>ab</sup> ± 1,05	0,45 <sup>c</sup> ± 0,37	1,77 <sup>ab</sup> ± 0,96	0,56 <sup>c</sup> ± 0,41
<b>Taux de germination pendant les 5 premiers jours (graines/jours)</b>				
IJ	0 <sup>b</sup> ± 0,00	0,41 <sup>a</sup> ± 0,26	0 <sup>b</sup> ± 0,00	0,05 <sup>b</sup> ± 0,10
BR	0 <sup>b</sup> ± 0,00	0,16 <sup>b</sup> ± 0,24	0 <sup>b</sup> ± 0,00	0,19 <sup>b</sup> ± 0,17
<b>Taux de germination entre le 6<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour (graines/jours)</b>				
IJ	0,65 <sup>ab</sup> ± 0,37 (58 %)	0,5 <sup>b</sup> ± 0,39 (54 %)	1,81 <sup>a</sup> ± 1,14 (84 %)	0,24 <sup>b</sup> ± 0,13 (82 %)
BR	1,81 <sup>a</sup> ± 1,14 (96 %)	0,22 <sup>b</sup> ± 0,22 (48 %)	1,75 <sup>a</sup> ± 1,00 (98 %)	0,34 <sup>b</sup> ± 0,31 (60 %)

<b>Taux de germination entre le 11<sup>ème</sup> et le 15<sup>ème</sup> jour (graines/jours)</b>				
IJ	0,44 <sup>a</sup> ± 0,15	0 <sup>b</sup> ± 0,00	0,35 <sup>a</sup> ± 0,33	0 <sup>b</sup> ± 0,00
BR	0,06 <sup>b</sup> ± 0,13	0 <sup>b</sup> ± 0,00	0 <sup>b</sup> ± 0,00	0 <sup>b</sup> ± 0,00

Les valeurs représentent les moyennes ± les écarts types

Les moyennes suivies de la même lettre au sein des lignes ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan (p=0,05).

### **3-1- Pourcentage de germination**

Les taux de germination obtenus ont varié entre 17,5 % et 65 %. Les résultats représentés révèlent une différence très hautement significative au niveau de ces taux des deux variétés. Ainsi, les meilleurs pourcentages 65 % et 57,5 % sont enregistrés chez IJ et BR respectivement après un traitement par l'AG<sub>3</sub> et une incubation à 18 °C. Un autre pourcentage important a été noté chez IJ sans traitement par l'AG<sub>3</sub> et une incubation à 25 °C.

La germination de la variété BR à 18 °C soit avec ou sans traitement par l'AG<sub>3</sub> n'a montré aucune différence significative, de même pour une germination à 25 °C ce qui montre que le traitement par l'AG<sub>3</sub> n'affecte pas la germination, mais agit positivement sur les jeunes plantules. Pour la variété IJ, le pourcentage de germination est passé de 47,5 % sans traitement à 65 % avec traitement par l'AG<sub>3</sub> et cela pour l'incubation à 18 °C, tandis que pour une incubation à 25 °C, nous avons obtenu une diminution très hautement significative du pourcentage après le traitement. De ces résultats, nous avons remarqué que la variété IJ a montré deux réponses différentes au traitement de l'AG<sub>3</sub> et cela en fonction de la température d'incubation ; pour 25 °C le traitement par l'AG<sub>3</sub> semble inutile, alors que pour une meilleure germination à 18 °C, l'utilisation de l'AG<sub>3</sub> est nécessaire.

### **3-2- Délai de germination**

Les délais de germination enregistrés durant cette expérience (**tableau 14**) vont de 6,63 à 10,24. L'analyse de ces données ne montre aucune différence significative. On peut conclure que sous les deux températures, et avec ou sans traitement par l'acide gibbérellique, le délai de démarrage de germination des graines n'est pas affecté par ces derniers paramètres.

### **3-3- Durée de germination**

Les durées de germination moyennes ont varié de 4 à 5 jours pour la température 18 °C et de 6,25 à 12,5 pour la température 25 °C. Une analyse statistique de ces durées, moyennant le test de Duncan, n'a révélé aucune différence significative (**tableau 14 ; Figure 30, 31**).

Une incubation des graines à 18 °C a maintenu la durée de germination à un maximum de 5 jours, et ce pour les graines des deux variétés traitées ou non par l'AG<sub>3</sub> (**tableau 14 ; Figure 32**). Quant aux graines incubées à 25 °C, nous avons noté que pour la variété IJ, la durée est passée de 12,5 à 6,25 après un traitement par l'AG<sub>3</sub> voir une diminution de moitié,

bien que la variété BR n'a pas enregistré une grande variation de cette durée entre les graines traitées et non traitées par l'AG<sub>3</sub>. Donc, une utilisation de l'AG<sub>3</sub> dans le cas de la variété IJ apparait nécessaire pour diminuer la durée de germination afin d'avoir une levée homogène.

### **3-4- Taux de germination (graines/jour)**

L'analyse des résultats du taux journalier de germination ou la vitesse de germination a montré des différences hautement significatives entre les deux variétés, ces différences sont plus prononcées au niveau de la variété IJ et pour les deux paramètres étudiés (température, AG<sub>3</sub>) (**tableau 14**).

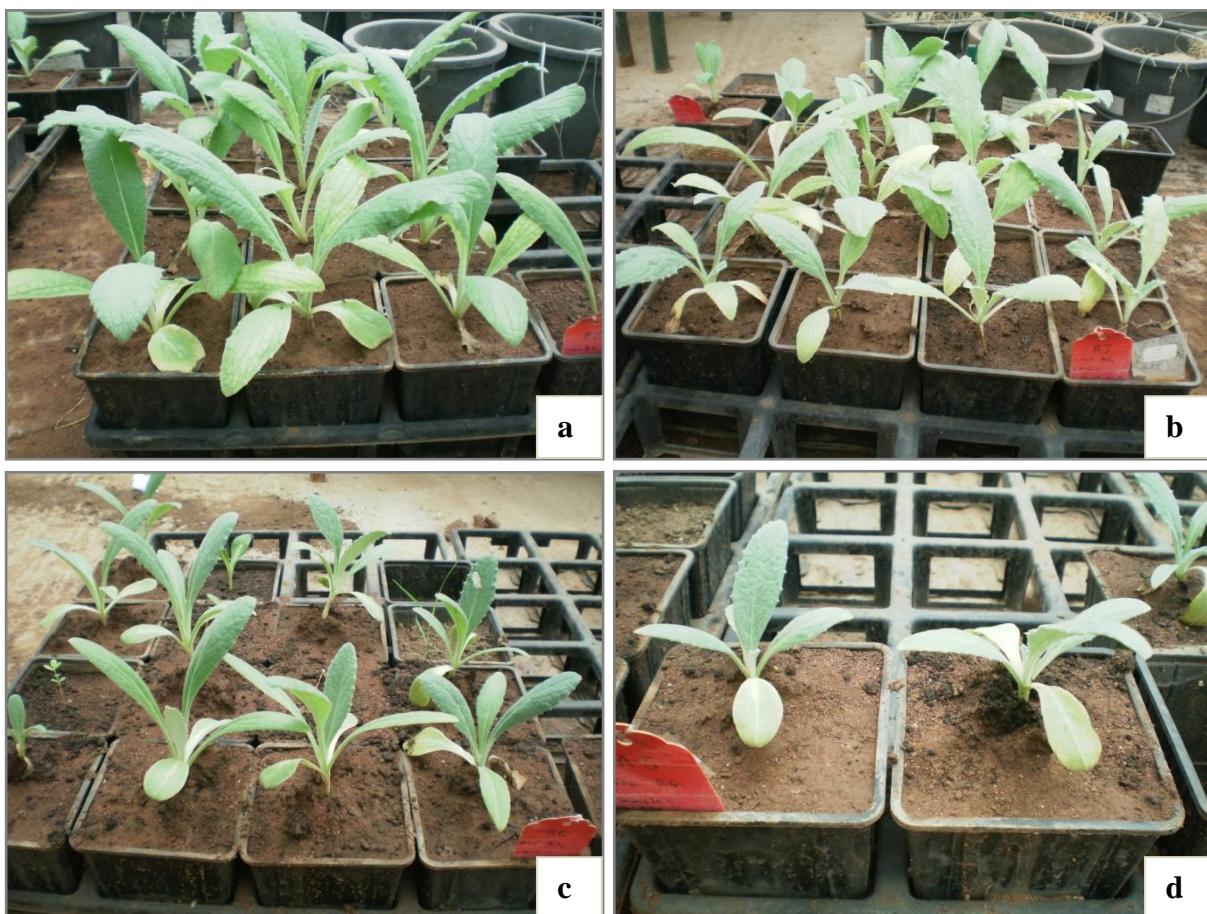
Pour la variété IJ, le traitement par l'AG<sub>3</sub> a donné deux réponses différentes selon la température d'incubation ; une augmentation significative du taux de germination des graines incubées à 18 °C (2,15 graines/jour) et une diminution significative après incubation à 25 °C (0,29 graine/jour). Alors pour la variété BR, le taux n'est pas affecté par le traitement par l'AG<sub>3</sub> (ex : 1,88 sans AG<sub>3</sub> et 1,77 avec AG<sub>3</sub> à une température de 18 °C).

La vitesse de germination des lots est affectée de manière significative par la température utilisée lors de l'incubation ; au niveau des deux variétés et pour les graines traitées ou non par l'AG<sub>3</sub> ; les taux de germination les plus élevés sont enregistrés chez les graines incubées à 18 °C, alors qu'une diminution hautement significative a été notée pour les graines incubées à 25 °C.

Nous avons constaté que la vitesse de germination est maximale entre le 6<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour, quelque soient le traitement et la température. Nous avons constaté également que le traitement avec l'AG<sub>3</sub> avait cerné la germination entre le 6<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour, puisque le pourcentage des graines germées au cours de cette période a augmenté surtout pour la variété IJ après application de l'AG<sub>3</sub> (84 % au lieu de 58 % à 18 °C, et 82 % au lieu de 54 % à 25 °C).

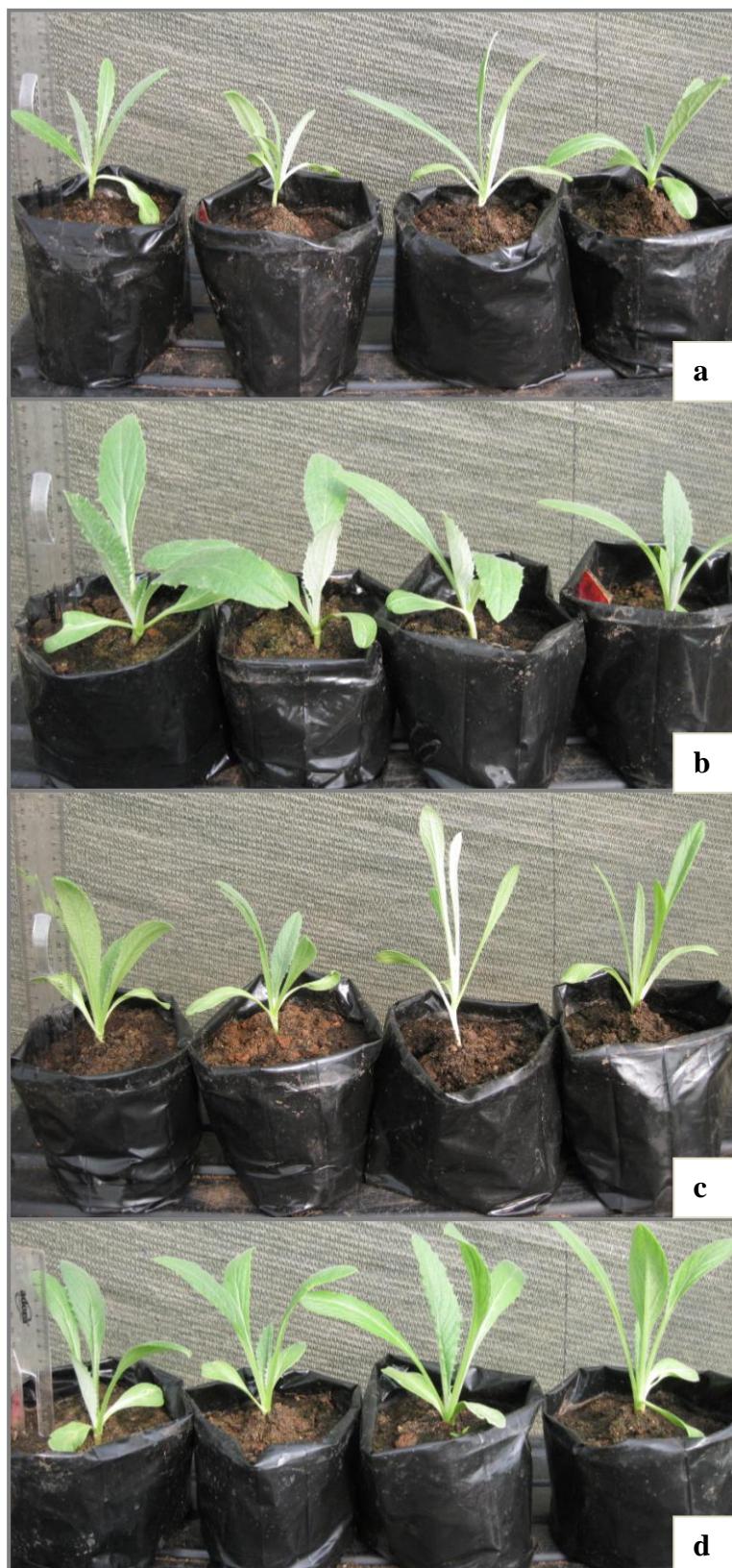


**Figure 30 :** Début de germination des graines de l'artichaut traitées par l' $\text{AG}_3$  et incubées à 25 °C ; **a)** variété IJ ; **b)** variété BR.



**Figure 31 :** Évolution des plantules provenant de la germination des graines de l'artichaut à 25 °C ; **a)** variété BR non traitée par  $\text{AG}_3$  (50 jours<sup>2</sup>) ; **b)** variété IJ non traitée par  $\text{AG}_3$  (50 jours) ; **c)** variété BR traitée par  $\text{AG}_3$  (39 jours) ; **d)** variété IJ traitée par  $\text{AG}_3$  (38 jours).

<sup>2</sup> Age de plantules après la levée



**Figure 32 :** Évolution des plantules provenant de la germination des graines de l'artichaut à 18 °C âgées de 32 jours ; **a)** variété II traitée par AG<sub>3</sub> ; **b)** variété II non traitée par AG<sub>3</sub> ; **c)** variété BR traitée par AG<sub>3</sub> ; **d)** variété BR non traitée par AG<sub>3</sub>.

### **III- Discussion**

Des essais préliminaires de la désinfection des explants (Méristèmes apicaux, segments de feuilles, fragments de racines, Fragments de cotylédons...) prélevés sur des plants d'artichaut développés dans les conditions habituelles de culture, nous ont posé de problèmes de contamination. Les travaux de Moncousin en 1979 ([Moncousin, 1979](#)) ont montré la possibilité d'obtenir la désinfection d'implants prélevés au champ. L'obtention de cultures désinfectées nécessite un traitement de désinfection sévère (alcool, hypochlorite de sodium et  $HgCl_2$ ) qui n'est pas toujours suffisant pour éliminer les contaminants bactériens ou fongiques. La culture des implants primaires sur un milieu favorisant le développement de ces derniers permet de cribler les échantillons désinfectés ([Benoit et Ducreux, 1981](#)).

Afin de réaliser la multiplication *in vitro*, nous étions obligés d'utiliser des plantes issues de la germination *in vitro* de graines préalablement désinfectées. Les expériences de germination sont menées dans un premier temps sur les accessions Art21 et Art22 et dans un deuxième temps sur les variétés BR et IJ.

La germination des graines d'artichaut a été abordée par plusieurs auteurs ([Basnizki et Mayer 1985](#) ; [Damato et Calabrese, 2005ab](#) ; [Vannella et al., 2005](#) ; [Damato et Calabrese, 2007](#) ; [Rengelink et Remeeus, 2009](#) ; [Damato et Calabrese , 2012](#)), alors que juste quelques-uns ont adopté la germination *in vitro* pour l'initiation de la culture *in vitro* de l'artichaut et ont rapporté l'efficacité de cette voie dans la micropropagation de cette plante. Citons par exemple [Benoit et Ducreux, \(1981\)](#) qui ont réalisé la culture *in vitro* à partir des graines, afin de surmonter le problème de la forte contamination des bourgeons axillaires prélevés sur des plants d'artichaut. [Bigot et Foury, \(1984\)](#) ont également utilisé les embryons pour initier le processus de multiplication *in vitro*. [Lauzer et Vieth \(1990\)](#) ont étudié la micropropagation à partir d'embryons de graines de plantes d'artichaut "Green Globe". Ils ont constaté que ces embryons matures, disséqués des graines désinfectées, produisent une plante normale sur le milieu de germination. Récemment, [De Moraes \(2007\)](#) a étudié d'une manière précise la problématique de germination *in vitro* de l'artichaut ainsi que les méthodes de désinfection et son travail constitue la première référence pour cette espèce notamment pour le cultivar 'Nobre' avec lequel elle a travaillé. Sa méthode a été basée sur la désinfection des graines avec l'alcool et une solution contenant 2 % de chlore actif suivie par l'enlèvement des téguments de graines et leur mise en culture sur le milieu MS puis une incubation à l'obscurité. En adoptant cette méthodologie, [De Moraes \(2007\)](#) est arrivé à 77,5 % de germination avec seulement 16,7 % de contamination et cela en sept jours.

Le processus de germination des graines *in vitro* a été utilisé pour d'autres espèces telles que les Orchidées, car leurs graines sont très petites. En raison de la petite taille et les réserves limitées, il est possible que les graines aient été perdues ou présentaient un faible taux de survie lorsqu'elles sont semées *in vivo*. La germination et le développement sont plus rapides *in vitro* dans un environnement contrôlé, sans compétition avec des champignons ou des bactéries. En étudiant la germination des graines de *Geodorum densiflorum* (Orchidée) *in vitro*, [Bhadra et Hossain \(2003\)](#) ont obtenu un grand nombre de plants. Des résultats similaires ont été obtenus par [Pant et Thapa \(2012\)](#) avec *Dendrobium primulinum*.

[Chaves et al. \(2005\)](#), dans les expériences visant à l'établissement et la multiplication *in vitro* de Coqueret du Pérou (*Physalis peruviana* L.), ont constaté que les espèces ont montré un comportement photoblastique positif. Les procédures de désinfection, avec de l'alcool et l'hypochlorite de sodium, conduisent à des taux de germination plus élevés. Dans la multiplication, la concentration de 0,3 mg/l de BAP a donné le plus grand nombre de pousses et de bourgeons, et la plus petite longueur des pousses.

[Niedz \(2008\)](#) a observé que l'enlèvement du tégument et le semis des graines de *Citrus sinensis* sur milieu de culture améliorent considérablement la germination, et la combinaison de cet enlèvement avec des traitements fournit des améliorations supplémentaires à la germination.

[Anderson et al. \(2002\)](#) ont effectué la culture *in vitro* des embryons de pêches précoces et ils ont conclu qu'il y avait un excellent développement pour la plupart des embryons avec un taux plus élevé de survie. Les résultats indiquent que la méthode de culture *in vitro* d'embryons immatures constitue une pratique indispensable au programme d'amélioration de la pêche, en vue de l'obtention de cultivars plus précoces.

La désinfection de la surface peut être réalisée par l'exposition des graines à la lumière UV, à la chaleur ou à des produits chimiques. Cependant, l'irradiation UV peut endommager l'ADN ([Taski et Vasic, 2005](#)) et la chaleur peut provoquer la mort de l'embryon. Ainsi, nous avons essayé de développer une technique de stérilisation à l'aide de solutions chimiques.

L'utilisation de différents agents germicides est essentielle pour réduire la contamination des explants et des graines. Les plus courants sont l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène et les composés à base de chlore, tel que l'hypochlorite de sodium et de calcium ([Rosell et Villalobos Arambula, 1992](#)). En outre, la concentration de la solution désinfectante, la combinaison de principes actifs et la durée d'exposition peuvent varier considérablement, ce qui nécessite une adaptation du protocole de désinfestation à l'espèce, le cultivar et la sensibilité des tissus à désinfecter ([Chaves et al., 2005](#)).

Dans le but de rechercher le meilleur équilibre entre l'efficacité de la désinfection et le maintien des possibilités de développement, trois traitements ont été mis en comparaison. Les résultats obtenus ont montré une contamination significativement élevée de nos graines qui n'était pas facile à éliminer par une simple désinfection faisant appel à une solution d'eau de Javel (1 %). L'infection des semences a été significativement réduite par l'usage de l'éthanol 70 % suivie de la solution d'eau de Javel à 1 %, et totalement éliminée par l'adoption d'une solution de l' $\text{HgCl}_2$  0,5 % (**tableau 10**). Ces résultats sont en accord avec les constatations de [De Moraes et al. \(2010\)](#) qui montrent que la désinfection des graines avec l'alcool à 70 % pendant 30 minutes suivie par une immersion dans une solution contenant 2 % de chlore actif pendant 10 minutes a été efficace pour réduire les contaminations dans les graines du cultivar 'Nobre'.

Sur la base des données obtenues, le pourcentage de germination a été dans tous les cas très faible, voir même nul, au niveau du premier protocole de désinfection, où plus de 60 % de graines ont été contaminées. Cette contamination des graines dans le milieu de culture a été causée par l'apparition de bactéries et de champignons. Selon [Donida \(2004\)](#), la germination des graines d'artichaut peut être affectée par des agents pathogènes qui y sont associés. [Miccolis et al., \(1990\)](#) et [Donida \(2004\)](#) ont observé la présence de *Rhizopus*, *Alternaria* et *Aspergillus* associés à la graine. Le traitement des semences, avec du Hydroxy-8-quinone sulfate, Thiran et le captane, améliore la germination ([De Moraes, 2007](#)).

En raison du faible pourcentage de germination, on peut penser que le tégument très dur de nos graines a empêché la pénétration de l'eau et par la suite la germination. De ce fait, nous avons eu recours dans un premier temps à des prétraitements pour résoudre le problème de l'inhibition tégumentaire et dans un autre temps à la dissection des graines pour enlever complètement les téguments.

L'artichaut montre une grande variation dans le pourcentage de germination et le taux d'émergence qui réduit l'uniformité des plantules. Ces variations peuvent dépendre de différentes causes qui pourraient être surmontées par le traitement des semences avant le semis ([Damato et Calabrese, 2007](#)). Selon [De Moraes \(2007\)](#), le faible taux de germination de l'artichaut peut être associé aux téguments très durs et difficiles à enlever, ces téguments ont une structure qui se traduit par une forte inhibition tégumentaire de la germination. L'exécution de coupures latérales du tégument permet probablement à l'eau de pénétrer et d'atteindre l'embryon, ce qui rend la germination possible. Déjà, nos graines non traitées n'ont présenté que 9 % et 11 % de la germination pour Art21 et Art22 respectivement. Ces résultats appuient la théorie selon laquelle la présence de l'enveloppe de la graine constitue réellement

une barrière physique à la germination et nécessite donc des traitements. Cela implique qu'une scarification naturelle ou artificielle du tégument est nécessaire pour permettre l'imbibition et la germination des graines.

Les graines d'artichaut étudiées présentent des comportements variés vis-à-vis du prétraitement au moment de leur germination, les résultats obtenus mettent en évidence le rôle capital de l'incubation à 4 °C pour lever l'inhibition tégumentaire des graines et leur dormance. En effet, l'incubation des semences pendant une semaine à 4 °C permet d'obtenir le plus important taux de germination (29 % pour Art21, 33 % pour Art22) et une réduction du temps moyen de germination (**tableau 11 et 12**).

Bien que le traitement par l'acide sulfurique a engendré un taux de germination de 15 % et 19 % pour Art21 et Art22 respectivement, il a provoqué une perte importante des graines allant jusqu'à 80 % au niveau de l'accession Art21. Une immersion des semences pendant 30 min dans l'acide sulfurique pur a réduit les performances germinatives de nos graines. Toutefois, l'efficacité de l'acide sulfurique pour lever l'inhibition tégumentaire d'autres espèces avait été démontrée par plusieurs auteurs ([El Hamdouni et al., 2001](#) ; [Jaouadi et al., 2010](#)). Un traitement de 5 minutes par l'acide sulfurique, selon [El Hamdouni et al. \(2001\)](#), accélère la germination et améliore significativement le taux de germination des akènes de Fraisier. [Neffati \(1994\)](#) a signalé que la durée optimale de trempage paraît être en rapport avec la dureté des téguments.

Contrairement à l'incubation à 4 °C et à l'immersion dans l'acide sulfurique, le trempage des graines dans l'eau chaude (100 °C) a empêché la germination probablement par la destruction de certains constituants enzymatiques présents dans la graine. Nos résultats corroborent ceux de [Devkota et Jha \(2010\)](#) qui ont signalé que le trempage des graines de *Centella asiatica* dans l'eau bouillante a réduit de près de deux fois la germination totale. De même, les travaux de [Jha et Sinha \(1989\)](#) sur la fève (*Vicia faba*), [Paul et al. \(2008\)](#) sur rauwolfia (*Rauwolfia serpentina Benth.*) et [Sinha et al. \(1993\)](#) sur le fenugrec (*Trigonella corniculata*), ont attribué la cause majeure de la perte de la viabilité à la rareté de l'oxygène, car l'eau à haute température a moins de contenu gazeux. Cependant, [Gill et al. \(1996\)](#) ont rapporté la germination de 40 % des graines du flamboyant royal (*Delonix regia*) lorsqu'elles sont immergées dans l'eau chaude pendant 3 minutes. [Padma et al. \(1994\)](#) ont également rapporté que le trempage dans l'eau chaude (80 °C) pendant 5 minutes améliore la germination des graines du faux-acacia (*Leucaena leucocephala*), mais pas celles de siris (*Albizia lebbeck*) et saman (*Samanea samon*). Du fait de sa simplicité et de son faible coût, l'ébouillantage de 3 min à 100 °C a été recommandé pour les graines de *Prosopis africana* par

Ahthon *et al.* (2009), après avoir donné un taux de germination très élevé et accéléré la vitesse de germination. Le traitement à l'eau chaude reste donc un moyen efficace pour ramollir le tégument de la graine et pour réduire l'imperméabilité de celui-ci à l'eau (Aduradola et Badru, 2004 ; Rolston, 1978 ; Tran et Cavanagh, 1984). Il faut donc faire attention à la durée de trempage des graines dans l'eau à 100 °C qui selon Ahthon *et al.* (2009) dépend de l'épaisseur et de la dureté des téguments de la graine.

De même, l'utilisation de l'acide gibberellique, comme prétraitement pour les deux accessions étudiées, n'a pas déclenché la germination. Ces résultats ne coïncident pas avec les recherches antérieures sur *Pistacia* sp. (Abou-Quad, 2007), la tomate (Groot *et al.*, 1987 ; Balaguera-López *et al.*, 2009), le maïs (Carpita et kanabus, 1988), le blé (Keyes *et al.*, 1990) et d'autres espèces avec des pourcentages de germination naturellement faibles, où les traitements avec des gibberellines favorisent un processus de germination élevé et plus rapide. Devkota et Jha (2010) ont également signalé une meilleure germination des graines de la centella asiatique (*Centella asiatica*) après un traitement avec 10 ppm d'AG<sub>3</sub> pendant 30 min, comparativement au témoin.

Le résultat de cette étude a révélé que la scarification des semences à l'aide du papier abrasif n'a pas amélioré le pourcentage de germination. Selon Franco et Ferreira, (2002), la scarification mécanique de l'enveloppe de la graine avec du papier de verre ou même la réalisation des coupes par scalpels, favorise la germination, et cela par la réduction des obstacles physiques permettant ainsi le passage de l'eau à l'embryon. Les résultats, obtenus dans notre travail, ne s'accordent pas avec les travaux de Singh *et al.* (1985), Sinha *et al.* (1993), Padma *et al.* (1994) et Paul *et al.* (2008) qui ont signalé que la scarification des graines avec un papier abrasif était la plus efficace pour l'augmentation de la germination respectivement chez les lentilles, *Trigonella corniculata*, *Leucaena*, *Alkbizia* et *Samanea* et *Rauwolfia serpentina* Benth. Ce même effet est observé chez les essences forestières telles que le chêne gris (*Planchonella cinerea*) et *Captaincookia margaretae* où la scarification mécanique accroît le taux de germination final et accélère la germination chez elles (Tassin, 2004). L'usage du papier abrasif, chez ces dernières, fournit les meilleures performances et permet d'atteindre pratiquement 100 % de germination ; la moitié des graines viables germant dans un délai d'une quinzaine de jours.

Quel que soit le traitement utilisé (incubation à 4 °C ou immersion dans l'acide sulfurique), il a été trouvé que le temps moyen de début de germination a été réduit de 27,33 à 10,67 jours après incubation à 4 °C par exemple pour Art21 (tableau 12). Par conséquent, il y a eu une réduction significative du délai de germination des graines prétraitées. En effet, cette

étude a montré que pour avoir une germination rapide et homogène des graines d'artichaut, un prétraitement des semences apparait nécessaire. Les graines ayant subi des prétraitements avant leur semis ont des délais d'attente plus courts que celles qui n'ont pas été traitées (**Tableau 12**). En ce qui concerne la durée de germination, l'étude a également montré que les courtes durées de germination sont obtenues avec les semences traitées (**Tableau 13**). Cela a montré que ces traitements augmentent donc l'activité métabolique nécessaire à la germination.

Les résultats obtenus par les différents prétraitements précédents (**tableau 11**) montrent qu'en général, ces prétraitements n'ont pas nettement favorisé la germination de nos graines. Les faibles taux de germination obtenus peuvent être liés au type de tégument d'artichaut, qui est très dur et difficile à briser, ce qui nous a incités à essayer la germination après enlèvement des téguments des graines.

Une différence nettement significative a été notée entre le pourcentage de germination des graines avec et sans téguments. Déjà, les graines avec tégument n'ont présenté que 3 et 5 % de germination pour Art21 et Art22 respectivement, tandis qu'après l'enlèvement de téguments, ce pourcentage a été significativement augmenté pour les deux accessions Art21 et Art22. Cet enlèvement a également accéléré la durée de germination qui est passée de 27-25 jours à 6-10 jours respectivement pour Art21 et Art22. Ces résultats appuient la théorie selon laquelle la présence de l'enveloppe de la graine forme une barrière physique contre la germination. L'accélération de la germination, induite par l'enlèvement de téguments, est probablement due à un plus grand contact de l'embryon avec le milieu de culture et l'oxygène. Dans ce cas, l'enlèvement aurait brisé les barrières naturelles de la graine, ce qui expose l'embryon plus rapidement à une plus grande quantité d'eau et de nutriments, ce qui entraîne une germination accélérée. En raison de la stérilité de l'environnement *in vitro*, cette exposition a eu lieu sans le risque d'infections de l'embryon. Soares Filho *et al.* (1995) ont rapporté que les ruptures naturelles dans les téguments de graines internes et externes permettent une diffusion plus élevée d'oxygène et l'absorption d'eau par la semence, facilitant ainsi la germination.

Nos résultats coïncident avec ceux de Soares Filho *et al.* (2002) qui ont observé que l'élimination du tégument externe ou tégument externe et interne de graines d'agrumes a anticipé considérablement le début de la germination et a augmenté la vitesse de l'émergence des plantules. Pour Mendes *et al.* (2008), la réponse au traitement mécanique (enlèvement manuel des téguments) n'était pas similaire pour les différentes espèces de citrus étudiées, pour *C. paradisi* x *P. trifoliata*, *C. reshni* et *P. trifoliata* ces traitements ont été bénéfiques

pour la germination *in vitro*, ils ont amélioré le pourcentage de germination des graines ainsi que l'indice de vitesse de germination et la hauteur moyenne des plantules de ces espèces. Cependant, *C. sunki* et *C. limonia* présentaient une bonne performance de germination *in vitro* sans aucun traitement, montrant que ces espèces ne nécessitent pas de traitement pour la germination. La pratique de l'enlèvement de téguments, encore employée (De Moraes, 2007), a été démontrée pour accélérer l'émergence des plantules chez l'artichaut, ce qui permet un développement plus rapide des plantes. Dans une étude des méthodes d'accélération de la germination des semences de bacuri (*Platonia insignis* Mart.), Oliveira *et al.* (2002) ont observé que l'élimination partielle du tégument des graines a fourni un taux plus élevé d'émergence des plantules.

La difficulté de germination des graines Art21 et Art22 sur le milieu de culture est maintenue également dans la tourbe. Ce maintien est bien illustré par les faibles pourcentages obtenus et qui n'ont pas dépassé 50 % pour les deux accessions (fig. 27). Cependant, les pourcentages obtenus dans la tourbe sont significativement plus élevés que ceux sur milieu. Contrairement à nos résultats, Tazi (2003) a observé que la germination *in vivo* des graines de l'arganier reste relativement faible par rapport à la germination *in vitro*. En plus, une diminution significative, au niveau du délai de germination, a été enregistrée pour les graines de Art21 et Art22 germées dans la tourbe (fig. 28).

De toutes ces expériences, nous pouvons conclure que les graines d'artichaut en général et les accessions Art21 et Art22 en particulier, présentent des taux de germination faibles. Ces derniers peuvent être liés au type de tégument d'artichaut, qui est très dur et difficile à briser. Un autre facteur s'ajoute qui est la vigueur des semences, car, ils sont issus de la production agricole, ce qui peut avoir été influencée par des facteurs environnementaux, comme la température élevée et des pluies excessives. Certains auteurs (Basnizki et Mayer, 1985; Foury, 1989; Damato et Calabrese, 1991) ont rapporté que les températures supérieures à 35 °C affectent le développement des graines. Les résultats de l'étude de Vilchez *et al.* (2005) ont montré que la faible germination et la mort des plantules sont dues à la combinaison de la faible vigueur des plantules sous des températures élevées, les blessures mécaniques et des semences immatures.

Les différents essais de germination non satisfaisants, réalisés sur les graines de l'accession Art21 et Art22, nous ont menés vers l'essai de nouveaux lots de graines d'autres variétés. Le deuxième lot était composé de graines des variétés IJ et BR de l'année dont les résultats des expériences de germination sont présentés au niveau du tableau 14. Il est à

rappeler que les graines de la variété IJ et BR ont été semées dans la tourbe après avoir été incubées à 4 °C pendant une semaine dans de l'eau stérile contenant ou non 0,6 % de l'AG<sub>3</sub>. La germination a été effectuée à deux températures différentes (18 et 25 °C).

En plus de l'augmentation du taux de germination, la méthode consiste à observer l'uniformité de la croissance des plantules les unes par rapport aux autres. Le but est de développer une méthode pour induire la germination des semences et leur développement de manière synchrone pour une transplantation au même moment.

La température et l'humidité du sol sont les facteurs les plus importants régulant le comportement des graines dans des conditions naturelles. La température est connue pour avoir un double effet : d'abord la régulation de la levée de dormance dans les graines qui nécessitent des températures fluctuantes, ensuite son influence sur la germination après avoir été libérées de dormance. En ce qui concerne le premier effet, l'environnement thermique peut augmenter ou diminuer le niveau de thermodormance des graines d'une population (Damato et Calabrese, 2007). Les températures plus élevées pendant la germination réduisent le pourcentage de germination (Damato et Calabrese, 2007).

Comme nous avons déjà signalé, les semences de l'artichaut montrent une grande variation du taux de levée, ce qui réduit l'uniformité des plantules, particulièrement lorsque la température est supérieure à 25 °C (Chaux et Foury, 1994 ; Khan, 1992).

Des recherches antérieures (Damato et Calabrese, 1991) ont montré que pour une bonne germination des akènes d'artichaut, la température doit être inférieure à 25 °C. Damato et Calabrese (2007) ont pu obtenir 20 % de germination avec une température de 22 °C contre 6 % de germination avec une température plus élevée (25/35 °C).

En ce qui concerne l'effet de la température, Rengelink et Remeeus (2009) ont rapporté que les températures qui dépassent 20 °C sont moins favorables pour la germination de l'artichaut que les températures comprises entre 15 ° et 20 °C. Selon les mêmes auteurs, un taux de germination égale à 80 % a été obtenu sous des températures comprises entre 15 et 20 °C, alors que des températures supérieures à 20 °C n'ont jamais permis d'avoir une telle augmentation du taux de germination. Dans ce travail, nous avons effectué la germination sous deux températures différentes (18 et 25 °C) et qui rentrent dans la fourchette (15 ° à 25 °C) favorable pour la germination des graines d'artichaut décrite dans plusieurs travaux (Damato et Calabrese, 1991 ; Chaux et Foury, 1994 ; Khan, 1992). Les meilleurs résultats obtenus, pour la température de 25 °C, sont 60 % pour IJ et 40 % pour BR, alors pour la température de 18 °C une légère augmentation a été notée pour IJ (65 %) contre une augmentation importante pour BR (57,5 %).

Les valeurs moyennes du délai de germination concernant les deux variétés sont comprises entre 6,63 et 10,24 jours. En examinant le tableau 14, on peut voir que pour les deux températures, aucune différence significative n'a été enregistrée et ce pour IJ et BR. Des résultats similaires ont été obtenus par [Damato et Calabrese \(2007\)](#) en incubant les graines à une température de 22 °C. Alors qu'une incubation à 35/25 °C, et selon les mêmes auteurs, a retardé le délai de germination. Ils ont conclu que les températures plus élevées retardent le début de la germination des graines d'artichaut de 3 jours.

La durée de la période de germination est avant tout influencée par les températures qui montrent des valeurs moyennes de 12,5 et 4 jours respectivement pour 25 et 18 °C (**tableau 14**). Lorsque les graines sont soumises à la température de 18 °C (**tableau 14**), une nette diminution de la durée de germination est notée pour les deux variétés aussi bien au niveau de celles traitées par l'AG<sub>3</sub> que celles non traitées. L'effet de la température est plus important pour la variété IJ (**tableau 14**), qui représente les valeurs moyennes de 12,5 (25 °C) et 4,75 (18 °C). Une durée de 4 jours, obtenue par une incubation à 18 °C, semble être intéressante, car les semences germent rapidement et en même temps. L'adoption de cette dernière nous a offert une germination uniforme. [Damato et Calabrese \(2007\)](#) en adaptant une température de 22 °C ont pu obtenir 20 % de germination dans une durée de 4 jours.

L'AG<sub>3</sub> exogène a été appliqué à de nombreuses espèces pour couvrir les besoins d'embryons afin de stimuler la germination ou pour augmenter le potentiel de croissance d'embryons ([Bradbeer, 1988](#) ; [Genève, 1991](#) ; [Evans \*et al.\*, 1996](#)). [Alouani et Bani-Aameur \(2004\)](#) ont signalé que l'application de l'AG<sub>3</sub>, combinée à un stockage au froid à 4 °C pendant un minimum d'un mois, permet une augmentation significative de la germination des graines d'arganier. Dans notre étude, l'effet de l'AG<sub>3</sub> sur le pourcentage de germination varie d'une variété à l'autre (**tableau 14**). Les résultats ont montré que la gibbérelline induisait une augmentation hautement significative des taux de germination des graines seulement dans le cas de la variété IJ incubée à 18 °C (de 47,5 % à 65 %), un effet contraire est noté pour la même variété avec une diminution hautement significative du taux de germination des graines incubées à 25 °C (de 60 % à 17,5 %).

Pour la variété BR, le traitement par l'AG<sub>3</sub> a entraîné une légère augmentation du pourcentage de germination dans les deux températures, mais qui n'était pas significative pour le cas de l'incubation à 18 °C (de 55 % à 57,5 %) et significative pour l'incubation à 25 °C (de 37,5 % à 40 %). La variété BR réagit différemment au traitement par l'AG<sub>3</sub>. Contrairement à la variété IJ pour laquelle, pour avoir une bonne germination, il faut tenir compte de la température et du traitement par l'AG<sub>3</sub>. Notant donc qu'un traitement par l'AG<sub>3</sub>

est nécessaire seulement pour une incubation des graines à 18 ° C. Des résultats similaires, sur l'importance de l'AG<sub>3</sub> pour la germination, ont déjà été rapportés pour la tomate (Groot *et al.*, 1987), le pois (Swain *et al.*, 1997) et le coton (Gokani et Thaker, 2002). Ces résultats montrent un effet clair du génotype, puisque les deux variétés mises en essai diffèrent clairement quant à la réaction vis-à-vis des traitements appliqués.

Le traitement ou non des graines par l'AG<sub>3</sub> n'a montré aucune différence statistique pour les délais et les durées de germinations trouvés, les graines ont germé dans tous les cas dans un délai entre 6 et 10 jours et une durée de 4 à 12 jours. Ces résultats concordent avec ceux trouvés dans le cas du sésame. En effet, le traitement par l'AG<sub>3</sub> n'a pas d'influence sur l'émergence des plantules (Kyauk *et al.*, 1995). Ces résultats ne coïncident pas avec les recherches antérieures sur *Alnus acuminata* (Araya *et al.*, 2000), *Pistacia* sp. (Abou-Quad, 2007), *Eucalyptus delegatensis* (Bachelard, 1967) et d'autres espèces avec des pourcentages de germination naturellement faibles, où les traitements avec des gibberellines favorisent un processus de germination élevé et plus rapide. De même pour l'arganier, l'application de l'AG<sub>3</sub> a diminué le temps et la période de germination (Alouani et Bani-Aameur, 2004). Une réduction de moitié de la durée de germination a été rapportée par Vera *et al.* (2010) pour les graines d'*Erica australis* après une application de l'AG<sub>3</sub>.

Dans notre cas, l'effet de l'AG<sub>3</sub> sur la durée de germination a été bien marqué sur la vitesse de germination. Étant donné que le traitement des graines par l'AG<sub>3</sub> a réduit la durée de germination d'une part et a cerné la germination dans un intervalle de temps en accélérant la vitesse de germination, et ce pour les deux variétés et sous les deux températures testées.

D'après les résultats précédents, nous pouvons conclure que pour une meilleure germination de la variété IJ, il faut incubé les graines à une température de 18 °C après les avoir traitées par l'AG<sub>3</sub> et incubées à 4 °C pendant une semaine, de même pour la variété BR même s'elle n'a pas présenté de différence significative entre les graines traitées et non traitées par l'AG<sub>3</sub>.

## **Conclusion**

La germination des graines *in vitro* de l'artichaut est à la fois intéressante et troublante. Les difficultés liées à la germination des graines nous ont obligés à tester plusieurs paramètres *in vitro* et *in vivo*. Le prétraitement des semences avec des hormones (ex. : AG<sub>3</sub>), l'incubation au froid, ou l'adoption de températures inférieures à 25 °C peuvent améliorer la germination des graines. Les comparaisons entre la germination des graines de divers génotypes ont été également étudiées (accession Art21 et Art22 et variétés IJ et BR).

Les résultats obtenus dans notre travail concernant l'accession Art21 et Art22, ont montré une grande difficulté de germination de ces deux accessions et un prétraitement des graines par une incubation à 4 °C et l'enlèvement des téguments des graines avant la mise en culture, ont donné des résultats qui malgré leur importance, restent à améliorer.

Pour la variété IJ et BR, les tests de germination effectués dans la tourbe ont montré que l'application de 0,6 % de l'AG<sub>3</sub> n'a pas présenté un grand effet sur le taux de germination de nos graines, mais elle a cerné la germination entre le 6<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour après semis permettant ainsi une germination et un développement homogène des plantules. De même, l'adoption d'une température de 18 °C nous a offert une germination uniforme et synchronisée.

En outre, de l'analyse des résultats de germination des deux accessions (Art21 et Art22) et des deux variétés (IJ et BR) de graines, nous pouvons conclure que les différences de germination entre les lots peuvent être attribuées aux différences génétiques et physiologiques, aux conditions auxquelles ils ont été soumis lors de la récolte et la conservation (le séchage, le nettoyage, le triage, durée de conservation...), mais aussi à leur composition, soit la présence de divers types de semences qui ne germent pas ou qui germent lentement. Une quantité différente de ces graines constituait les quatre lots.

Les vitroplants obtenus par germination *in vitro* constituent une excellente source d'explants pour les prochaines expériences de la culture *in vitro* de l'artichaut, tels que les parties apicales entières, les racines et les feuilles.

---

---

## Chapitre IV

---

**Multiplication *in vitro* de  
l'artichaut (*Cynara  
cardunculus* var.  
*scolymus* L.)**

---

**Chapitre IV :**  
**Multiplication *in vitro* de l'artichaut (*Cynara cardunculus* var.  
*scolymus* L.)**

---

**Résumé**

Vu l'importance que connaît la culture artichautière au Maroc et dans les pays méditerranéens et les difficultés liées à son mode de multiplication (multiplication végétative), nous avons entamé ce travail dans la perspective d'une production en masse des cultivars marocains de l'artichaut moyennant les techniques de la culture *in vitro*. Un protocole pour la multiplication *in vitro* de l'artichaut (*Cynara cardunculus* var. *Scolymus* L.) accession Art21 a été développé en utilisant des bourgeons axillaires obtenus à partir de plantules provenant de semences germées sur milieu de culture. Les travaux que nous avons réalisés, nous ont permis de mettre au point un certain nombre de facteurs qui ont montré un effet positif sur la réussite de la culture *in vitro* de l'artichaut et sur le taux de multiplication, dont les principaux sont : la décapitation, la densité de culture, la taille des explants, la durée d'une génération et les conditions de culture.

Un taux élevé de la régénération (7,56 pousses/explant) a été obtenu avec des bourgeons axillaires sur un milieu de prolifération contenant 1 mg/l de kin et 0,1 mg/l de l'ANA après l'enlèvement des bourgeons apicaux, les feuilles et les racines de jeunes plantules. En outre, les résultats ont révélé que les explants de 1-1,5 cm de longueur donnent le plus grand nombres de nouveaux bourgeons formés (7,33) parmi les catégories de tailles testées ainsi qu'un taux de 100 % de survie des pousses. La réduction de la densité des explants de pousses de 6-7 à 3-4 par 132 cm<sup>2</sup> de milieu de culture a augmenté le taux de multiplication par un facteur de deux. De même, une durée de culture de quatre semaines semble être optimale pour une bonne prolifération.

La mise en culture des pousses multipliées sur un milieu d'enracinement MS supplémenté par l'ANA, avec un passage antérieur par un milieu d'elongation, a donné 58,33 % de pousses enracinées. Parallèlement, l'essai du milieu MS modifié décrit par [Tavazza et al. \(2004\)](#), avec ou sans charbon actif, a montré que l'addition de ce dernier a augmenté le pourcentage d'enracinement et a amélioré la qualité des racines formées et cela dans les générations à rang élevé. Nos essais ont également mis en évidence la propriété récalcitrante de notre cultivar.

## **Introduction**

La propagation de l'artichaut peut être effectuée par semence ou par voie végétative. La multiplication par semences produit des descendants hétérogènes. En plus d'être la méthode la plus souvent utilisée en production (Moncousin, 1979), la multiplication végétative présente certains inconvénients tels que : les problèmes phytosanitaires au niveau de la plante-mère par la présence des agents pathogènes comme les virus, les champignons et les bactéries (Mauromicale, 1984) ; le faible taux de multiplication (environ 5 pousses par plant et par an) (Harbaoui et Debergh, 1980 ; Pécaut *et al.*, 1983) ; l'hétérogénéité en raison des différences physiologiques entre les pousses de la même plante mère ; les coûts élevés de l'implantation et la faible possibilité de mécanisation (Mauromicale, 1984).

En tenant compte des limites des deux méthodes de propagation, les techniques de la culture *in vitro* offrent une méthode alternative pour la production en grande quantité de matériel végétal homogène et exempt de maladies, permettant également l'installation rapide de génotypes sélectionnés dans une région spécifique (Lauzer et Vieth, 1990).

Les études sur la micropropagation de l'artichaut ont commencé au début des années soixante et sont employées avec succès pour le renouvellement, la sélection clonale et la production en pépinière. Ces études ont rencontré quelques problèmes, tels que la difficulté de désinfection du matériel, en raison de la proximité des organes utilisés comme explants des contaminants du sol par exemple les bactéries, de la structure des organes des plantules et la difficulté d'enracinement. En outre, le faible taux de multiplication est considéré comme une limitation de la micropropagation d'artichaut (Brutti *et al.*, 2000).

Des travaux intéressants ont permis d'avancer dans la compréhension de la culture *in vitro* de l'artichaut et ont permis également l'élaboration de protocoles de micropropagation de cette espèce. De Leo et Greco (1976) ont été les premiers chercheurs à appliquer la propagation *in vitro* pour la production d'artichaut en utilisant du matériel dérivé de graines. Depuis lors, d'autres méthodes de propagation *in vitro* de l'artichaut ont été développées (Moncousin 1981 ; Ancora *et al.*, 1981 ; Pécaut *et al.*, 1983 ; Moncousin et Ducreux 1984 ; Draoui *et al.*, 1993) et ont produit des taux plus élevés que les méthodes de la multiplication *in vivo* traditionnelle. En 1982, Harbaoui *et al.* ont développé une méthode de micropropagation et de l'assainissement en utilisant la culture de méristèmes.

Lauzer et Vieth (1990) ont étudié la micropropagation à partir d'embryons de graines du cultivar d'artichaut 'Green Globe'. Ils ont constaté que la multiplication des pousses a eu lieu à travers la prolifération et le développement des bourgeons axillaires des feuilles et la meilleure multiplication a été obtenue quand différentes concentrations du 6-benzylaminopurine (BAP) et 0,5 mg/l de l'acide naphtalène acétique (ANA) ont été combinées. Près de 65 % des pousses *in vitro* ont produit des racines après deux mois de culture en présence de 1 mg/l de l'ANA.

Dridi (2003) a rapporté qu'un milieu de multiplication composé des macro et micro éléments de Murashige et Skoog additionné de 0,1 mg/l de l'acide indole-butyrique (AIB), 0,5 mg/l de la méta-topoline et 2 mM/l du paclobutrazol a donné les meilleurs résultats aussi bien au niveau de la qualité des pousses qu'au niveau du taux de multiplication qui était de 4,5. L'ajout de la méta-topoline et le paclobutrazol, au milieu de prolifération, ont eu un bon effet sur la prolifération de l'artichaut.

Tavazza *et al.* (2004) ont utilisé un rapport modifié d'ammonium/nitrate pour l'obtention de pousses de bonne qualité et une multiplication satisfaisante *in vitro* d'un cultivar d'automne 'Spinoso sardo' et le taux de multiplication a été augmenté par l'utilisation de la kin combinée avec une faible concentration de l'AIB. Schneider (2005), en profitant de nouveaux régulateurs de croissance, a pu améliorer la micropropagation *in vitro* de l'artichaut.

Morone Fortunato *et al.* (2005) ont rapporté le développement d'une méthodologie de micropropagation pour le type d'automne d'artichaut 'Catanese'. Ils ont signalé que la combinaison entre les deux approches biotechnologiques, celles de la micropropagation et l'inoculation mycorhizienne, est un outil important dans la production horticole plus durable. Conformément aux travaux d'Elia *et al.* (2007), le rapport équilibré entre cytokinines et auxines au cours de la phase de multiplication, semble être utile pour atteindre une croissance optimale et la formation de pousses en particulier en présence de l'acide gibbérellique (AG<sub>3</sub>). Pour le cultivar 'Violet de Provence' ces auteurs ont démontré qu'une concentration hormonale élevée ne semble pas être nécessaire pour la croissance des pousses.

Les travaux de Grando *et al.*, (2011) sur le cultivar brésilien 'Nobre-UPF' ont montré que les milieux de multiplication additionné de BAP et l'ANA avec un faible rapport cytokinine/auxine, combiné ou non avec l'AG<sub>3</sub>, ont donné un taux de multiplication de 4. La fréquence des plantes à racines était de 62 % et après 30 et 60 jours, le pourcentage de survie

était de 44,83 et 37,93 % respectivement. Ces résultats montrent la possibilité d'application commerciale de la micropropagation pour ce cultivar d'artichaut brésilien.

Récemment [Bedini et al. \(2012\)](#), en étudiant la possibilité de propager *in vitro* quatre cultivars les plus courants à Toscane (Italie centrale) et en utilisant différents milieux (induction, prolifération, pré-enracinement et enracinement), ont remarqué que les quatre cultivars n'ont pas montré la même réponse vis-à-vis des milieux utilisés. Un meilleur taux de prolifération des pousses a été noté pour le cultivar Empolese.

Tous ces travaux ont facilité la production à grande échelle de nombreux cultivars et leurs clones. En outre, les plantes d'artichaut obtenues à partir des plantules *in vitro*, présentent une plus grande vigueur et une meilleure productivité. En même temps, les problèmes qui se posent dans l'élaboration de protocoles efficaces pour la phase d'enracinement *in vitro* ont entravé la production *in vitro* de certaines variétés d'artichaut. L'enracinement se produit à des taux qui sont beaucoup trop faibles pour atteindre une micropropagation rentable de l'artichaut ([Rossi et De Paoli, 1990](#)). En général, les cultivars tardifs d'artichaut montrent un plus grand potentiel pour l'enracinement *in vitro* que les cultivars précoces ([Ancora et al., 1981](#) ; [Tavazza et al., 2004](#)).

Pour combler cette lacune, des méthodes d'enracinement *in vitro* améliorées étaient nécessaires pour presque tous les cultivars d'artichaut. Les problèmes, liés à l'enracinement *in vitro* de cette plante, ont été plus au moins résolus dans diverses études par l'utilisation d'une seule auxine ([Harbaoui et Debergh, 1980](#); [Draoui et al., 1993](#)), l'ajout de charbon actif ([Bigot et Foury, 1984](#)) ou l'utilisation de cyclodextrine ([Brutti et al., 2000](#)) ou seulement l'acide gibbérellique ([Morzadec et Hourmant, 1997](#)), ou encore des mycorhizes ([Cavallaro et al., 2004](#) ; [Morone Fortunato et al., 2005](#)). Une étape de pré-enracinement ([Moncousin, 1981](#) ; [Brutti et al., 2000](#) ; [Brutti et al., 2002](#) ; [Apostolo et al., 2005](#) ; [Bedini et al., 2012](#)) a amélioré l'enracinement bien que le taux n'ait jamais dépassé 80 %. L'influence de l'environnement de culture, sur les processus d'enracinement *in vitro* de l'artichaut, a été également étudiée ([Pacifici et al., 2007](#)). Le meilleur taux d'enracinement (100 %) pour l'artichaut, obtenu jusqu'à nos jours, a été rapporté par [Dridi \(2003\)](#), en utilisant des pousses sélectionnées de la 12<sup>ème</sup> et 13<sup>ème</sup> subculture et le β-cyclodextrine plus 2 mg/l de l'ANA.

L'acclimatation des plantules d'artichaut est une phase critique du processus de micropropagation, car les plantules régénérées présentent généralement de faibles taux de survie lors de leur transfert vers le sol. Les stomates des jeunes feuilles cultivées *in vitro*

demeurent constamment ouverts et laissent donc s'échapper l'eau de transpiration de manière continue, ce qui entraîne le flétrissement des feuilles et peut entraîner la sénescence et la mort des feuilles et des plantules (Díaz-Pérez *et al.*, 1995). Par conséquent, les conditions environnementales de croissance (température, rayonnement solaire et l'humidité relative de l'air et la teneur en eau du sol) jouent un rôle décisif au cours de cette phase (Cavallaro *et al.*, 2007). Cependant, peu d'études ont été réservées à l'acclimatation de l'artichaut. Afin d'améliorer l'acclimatation, certains auteurs suggèrent de transférer les plantes en serre, dans des pots remplis d'un mélange de tourbe et de perlite, dans des conditions très élevées de l'humidité relative de l'air (fournies de préférence par des brumisateurs) pendant les premières semaines qui suivent le transfert, et sous une humidité de l'air décroissante par la suite (Harboui *et al.*, 1982). En 2003, Dridi a obtenu 100 % de survie des plantes lorsque les vitroplants ont été acclimatés en laboratoire sous des conditions environnementales contrôlées avant le transfert sous serre. Récemment, Morone Fortunato *et al.* (2005), Cavallaro *et al.* (2007) et Ruta *et al.*, (2009) ont obtenu une amélioration significative de la survie des plantules par la symbiose mycorhizienne.

Brutti *et al.* (2000) ont affirmé que les recherches sur la multiplication *in vitro* de l'artichaut sont limitées aux cultivars européens et le cultivar Green Globe. De même, Mauromicale et Ierna (2000) ont déclaré que les recherches liées à la micropropagation d'artichaut ont été limitées seulement au groupe des cultivars utilisés pour la propagation commerciale en Italie. Tavazza *et al.*, (2004) ajoutent que la propagation *in vitro* de l'artichaut est principalement utilisée pour quelques cultivars de printemps et permet la production de plantules pour la distribution aux agriculteurs. La micropropagation de cultivars d'automne est plus difficile et présente quelques problèmes liés à la perte de précocité (Pécaut et Martin, 1992) avec un très faible taux de multiplication et d'enracinement (Elia *et al.*, 2007). Récemment, une propagation *in vitro* de l'artichaut a été introduite sur une grande échelle et avec beaucoup de succès, surtout avec le clone C3 sélectionné à partir du cultivar Romanesco en Italie (vitroplants Italia Srl, Cesena, Italie) (Bedini *et al.*, 2012).

Le succès de la micropropagation peut dépendre de facteurs génétiques, environnementaux ou physiologiques, on peut montrer de grande variabilité dans les réponses *in vitro* (Cavallaro *et al.*, 2004). La variabilité, existante dans la réponse morphogénétique *in vitro*, non seulement entre les espèces du même genre, mais aussi entre les génotypes de la même espèce, conduit à la nécessité de définir des protocoles différents. Dans ce sens, les

techniques de culture de tissus de l'artichaut ont été utilisées, visant principalement la micropropagation des plantes saines et de haute qualité.

Malgré les résultats prometteurs déjà obtenus, la multiplication *in vitro* de l'artichaut a toujours présenté des problèmes de contamination et un faible taux de multiplication et d'enracinement, limitant ainsi l'utilisation de la micropropagation à une échelle commerciale. En plus, aucune information n'est disponible sur la propagation clonale des cultivars d'artichaut cultivés au Maroc. Par conséquent, cette étude a été menée afin de réussir l'initiation de la culture *in vitro* de l'artichaut, d'évaluer le taux de multiplication de notre cultivar et d'enraciner et acclimater les plantules cultivées *in vitro*, dans le but d'élaborer un protocole efficace pour la multiplication à grande échelle des cultivars marocains.

## I- Matériel et méthodes

Dans ce chapitre, l'étude de la prolifération, l'enracinement et l'acclimatation de l'artichaut a été réalisée sur les plantules de l'accession Art21 germées *in vitro* sans téguments, dont la méthodologie est décrite au chapitre précédent (chapitre I : I, 3, 3-2).

Le tableau 15 présente un récapitulatif des expériences réalisées dans ce chapitre pour réussir un protocole de multiplication *in vitro* de l'artichaut.

**Tableau 15:** Récapitulatif des expériences réalisées au niveau de ce chapitre.

Numéro de l'expérience	Étape de culture	Milieux ou substrats utilisés	Type d'explant
1	Établissement	MS+VG**+AIB/AG <sub>3</sub>	Plantules issues de graines germées
2	Prolifération	MS+VG+Kin/ANA>1	- En G <sub>0</sub> : plantules décapitées - À partir de G <sub>1</sub> : les pousses des générations précédentes
3	Élongation	- MS+VG+Kin/2iP/AIB - MS modifié+ Kin/2iP/AIB	Pousses développées sur le milieu de prolifération
4	Enracinement	- MS+VG+ Kin/ANA <1 - MS+VG+AIB - MS+VG+ANA+β- cyclodextrine - MS+VG+ANA - MS modifié+ANA - MS modifié+ANA+ charbon actif	- Pousses développées sur le milieu d'élongation ou - Pousses développées sur le milieu de prolifération
5	Acclimatation	- Tourbe ou - Tourbe + perlite	- Pousses enracinées - Pousses non enracinées

\*Murashige et Skoog (1962) ; \*\*Vitamines de Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968)

### 1- Préparation des milieux de culture

Étant donné que la culture *in vitro* implique trois composantes principales à savoir : un explant désinfecté, un milieu de culture stérile et un environnement donné, la préparation du milieu de culture reste une étape clé et essentiel dans la réussite de chaque culture *in vitro*. Cette préparation passe généralement par quatre étapes à savoir : dissolution des composés dans un volume d'eau, l'ajustement du pH, l'ajout du phytigel et l'autoclavage.

Les milieux que nous avons utilisés dans ce travail ont une composition de base presque similaire (sels de MS complets ou modifiés, vitamines de MS modifiées ou vitamines de Gamborg, saccharose, phytigel). Dans cette partie, nous décrirons la méthode de préparation d'un litre du milieu de prolifération ([El Boullani \*et al.\*, 2012](#)) et les détails des autres milieux seront résumés dans le tableau 16. Pour ce faire, dans une éprouvette contenant deux tiers de la quantité d'eau requise (soit environ 600 ml), nous avons additionné les sels de MS suivis des vitamines de Gamborg, le saccharose, les autres composées (adénine sulfate, phosphate monosodique) et les régulateurs de croissance. Ensuite, nous avons complété le volume de la

solution à un litre. Durant la préparation, l'éprouvette est déposée sur un agitateur sans chauffage et chaque composé est additionné après la dissolution complète du précédent. Il est à noter que les vitamines de Gamborg sont ajoutées sous la hotte pour garder l'état stérile de la solution mère. L'ajout du phytagel a été fait après l'ajustement du pH à 5,7 pour éviter le collage de ses particules à l'électrode du pH. Après autoclavage du milieu à 121 °C pendant 20 min, il est coulé dans des boites de Pétri ou dans des bocaux, selon l'objectif, et conservé à 4 °C jusqu'à son usage. Pour éviter la formation des gouttelettes d'eau au niveau de la paroi des bocaux ou sur les couvercles de boites et faciliter sa manipulation, le milieu doit être refroidi à une température de ±40 °C avant le coulage.

**Tableau 16:** Milieux de culture utilisés durant les différentes étapes de la culture *in vitro* de l'artichaut.

Type de milieu	Macro et microélément	Vitamines	Saccharose-phytagel	Régulateurs de croissance	Autres composées	pH
Germination MG	MS*	Gamborg	30 g/l-0,3%	-	-	5,6
Établissement MEt	MS	Gamborg	20 g/l-0,3%	AIB/AG <sub>3</sub>	-	5,7
Prolifération MP	MS	Gamborg	20 g/l-0,3%	Kin/ANA	- Adénine sulfate - Phosphate monosodique - acide ascorbique	5,7
Élongation ME1 ME2	MS	Gamborg	20 g/l-0,3%	Kin/2iP/AIB	- A. ascorbique	5,7
	MS modifié	MS modifié	20 g/l-0,3%	Kin/2iP/AIB	- A. ascorbique	5,8
Enracinement M1 M2 M3 M4 M5 M6	MS	Gamborg	20 g/l-0,3%	Kin/ANA	- A. ascorbique	5,7
	MS	Gamborg	20 g/l-0,3%	AIB	- A. ascorbique	5,7
	MS	Gamborg	20 g/l-0,3%	ANA	- β-CD** - A. ascorbique	5,7
	MS	Gamborg	20 g/l-0,3%	ANA	- A. ascorbique	5,7
	MS modifié	MS modifié	20 g/l-0,3%	ANA	- A. ascorbique	5,8
	MS modifié	MS modifié	20 g/l-0,3%	ANA	- 2 g/l Charbon actif - A. ascorbique	5,8

\* : Murashig et Skoog; \*\* : β- cyclodextrine

## 2- Source d'explants et désinfection

Les graines ont été trempées dans de l'eau distillée stérile pendant 24 heures, puis désinfectées pendant 5 min dans 0,5 % (p/v) de HgCl<sub>2</sub>, ensuite pendant 15 min dans 1 % de la solution d'eau de Javel (**annexe 1**) contenant quelques gouttes de Tween 20 et enfin rincées trois fois dans de l'eau distillée stérile. Après élimination aseptique des téguments, les graines ont été désinfectées une deuxième fois par un passage rapide dans la solution d'eau de Javel 1 %, lavées trois fois et placées individuellement dans des tubes à essai contenant 20 ml de

milieu de Murashige et Skoog (MS) ([Murashige et Skoog, 1962](#)), additionné de 30 g/l de saccharose et 0,3 % de Phytagel (milieu de germination). Le pH du milieu a été ajusté à 5,6 avant l'addition du phytagel et le milieu a été stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 20 min. Les tubes sont placés par la suite dans une chambre de culture maintenue à 25±1 °C, à l'abri de la lumière jusqu'au début de germination, puis illuminés grâce à une photopériode de 16 h. Les plantules obtenues après germination ont été transférées sur milieu d'établissement pour continuer leur croissance.

### **3- Établissement de la culture**

Afin d'établir la culture initiale des plantules issues de la germination, le milieu MS (macro et microéléments) contenant les vitamines de Gamborg (B5) ([Gamborg et al., 1968](#)), 20 g/l de saccharose en tant que source de carbone et les régulateurs de croissance [1 mg/l de l'acide indole butyrique (AIB), 0,1 mg/l d'acide gibbérellique (AG<sub>3</sub>)], a été utilisé dans cette étape ([tableau 16](#)). Ce milieu ainsi que la combinaison hormonale ont été tirés du travail de [Lauzer et Vieth \(1990\)](#). Les plantules développées ont été utilisées comme source d'explant dans l'étape de la prolifération.

## **4- Induction des pousses et prolifération**

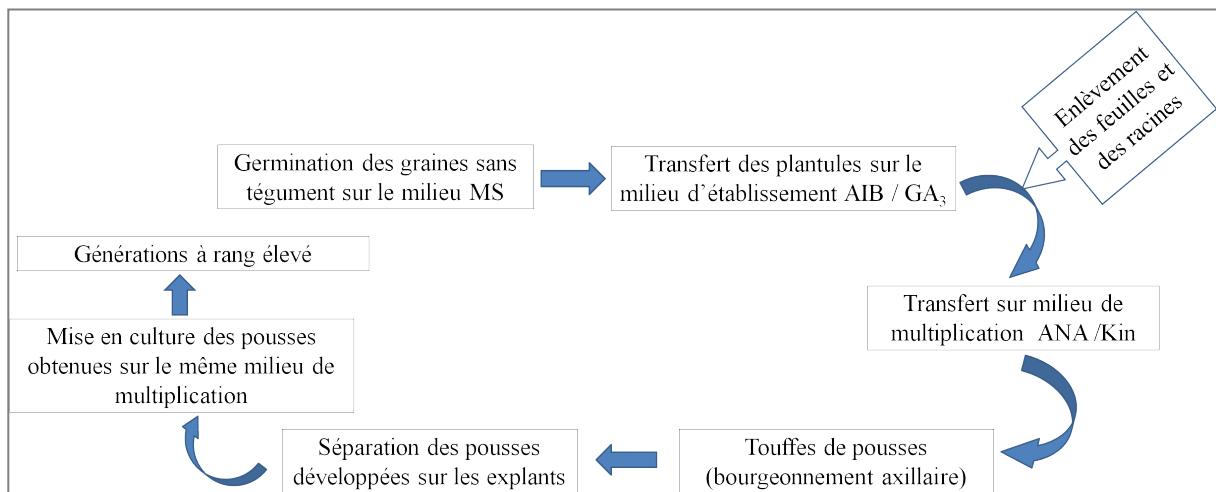
### **4-1- Décapitation et amélioration du taux de multiplication**

La méthode adoptée, pour l'amélioration du taux de multiplication, a été basée sur deux concepts, la décapitation et l'avancement dans les générations. Cet avancement dans les générations a été adopté à la fois pour l'obtention d'un taux de prolifération encourageant et pour réussir l'étape de l'enracinement liée au rang de subculture ([Dridi, 2003](#)).

Après six semaines de culture sur le milieu d'établissement, les plantules obtenues ont subi une ‘décapitation’ c'est-à-dire une élimination des bourgeons apicaux, des feuilles et des racines et les explants résultants ont été transférés sur un nouveau milieu (tableau 16 : milieu de prolifération). Ce milieu MS a été enrichi par les vitamines B5, 20 g/l de saccharose, 40 mg/l de sulfate d'adénine, 50 mg/l de phosphate monosodique, 1 mg/l de la kinétine, 0,1 mg/l de l'acide naphtalène acétique (ANA) et 0,3 % de phytagel ([El Boullani et al., 2012](#)) pour la formation de bourgeons axillaires et leur évolution en pousses.

Les bourgeons axillaires, développés à l'aisselle des feuilles des plantules décapitées, ont donné des pousses qui ont été utilisées par la suite pour induire plusieurs bourgeons adventifs par subculture sur un milieu de prolifération frais. La touffe de pousses obtenues à partir de bourgeons adventifs au cours de la phase de prolifération a été séparée et transférée

sur le milieu pour une nouvelle prolifération et ainsi de suite jusqu'à un rang élevé de subcultures (**figure 33**).



**Figure 33:** Schéma récapitulant les différentes étapes de la culture *in vitro* de l'accession Art21 de l'artichaut.

Le stock de cultures, qui a servi aux prochaines expériences, a été maintenu par repiquage des pousses néoformées toutes les 4 semaines sur un nouveau milieu de prolifération.

#### 4-2- Effet de la densité d'explants sur le bourgeonnement

Pour étudier l'effet de la densité des explants sur la formation de pousses *in vitro*, quatre densités d'explant d'artichaut (3, 4, 6 et 7 pousses par 132 cm<sup>2</sup> de surface de milieu de culture) ont été testées. Des pousses multiples provenant du stock de cultures ont été cultivées en bocaux (capacité de 370 ml) contenant 30 ml du milieu de prolifération. Pour chaque catégorie de densité, dix pousses avec trois répétitions ont été utilisées et le nombre de pousses développées a été enregistré après 4 semaines.

#### 4-3- Effet de la taille de l'explant sur le bourgeonnement

De même, l'effet de la taille d'explants sur la formation des bourgeons adventifs (prolifération) a été évalué (El Boullani *et al.*, 2013). Des pousses, de quatre catégories de taille (<1 cm, 1 à 1,5 cm, 1,5 à 2 cm et >2 cm) (**Figure 34**) provenant de la 8<sup>ème</sup> génération, ont été mises sur le milieu de prolifération à raison de quatre explants par bocal. Chaque expérience comportait trois répétitions avec au moins dix explants par répétition. Pour toutes les expériences de régénération, le nombre de pousses développées par explant a été enregistré après un mois de culture ainsi que le pourcentage de reprise des pousses.



**Figure 34 :** Différentes tailles d'explants utilisées pour l'évaluation de l'effet de la taille sur la multiplication des pousses de l'artichaut.

#### **4-4- Effet de la durée de culture sur le bourgeonnement**

Afin d'évaluer l'effet de la durée de culture des pousses sur le bourgeonnement et de déterminer la durée optimale d'une génération, des pousses de la 8<sup>ème</sup> génération ont été mises en culture sur le milieu de multiplication en présence de l'ANA et la kin à raison de quatre explants par bocal. Le nombre de pousses par explant a été noté après 3, 4, 5, 6 et 7 semaines de culture. Trente pousses ont été utilisées pour chaque essai avec trois répétitions.

#### **5- Élongation des pousses multipliées**

Pour évaluer l'effet du passage des pousses par une étape d'élongation sur la réussite de l'enracinement, nous avons testé deux milieux de culture à savoir le milieu MS et le milieu MS modifié décrit par [Tavazza et al. \(2004\)](#) (**tableau 16**). Comme régulateurs de croissance, nous avons choisi la combinaison de 0,5 mg/l de la kinétine, 0,1 mg/l de l'AIB et 0,01 mg/l de 6-(γ,γ-diméthylallylamino) purine (2iP) (milieu d'élongation adopté par le laboratoire de biotechnologie à l'ENEA en Italie). Le pH a été ajusté à 5,7 pour le milieu MS et à 5,8 pour le milieu MS modifié. Les pousses utilisées proviennent du milieu de multiplication précédent dont la longueur initiale moyenne était de 1,42 cm pour celles sur milieu MS et 1,9 cm pour celles sur milieu MS modifié. Un suivi journalier de l'évolution de la taille a été mené afin de déduire la durée nécessaire pour cette étape ainsi que le milieu convenable.

#### **6- Enracinement des vitroplants**

L'enracinement représente toujours une étape critique dans la micropropagation de l'artichaut, cette espèce étant particulièrement récalcitrante à l'enracinement. Dans le but de résoudre ce problème, nous avons testé plusieurs protocoles, en utilisant les pousses provenant soit du milieu d'élongation (voir 6-1) ou directement du milieu de multiplication (voir 6-2).

Une description détaillée, des différents milieux testés durant cette étape d'enracinement, est indiquée dans le tableau 17. Aussi, ce tableau présente le rang de subculture des pousses utilisées et leur origine. À tous ces milieux de culture, nous avons additionné 10 mg/l de l'acide ascorbique pour éviter l'oxydation des explants.

**Tableau 17:** Composition des milieux de culture testés pour l'enracinement de nos pousses

Milieux	Sels et vitamines	PGR	Autres composés	Rang de subculture	Origine des pousses
M1	MS*+ VG**	Kin 0,05 mg/l ANA 0,5 mg/l	-	G17	M. prolifération
M2	MS + VG	AIB 0,1 mg/l	-	G17	M. prolifération
M3	MS + VG	ANA 2 mg/l $\beta$ -cyclodextrine 2g/l	-	G17	M. prolifération
M4	MS + VG	ANA 2 mg/l	-	G17	M. élongation
M5	MS modifié	ANA 2 mg/l	-	G23	M. élongation
M6	MS modifié	ANA 2 mg/l	Charbon actif 2 g/l	G23	M. élongation

\*Milieu de Murashige et Skoog ; \*\*Vitamines de Gamborg ; PGR : régulateurs de croissance

#### **6-1- Enracinement sans passage par le milieu d'élongation**

Nous avons utilisé les pousses de la 17<sup>ème</sup> génération appartenant à *Cynara cardunculus* var. *scolymus* L. accession Art 21, issues du milieu de multiplication avec une taille de 1 à 2 cm. Trois milieux de culture, dont la composition hormonale est inspirée de la littérature, ont été utilisés dans cette partie pour tester leurs effets sur l'enracinement. La composition de base de ces milieux inclut les sels de MS additionné de saccharose (20 g/l) et le phytigel (0,3%). Le milieu 1 (M1) est supplémenté par 0,05 mg/l de la Kin et 0,5 mg/l de l'ANA, le milieu 2 (M2) par 0,1 mg/l de l'AIB et le milieu 3 (M3) par 2 mg/l de l'ANA et 2 g/l de la  $\beta$ -cyclodextrine (**tableau 17**). Après six semaines de culture, nous avons noté le nombre de racines apparues sur les pousses de chaque milieu ainsi que le développement des pousses.

#### **6-2- Enracinement après passage par le milieu d'élongation**

Afin d'améliorer le pourcentage de l'enracinement et de noter l'importance du passage par une phase intermédiaire d'élongation, nous avons utilisé les pousses appartenant à *Cynara cardunculus* var. *scolymus* L. accession Art21, provenant du milieu d'élongation MS modifié (ME2) et ayant atteint une taille de plus de 3 cm. Ces pousses ont été cultivées sur les milieux d'enracinement M4, M5 et M6 (**tableau 17**). Ces trois milieux contiennent tous 2 mg/l de l'ANA qui a donné des résultats positifs pour l'enracinement de nos pousses au niveau des essais précédents, mais diffèrent par leur composition de base : le milieu 4 (M4) contient les sels de MS et les vitamines de Gamborg, tandis que la composition des milieux 5 (M5) et 6 (M6) est celle décrite par [Tavazza et al. \(2004\)](#). Au milieu 6 (M6), nous avons ajouté le charbon actif ayant un effet positif sur l'enracinement, tant de points de vue quantitatif et qualitatif. Pour cette partie également, nous avons noté le nombre de racines apparues sur chaque milieu ainsi que le développement des pousses après 6 semaines de culture.

## **7- Acclimatation**

Après six semaines dans le milieu d'enracinement, les vitroplantes ont été transférés en conditions de croissance *ex vitro* en chambre de culture. Avant la transplantation, les plantes enracinées ont été retirées de la gélose et les racines ont été lavées soigneusement avec de l'eau du robinet pour se débarrasser de la gélose. Par la suite, les feuilles mortes ont été retirées et les plantes transplantées dans le substrat. Deux substrats ont été testés dans cette étape à savoir : la tourbe seule ou bien un mélange de moitié tourbe et moitié perlite.

Les plantes ont été cultivées dans des plateaux ( $\approx 5$  cm de hauteur) avec 30 mottes ou bien dans des pots individuels. L'artichaut a été acclimaté dans des conditions de la chambre de culture avec une température d'environ 25 °C. Immédiatement après le transfert des plantes dans les plateaux, ces derniers ont été initialement placés dans une enceinte de verre à forte hygrométrie et couverts pour deux semaines par du plastique transparent puis maintenus dans un endroit moins éclairé pendant une semaine, afin de maintenir l'humidité de l'air élevée et prévenir la photoinhibition, puisque l'intensité lumineuse dans des conditions *ex vitro* est beaucoup plus élevée que dans les conditions de la culture *in vitro*. La couverture en plastique est graduellement enlevée après la première semaine d'acclimatation.

Un autre essai d'acclimatation a été réalisé en parallèle avec les pousses non enracinées et qui ont passées plus de six semaines sur le milieu d'enracinement. Ces pousses ont suivi la même démarche de l'acclimatation que celles enracinées décrite précédemment.

## **8- Paramètres observés et analyse statistique**

Chaque étape de la culture *in vitro* de *Cynara cardunculus* var. *scolymus* a porté sur le suivie d'un certain nombre de paramètres ; pour la multiplication, les données ont porté sur le nombre de nouvelles pousses formées/explant primaire (pousses utilisables pour la multiplication) et le pourcentage de survie (reprise) des pousses après quatre semaines. Alors que pour l'élongation, le paramètre que nous avons observé était la taille des pousses. Quant à l'enracinement et après six semaines de culture, nous avons observé quatre paramètres : le pourcentage de pousses enracinées, le nombre de racines/plante enracinées, la longueur de la racine la plus longue et l'importance du cal à la base des pousses. Au cours de l'acclimatation, nous avons suivi, comme paramètre de l'évaluation de cette étape, la survie des vitroplants dans les deux substrats.

L'analyse statistique des données a été réalisée en utilisant une analyse de variance (Anova) et les différences entre les moyens ont été comparées en utilisant le test de Duncan au seuil de probabilité de 5% (Duncan, 1955).

## **II- Résultats**

Les résultats obtenus à partir des études sur la décapitation, l'effet de la taille, la durée de culture et la densité des explants sur le taux de multiplication, l'élongation et l'enracinement de *Cynara cardunculus* var. *scolymus* accession Art21 sont présentés dans cette partie.

### **1- Établissement de la culture**

Les graines désinfectées ont produit des plantules normales sur le milieu de germination. Après six semaines de culture sur le milieu d'établissement contenant l'acide indole butyrique (AIB) et l'acide gibbérellique (AG<sub>3</sub>), ces plantules ont atteint plus de 8 cm de hauteur et ont développé un nombre de feuilles allant de 10 à 13 avec un système racinaire bien évolué (**Figure 35**). Ces plantules ont été la source des explants primaires de la phase de multiplication.



**Figure 35 :** plantule issue de la graine sur milieu d'établissement; AIB 1 mg/l ; AG<sub>3</sub> 0,1 mg/l J<sup>3</sup>=28 jours



**Figure 36** Parties centrales décapitées de plantules issues de graines sur milieu de prolifération, ANA 0,1 mg.l<sup>-1</sup>/Kin 1 mg.l<sup>-1</sup>; J<sup>3</sup>=7 jours

## **2- Prolifération**

Afin d'évaluer l'influence de certains paramètres sur le taux de multiplication et sur la croissance des pousses au cours du temps, le nombre de pousses régénérées durant les douze générations en phase de prolifération et le survie des pousses ont été contrôlés.

### **2-1- Décapitation et amélioration du taux de multiplication**

Dans le but de hausser le taux de multiplication *in vitro* de l'artichaut et vu son effet positif sur le bourgeonnement, nous avons tenté la décapitation de plantules d'artichaut.

<sup>3</sup> : Age des explants sur le milieu de culture

Dans cette étape, nous avons utilisé des plantules issues de la germination des graines (**Figure 35**). Ces plantules, après leur développement sur le milieu d'établissement, ont subi une ‘décapitation’ qui consiste en l'enlèvement de leurs feuilles et leurs racines ainsi que la partie apicale. Les explants une fois décapités (**Figure 36**) sont transférés sur le milieu de multiplication en présence de la kinétine et l'acide naphthalène acétique.

Les explants d'artichaut, décapités et cultivés sur le milieu de multiplication, ont montré un bourgeonnement très important. La décapitation de ces explants nous a permis d'enregistrer un nombre moyen de pousses par explant exceptionnel de 17 lors de la génération G<sub>0</sub> (**tableau 18, Figure 37**).



**Figure 37 :** Induction des pousses axillaires de l'artichaut sur le milieu de prolifération contenant 1 mg/l de la kin et 0,1 mg/l de l'ANA, 6 semaines après la subculture  
(barre=1,5 cm)

Les subcultures suivantes (G1 à G11) ont été réalisées avec des pousses sans l'enlèvement des bourgeons apicaux et les feuilles (**Figure 38**). En conséquence, le nombre de pousses était considérablement plus faible que la génération G<sub>0</sub> décapitée (**tableau 18**).

Un changement imprévu dans les conditions de culture a provoqué une nette baisse du nombre moyen des pousses néoformées par explant au cours de la deuxième et la troisième génération. Ces conditions ont concerné deux paramètres à savoir :

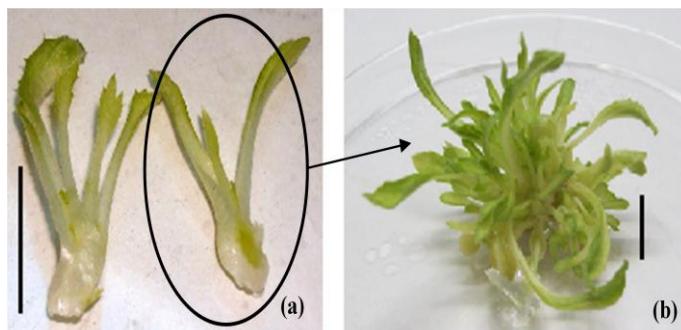
- l'intensité lumineuse : qui est passée de 20  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (en G<sub>0</sub> et G<sub>1</sub>) à 40  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (en G<sub>2</sub> et G<sub>3</sub>) ;
- le nombre d'explants par bocal de culture : qui est passé de 3-4 explants (en G<sub>0</sub> et G<sub>1</sub>) à 6-7 explants (en G<sub>2</sub> et G<sub>3</sub>) par milieu de culture.

La rectification de ce changement et le retour aux conditions du départ (c.-à-d.. intensité de  $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  et densité de quatre explants par bocal) ont augmenté le taux de multiplication de 2,8 à plus de 5 pousses/explant.

**Tableau 18:** Nombre moyen de pousses par explant d'artichaut enregistré durant les 12 générations consécutives sur le milieu de prolifération.

Numéro de générations	Nombre moyen de pousses par explant	Taux de multiplication cumulé durant 12 générations
G0	$17^{\text{a}} \pm 5,50$	
G1	$6,57^{\text{c}} \pm 1,52$	
G2	$2,88^{\text{d}} \pm 0,97$	
G3	$2,33^{\text{d}} \pm 0,52$	
G4	$5^{\text{cd}} \pm 1,09$	
G5	$7,33^{\text{c}} \pm 1,75$	
G6	$6,33^{\text{c}} \pm 1,21$	
G7	$7,5^{\text{c}} \pm 1,52$	
G8	$9,5^{\text{b}} \pm 2,07$	
G9	$7,66^{\text{c}} \pm 1,86$	
G10	$9,33^{\text{b}} \pm 2,50$	
G11	$9,33^{\text{b}} \pm 2,42$	
		7,56

Les moyennes, suivies par la même lettre, ne diffèrent pas statistiquement entre elles selon le test de Duncan ( $p=0,05$ ).

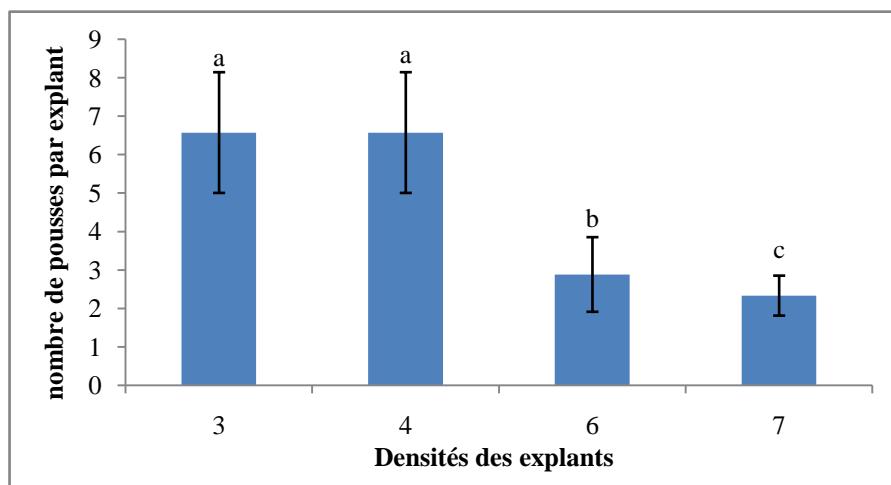


**Figure 38 :** (a) Pousses de la génération (G0) de l'artichaut accession Art21 développées sur le milieu de prolifération ; (b) Touffe de la génération (G1) après quatre semaines de culture de la pousse entourée en (a) utilisée comme explant pour la multiplication (barre=1 cm)

## 2-2- Effet de la densité d'explants sur le bourgeonnement

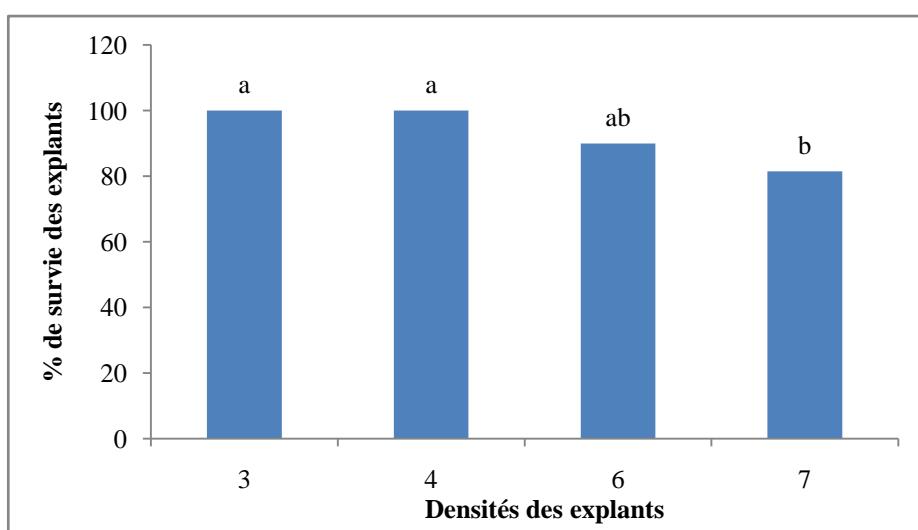
L'étude de l'effet de la densité des explants sur le bourgeonnement, c'est-à-dire le nombre d'explants par milieu de culture, a été réalisée sur quatre densités différentes (3, 4, 6 et 7 explants/bocal de  $132 \text{ cm}^2$ ). L'analyse des résultats de la figure 39 a montré qu'il y a un effet hautement significatif du nombre d'explants par unité de surface du milieu sur le bourgeonnement, cela indique que la densité d'explants a un rôle certain dans la prolifération des pousses de l'artichaut. La réduction de cette densité, de 6-7 à 3-4 explants par  $132 \text{ cm}^2$  de

surface de culture, a augmenté le taux de multiplication de 2,33 à 6,57 pousses néoformées (**figure 39**). Les densités, de trois et quatre explants par unité de surface, ont montré une meilleure prolifération des pousses. Cette faible densité est en faveur d'une meilleure nutrition des explants et une diminution de la concentration d'exsudats de pousses. Une chute significative du pourcentage de survie de pousses a été enregistrée pour les densités de 6 et 7 explants par unité de surface de culture, 90 % et 81,5 % respectivement. Cela signifie que les densités des explants de 3 à 6 pousses par unité de surface n'influent pas de manière notable sur la viabilité des pousses mais plutôt sur le bourgeonnement (**figure 40**).



**Figure 39:** Effet de la densité des explants sur la prolifération de bourgeons axillaires chez l'artichaut.

Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan ( $p=0,05$ ).

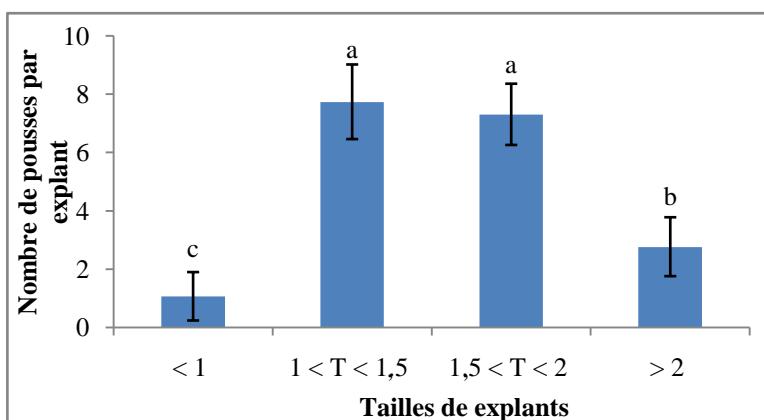


**Figure 40:** Effet de la densité des explants sur le pourcentage de survie des explants chez l'artichaut.

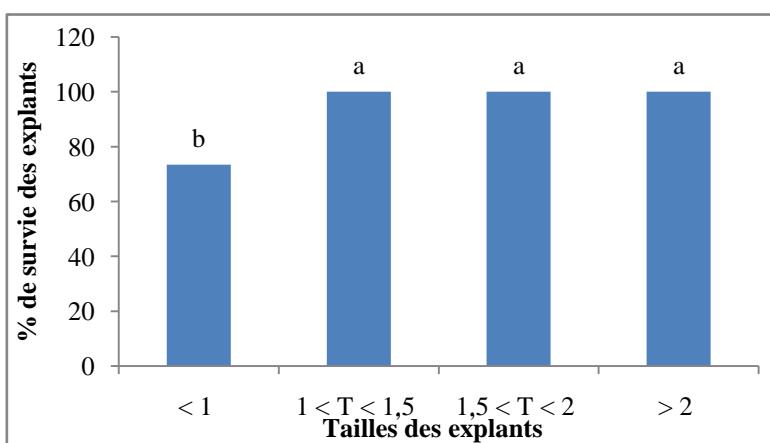
Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan ( $p=0,05$ ).

### 2-3- Effet de la taille de l'explant sur le bourgeonnement

L'effet de la taille d'explants sur la régénération des plantes a été établi par la culture d'explants de tailles différentes sur le milieu de prolifération (El Boullani *et al.*, 2013). La taille initiale des explants affecte le taux de régénération et des différences très hautement significatives ont été notées sur le nombre de bourgeons axillaires en réponse à la différence de taille. Seulement 1,06 pousses ont été produites pour la catégorie de taille <1 cm, dont 26,6 % sont devenues nécrotiques après deux semaines de culture, mais la régénération des pousses était significativement supérieure pour les tailles de 1-1,5 cm et 1,5-2 cm avec 7,73 et 7,30 pousses par explant respectivement (figure 41). En revanche, seules 2,76 pousses ont été obtenues pour la catégorie de taille > 2 cm, probablement en raison de la dominance apicale qui inhibe la formation de bourgeons adventifs. Le pourcentage de survie des pousses a été significativement affecté par la taille initiale des explants sachant qu'avec une taille inférieure à 1 cm nous avons noté une diminution de 26,6 % de ce pourcentage (figure 42).



**Figure 41:** Effet de la taille initiale des explants sur la prolifération des pousses de l'artichaut. Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan ( $p=0,05$ ).



**Figure 42:** Effet de la taille initiale des explants sur le pourcentage de survie des explants de l'artichaut.

Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan ( $p=0,05$ ).

## 2-4- Effet de la durée de culture sur le bourgeonnement

La détermination de la durée optimale, pour l'obtention du meilleur taux de multiplication de l'artichaut, a été le but de cette expérience au niveau de laquelle nous avons compté le nombre de pousses nouvellement formées après 3, 4, 5, 6 et 7 semaines de culture en milieu de prolifération. D'après les résultats représentés dans le tableau 18, nous avons noté l'existence de différences très hautement significatives entre les différentes durées, ce qui montre que la durée de culture a un effet important sur le maintien des pousses en bon état (**Figure 43**). Nous avons également noté que l'obtention du nombre le plus élevé de bourgeons (7,47 pousses/explant) a nécessité une durée de culture de 4 semaines sur le milieu de multiplication.

Nous avons remarqué qu'après 5 semaines de culture sur le même milieu, les pousses commencent à se nécroser et finissent par un flétrissement partiel ou complet de la touffe avec parfois la vitrification des pousses ce qui explique la diminution du nombre de pousses au bout de la 6<sup>ème</sup> et la 7<sup>ème</sup> semaine de culture (**Figure 44 a, b**).

**Tableau 19:** Nombre de pousses obtenues durant les différentes durées de culture sur milieu de multiplication

Durée de culture en semaines	Nombre de pousses ± l'écart type	Aspect des pousses néoformées
3	3,37 <sup>d</sup> ± 0,85	feuilles vertes
4	7,47 <sup>a</sup> ± 1,04	feuilles vertes
5	7,23 <sup>a</sup> ± 1,36	feuilles vertes
6	5,70 <sup>b</sup> ± 1,12	feuilles nécrosées et flétries
7	4,37 <sup>c</sup> ± 0,93	feuilles nécrosées et flétries

Les moyennes, suivies par la même lettre, ne diffèrent pas statistiquement entre elles selon le test de Duncan (p=0,05).



**Figure 43 :** Pousses de la 8<sup>ème</sup> génération après 5 semaines de culture sur milieu de prolifération



**Figure 44 (a, b)** : pousses de la 8<sup>ème</sup> génération après 7 semaines de culture sur milieu de multiplication avec un effet de nécrose

### 3- Élongation des pousses multipliées

Pour faciliter la séparation des pousses et leur passage à l'enracinement, nous avons essayé d'améliorer leur allongement. Pour cela, les pousses ont été mises en culture sur deux milieux dont la composition en micro et macroéléments et vitamines était différente. Ces deux milieux ont été supplémentés par la combinaison hormonale suivante : kin (0,5 mg/l), l'AIB (0,1 mg/l) et le 2iP (0,01 mg/l).

Un contrôle continu des vitroplants et des mesures de leur allongement ont été effectués chaque jour. Après deux semaines de la première introduction dans différents milieux (**tableau 20**), les résultats obtenus ont montré que le meilleur milieu d'allongement est le milieu MS modifié (ME2) avec une longueur des vitroplants qui a pu atteindre en moyenne 4,34 cm. Les pousses, développées sur ce milieu, ont présenté des feuilles de couleur vert foncé avec un aspect vigoureux (**Figure 45b**). Alors que sur le milieu MS (ME1), les pousses initiales ont développé d'autres pousses plutôt que de croître en longueur (**Figure 45a**).

Le suivi journalier de l'évolution de la taille nous a permis de déduire que deux semaines sur ce deuxième milieu d'élongation sont suffisantes pour atteindre une taille supérieure à 4 cm et les pousses présentent un bon aspect pour passer à l'enracinement.

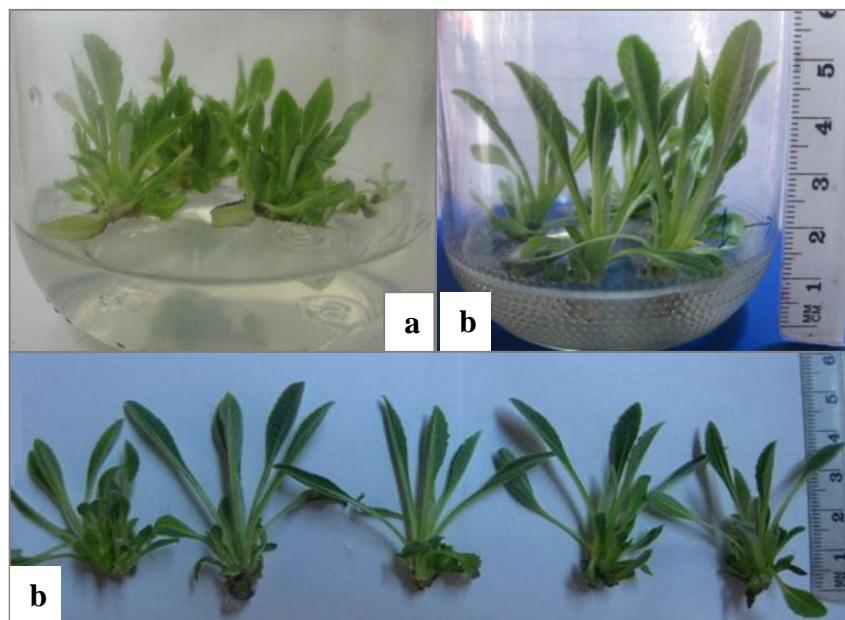
L'analyse de la variance suivie du test de Duncan effectuée après deux semaines de culture dans les milieux d'élongation ( $p=0,05$ ), révèle un effet très hautement significatif des milieux testés sur l'élongation moyenne des vitroplants (**tableau 20**).

Pour ces raisons, nous avons décidé de retenir ce dernier milieu comme milieu d'élongation à appliquer avant la phase d'enracinement.

**Tableau 20:** Comparaison de l'évolution des pousses sur deux milieux d'elongation après deux semaines de culture.

Milieux	Longueur initiale des pousses (cm) (moyenne ± ET)	Longueur de pousses après 2 semaines (cm) (moyenne ± ET)
MS (ME1)	1,9 <sup>a</sup> ± 0,54	2,75 <sup>b</sup> ± 0,70
MS modifié (ME2)	1,42 <sup>b</sup> ± 0,56	4,34 <sup>a</sup> ± 0,98

Les résultats sont analysés par l'ANOVA suivie du test de Duncan ( $p=0,05$ ). Deux lettres différentes dans la même colonne indiquent deux traitements significativement différents.



**Figure 45 :** Pousses développées sur les milieux d'elongation en présence de la kin (0,5 mg/l), l'AIB (0,1 mg/l) et le 2iP (0,01 mg/l) ; **(a)** Pousses allongées sur milieu ME1 ( $J^4=27$  jours) ; **(b)** Pousses allongées sur milieu ME2 ( $J^4= 2$  semaines).

#### 4- Enracinement

La plante d'artichaut est connue par sa récalcitrance à la rhizogenèse et c'est la phase de l'enracinement qui a constitué un obstacle devant la réussite des protocoles de la culture *in vitro* de cette espèce. Nous avons mis en essai six milieux d'enracinement, trois sans passage par l'étape d'elongation et trois autres avec passage par l'elongation dont le dernier milieu a été utilisé pour tester l'effet du charbon actif.

##### 4-1- Enracinement sans passage par le milieu d'elongation

Les données obtenues, en ce qui concerne l'effet des régulateurs de croissance : l'IBA seul et l'ANA combiné à la kin ou à la  $\beta$ -cyclodextrine sur l'enracinement, sont présentées dans le tableau 21.

<sup>4</sup> J : âge des pousses sur le milieu d'elongation

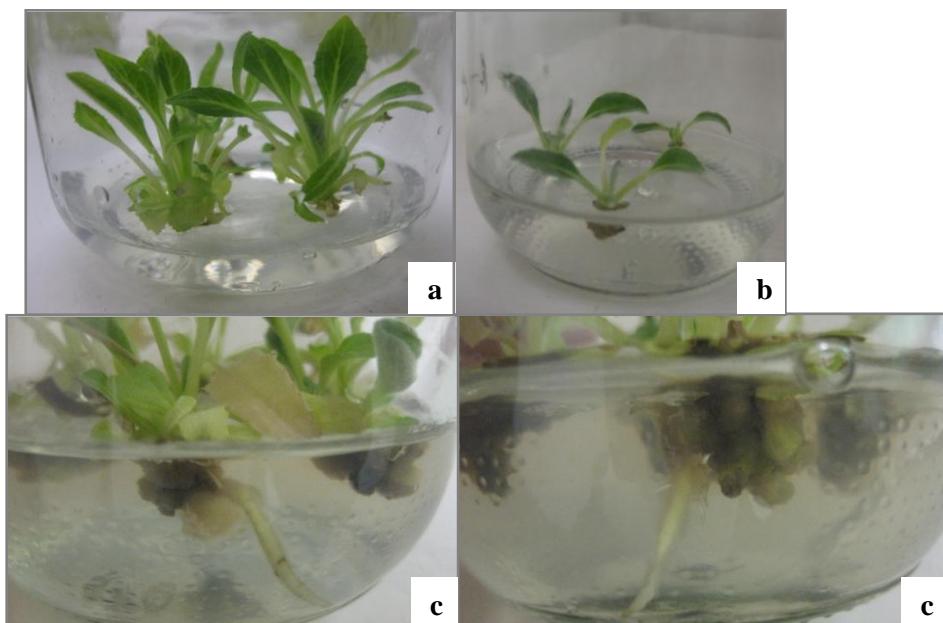
D'après ces résultats, nous avons noté qu'il n'y avait pas de réponse de l'enracinement dans les milieux contenant l'IBA (**Figure 46a**) et l'ANA avec une faible concentration de la kin (**Figure 46b**). Nous avons constaté également que le meilleur enracinement a été obtenu avec le milieu contenant 2 mg/l de l'ANA et 2 g/l de la  $\beta$ -cyclodextrine. Cependant, le taux reste assez faible (7,81 %) (**Tableau 21 ; Figure 46c**).

Nous avons aussi remarqué que l'ANA stimule la callogenèse plus que l'AIB, surtout à fortes concentrations (**Figure 46c**). En fait, la formation des racines a été initiée sur le cal développé à la base des pousses, ces racines sont faiblement attachées à ces dernières, ce qui facilite leur perte au moment de l'acclimatation. De plus, elles sont dures et facilement cassantes.

**Tableau 21:** Comparaison de l'enracinement des pousses de la 17<sup>ème</sup> génération sur trois milieux différents après 4 semaines de culture.

Milieux	M1 : MS + Kin 0,05 mg.l <sup>-1</sup> / ANA 0,5 mg.l <sup>-1</sup>	M2 : MS + AIB 0,1 mg/l	M3 : MS + ANA 2 mg/l+2 g/l $\beta$ -cyclodextrine
Taille initiale moyenne des pousses (cm)	2,05 <sup>a</sup> ± 0,95	1,25 <sup>b</sup> ± 0,76	1,48 <sup>b</sup> ± 0,85
Cal à la base des pousses	+	-	+++
Taille moyenne des pousses après 4 semaines	4,15 <sup>a</sup> ± 0,34	1,52 <sup>c</sup> ± 0,54	3,18 <sup>b</sup> ± 0,44
Pourcentage d'enracinement	-	-	7,81%
Nombre moyen de racines par pousses	-	-	3

Les résultats sont analysés par l'ANOVA suivie du test de Duncan (p=0,05). Deux lettres différentes dans la même ligne indiquent deux traitements significativement différents.



**Figure 46 :** Pousses sur les différents milieux d'enracinement après 4 semaines de culture. **(a)** M1 : ANA 0,5 mg/l et Kin 0,05 mg/l ; **(b)** M2 : AIB 0,1 mg/l ; **(c)** M3 : ANA 2 mg/l et 2 g/l  $\beta$ -cyclodextrine.

Nous avons également constaté que la présence d'une cytokinine a été traduite par un bon développement des feuilles. Ainsi, dans le milieu M1 contenant la Kinétine, les pousses arrivent à une taille de 4,15 cm (**Figure 46b**) au bout d'un seul mois, alors que le milieu contenant l'AIB n'a pas favorisé la croissance des pousses, dont la taille moyenne n'a pas dépassé 1,52 cm pour la même période que les autres milieux (**tableau 21, Figure 46a**). En fait, cette taille réduite a eu un impact négatif sur l'enracinement, vu que l'étape de l'enracinement de l'artichaut demande des pousses de taille supérieure à 4 cm pour assurer un bon enracinement.

#### 4-2- Enracinement après passage par le milieu d'elongation

Le tableau 22 présente une comparaison des résultats d'enracinement sur deux milieux qui diffèrent par leur composition du base en macro et microéléments et vitamines alors qu'ils sont supplémentés par la même auxine (2 mg/l de l'ANA). Les pousses utilisées proviennent du milieu d'elongation (ME2) et présentent un bon aspect avec une taille importante. Les résultats, récapitulés dans ce tableau, montrent l'effet positif du passage des pousses par une étape d'elongation sur l'enracinement. Le taux d'enracinement a atteint avec cette procédure 58,33 % pour le milieu M4 et seulement 6,45 % pour le milieu M5. Mais le nombre des racines par pousse enracinée reste cependant réduit, puisqu'il n'a pas dépassé la moyenne de 1,66 pour M4 et 1 pour M5, de même pour la taille des racines au bout de six semaines et le

nombre des racines secondaires par plante, dont les valeurs restent insatisfaisantes (**Figure 47a et b**).

Nous avons constaté que le passage des pousses par le milieu d'élongation a un effet positif clair sur le pourcentage d'enracinement en milieu MS supplémenté de l'ANA à 2 mg/l (M4), mais pas sur la qualité des racines formées, car ces dernières sont dures et fragiles et demandent beaucoup de précaution lors de la manipulation.

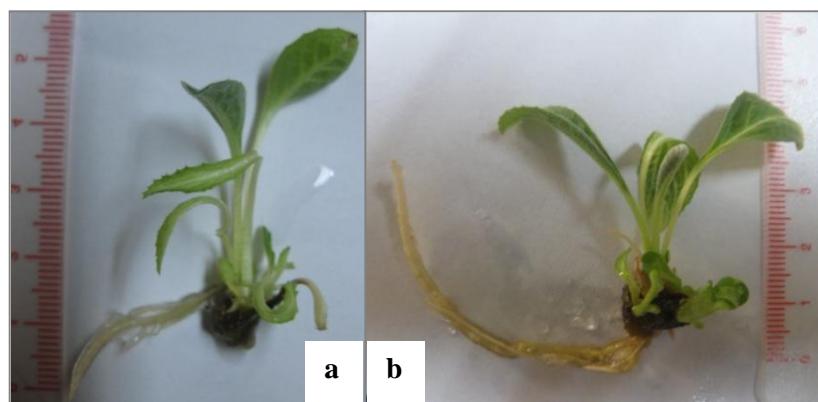
En outre, et d'après les résultats des tableaux 21 et 22 nous avons remarqué que le milieu MS supplémenté par les vitamines de Gamborg en présence de l'ANA stimule fortement la formation de cal à la base des pousses à la différence du milieu MS modifié (**tableau 22**).

L'analyse statistique des résultats a donné des différences très hautement significatives entre les deux milieux, et ce pour les différents paramètres étudiés. Les résultats restent encore insatisfaisants tant pour le pourcentage d'enracinement que pour la qualité des racines formées.

**Tableau 22:** Étude de l'enracinement sur le milieu MS et le milieu MS modifié décrit par Tavazza *et al.* (2004), contenant 2 mg/l de l'ANA après 6 semaines de culture.

Milieux	M4 : MS +VG+ 2 mg/l ANA	M5 : MS modifié + 2 mg/l ANA
Cal à la base des pousses	+++	+
% d'enracinement	58,33 <sup>a</sup>	6,45 <sup>b</sup>
Nombre moyen de racines par poussée enracinée	1,66 <sup>a</sup> ± 1,06	1 <sup>b</sup> ± 0,00
Taille moyenne de la racine la plus longue (cm)	2,74 <sup>b</sup> ± 1,14	5 <sup>a</sup> ± 1,20
Nombre moyen de racines secondaires par poussée	1,33	0

Les résultats sont analysés par l'ANOVA suivie du test de Duncan ( $p=0,05$ ). Deux lettres différentes dans la même ligne indiquent deux traitements significativement différents.



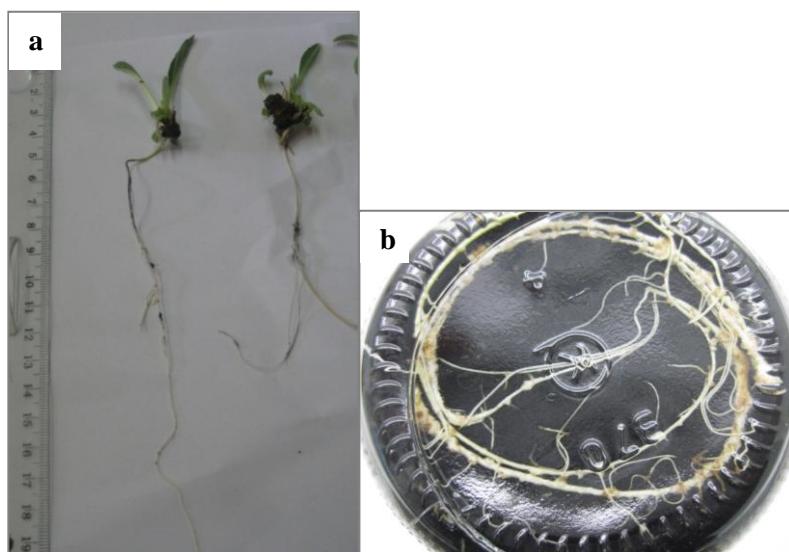
**Figure 47 :** vitroplants d'artichaut après 6 semaines sur le milieu MS (a) et sur milieu MS modifié (b), contenant 2 mg/l de l'ANA

Afin d'améliorer la qualité des racines formées, nous avons eu recours à l'ajout du charbon actif au milieu MS modifié pour le comparer à celui sans charbon. Le tableau 23 présente une comparaison des résultats obtenus sur les deux milieux. D'après ces résultats, nous avons remarqué que l'ajout du charbon actif a augmenté le taux d'enracinement par un facteur de 4,5 (tableau 23). Cependant, le test statistique de Duncan n'a montré aucune différence significative entre les deux traitements au seuil de 5 % en ce qui concerne le pourcentage d'enracinement. Les résultats de l'application du charbon actif, malgré leur importance, restent faibles (29,03 %), ce qui est en fait normal vu la nature de la variété utilisée.

**Tableau 23:** Étude de l'enracinement des pousses de la 23<sup>ème</sup> génération sur le milieu de Tavazza en absence et en présence du charbon actif (6 semaines).

Milieux	M5 : MS modifié + 2 mg/l ANA	M6 : MS modifié + 2 mg/l ANA + charbon actif
Cal à la base des pousses	+	+
Pourcentage d'enracinement (%)	6,45 <sup>a</sup>	29,03 <sup>a</sup>
Nombre moyen de racines par pousse enracinée	1	1
Nombre moyen de racines secondaires	0	2
Longueur moyenne de la racine la plus longue (cm)	$5^b \pm 1,20$	$12,5^a \pm 3,01$

Les résultats sont analysés par l'ANOVA suivie du test de Duncan ( $p=0,05$ ). Deux lettres différentes dans la même ligne indiquent deux traitements significativement différents.



**Figure 48 :** Enracinement sur le milieu MS modifié (Tavazza *et al.*, 2004) en présence du charbon actif ; **(a)** taille des racines formées ; **(b)** importance du système racinaire développé à la base du bocal (vue de dessous).

Le milieu additionné du charbon actif a engendré un développement important de racines longues (>12 cm), fines et souples (**Figure 48 a et b**). L'ajout du charbon actif rend le milieu opaque, imitant ainsi les conditions du sol où évoluent normalement les racines, ce qui explique le fort développement des racines après l'ajout de ce produit.

Plusieurs milieux tirés de la littérature ont été essayés pour réussir l'enracinement de l'artichaut. Le tableau 24 résume les différents types de substances testées, les conditions de culture ainsi que les résultats obtenus. Les pousses utilisées pour ces expériences dérivent des rangs de subculture inférieure au 15<sup>ème</sup>. L'absence de réponse à l'enracinement, observé pour tous les milieux, confirme les hypothèses de l'effet du rang de la subculture et celui du génotype sur la réussite de tels protocoles chez l'artichaut, sachant que ces protocoles ont donné jusqu'à 100 % d'enracinement pour d'autres cultivars d'artichaut (Dridi, 2003) (**tableau 24**).

**Tableau 24:** Aperçu sur les essais d'enracinement non concluants effectué sur des pousses du rang inférieur au 15<sup>ème</sup>.

Essais	Origine des pousses	Milieux d'enracinement	Références	Durée de culture	Résultats enracinement
1	Milieu de multiplication	-MS + VG -20 g/l saccharose -10 mg/l A. ascorbique - 2 g/l $\beta$ -cyclodextrine - 2 mg/l ANA	Dridi (2003)	6 semaines	7,7 %
2		-MS + VG -20 g/l saccharose -10 mg/l A. ascorbique - 2 g/l $\beta$ -cyclodextrine, - 2 mg/l ANA	Dridi (2003)	1 semaine suivie par 5 semaines sur milieu sans hormones.	0 %
3		-MS + VG -20 g/l saccharose -10 mg/l A. ascorbique - 10 mg/l AIA	Morone Fortunato <i>et al.</i> (2005)	6 semaines	0 %
4		-MS + VG -20 g/l saccharose -10 mg/l A. ascorbique -30 $\mu$ M Riboflavine - 1 mg/l AIB	Dridi (2003)	1 semaine à l'obscurité suivie de 5 semaines à la lumière (16h)	0 %
5	4 semaines sur milieu sans hormones	-MS + VG -20 g/l saccharose -10 mg/l A. ascorbique - 10 mg/l AIA	Morone Fortunato <i>et al.</i> (2005)	1 semaine suivie par 5 semaines sur milieu sans hormones.	0 % Cal : +++
6		-MS + VG -20 g/l saccharose -10 mg/l A. ascorbique - 2 mg/l AIA		6 semaines	0 % Cal : +
7		-MS + VG -20 g/l saccharose -10 mg/l A. ascorbique - 0,4 mg /l ANA - 5 mg/l GA3	Pécaut et Martin (1993) Morzadec et Hourmant (1997)	6 semaines	0 %
8		-MS + VG -20 g/l saccharose -10 mg/l A. ascorbique - 3 mg /l ANA, - 2 g/l $\beta$ -cyclodextrine	Brutti <i>et al.</i> (2000), (2002) Apostolo <i>et al.</i> (2005)	1 semaine suivie par 5 semaines sur milieu sans hormones.	0 % Cal : +++
9	Milieu d'élongation	-MS + VG -20 g/l saccharose -10 mg/l A. ascorbique - NAA 2 mg/l	Ancora <i>et al.</i> (1981)	4 semaines	0 % Cal : +
10		- MS/2 + VMS - 2 g/l $\beta$ -cyclodextrine, - 2 mg/l ANA	Dridi (2003)	6 semaines	0 % Cal : ++
11		- MS + VMS* - 20 g/l Saccharose - 2 g/l $\beta$ -cyclodextrine,	Dridi (2003)	6 semaines	0 % Cal : ++

		- 2 mg/l ANA			
--	--	--------------	--	--	--

\* : Vitamines de Murashig et Skoog

En plus de ce qui est mentionné au niveau du tableau 24, d'autres paramètres que la composition des milieux de culture, tels que l'effet de la lumière, ont été essayés mais sans résultats positifs sur l'enracinement de notre accession Art21.

## 5- Acclimatation

La méthode d'acclimatation appliquée dans notre étude, pour les pousses enracinées ou non, n'a pas donné de résultats satisfaisants. En effet, les vitroplants meurent une semaine à dix jours après leur transplantation, et ce dans les deux substrats testés (tourbe et/ou tourbe avec perlite en proportion égale). On remarque un affaiblissement du vitroplant qui se flétrit progressivement avant de mourir. La Figure 49 représente la seule pousse enracinée qui a réussi la phase d'acclimatation.



**Figure 49 :** Pousse après un mois d'acclimatation dans la tourbe.

### **III- Discussion**

Pour trouver une application à grande échelle, les protocoles de multiplication doivent être fiables, simples et reproductibles. Ils doivent atteindre deux objectifs majeurs : la conformité des plants produits par rapport aux pieds mère et un taux de multiplication élevé de manière à être économiquement rentables. En ce qui concerne *Cynara cardunculus* var. *scolymus* L., les données bibliographiques montrent que le nombre de pousses régénérées, quel que soit le type d'explant et la technique utilisée, reste assez faible.

Les premiers travaux, sur la culture de tissus de l'artichaut, ont été principalement initiés à partir de méristèmes afin de permettre la production et la multiplication de plantes indemnes de virus (Ancora *et al.*, 1981 ; Pecaut *et al.*, 1983). Toutefois, les difficultés de désinfection et de disponibilité des méristèmes ont incité certains chercheurs à utiliser des semences pour l'initiation de la culture (Lauzer et vieth, 1990, Benoit et Ducreux, 1981 ; Bigot et Foury, 1984).

Dans ce travail, l'accent a été mis sur l'amélioration du taux de multiplication par bourgeonnement des pousses et de son suivi en fonction du nombre de générations et, particulièrement des générations qui avoisinent la 9<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> qui s'apprêtent mieux à l'étape de la rhizogenèse (Dridi, 2003). Nous avons procédé par l'initiation de la culture à partir des graines dépourvues de téguments ; une germination rapide et efficace de graines et leur évolution en plantules ont permis la réalisation des expériences de la multiplication et d'enracinement. La prolifération de vitroplants d'artichaut a été réalisée sur le milieu MS en présence de l'ANA et la kinétine. Un suivi de la multiplication par bourgeonnement a été effectué sur la partie centrale de vitroplants d'artichaut décapirés et débarrassés de leurs racines et leurs feuilles et sur les nouvelles pousses isolées à partir des touffes nouvellement formées.

La décapitation, c'est-à-dire la suppression des bourgeons apicaux, les feuilles et les racines de jeunes plants, a été très efficace pour produire des pousses multiples, comme en témoigne la production de 17 bourgeons en moyenne par plante à la génération G<sub>0</sub>. Ainsi, la dominance apicale du bourgeon terminal a été brisée et les bourgeons axillaires des feuilles ont été développés en nouvelles pousses, probablement parce que la production d'auxine dans l'apex des pousses inhibe l'excroissance de bourgeons axillaires (Thimann et Skoog, 1933). L'importance de la préparation des explants, pour la production des pousses axillaires, a été également signalée pour le poivre (Sanatombi et Sharma, 2007).

Le milieu MS de prolifération, que nous avons utilisé, a été supplémenté par la kin et une faible concentration de l'ANA comme régulateurs de croissance. L'importance de la kin à induire la formation de bourgeons a été signalée pour l'artichaut par de nombreux chercheurs (Ancora *et al.*, 1981 ; Bigot et Foury, 1984 ; Lauzer et Vieth, 1990 ; Pécaut et Martin, 1993 ; Morzadec et Hourmant, 1997 ; Brutti *et al.*, 2000 ; Tavazza *et al.*, 2004 ; Apostolo *et al.*, 2005 ; Schneider, 2005 ; Bekheet, 2007).

Normalement, les milieux utilisés pour la micropropagation de l'artichaut contiennent les macroéléments de base de MS, toutefois des concentrations modifiées ont souvent été utilisées. Pour la micropropagation de l'artichaut, Rossi et De Paoli (1992) ont réduit de moitié tout le contenu en macroéléments et Brutti *et al.* (2000) ont réduit de moitié seulement les concentrations de  $\text{KNO}_3$  et  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . La composition en macro et microéléments joue un rôle essentiel dans la qualité des pousses développées *in vitro* (Tavazza *et al.*, 2004). Ces derniers auteurs et afin d'avoir des pousses de meilleure qualité utilisèrent un rapport ammonium/nitrate modifié. Sur notre milieu contenant à la fois les sels de MS et les vitamines de Gamborg, les pousses ont montré une prolifération importante et un développement normal sans apparition de cal à la base des pousses ni de structures vitrifiées.

En outre, des études antérieures (Ancora *et al.*, 1981 ; Pécaut *et al.*, 1983 ; Rossi et De Paoli, 1992 ; Castiglione *et al.*, 2007) ont montré que de faibles concentrations de régulateurs de croissance ont amélioré la qualité des explants, tandis que des concentrations plus élevées ont provoqué une augmentation de l'hyperhydricité et le brunissement des pousses. Des milieux de culture avec de faibles concentrations de régulateurs de croissance ont été utilisés durant les phases d'établissement et la prolifération de ce protocole afin d'éviter de tels effets négatifs.

Le taux de multiplication de 7,56 pousses/explant/subculture, obtenu dans ce travail, est considéré très important pour cette espèce. Des taux de multiplication différents ont été déjà rapportés pour d'autres cultivars d'artichaut, mais restent moins importants que celui que nous avons obtenu. Un taux de multiplication de 4,5 a été obtenu par Ancora *et al.* (1981) à partir de pousses du cultivar de printemps 'Romanesco' après 3 semaines de culture sur milieu MS de base supplémenté avec 5 mg/l de kin et 0,5 mg/l de l'AIA. Pour le cultivar d'automne d'artichaut 'Violet de Provence', Elia *et al.* (2007) ont obtenu un taux de multiplication maximale de 4,5 dans un milieu de prolifération des pousses présentant une faible concentration de cytokinine combinée à l'auxine avec un faible rapport cytokinine/auxine.

Pour le cultivar ‘Nobre-UPF’, [Augustin et al. \(2006\)](#) ont rapporté un taux de multiplication de 2,7 en cultivant des apex sur MS + 0,5 mg/l de kin et 0,1 mg/l de l’AIB. Pour ce même cultivar d’artichaut, [Grando et al. \(2009\)](#) ont évalué 8 milieux de multiplication combinant 4 concentrations de BAP (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 mg/l) et d’ANA (0 et 0,1 mg/l) et obtenu de faibles taux de multiplication variables de 1,88 à 2,23. En évaluant l’effet de différents régulateurs de croissance (kinétine, BAP, 2ip) et de sulfate d’adénine dans la multiplication du cultivar précoce français d’artichaut, [Brutti et al. \(2000\)](#) ont obtenu un taux de multiplication de 5:1 en utilisant 2,0 mg/l de BAP seule. Cependant, avec cette concentration, la longueur des pousses a été réduite (0,57 cm). [Tavazza et al. \(2004\)](#) a également obtenu un bon taux de prolifération de ‘Spinoso sardo’ avec des pousses de bonne qualité, en combinant une cytokinine (2 mg/l de kinétine) et l’auxine (0,1 mg/l AIB) dans un milieu présentant une réduction de l’azote sous forme de l’ammonium accompagné d’une augmentation de nitrate.

En comparant ces données avec le présent travail, on peut conclure que 1 mg/l de la kin associé avec 0,1 mg/l d’ANA permet de trouver une balance cytokinine/auxine convenable pour la multiplication de l’accession Art21 d’artichaut. En plus, les pousses étaient vigoureuses et présentant un aspect normal, ce qui suggère que la combinaison de la kin avec l’ANA semble être intéressante afin de favoriser la prolifération des pousses. Conformément à [Schneider \(2005\)](#), une concentration égale de la kin combinée à l’ANA est la plus recommandée pour la prolifération des pousses qui seront utilisées par la suite dans l’enracinement.

Dans notre cas, l’augmentation du taux de multiplication à plus de 7 pousses/explant/subculture de quatre semaines, résulterait de l’action combinée des phytohormones et des suppléments présents dans le milieu à savoir le sulfate d’adénine et le phosphate monosodique. Le sulfate d’adénine joue un rôle important dans l’organogénèse. En synergie avec une cytokinine (kin ou BAP), il stimule la croissance des cellules et favorise la formation des tiges ([Raha et Roy, 2001](#) ; [Daudet et al., 2011](#)). Nos résultats sur l’ajout de phosphate monosodique et le sulfate d’adénine au cours de la phase de prolifération sont cohérents avec ceux de [Lauzer et Vieth \(1990\)](#), qui ont démontré l’effet positif de ces deux composés sur le bourgeonnement. L’utilisation de ces composés, au cours de la phase de prolifération, a été mentionnée également par d’autres auteurs pour l’artichaut ([Bigot et Foury, 1984](#) ; [Pecaut et Martin, 1993](#) ; [Morzadec et Hourmant, 1997](#) ; [Brutti et al., 2000](#)) et pour d’autres espèces tels que *Jatropha curcas* L. ([Medza Mve et al., 2010](#)). Tandis que chez

*Vitis*, la combinaison du sulfate d'adénine à la BAP a déprimé la multiplication des pousses ([Chee et Pool, 1985](#)).

Durant la deuxième et la troisième génération, nous avons noté une diminution du nombre moyen de pousses par explant ([tableau 18](#)), cette diminution a été liée à un changement imprévu dans l'intensité lumineuse qui est passée de 20 à 40  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . D'après ces résultats, nous pouvons dire qu'une forte luminosité affecte le taux de multiplication de notre accession Art21, sachant que le rétablissement des bonnes conditions (intensité de 20  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) a doublé le taux de multiplication en réduisant le brunissement des pousses. Les travaux antérieurs sur l'artichaut et qui ont utilisé de fortes intensités lumineuses sont arrivés à des taux de multiplication moins importants. Citant par exemple [Dridi, \(2003\)](#) qui a obtenu un taux de 4,5 avec une intensité de 45  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  et récemment [Bedini et al., \(2012\)](#) n'ont pas dépassé une moyenne de 5 pousses par explant sous une intensité de 70  $\mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Le taux a été également amélioré en réduisant la densité des explants par unité de surface (3 à 4 explants/132 cm<sup>2</sup>) et en utilisant des explants de taille supérieure à 1cm. Bien que, facile à tester et simple à appliquer, l'effet de la taille et de la densité des explants sur la multiplication *in vitro* de l'artichaut a été totalement ignoré dans les travaux précédents. Dans la majorité des études, l'attention s'est focalisée sur l'optimisation des hormones et l'état des milieux.

Nos résultats montrent que l'augmentation du nombre de pousses par surface de culture réduit le nombre de bourgeonnements. C'est probablement à cause de la compétition pour les nutriments entre les pousses. Une faible densité est donc en faveur d'une meilleure nutrition des explants et une diminution de la concentration exsudats de bourgeons. Ces résultats sur l'artichaut sont cohérents avec ceux sur le peuplier, où [Chun et al. \(1986\)](#) ont montré que le nombre de pousses cultivées par récipient de culture a une influence significative sur la prolifération des pousses. Par ailleurs, [Monette \(1983\)](#) a signalé qu'il est concevable que la surface disponible pour la culture puisse, dans une certaine mesure, réguler le nombre de bourgeons axillaires qui peuvent se développer. D'après les résultats de ce travail, les densités de trois et quatre explants, par bocal de culture, donnent des résultats similaires, mais en tenant compte de l'aspect commercial, une densité de quatre explants reste la meilleure pour réduire le coût de production. [Hamad et Taha \(2009\)](#) ont montré que le coût de production de pousses *in vitro* de l'ananas pourrait être réduit de moitié par l'adoption d'une densité de 3 pousses au lieu d'une pousse par la même surface de culture.

L'effet de la hauteur des pousses, sur l'efficacité de la culture de l'artichaut, n'a pas encore été rapporté. Peu d'études, sur l'effet de la taille de l'explant sur la formation des pousses, ont été publiées pour d'autres espèces ; gerbera ([Nhut et al., 2007](#)), le cèdre ([Renau-Morata et al., 2005](#)). Dans la présente étude, les explants de 1 à 1,5 cm de hauteur ont entraîné une meilleure prolifération des pousses. Pour [Smith \(2000\)](#), la taille des explants a un effet sur la réponse du tissu. Ceci a été renforcé par [Renau-Morata et al. \(2005\)](#) qui ont expliqués que la taille d'explants est un facteur important qui influe sur la prolifération des bourgeons axillaires en culture *in vitro*. Les explants de grandes tailles contiennent probablement plus de réserves en éléments nutritifs et en régulateurs de croissance endogènes pour soutenir la culture ([Smith, 2000](#)). [George et al. \(2008\)](#) ont également confirmé que les grands explants survivent mieux et croissent plus rapidement dès le début que ceux de petite taille. Il existe une corrélation entre la taille de l'explant et l'âge, dans ce sens, [Nhut et al. \(2007\)](#) ont rapporté que comme l'âge des bourgeons de gerbera augmente, la capacité de régénération augmente significativement. Les chercheurs ont cité que non seulement l'état physiologique qui diffère entre les bourgeons, mais la taille a probablement joué un certain rôle, parce que les grands tissus ont plus de réserves en éléments nutritifs, ce qui peut promouvoir le développement de pousses.

À tous les facteurs cités précédemment, qui ont un apport direct sur la prolifération des pousses chez l'artichaut, s'ajoute la durée d'une génération qui a montré un effet direct sur le maintien du taux de multiplication durant toutes les générations. De toutes les cinq durées testées (3, 4, 5, 6 et 7 semaines de culture), une culture de quatre semaines sur le milieu de prolifération apparaît la plus efficace en termes de qualité et quantité de pousses régénérées (7,47), sachant qu'un prolongement de cette durée provoque la diminution du taux de prolifération suite à la nécrose des pousses néoformées (4,37) (**tableau 19**). La durée de culture sur le milieu de prolifération est donc un facteur très important, chose qui est confirmée par [Zurinsky et al. \(1994\)](#) qui ont noté que le taux de multiplication des pousses de *Pontederia cordata* a diminué considérablement lorsque l'intervalle entre les subcultures a dépassé 28 jours. Les explants d'artichaut sécrètent des composés phénoliques qui altèrent le milieu de culture et la qualité des pousses. En effet, le respect d'une durée de quatre semaines sur milieu de culture influe directement sur le temps nécessaire pour la production de vitroplants d'artichaut et également sur le taux de multiplication. Une durée fixe de production de vitroplants permet la maîtrise du cycle de culture nécessaire pourachever une telle production et permet également la mise en disposition des agriculteurs d'un matériel de

propagation à tout moment de l'année pour une production économiquement rentable. Dans ce sens et d'après nos résultats, nous pouvons ajouté que l'allongement de la durée de culture pour des raisons de conservation du matériel végétal de l'artichaut sur milieu de culture est non recommandé suite à l'énorme travail que demande le transfert des pousses vers un milieu neuf et l'enlèvement des parties brunes qui sont à l'origine de l'altération du milieu de culture, d'où la recommandation de l'utilisation de la technique de cryoconservation (voir chapitre suivant). Nous avons cerné le temps de génération qui se limite à quatre semaines réduisant ainsi le coût de production.

Dans le but d'améliorer le taux d'enracinement, nous avons effectué un passage par une étape d'élongation afin d'avoir des pousses de taille importante capables de réussir l'enracinement. Le travail de [Lahlimi-Alami et al., \(2001\)](#), sur le kiwi (*Actinidia chinensis*), a montré qu'un passage sur milieu d'élongation (MS + BAP à 3 mg/l + saccharose à 20 g/l) a été nécessaire suite à la taille réduite et le caractère juvénile des explants développés sur le milieu de multiplication avant d'entamer l'enracinement.

Dans ce travail, la culture de pousses sur le milieu MS modifié (ME2) (**tableau 20**, **Figure 45b**) a amélioré non seulement la croissance des pousses, mais aussi leur qualité, alors que le milieu MS (ME1) a favorisé plutôt la prolifération de nouveaux bourgeons axillaires au lieu de l'élongation des pousses. Nos résultats obtenus avec le milieu MS sont partiellement similaires à ceux obtenus par [Ordas et al. \(1990\)](#), qui ont obtenu une élongation associée à une prolifération des pousses en adoptant la combinaison AIB (0,5 mg/l)/BAP (0,5 mg/l). Alors que [Grando et al., \(2011\)](#), en utilisant également le milieu MS sans régulateur de croissance, ont obtenu des pousses de 5 à 6 cm de longueurs, de bonne qualité et ayant des feuilles de couleur vert foncé.

D'après [Margara \(1989\)](#), le milieu de Murashige et Skoog est caractérisé principalement par une très forte teneur en azote dont le tiers est apporté sous forme réduite (ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et une concentration élevée en potassium (K<sup>+</sup>). Ces deux composants interviennent fortement dans le développement des plantes. En outre, l'azote est l'élément minéral qui favorise le développement végétatif, tandis que le potassium favorise la division cellulaire. Ceci explique la capacité de certaines espèces à se développer et à s'allonger après le repiquage dans un milieu MS sans hormone comme le cas d'*Aristolochia longa* L. Au contraire, nos résultats ont montré que l'utilisation du milieu MS modifié (ME2), présentant une réduction de la

concentration en azote sous forme d'ammonium, semble être appropriée pour une bonne évolution des pousses de notre cultivar avant d'entamer la rhizogenèse.

Pour quelques espèces et selon [Cornu et Boulay, \(1986\)](#), l'elongation et l'enracinement prennent place sur le même milieu (Peuplier, Saule, Tremble). Également, les travaux de [Quoirin et al. \(1974\)](#) et [Druart et al. \(1983\)](#) ont montré que, dans de nombreux cas, il suffit de laisser grandir suffisamment les plantules sur le milieu de multiplication avant de les faire passer en enracinement, chose qui n'est pas adéquate pour nos pousses, car un prolongement de la durée de culture sur le milieu de multiplication provoque la nécrose des pousses et par la suite, la diminution du taux de multiplication. Dans notre cas, le passage par un milieu d'elongation (MS modifié + kin 0,5 mg/l + AIB 0,1 mg/l + 2iP 0,01 mg/l) a donc été nécessaire. Le critère d'elongation retenu est la taille de la pousse. Après deux semaines de culture sur milieu d'elongation, les pousses deviennent prêtes à être transférées sur le milieu d'enracinement.

En ce qui concerne le processus d'enracinement, l'artichaut a toujours présenté des difficultés d'enracinement *in vitro* comme le montrent des travaux intéressants consacrés à la récalcitrance de sa rhizogenèse ([Ancora et al., 1981](#) ; [Morzadec et Hourmant, 1997](#) ; [Dridi 2003](#) ; [Morone Fortunato et al., 2005](#) ; [Apostolo et al., 2005...](#)). Plusieurs milieux tirés de la littérature ont été essayés pour réussir la phase d'enracinement et à travers les différents essais que nous avons effectués, nous avons été confrontés à ces difficultés d'enracinement.

Notre étude, de cette étape de culture, a été effectuée sur des pousses avec et sans passage par un milieu d'elongation. Dans un premier temps, une expérience avec trois milieux dont la composition hormonale était différente et des pousses issues du milieu de multiplication a été effectuée. Durant cette phase d'enracinement, nous avons noté une bonne évolution des pousses sur le milieu contenant la combinaison ANA 0,5 mg.l<sup>-1</sup> /kin 0,05 mg.l<sup>-1</sup> et le milieu contenant 2 mg/l de l'ANA avec 2 g/l de la β-cyclodextrine. Pour ce dernier milieu, l'évolution en taille a été accompagnée par un faible pourcentage d'enracinement qui n'a pas dépassé 8 %, alors qu'aucun enracinement n'a été enregistré pour les deux autres milieux. Ceci est conforme avec les résultats rapportés dans la littérature. Selon [Dridi \(2003\)](#), l'ANA à 2mg/l a donné les meilleurs résultats, vu le taux d'enracinement, par rapport aux autres auxines utilisées, comme l'AIB, et par rapport aux autres concentrations. [Ancora et al \(1981\)](#) ont induit un taux d'enracinement de 84 % après deux subcultures sur un milieu MS/2 supplémenté de l'ANA à 2 mg/l, et ils ont confirmé que l'AIB est moins efficace que l'ANA

dans l'induction racinaire. Plusieurs autres chercheurs ont essayé l'enracinement de l'artichaut avec l'ANA, souvent à 2 mg/l (Moncousin, 1981 ; Pécaut *et al.*, 1982 ; Bigot et Foury, 1984) et ils ont trouvé généralement des taux satisfaisants d'enracinement. Schneider (2005) qui a travaillé avec une concentration faible de l'ANA (0,5 mg/l) a trouvé des résultats beaucoup moins brillants (32 %).

Cependant, nos résultats montrent un faible taux d'enracinement, ce qui est probablement dû à l'effet du génotype. En fait, les travaux de Iapichino (1996) viennent montrer que l'effet de l'ANA même s'il est bien favorable dans la plupart des études menées sur l'enracinement de l'artichaut, reste néanmoins dépendant de la variété, par exemple la variété 'violetto spinoso di sicilia' a montré des résultats insatisfaisants avec cette hormone, à savoir un taux réduit d'enracinement, formation de cal et apparition de nécroses. D'autre part, Morone Fortunato *et al.* (2005) ont montré que certaines variétés comme le type "catanese", sur lequel ils ont travaillé, valorisent mieux l'utilisation de l'AIA à des concentrations élevées. Ils ont montré également que l'excès de l'ANA et de l'AIB inhibe l'enracinement.

D'autre part, l'AIB quoique reconnue comme ayant une propriété rhizogène claire sur plusieurs autres espèces, sur l'artichaut, cette propriété n'a pas pu être vérifiée. En effet, Epstein et Ludwig-Müller (1993) ont montré que les cultivars difficiles à enraciner comme dans le cas de l'artichaut métabolisent l'AIB plus rapidement que les cultivars faciles à enraciner et l'AIB disparaît dès le premier jour. Et vu que l'induction racinaire est retardée chez l'artichaut, la rapidité avec laquelle l'AIB disparaît, ne laisse pas le temps à ce dernier pour induire la formation des racines.

Nous avons aussi constaté que l'ANA stimule la callogenèse plus que l'AIB, surtout à fortes concentrations (Figure 46 b et c), ceci a été confirmé par les travaux de Dridi (2003), De Klerk *et al.* (1997) et Lauzer et Vieth (1990) qui ont montré que l'ANA favorise l'apparition de cal plus que les autres auxines.

Au cours de la phase d'enracinement, l'utilisation de  $\beta$ -cyclodextrine combiné à l'ANA s'est avérée inutile, car elle n'a pas amélioré l'enracinement et les racines sont formées sur des cals avec une mauvaise qualité. Plusieurs travaux ont rapporté l'effet bénéfique de ce produit au milieu de culture sur l'amélioration du pourcentage de l'enracinement chez d'autres espèces tels l'olivier (Mura *et al.*, 1995) et le jojoba (Brutti *et al.*, 2000). Pour l'artichaut, les travaux de Brutti *et al.* (2000) ont aussi rapporté que l'ajout de 3 mg/l de  $\beta$ -cyclodextrine au milieu d'enracinement a augmenté trois fois le taux d'enracinement et deux fois le nombre de

racines par pousse enracinée. D'autre part, [Dridi \(2003\)](#) a réussi l'obtention de 100 % d'enracinement avec l'addition de 2 g/l de  $\beta$ -cyclodextrine. Selon [Mura et al., \(1995\)](#), cela est expliqué par l'action des oligosaccharides cycliques qui augmentent la solubilité ou la perméabilité de la membrane cellulaire aux auxines favorisant ainsi la rhizogenèse ([Brutti et al., 2000](#) ; [Cavallaro et al., 2004](#)). Pourtant, [Brutti et al. \(2000\)](#) ont montré que les cyclodextrines peuvent avoir aussi des effets négatifs, ils favorisent la callogenèse à partir de 2 g/l et engendrent une malformation des pousses et des racines si les concentrations sont élevées. De même, [Dridi \(2003\)](#) a confirmé cette constatation en ajoutant que la  $\beta$ -cyclodextrine a entraîné une baisse significative au niveau de la longueur des racines et le nombre de racines par pousse enracinée. La différence entre les résultats notés, pour notre cultivar et ceux trouvés par d'autres chercheurs sur leurs cultivars, concernant la réponse à la rhizogenèse, peut être attribuée à la différence génotypique ce qui a mené à la faible efficacité indiquée dans le cultivar étudié. Cela impose la nécessité d'optimisation spécifique des conditions d'enracinement pour chaque génotype d'artichaut.

L'allongement des pousses, par un passage préalable par milieu d'élongation, avait un effet remarquable sur l'amélioration de l'enracinement de notre accession Art21. En fait, peu de chercheurs ont utilisé le milieu d'élongation ([Ordas et al., 1990](#) ; [Grando et al., 2011](#)). Pour l'artichaut, cette étape n'est recommandée que pour quelques cultivars qui ont montré une grande difficulté de l'enracinement alors que d'autres auteurs ont eu recours à une phase de pré-enracinement au lieu de l'élongation, par culture des pousses sur milieu sans régulateurs de croissance ([Brutti et al., 2000](#) ; [Brutti et al., 2002](#) ; [Apostolo et al., 2005](#)) ou avec une faible concentration de l'AIA et le paclobutrazol afin de stimuler l'induction de racines ([Bedini et al., 2012](#)). Selon [Ancora \(1986\)](#), la culture de pousses dans un milieu dépourvu de cytokinines, avant le transfert vers le milieu d'enracinement, est essentielle pour l'enracinement. Ceci est cohérent avec nos résultats où des pousses directement transférées du milieu de prolifération au milieu d'enracinement n'ont pas réussi à s'enraciner (**tableau 21**).

De même, [Iapichino \(1996\)](#) qui a travaillé avec un cultivar montrant le même résultat pour l'effet de l'ANA sur la rhizogenèse que le nôtre, a réussi l'enracinement à 60 % après passage par un milieu d'élongation. Ce même auteur a confirmé récemment que le transfert de micropousses d'artichaut à un milieu dépourvu de cytokinines ou avec une faible concentration de cytokinine est essentiel pour l'enracinement et cela en améliorant son efficacité ([Iapichino, 2013](#)). Le pourcentage d'enracinement, obtenu par [Iapichino \(1996\)](#), est très similaire à celui obtenu dans notre essai (58,33 %) avec l'ANA à 2 mg/l en milieu MS.

Cependant, la qualité des racines obtenues dans ce dernier milieu n'était pas encourageante, car elles étaient courtes et dures.

Dans l'objectif d'améliorer la qualité ainsi que la quantité des racines formées sur les vitroplants d'artichaut, nous avons essayé le charbon actif dont la contribution dans l'amélioration de l'enracinement est signalée pour le fraisier (El Hamdouni *et al.*, 2000), l'acacia (Quoirin *et al.*, 2001), les orchidées (Moraes *et al.*, 2005) et également pour l'artichaut (Bigot et Foury, 1984; Morzadec et Hourmant, 1997). L'incorporation dans le milieu de charbon activé (**tableau 23**) a augmenté le pourcentage d'enracinement de 6,45 % (milieu sans charbon actif) à 29,03 % (milieu avec charbon actif). Cette incorporation a affecté significativement la longueur des racines formées. Ce qui est conforme aux résultats publiés par Bigot et Foury (1984), Le Guen-Le Saos et Hourmant (2001) ainsi que Morzadec et Hourmant (1997), qui ont rapporté une nette amélioration du taux d'enracinement par l'utilisation du charbon actif. Sur ce milieu, la qualité des racines formées était encourageante, elles sont plus flexibles, plus ramifiées et possèdent une longueur plus importante que celles formées sur le milieu sans charbon actif. Ce dernier est donc important tant pour le nombre de racines que pour leur qualité. Dans ce sens, le travail de Dumas et Monteuis (1995) a montré que pendant l'enracinement *in vitro* de pousses micropropagées de *Pinus pinaster*, l'addition du charbon actif dans le milieu d'enracinement a amélioré le potentiel de l'enracinement adventif, non seulement en termes de taux d'enracinement, mais aussi une amélioration du nombre et de la longueur des racines. L'addition du charbon actif dans le milieu d'enracinement (M6) a également réduit la formation du cal brun et l'hyperhydricité des pousses. D'après Pan et van Staden (1998) et Thomas (2008), le succès avec le charbon actif s'expliquerait par sa capacité, d'une part, à absorber les substances inhibitrices diffusées dans le milieu, et d'autre part, à créer un environnement obscur favorable à la formation et à la croissance des racines (conditions présentes dans le sol où évoluent normalement les racines).

Vu que sur le milieu sans charbon actif, les pousses émettent des racines ne dépassant pas 5 cm de longueur, avec l'ajout de 2 g/l de cette substance, les racines atteignent plus de 12 cm et cela dans la même durée que le milieu précédent. Nous pouvons dire que le charbon accélère l'émission des racines comme il est rapporté par les travaux de Damiano (1980) qui a remarqué que l'addition de 1 à 2 g/l de charbon actif au milieu d'enracinement réduit le temps nécessaire à l'émission des racines et accélère leur croissance. De même, Boxus *et al.* (1984) et Desjardins *et al.* (1987) ont rapporté un effet similaire à une concentration de 0,5 à 0,8 g/l.

Les différences génotypiques dans la réponse à la concentration hormonale et les cyclodextrines utilisés pour un milieu d'enracinement, entre ce travail et les travaux antérieurs sur l'artichaut, montrent la faible efficacité indiquée dans le cultivar étudié et imposent l'optimisation spécifique des conditions de rhizogenèse pour chaque génotype d'artichaut.

Durant la phase d'enracinement et malgré l'application des différents protocoles cités dans la littérature et qui ont donné des pourcentages d'enracinement qui dépassent les 90 %, nous n'avons pas pu réussir d'une manière définitive l'enracinement de notre accession Art21. Les pourcentages d'enracinement des vitroplants d'artichaut cités dans les différents travaux sont très variables et reflètent la difficulté de cette phase. D'après [Iapichino \(2013\)](#), le taux de la fréquence d'enracinement *in vitro* dépend du génotype, mais également du protocole utilisé. [Benoit et Ducreux \(1981\)](#) ont obtenu 1 % des plantes enracinées avec le cultivar Camus de Bretagne. Avec ce même cultivar, [Moncousin \(1981\)](#) a obtenu 30 % d'enracinement et [Bigot et Foury \(1984\)](#) ont atteint 77 % chose qui confirme qu'avec le même cultivar et des protocoles différents, les pourcentages obtenus diffèrent d'une manière considérable.

Il est à noter qu'un bon début d'enracinement n'a été obtenu que par les pousses des rangs supérieurs qui avoisinent la 17<sup>ème</sup> (**tableau 21, 22 et 23**). Dans ce sens, [Dridi \(2003\)](#) a rapporté que l'artichaut s'enracine mieux si les pousses proviennent des rangs de subcultures supérieurs au 10<sup>ème</sup>. Par conséquent, tous les essais effectués avec des pousses issues des premiers rangs de subcultures avaient abouti à l'échec (**tableau 24**). [Dridi \(2003\)](#) a expliqué la réussite de l'enracinement à ce niveau par le rajeunissement du matériel végétal au cours des différentes subcultures. Cette constatation est appuyée par les résultats de [Moncousin et Ducreux \(1984\)](#), qui ont trouvé que des pousses issues de la 15<sup>ème</sup> subculture se comportent comme des pousses issues de graines vis-à-vis des traitements rhizogènes. [Bigot et Foury \(1984\)](#) ont eux aussi constaté que les pousses à morphologie juvénile avaient plus d'aptitude à s'enraciner que celles ayant atteint le stade adulte.

Un travail important reste à accomplir afin de compléter la mise au point d'un milieu convenable pour notre accession, permettant d'obtenir un taux d'enracinement encourageant et des pousses de bonne qualité capable de réussir l'étape de l'acclimatation.

L'acclimatation est la phase la plus critique de la micropropagation chez plusieurs espèces végétales et constitue, avec ses nouvelles conditions *in vivo*, un obstacle majeur pour l'utilisation de la micropropagation à l'échelle industrielle à cause des problèmes de survie. La méthode d'acclimatation appliquée dans notre étude n'a pas donné de résultats

satisfaisants. En effet, les vitroplants meurent une semaine à dix jours après leur transplantation. On remarque un affaiblissement du vitroplant qui se flétrit progressivement avant de mourir, cela peut être en relation avec les racines produites *in vitro* qui ne sont pas complètement fonctionnelles. Un transport inadéquat de l'eau et des minéraux à partir des racines vers la partie aérienne de la plante, et des glucides vers les racines, s'est produit suite au développement de ces racines à partir de cals sur la base de la tige. Contrairement à nos résultats [Tavazza et al. \(2004\)](#), en utilisant comme substrat un mélange de tourbe et de perlite et en suivant la même méthodologie que la nôtre, ont pu arriver à 95-100 % de survie des pousses enracinées.

Durant la phase d'enracinement, l'ajout du charbon actif a favorisé l'enracinement et amélioré la qualité des racines formées. Néanmoins, les plantes transférées au sol n'ont pas survécu plus de 2 semaines. En s'accordant avec [Bigot et Foury \(1984\)](#), l'échec de l'acclimatation de nos pousses peut être expliqué également par le faible nombre de racines obtenu. Selon cet auteur, les pousses ayant une seule racine montrent un taux de survie réduit au cours de l'acclimatation. Par contre, [Lauzer et Vieth \(1990\)](#) ont rapporté un taux de survie égale à 92 % avec des pousses ayant une ou deux racines chacune. En conclusion, la réussite de l'acclimatation dépend, dans ce cas, du génotype.

## **Conclusion**

À ce jour, les protocoles couramment utilisés pour la multiplication *in vitro* de l'artichaut ne sont pas satisfaisants pour tous les cultivars et l'effet du génotype impose la mise au point d'un protocole de culture *in vitro* spécifique à chaque cultivar ou variété d'artichaut. Dans ce travail, nous avons rapporté un protocole de micropropagation pour l'accession Art21 d'artichaut. Nos résultats indiquent clairement que l'élimination du bourgeon apical, les feuilles et les racines des plantules issues de graines, dans la première étape de culture *in vitro*, a augmenté considérablement le développement des bourgeons axillaires. Cette étude nous a permis également de déterminer la taille appropriée pour la régénération des pousses et d'analyser l'effet de la densité d'explants sur le bourgeonnement *in vitro* de l'artichaut ainsi que la durée d'une génération. Ces résultats pourraient être un outil supplémentaire pour l'amélioration et le maintien du taux important de multiplication obtenu et qui est de 7,56. En outre, le respect de ces paramètres contribuera certainement au développement de la culture *in vitro* de l'artichaut et ceci par la réduction des pertes en matériel végétal, ainsi qu'un gain au niveau des milieux de culture et produits. Nos essais d'enracinement ont mis au point la propriété récalcitrante de notre accession à la rhizogenèse, étant donné les difficultés que nous avons rencontrées pour développer un protocole convenable, même en utilisant ceux qui apparaissent les plus prometteux dans la littérature. Toutefois, on peut retenir le protocole qui se base sur l'utilisation du milieu MS modifié, l'ANA 2 mg/l, le charbon actif 2 g/l et sur un passage préalable par un milieu d'elongation avant d'entamer l'étape d'enracinement.

La méthode décrite dans cette étude peut être utilisée pour une propagation rapide et à grande échelle de l'accession Art21 d'artichaut. Nos protocoles semblent être très encourageants, cependant, la phase d'enracinement est toujours l'étape la plus difficile dans la micropropagation. Des travaux supplémentaires sont donc nécessaires pour améliorer l'enracinement et l'établissement des plantules *in situ*.

---

---

## Chapitre V

---

# Cryoconservation de l'artichaut (*Cynara* *cardunculus* var. *scolymus* L.)

---

**Chapitre V :**  
**Cryoconservation de l'artichaut (*Cynara cardunculus* var.  
*scolymus* L.)**

---

**Résumé**

La cryoconservation est l'une des méthodes de conservation à long terme les plus prometteuses. Au cours de ce travail, nous avons essayé de mettre en place le processus de cryoconservation par l'application des différentes étapes de la vitrification aux apex d'artichaut, puis de déterminer le milieu de reprise convenable pour ces apex. La démarche a consisté à disséquer, en conditions stériles, des apex prélevés sur du matériel végétal cultivé *in vitro*. Ces apex excisés ont été déshydratés en utilisant la solution de charge (PVS2 : plant vitrification solution 2) puis immergés directement dans l'azote liquide. Après décongélation et immersion dans la solution de récupération à température ambiante pendant 20 min, les apex ont été cultivés sur quatre milieux différents de Murashige et Skoog pour la reprise de croissance. Ce protocole simple a été appliqué avec succès à deux variétés d'artichaut avec un taux de survie allant de 22,22 % pour la variété 'Grato' à 35,71 % pour la variété 'Campagnano'. Ces résultats préliminaires ouvrent la voie du stockage à long terme du germoplasme d'artichaut par la cryoconservation.

## **Introduction**

Le maintien, des ressources phytogénétiques *in situ* et *ex-situ*, a pour objectifs principaux, la conservation de la diversité génétique en général et particulièrement celle des variétés sélectionnées ayant une valeur agronomique et économique. La conservation joue un rôle fondamental dans la préservation et contre la disparition d'espèces végétales.

Sur le plan économique, l'artichaut est l'une des cultures les plus importantes dans le bassin méditerranéen. Le germoplasme d'artichaut est le plus souvent conservé dans des collections sous serre, mais cela ne permet pas une préservation sécurisée à long terme. Le grand espace requis, le coût élevé de l'entretien (Engelmann, 2011), les risques de perte d'accessions par des erreurs humaines, les variations climatiques et les maladies sont parmi les problèmes qui limitent l'utilisation de ce type de maintien à long terme. La conservation *in vitro* du matériel végétal, dans des conditions de croissance ralentie (faible température et luminosité), nécessite un repiquage régulier sur milieu neuf. Le processus de repiquage demande une main-d'œuvre importante et fait encourir des risques de contaminations fongiques ou bactériennes au matériel végétal. En outre, malgré des conditions de croissance ralentie, les accessions maintenues *in vitro* sont sujettes aux phénomènes de variations somaclonales et la cryoconservation dans l'azote liquide constitue un choix logique pour le stockage à long terme des cultures à multiplication végétative comme l'artichaut, car elle est sûre et nécessite un minimum d'espace et d'entretien.

Pour surmonter ces problèmes et assurer une conservation à long terme en toute sécurité des ressources génétiques de l'artichaut, le laboratoire de biotechnologie à l'ENEA (Italie) réalise des recherches sur la cryoconservation. C'est une méthode de choix pour assurer un stockage à long terme rentable et sûr des ressources génétiques végétales. Elle est particulièrement adoptée pour les espèces à germination récalcitrante ou à propagation végétative, tel le genre *Cynara*. La conservation à long terme en toute sécurité dans l'azote liquide constitue une collection complémentaire à celle *in vitro* et sert de collection de secours en cas de perte d'accessions pour raisons de contamination, de variations somaclonales ou d'erreurs humaines lors du processus de repiquage.

La cryoconservation est une technique *in vitro* qui consiste en le maintien à une ultra basse température (-196 °C) des tissus et des cellules que l'on souhaite conserver à long terme, en altérant le moins possible leur potentiel vital et leur capacité à régénérer de manière conforme. À cette température, en effet, les divisions cellulaires sont arrêtées et tous les processus métaboliques sont bloqués sans être altérés. Le matériel végétal peut donc être

conservé sans altération ni modification pendant des périodes théoriquement indéfinies, à l'abri de toute contamination, dans un espace limité et avec un entretien réduit (Dulloo *et al.*, 2009). La régénération de ce matériel est rendue possible si la formation de cristaux de glace intracellulaire, à l'origine de dommage physique des biomembranes, est évitée. Ce matériel végétal doit également pouvoir résister aux procédures de congélation et de décongélation afin d'avoir une meilleure survie et une régénération post-cryoconservation.

Différents types de tissus et organes peuvent être cryoconservés, y compris les suspensions cellulaires, le pollen, les cals, les embryons somatiques et zygotiques, les semences, les apex et les bourgeons dormants. Pour les espèces à multiplication végétative, les organes les plus couramment utilisés dans la cryoconservation sont les apex excisés de bourgeons apicaux ou axillaires de pousses cultivées *in vitro* (Lambardi et De Carlo, 2003). L'utilisation des pousses développées *in vitro*, dans les protocoles de la cryoconservation, a plusieurs avantages : elles sont faciles à multiplier et à manipuler et disponibles toute l'année (Reed, 2008). Cette méthode de conservation a été rapportée avec succès pour un certain nombre de cultures, comme la pomme de terre (Schäfer-Menuhr *et al.*, 1997), l'olive (Lynch *et al.*, 2007), le palmier à huile (Dumet *et al.*, 1993) et le bananier (Panis *et al.*, 2005).

Il existe de nombreuses techniques de cryoconservation, notamment la congélation lente contrôlée, la vitrification, l'encapsulation-déshydratation, l'encapsulation-vitrification, la conservation de bourgeons dormants, la préculture-déshydratation et la congélation sous forme de gouttelettes (*droplet-freezing*) (Panis, 2008). La technique de cryoconservation regroupe des étapes successives qui doivent être appliquées correctement à chaque espèce :

- Prétraitement : culture du matériel en présence de substances cryoprotectrices;
- Congélation : immersion directe dans l'azote liquide ou refroidissement programmé jusqu'à -40 à -100 °C, suivi d'une immersion des échantillons dans l'azote liquide ;
- Réchauffement rapide ;
- Post-traitement : culture du matériel dans des conditions favorisant la reprise de sa croissance.

D'une manière générale, les bourgeons dormants et les graines orthodoxes peuvent être cryoconservés sans aucun prétraitement, car ils présentent des processus naturels de déshydratation. Cependant, les quantités élevées d'eau intracellulaire, présentent dans la plupart du matériel biologique utilisé en cryoconservation (bourgeons, embryons, apex, suspensions ou cals), rendent ce matériel très sensible à la congélation. Dans ce dernier cas,

une déshydratation artificielle doit être menée afin de protéger les cellules contre les risques de cristallisation de l'eau intracellulaire. D'après [Withers et Engelmann \(1998\)](#), les techniques adoptées et les mécanismes sur lesquels elles se basent sont différents dans les méthodes de cryoconservation classiques et nouvelles. Les nouvelles méthodes sont basées sur la vitrification, tandis que les techniques classiques de cryoconservation sont basées sur la déshydratation induite par la congélation visant à diminuer la taille et le nombre des cristaux de glace intracellulaires. La vitrification peut être définie selon [Benelli et al., \(2013\)](#) par la transition directe de l'eau de la phase liquide en une phase vitreuse amorphe, empêchant de ce fait la formation de glace cristalline nocive pour l'intégrité cellulaire.

Le travail présenté ici constitue une technologie de pointe que nous avons acquise dans le cadre de la collaboration entre notre laboratoire et celui de Biotechnologie au centre de recherche ENEA en Italie. Il porte sur l'étude de la cryoconservation avec comme modèle de plante multipliée végétativement l'artichaut (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*). L'objectif de ce chapitre est de décrire la technique de la cryoconservation appropriée au matériel génétique de *Cynara*. Le travail de recherche présenté dans ce chapitre a porté essentiellement sur l'évaluation de la composition des milieux de culture utilisés en post-cryoconservation. En effet, ils conditionnent la reprise de croissance des apex et donc le succès de la régénération.

## I- Matériel et méthodes

### 1- Matériel végétal

L'étude a porté sur deux variétés italiennes d'artichaut 'Grato' et 'Campagnano'. Les pousses traitées sont des vitroplants obtenus à partir des parties apicales cultivées *in vitro* sur le milieu MS modifié contenant 2 mg/l de la kin et 0,1 mg/l de l'AIB (milieu de multiplication) (**Annexe 3**). Ces parties apicales ont été prélevées à partir des plantes d'artichaut provenant du champ et ayant une taille d'environ 30 cm. Après l'enlèvement des feuilles externes et la partie basale, les parties apicales de 5 cm ont subi une désinfection sous la hotte selon le protocole de [Tavazza et al. \(2004\)](#) (**annexe 6**). Cette désinfection a été suivie par une mise en culture des explants, pendant trois semaines, sur le milieu d'initiation contenant 0,2 mg/l de l'AIB et 0,8 mg/l de BAP (**annexe 3**). Les bocaux de culture ont été maintenus en chambre de culture couverts avec du papier aluminium durant les deux premiers jours puis transférés à la lumière avec une photopériode de 16 h. Le changement du milieu d'initiation par celui de multiplication a été réalisé après trois semaines. Les apex des pousses obtenues en phase de multiplication sont utilisés pour la cryoconservation.

## 2- Méthodes

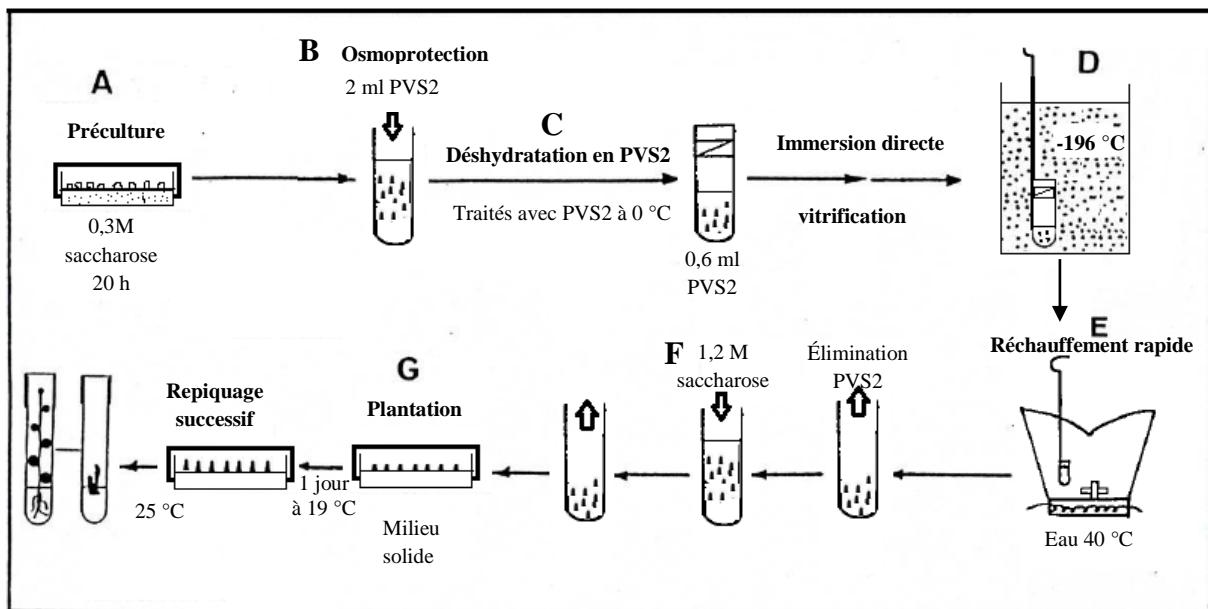
### 2-1- Excision des apex

Un traitement d'adaptation au froid (prétraitement ou durcissement) a été réalisé sur les pousses avant le prélèvement des apex et cela par culture des pousses sur milieu MS modifié (**annexe**) à 4 °C pendant 6 semaines.

L'excision des apex est faite en conditions stériles, sous une hotte à flux laminaire. Les méristèmes apicaux individuels sont excisés sous une loupe binoculaire à l'aide de scalpels (lames n° 23) jusqu'à ce que l'apex soit partiellement recouvert par deux à trois primordia foliaires. L'apex dégagé est alors sectionné à sa base puis utilisé pour la cryoconservation.

### 2-2- Cryoconservation par vitrification

La technique de cryoconservation utilisée pour l'artichaut est la vitrification, appliquée pour la première fois sur *Citrus sinensis* ([Sakai et al., 1990](#)). Le protocole expérimental utilisé lors de ce travail est celui de [Sakai \(1995\)](#) adapté aux apex des deux variétés italiennes d'artichaut, 'Grato' et 'Campagnano'. Le schéma, présenté en **figure 50**, regroupe les différentes étapes de la vitrification de méristèmes de l'artichaut.



**Figure 50:** Schéma général du procédé de cryoconservation des apex de l'artichaut.

A) Préculture des apex sur un milieu MS solidifié supplémenté avec 0,3 M de saccharose pendant 20 heures à 4 °C ; B) osmoprotection : transfert des apex dans des cryotubes et ajout de 2 ml de la solution de charge PVS2, 20 min à 0 °C ; C) déshydratation : remplacement du PVS2 par 2 ml de la même solution fraîche et maintien des cryotubes sur la glace, 90 min ; D) stockage dans l'azote liquide (-196 °C) ; E) décongélation ou réchauffement, 60s à +40 °C ; F) déchargement : ajout de 2 ml du milieu MS liquide contenant 1,2 % de saccharose (température ambiante), 20 min ; G) plantation : culture des apex sur milieu de culture pour la reprise de croissance.

Les apex de 3 à 5 mm de long, prélevés sur les vitroplants, sont maintenus sur milieu MS solide avec 0,03M de saccharose (**annexe 8**) dans des boites de Pétri jusqu'à ce qu'ils soient tous disséqués. La préculture a été réalisée par le transfert des apex sur des boites de Pétri contenant le milieu MS modifié supplémenté par le saccharose à 0,3M (**annexe 8**). La conservation des boites, enveloppées dans une feuille de papier, a été faite à 2-4 °C pendant 20 heures. Au total 117 apex ont été obtenus (58 pour '*Campagnano*' et 59 pour '*Grato*'). Pendant le prélèvement, il est important de ne pas exposer les apex trop longtemps à la température ambiante pour ne pas perdre leur durcissement.

Après 20h de conservation à froid, les méristèmes sont transférés dans des cryotubes contenant 2 ml de la solution de charge PVS2 (Plant vitrification solution 2) préalablement refroidie dans de la glace, cette étape est dite d'osmoprotection. La solution PVS2 contient 30 % (p/v) (3,26M) de glycérol, 15 % (p/v) (2,42M) d'éthylène glycol, 15 % (p/v) (1,9M) de DMSO et 0,4M (=136,8 g/l) de saccharose (**annexe 7**) ([Sakai et al., 1990](#)). Tous ces composés sont dissous dans du milieu MS, le pH est ajusté à 5,8 et la solution est stérilisée par filtration. Les méristèmes sont immergés dans la solution PVS2 pendant 20 minutes à 0 °C sur la glace.

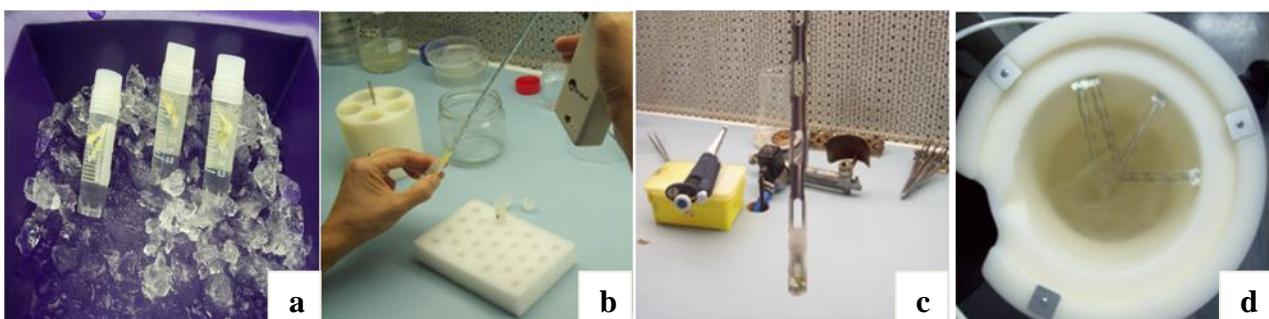
L'osmoprotection est suivie par la déshydratation qui consiste à maintenir les cryotubes horizontalement sur la glace pendant 90 min (**Figure 51a**) après remplacement du PVS2 par 2 ml de PVS2 fraîche (0 °C) à l'aide d'une pipette de 2 ml en plastique muni d'une pointe jaune de 200 µl ou une pipette Pasteur (**Figure 51b**).

Suite à cette déshydratation, la solution PVS2 a été enlevée et remplacée par 0,6 ml de la même solution fraîche ensuite, les cryotubes sont directement et complètement plongés dans l'azote liquide en position verticale pendant 90 min (**Figure 51c et d**).

Les apex sont décongelés rapidement en immergeant les cryotubes dans un bain-marie à 40 °C pendant 60 s en remuant. La solution PVS2 est éliminée immédiatement et remplacée par 2 ml du milieu MS liquide contenant 1,2 % de saccharose à une température ambiante ([annexe 7](#)) ([Sakai, 2000](#)). Les explants sont maintenus dans cette solution pendant 20 min.

Pour la régénération, les apex desséchés sur du papier stérile, sont cultivés sur des boites de Pétri contenant quatre milieux différents : (1) milieu MS modifié supplémenté par le saccharose à 0,3M (MS modifié 0,3M), (2) milieu MS modifié avec 30g de saccharose (MS modifié 0,09M), (3) Milieu MS additionné de saccharose à 0,3M (MS 0,3M), (4) milieu MS supplémenté par 10 g de saccharose (MS 0,03M) ([annexe 8](#)). Les boites ont été placées par la suite dans une chambre de culture à 19 °C, maintenues pendant un jour couvertes d'une feuille de papier pour l'obscurité. Le jour d'après les boites ont été transférées à 25 °C et le changement du milieu est pratiqué régulièrement toutes les 4 semaines de culture.

Il est à noter que la solution PVS2 est toxique pour le matériel végétal en particulier à 25 °C, les traitements par PVS2 dans ce cas doivent être terminés à temps. En outre, les méristèmes en cryotube sont facilement blessés lors de l'ajout et de l'enlèvement de solutions à l'aide de la pipette Pasteur ce qui nécessite des précautions lors des manipulations.



**Figure 51 :** Certaines étapes de la cryoconservation par vitrification.

**a)** Cryotubes contenant les méristèmes immergés dans la solution PVS2 à 0 °C sur la glace ; **b)** Enlèvement de la solution PVS2 à l'aide d'une pipette de 2 ml en plastique muni d'une pointe jaune de 200 µl ; **c)** Cryotube inséré dans un support pour être immergé dans l'azote liquide ; **d)** Cryotubes plongés complètement et verticalement dans l'azote liquide.

### **3- Estimation des taux de survie des apex après la cryoconservation**

Le taux de survie a été évalué dix jours après la cryoconservation par le comptage du nombre d'apex vivants. Un apex a été considéré comme vivant à partir du moment où la coloration verte s'est maintenue et une augmentation de volume a été observée. Contrairement aux apex vivants, les apex morts apparaissent totalement bruns et sans signes apparents de reprise de croissance.

## II- Résultats

Suite à la courte durée du stage, les résultats de la cryoconservation ont été focalisés juste sur la survie des apex dans les différents milieux de régénération après dix jours de la mise en culture.

Le tableau ci-dessous représente les pourcentages de survie de chaque variété sur les quatre milieux de culture utilisés après la cryoconservation. Les résultats montrent qu'à 10 jours de la sortie de l'azote liquide, la survie n'a été constatée que pour les milieux MS modifié 0,09M et MS modifié 0,3M. Aucune contamination n'a été observée lors de cette initiation au procédé de cryoconservation.

**Tableau 25:** Pourcentage de survie des apex cryoconservés des variétés d'artichaut '*Grato*' et '*Campagnano*'.

Variétés d'artichaut	Paramètres	Milieux de culture			
		MS modifié 0,3M	MS modifié 0,09M	MS 0,3M	MS 0,03M
<i>Campagnano</i>	Nombre total des apex	14	15	12	17
	Apex viable	5	2	0	0
	Pourcentage de survie	35,71	13,33	0	0
<i>Grato</i>	Nombre total des apex	18	14	16	11
	Apex viable	4	1	0	0
	Pourcentage de survie	22,22	7,14	0	0

Il est à noter qu'en absence de régulateurs de croissance (milieux MS 0,3M et MS 0,03M), la régénération est quasiment impossible puisque la totalité des apex n'a pas survécu sur ces milieux. En plus, dans un milieu présentant une faible concentration de saccharose, le pourcentage des apex survécus a chuté d'un facteur de 2,7 pour '*Campagnano*' et 3 pour '*Grato*' (**tableau 25**).

Pour les deux variétés, le milieu MS modifié additionné de saccharose à 0,3M a montré le plus grand nombre d'apex viables. Ce milieu contenant une concentration élevée de saccharose est supplémenté également par deux régulateurs de croissance à savoir la kin et l'AIB. Les pourcentages de survie, obtenus avec ce milieu après cryoconservation, variaient entre 22,22 % pour la variété '*Grato*' et 35,71 % pour la variété '*Campagnano*'. Les différences observées, entre ces pourcentages pour le même milieu de culture, prouvent qu'il existe un effet du génotype sur la survie des apex en plus du facteur du milieu cité précédemment.

En revanche, les résultats portant sur la régénération des apex n'ont pas été suivis dans le temps, car cette dernière nécessite au moins quatre semaines. Les figures ci-dessous montrent les apex des deux variétés sur les milieux de régénération (**Fig. 52**), ainsi qu'un exemple d'apex viable de la variété 'Campagnano' après dix jours de culture sur le milieu MS modifié 0,3M (**Fig. 53**).



**Figure 52 :** Apex des deux variétés dix jours après la cryoconservation sur les différents milieux de culture.



**Figure 53 :** Vue sous loupe d'un apex vivant de la variété 'Campagnano' dix jours après la cryoconservation (barre = 2,5 mm).

### **III- Discussion**

Notre travail avait comme objectif principal la maîtrise de la technique de cryoconservation comme outil biotechnologique de conservation des ressources génétiques. Au cours de ce travail, nous avons tout d'abord exposé la méthode de cryoconservation appliquée et qui est fondue sur la vitrification puis abordé l'impact de la composition du milieu de culture et du génotype sur la survie des apex après cryoconservation.

Le développement des techniques de la cryoconservation, surtout celles basées sur la vitrification, a permis d'avancer dans le domaine de la cryoconservation et de réaliser des développements importants dans la conservation des ressources génétiques végétales ([Engelmann et Dussert 2000](#)). Une mise en œuvre simple et une application large sont les principaux critères qui augmentent l'utilisation de cette technique. Selon [Engelmann et Dussert \(2000\)](#), les plus importants progrès de la cryoconservation sont soulignés pour la plupart des espèces à propagation végétative contrairement aux espèces à semences récalcitrantes.

Les premiers essais de l'application de la cryoconservation pour l'artichaut ont été déjà lancés au niveau du laboratoire de biotechnologie au centre de recherche ENEA en Italie, alors qu'aucun travail sur la cryoconservation de cette espèce n'a été publié jusqu'à présent. Ce laboratoire, qui s'intéresse plutôt à la multiplication *in vitro* des plantes, cherche à travers les essais des protocoles de cryoconservation à conserver à long terme les ressources génétiques de l'artichaut, sachant que l'Italie dispose de la plus grande collection de germoplasmes d'artichaut dans le monde.

Pour nos deux variétés, nous avons appliqué la technique de vitrification. Le choix de cette technique est justifié par les étapes qu'elle comporte et qui ont comme intérêt de réduire les chocs osmotiques dus principalement à l'utilisation de la solution de vitrification (PVS2). Ce protocole de vitrification appliqué comporte six étapes principales à savoir : préculture, osmoprotection, cryoprotection, congélation, décongélation et régénération. L'importance d'un prétraitement des apex, afin d'augmenter leur osmo-tolérance par des étapes de préculture, de charge, ou une combinaison des deux, a été rapportée par [Gupta et Reed \(2006\)](#). Dans notre cas l'étape de préculture a été faite sur milieu MS modifié 0,3M pendant 20 h. Cette étape conduit à une augmentation de la durée du processus général de cryoconservation et peut parfois être supprimée comme il a été rapporté par [Panis et al. \(2005\)](#) pour le bananier où l'application d'une préculture n'a pas d'effet bénéfique significatif sur la survie. Tandis qu'une préculture des apex pendant 1, 2 ou 3 jours sur un milieu semi-solide enrichi avec

0,3M de saccharose avant l'étape de charge, est importante pour la pomme de terre (Kim et al., 2006) par exemple.

Plusieurs études ont montré qu'un traitement dans PVS2 est limité dans une durée optimale d'immersion des apex qui varie d'une espèce à l'autre. Cette durée d'immersion se détermine en fonction de deux principes : (1) la limitation de la cristallisation de l'eau et (2) la limitation de la toxicité de PVS2 (Gallard et al., 2008). Le respect de cette durée était absolument nécessaire pour la survie post-cryoconservation. Dans le cas des apex de l'artichaut, une durée d'immersion de 90 min dans le PVS2 a été déterminée après l'essai de trois durées différentes (30, 60 et 90 min) au niveau du laboratoire de l'ENEA (résultats non publiés) et c'est elle que nous avons utilisée dans ce travail. Ainsi, la durée optimale du traitement dans PVS2 signalée pour d'autres espèces était de 15 min pour le *Pelargonium* (Gallard et al., 2008), 20 min pour les apex de pomme de terre sauvage (Yoon et al., 2006), 45 min chez le manioc (Charoensub et al., 2003) ou encore 80 min pour des apex de vigne (Matsumoto et Sakai, 2000).

Concernant les milieux de culture utilisés, le travail que nous avons mené s'est focalisé sur l'utilisation de deux régulateurs de croissance (kin et AIB) et seulement dans les deux premiers milieux (MS modifié 0,3M et MS modifié 0,09M). Les résultats ont montré qu'en leur absence (milieu MS 0,3M et MS 0,03M), la régénération est pratiquement impossible (tableau 25), alors qu'en leur présence, le pourcentage de survie était nettement supérieur sur le milieu MS modifié 0,3M en comparaison avec le milieu MS modifié 0,09M. De plus, nos résultats mettent en évidence que la survie post-cryoconservation est fonction de la composition du milieu de culture et également du génotype. L'effet génotype est bien marqué lors de l'utilisation de milieu MS modifié 0,3M. Notre résultat concernant l'effet du génotype est conforme à celui de Gonzalez-Arnau et Engelmann, (2006) sur la canne à sucre où les taux de survie de 15 génotypes variaient de 24 à 91 %, ou encore celui de Clavaro-Ramirez et al., (2005) sur sept génotypes de fraisier où la survie variait de 23 à 63 %.

Les résultats obtenus, concernant le pourcentage de survie post-cryoconservation des apex des deux variétés (22,22 % pour la variété 'Grato' et 35,71 % pour la variété 'Campagnano'), restent importants pour ce protocole d'initiation même s'ils n'ont pas dépassé 50 %. La technique de vitrification, appliquée dans ce travail, a été jugée efficace pour de nombreuses espèces avec des pourcentages de régénération encourageants : 38 % pour *Olea europaea* (Lynch et al., 2007), 52 % pour *Actinidia chinensis* (Xu et al., 2006), 80 % pour *Malus domestica* (Liu et al., 2008), 71 % pour *Pyrus* spp. (Wang et al., 2008) et 78 % pour *Prunus avium* (Shatnawi et al., 2007).

La réussite de cette technique est liée à plusieurs facteurs, allant de l'étape de déshydratation et la congélation en azote liquide jusqu'à la régénération des pousses à partir du matériel cryoconservés. Selon [Gallard et al. \(2008\)](#), la réussite de la cryoconservation est fonction de la capacité à s'affranchir des contraintes biologiques et physiques inhérentes à une exposition à un froid extrême (-196 °C). Pour cela et selon ce même auteur, il est nécessaire de connaître la nature du matériel végétal à cryoconserver ainsi que les effets du gel sur les cellules et les tissus.

L'ensemble des résultats obtenus, pour cette partie montre que la réussite de la cryoconservation en termes de survie, est surtout fonction des génotypes et de la composition du milieu de culture de reprise de croissance. Il se dégage de cette étude que le milieu MS modifié 0,3M est le plus convenable pour nos variétés d'artichaut. Il reste dans ce cas d'étudier l'effet d'autres facteurs tel que l'effet de la durée d'exposition aux solutions (PVS2 par exemple) sur la réussite de la régénération des apex après la cryoconservation. Il est important également de comprendre les phénomènes physiques et biochimiques qui surviennent au cours de la cryoconservation.

## **Conclusion**

Lors de notre stage d'initiation en cryoconservation, pour l'acquisition de cette technique, nous avons appliqué le procédé, mis au point par le laboratoire de l'ENEA, sur deux variétés italiennes d'artichaut. Les résultats observés à 10 jours, concernant le pourcentage de survie des apex, n'ont pas dépassé 50 %. Une différence, quant à la réponse des deux variétés après la cryoconservation, a été notée. Cette différence pourrait être expliquée par la différence génotypique qui peut exister entre ces deux variétés. Avant de conclure, il est important de noter que la cryoconservation ne vise pas à remplacer les techniques de conservation *ex-situ*, mais c'est juste un outil additionnel à la disposition des gérants de banques de gènes pour faciliter et améliorer la préservation des germoplasmes mises sous leur responsabilité.

---

## Conclusion Générale et Perspectives

---

## Conclusion générale et perspectives

---

La présente étude avait comme objectif le développement d'un protocole adéquat de micropropagation de l'artichaut (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.). Cette espèce revêt une importance particulière dans les pays du bassin méditerranéen suite à ses propriétés culinaires et thérapeutiques et son usage industriel. Pourtant, elle présente un système de reproduction sexuée très complexe de sorte que la multiplication végétative demeure quasiment la seule voie de multiplication adoptée de nos jours pour cette espèce. Cependant, cette voie s'affronte à deux problèmes majeurs, à savoir, le faible taux de multiplication basée sur les rejets et le grand risque de transmission de maladies. Beaucoup de travaux ont été réalisés dans le but de pallier à ces problèmes, mais jusqu'à présent, les succès restent limités. Dans ce cas, les techniques de la culture *in vitro* sont les seules capables de résoudre ces problèmes et un protocole fiable de micropropagation à grande échelle de l'artichaut serait d'un apport certain pour la culture artichautière. De nombreux efforts ont été déployés dans ce sens pour réaliser une multiplication *in vitro* appropriée avec un taux important, mais les résultats obtenus sont peu brillants, notamment ceux relatifs à l'enracinement et à l'acclimatation.

Sur la base des résultats présentés dans cette étude concernant la micropropagation de l'artichaut (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.), les conclusions suivantes peuvent être tirées.

L'asepsie des graines avec de l' $HgCl_2$  0,5 % pendant 5 min et une solution d'eau de Javel 1 % pendant 15 min, a été efficace pour réduire la contamination des graines.

L'obtention de plants sains d'artichaut, pour une utilisation comme source d'explants dans la micropropagation, a été réalisée à partir des graines germées *in vitro*. L'utilisation des graines désinfectées et dépourvues de téguments a amélioré le taux de germination *in vitro* de l'accession Art21 et Art22 (28,3 % et 32 % respectivement) sur un milieu MS supplémenté par 30 g/l de saccharose et 0,3 % de phytigel et conservé dans une chambre de croissance à l'obscurité.

L'application de 0,6 % de l' $AG_3$  pour la variété IJ et BR a cerné la germination entre le 6<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour après semis permettant ainsi une germination et un développement homogène des plantules. De même, l'adoption d'une température de 18 °C a conduit à une germination uniforme et synchronisée.

La multiplication *in vitro* de l'artichaut a été influencée par la méthode suivie, la taille et la densité des explants et la durée de culture sur le milieu. Ainsi, l'induction de la prolifération des pousses axillaires, à partir de plantules provenant des graines germées *in vitro* et décapitées, a conduit à un grand nombre de pousses à partir d'un explant et fournit une nouvelle technique capable de hausser le taux de multiplication des pousses axillaires pour la culture de tissus de l'artichaut.

L'utilisation de 0,1 mg/l de l'ANA + 1,0 mg/l de la kin dans le milieu de culture a contribué à une meilleure prolifération et croissance des pousses dans la phase de multiplication, chose qui nous a permis d'atteindre un taux de 7,56 pousses par explant au cours des subcultures.

Le maintien de ce taux demande l'adoption de certains paramètres lors de la phase de prolifération à savoir : une taille des pousses de 1-1,5cm ; une densité des explants de 4 pousses par 132 cm<sup>2</sup> de surface de milieu de culture et une durée de génération de 4 semaines.

En ce qui concerne la phase d'enracinement, l'ajout d'auxine (ANA) dans le milieu d'enracinement à une concentration de 2 mg/l est convenable pour la micropropagation de l'artichaut. En outre, l'addition du charbon actif au milieu d'enracinement est recommandée. Les résultats ont également montré que pour arriver à enracer les pousses, un passage de deux semaines par le milieu d'elongation doit être effectué dans la micropropagation de cette espèce. Dans notre cas, ce milieu était celui de MS modifié additionné de la kin (0,5 mg/l), l'AIB (0,1 mg/l) et le 2iP (0,01 mg/l).

Le travail de cryoconservation, que nous avons réalisé en stage sur deux variétés italiennes d'artichaut (*Grato* et *Campagnano*), a mis en évidence l'effet du milieu de culture sur la survie des apex en post-cryoconservation ainsi qu'un effet génotype rendant de ce fait nécessaire le développement de protocole adéquat pour chaque variété. L'application de la méthode de vitrification a abouti à des pourcentages de survie allant de 22,22 pour '*Grato*' à 35,71 pour '*Campagnano*'.

Enfin au cours de ce travail, nous sommes parvenus à réussir la germination des graines de l'artichaut et à améliorer nettement le taux de multiplication (7,56). En revanche, nos expériences d'enracinement et d'acclimatation des pousses n'ont pas été satisfaisantes. Il convient donc de poursuivre les travaux sur l'enracinement dans le but d'améliorer le taux d'enracinement des vitroplants. Par ailleurs, les études relatives à l'acclimatation *ex vitro*

pourraient être menées en vue d'améliorer la survie des plantes dans cette phase et rendre la production moins onéreuse, par exemple l'étude de l'effet de substrat. Ce travail nécessitera également la vérification de la conformité des plants produits, pour s'assurer de la bonne stabilité des caractères au cours de repiquages successifs et de l'absence de vitrovariations.

Pour la cryoconservation, l'étude des différentes solutions cryoprotectrices et leurs effets sur les apex serait d'un grand intérêt dans le développement de cette technique chez l'artichaut. Des travaux de microscopie doivent être également menés pour essayer de mieux comprendre comment les cryoprotecteurs agissent au niveau des cellules apicales et des apex. En plus, la qualité des plantes régénérées nécessite d'être évaluée afin de déterminer si la cryoconservation a un impact sur celle-ci.

---

---

## **Références Bibliographiques**

---

## Références bibliographiques

---

- Abou-Quad H. (2007).** Effect of scarification, gibberellic acid and stratification on seed germination of three Pistacia species. An-Najah Univ. J. Res. (N. Sc.), 21:1-11.
- Acquadro A., Papanice M.A., Lanteri S., Bottalico G., Portis E., Campanale A., Finetti-Sialer M.M., Mascia T., Sumerano P., Gallitelli D. (2010).** Production and fingerprinting of virus-free clones in a reflowering globe artichoke. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 100 : 329-337.
- Aduradola A.M., Badru A.A. (2004).** Aspects of germination in seeds of *Afzelia africana* Sm. and *Terminalia ivorensis* A. Chev. Annales des Sciences Agronomiques du Bénin, 6(2) : 175-184.
- Adzet T., Camarassa J., Laguna C.J. (1987).** Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCL4 toxicity in isolated rat hepatocytes. Journal of Natural Products, 50: 612-617.
- Ahotor L.E., Adjakpa M'po Ifonti M'po J.B., Akpo E.L. (2009).** Effet des prétraitements des semences sur la germination de *Prosopis africana* (Guill., Perrot. et Rich.) Taub., (Césalpiniacées). Tropicultura, 27(4) : 233-238.
- Alouani M., Bani-Aameur F. (2004).** Argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) seed germination under nursery conditions: Effect of cold storage, gibberellic acid and mother-tree genotype. Ann. For. Sci., 61 : 191-194.
- Amenduni M., Cirulli M., D'Amico M., Colella C. (2005).** Verticillium wilt of artichoke caused by *Verticillium dahliae* Kleb. Acta Hortic., 681 : 603-606.
- Ancora G. (1986).** Globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). In : Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 2: Crops, YPS Bajaj ed., Springer Verlag Berlin-Heidelberg, 471-484.
- Ancora G., Belli-Donini M.L., Cuozzo L. (1981).** Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid *in vitro* micropagation. Sci. Hortic., 14(3) : 207-213.
- Anderson N., Byrne D.H., Sinclair J., Burrell A.M. (2002).** Cooler Temperature During Germination Improves the Survival of Embryo Cultured Peach Seed. HORTSCIENCE, 37(2):402-403.
- Angelini L.G., Ceccarini L., Nassi o Di Nasso N., Bonari E. (2009).** Long-term evaluation of biomass production and quality of two cardoon (*Cynara cardunculus* L.) cultivars for energy use. Biomass and bioenergy, 33: 810-816.
- Anonyme (2010).** <http://www.statsoft.fr/index.php>
- Anthunes A., Amaral E., Belgacem M.N. (2000).** *Cynara cardunculus* L.: chemical composition and soda-antraquinone cooking. Industrial Crops and Products, 12: 85-91.
- Apostolo N.M., Brutti C., Llorente B. (2005).** Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. In successive micropagation stages. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant, 41 : 307-313.
- Araya E., Gómez L., Hidalgo N., Valverde R. (2000).** Effect of light and gibberellic acid on *in vitro* germination of *Alnus acuminata*. Agronomía Costarricense, 24(1):75-80.
- Armengol J., Berbegal M., Giménez-Jaime A., Romero S., Beltrán R., Vicent A., Ortega A., García-Jiménez J. (2005).** Incidence of verticillium wilt of artichoke in eastern Spain and role of inoculum sources on crop infection. Phytoparasitica, 33 (4) : 397-405.

- Auge R., Beauchesne G., Boccon-Gibod R., Decourtey L., Digat B., Jalouzot R., Minier R., Morand. C. L., Reynoard J.P., Strullud G., Vidalie H. (1989).** La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Eds Lavoisier. Paris. 225p.
- Augustin L., Grandio M.F., Suzin M., Piva M., Donida B., Floss E.L. (2006).** Micropropagation of an artichoke cultivar for industrial use. In : Brazilian Congress of vegetable crops. Horticultura Brasileira, 24:132-132.
- Babes G., Lumia V., Pasquini G., Di Lernia G., Barba M. (2004).** Production of virus free artichoke germplasm. Acta hort., 660:467-472.
- Bachelard E.P. (1967).** Role of the seed coat in dormancy of *Eucalyptus pauciflora* and *E. delegatensis* seeds. Australian Journal of Biological Science, 20 : 1237-1240.
- Balaguera-López H.E., Cárdenas-Hernández J.F., Álvarez-Herrera J.G. (2009).** Effect of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on seed germination and growth of tomato (*solanum lycopersicum* L.). Acta Hort., 821:141-148.
- Bànfalvi Z., Molnàr A., Kostyal Z., Lakatos L., Molnar G. (1997).** Comparative studies on potato tuber development using an *in vitro* tuber induction system. Acta Biol. Hung., 48 (1) : 77-86.
- Barba M., Di Lerna G., Babes G., Cirruli F. (2004).** Production and maintenance of virus free globe artichoke germplasm [*Cynara scolymus* L.; Italy]. Institute for Experimental Pathology Plant, Italus Hortus, 11(5) : 5-10.
- Baskin C.C., Baskin J.M. (1998).** Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. San Diego, Academic Press, 666p.
- Basnizki J., Goldschmidt E.E. (1994).** Further examination of Gibberellin A3 effects on flowering of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) under controlled environment and field conditions. Israel Journal of Plant Sciences, 42:159-166.
- Basnizki J., Zohary D. (1994).** Breeding of seed planted artichoke. Plant Breeding Reviews, 12 : 253-269.
- Basnizki Y., Mayer A.M. (1985).** Germination of *Cynara* seeds: effects of light and temperature and function of the endosperm. Agronomie 5:529-532.
- Basnizki Y., Mayer A.M. (1994).** A seed-planted cultivar of globe artichoke. *Plant Breeding Reviews*, Connecticut, 12 : 253-269.
- Basnizki Y., Zohary D. (1987).** Seed-planted Cultivar of Globe Artichoke. HortScience, 22(4) : 678-679.
- Bedini L., Lucchesini M., Bertozzi F., Graifenberg A. (2012).** Plant tissue cultures from four Tuscan globe artichoke cultivars. Cent. Eur. J. Biol., 7(4) : 680-689.
- Bekheet S.A. (2007).** *In vitro* Preservation of globe artichoke germplasm. Plant Tissue Cult. & Biotech. 17 : 1-9.
- Benelli C., De Carlo A., Engelmann F. (2013).** Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. Biotechnology Advances, 31 : 175–185.
- Benoit H., Ducreux G. (1981).** Étude de quelques aspects de la multiplication végétative *in vitro* de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Agronomie, 1 : 225-230.

- Bernal C., Palomares G., Susín I. (2005).** Establishment of a germination medium for artichoke pollen and its relationship with seed production. *Acta Horticulturae*, 681 : 291-300.
- Bhadra S.K., Hossain M.M. (2003).** *In vitro* Germination and Micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an Endangered Orchid Species. *Plant Tissue Cult.*, 13(2) : 165-171.
- Bianco V.V. (1990).** Carciofo (*Cynara scolymus* L.). In : Bianco V.V. and Pimpini F. (eds), *Orticoltura*. Patron Editore, Bologna (in Italian), 209-251.
- Bianco V.V., Calabrese N. (2009).** Morfologia e fisiologia. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 13-17.
- Bigot C., Foury C. (1984).** Multiplication *in vitro* d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) à partir de semences ; comparaison au champ de quelques clones à la lignée dont ils sont issus. *Agronomie*, 4 : 699-710.
- Bonomi A., Bonomi B.M., Quarantelli A. (1998).** Use of dried artichoke leaf meal (*Cynara scolymus* L.) in broiler feeding. *Rivista di Avicoltura*, 67(12) : 28-32.
- Bonomi A., Bonomi B.M., Quarantelli A. (1999).** The use of dehydrated artichoke leaf meal (*Cynara scolymus* L.) in duck feeding. *Rivista di Avicoltura*, 68(7-8) : 38-43.
- Bonomi A. (1999).** The use of dehydrated artichoke leaves meal (*Cynara scolymus* L.) in the feeding of meat rabbits. *Rivista di Coniglicoltura*, 36(4-5) : 53-58.
- Borrego J.V.M. (1986).** Hortalizas aprovechables por sus inflorescencias: herbaceas especial. In : *Horticultura Herbaceas Especial*. 2. ed. Madrid : Ediciones Mundi-Prensa. p. 313-326.
- Bottalico G., Padula M., Campanale A. (2002).** Seed transmission of Artichoke Italian Latent virus and Artichoke latent virus in globe artichoke. *Journal of Plant Pathology*, 84(3) : 167-168.
- Boxus P., Damiano C., Brasseur E. (1984).** Strawberry. - In Ammirato (P.V.), Evans (D.A.), Sharp (W.R.), Yamada (Y.) *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 3, New York : Macmillan. p 453-486.
- Bradbeer J.W. (1988).** Seed dormancy and germination. Blackie and Son, Glasgow, 146 p.
- Bratsch A. (2009).** Virginia Cooperative Extension. "Specialty Crop Profile: Globe Artichoke." May 1, 2009. (Novembre, 2012) <http://pubs.ext.vt.edu/438/438-108/438-108.html>
- Bressan R.H., Kim Y.J., Hyndman S.E., Hasegawa P.M., Bressan R.A. (1982).** Factors affecting *in vitro* propagation of rose. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 107 : 979-990.
- Brutti C., Apostolo N.M., Ferrarotti S.A., Llorente B.E., Krymkiewicz N. (2000).** Micropropagation of *Cynara scolymus* L. employing cyclodextrins to promote rhizogenesis. *Scientia Horticulturae*, 83 : 1-10.
- Brutti C.B., Rubio E., Llorente B.E., Apóstolo N.M. (2002).** Artichoke leaf morphology and surface features in different micropropagation stages. *Biol. Plant.* 45:197–204.
- Bucan L., Goreta S., Perica S. (2005).** Influence of transplant age and type on growth and yield of seed propagated artichoke. *Acta Hort.*, 681 : 95-98.

- Cajarville C., Gonzales J., Repetto J.L., Alvir M.R., Rodriguez C.A. (2000).** Nutritional evaluation of cardon (*Cynara cardunculus*) seed for ruminants. Animal Feed Science and Technology, 87: 203-214.
- Calabrese N., Bianco V.V. (2000).** Effect of gibberellic acid on yield and quality of seed grown artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). Acta Hort., 514 : 25-32.
- Calabrese N., Cardinali A., Di Venere D., Linsalata V., Pieralice M., Sergio L. (2005a).** Technological parameters and suitability to freezing of seed grown artichoke hybrids. Acta Hort., 681 : 495-501.
- Calabrese N., De Palma E., Bianco V.V. (2005b).** Yield and quality of seed propagated artichoke hybrid cultivars grown for four years. Acta Hort., 681 : 135-141.
- Calabrese N. (2009).** Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, Impianto, 168-171.
- Calabrese N. (2012).** Introduction on economical aspects of globe artichoke in the world. VIII International Symposium on Artichoke, Cardoon and their wild relatives. Rome, Italie. (communication orale).
- Cardarelli M., Rouphael Y., Saccardo F., Colla G. (2005a).** An Innovative vegetative propagation system for large scale production of globe artichoke transplants. Part I. Propagation System Set up. HortTechnology, 15 (4) : 812-816.
- Cardarelli M., Rouphael Y., Saccardo F., Colla G. (2005b).** An innovative vegetative propagation system for large-scale production of globe artichoke transplants. Part II. Propagation System validation. Horticultural Technology, 15, 4, 817-819.
- Carpita NC., Kanabus J. (1988).** Chemical structure of cell walls of dwarf maize and changes by gibberellin. Plant Physiol., 88 : 671-678.
- Castiglione V., Cavallaro V., Di Silvestro I. et Melilli M.G. (2007).** Influence of different substrates on *in vitro* initiation of some early and late cultivars of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. Subsp.*scolymus* (L.) Hayek]. Acta Hort., 730:107-112.
- Cavallaro V., Castiglione V., Avola G., Finocchiaro E. (2004).** Influence of different substrates on the *in vitro* rhizogenesis process of early artichoke [*Cynara cardunculus* l. Subsp. *Scolymus* (L.) Hegi]. Acta Hort., 660:267-272.
- Cavallaro V., Castiglione V., Di Silvestro I., Patanè C. and Barbera A.C. (2007).** Influence of different transplant times and mycorrhizal symbiosis on the acclimatisation process of micropropagated artichoke [*Cynara cardunculus* l. Subsp.*scolymus* (L.) Hayek]. Acta Hort. (ISHS) 730:75-80.
- Charoensub R., Phansiri S., Yongmanitchai W., Sahai A (2003).** Routine cryopreservation of *in vitro*-grown axillary apices of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by vitrification: importance of a simple mononodal culture, Scientia Horticulturae. 98 : 485-492.
- Chaux C., Foury C. (1994).** Artichaut. In : Productions légumières, (eds C., Chaux and C., Foury), Lavoisier, Paris, 2 : 405-438.
- Chaves A.C., Schuch M.W., Erig A.C. (2005).** *In Vitro* establishment and multiplication of *Physalis peruviana* L. Ciênc. agrotec., Lavras, 29(6) : 1281-1287.
- Chee R., Pool R.M. (1985).** *In vitro* propagation of *Vitis*. The effect of organic substances on shoot multiplication. Vitis 24 : 106–118.

- Chun Y.W., Hall R.B., Stephens L.C. (1986).** Influences of medium consistency and shoot density on *in vitro* shoot proliferation of *Populus alba* x *P. grandidentata*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 5, 179-185.
- Ciancolini A. (2012).** Characterization and selection of globe artichoke and cardoon Germplasm for biomass, food and biocompound production. Thèse de doctorat en Sciences des Agroressources. Universita degli Studi della Tuscia (Italie), 251p.
- Ciancolini A., Micozzi F., Crinò P., Saccardo F. (2012).** VIII International Symposium on Artichoke, cardoon and their wild relatives. Viterbo April 10-13, 2012 (Résumé de communication).
- Ciccarese F., Cirulli M. (1985).** The *Verticillium* wilt of artichoke. Informatore Fitopatologico, 35 (9) : 25-26.
- Ciccarese F., Cirulli M., Frisulli S. (1985).** Prove di lotta chimica contro la verticilliosi del carciofo. Informatore Fitopatologico, 35(5) : 39-42.
- Cirulli M., Ciccarese F., Amenduni M. (1994).** Evaluation of Italian clones of artichoke for resistance to *Verticillium dahliae*. Plant Disease, 78 (7) : 680-682.
- Clavero-Ramirez, Galvez-Farfan J., Lopez Aranda J.M., Gonzalez-Benito M.E. (2005).** Apex Cryopreservation of several strawberry genotypes by two encapsulation-dehydration methods, Cryoletters, 26(1) : 17-24.
- Clifford M. (2000).** Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. Journal of Science of Food and Agriculture, 80, 1033-1043.
- Cointry E.L. (2001).** Evaluation of qualitative and quantitative traits in *Cynara scolymus* L. and their use in improving the species. (Thèse de doctorat). Université nationale de Rosario, Rosário- Argentina.
- Coinu R., Cart S., Urgeghe P., Mulinacci N., Pinelli P., Franconi F., Romani A. (2007).** Dose-effect study on the antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from Violetto di Toscana artichoke. Food Chemistry, 101 : 524-531.
- Çölgeçen H., Koca U., Toker G. (2011).** Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densilfora* Ledeb. Turk J Biol, 35 : 513-520.
- Cook S.K., Adams H., Hedley C.L., Ambrose M.J., Wang T.L. (1988).** An analysis of seed development in *Pisum sativum*. VII. Embryo development and precocious germination *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 14(2) : 89-101.
- Cornu D., Boulay M. (1986).** La multiplication végétative : techniques horticoles et cultures *in vitro*. Revue Forestière Française, numéro spécial (38) : 60-68.
- Crinò P., Tavazza R., Rey Munoz N.A., Trionfetti Nisini P., Saccardo F., Ancora G., Pagnotta M.A. (2008).** Recovery, morphological and molecular characterization of globe artichoke ‘Romanesco’ landraces. Genetic Resources and Crop Evolution, 55: 823-833.
- Curt M.D., Sánchez G., Fernández J. (2002).** The potential of *Cynara cardunculus* L. for seed oil production in a perennial cultivation system. Biomass and bioenergy, 23: 33-46.
- Dalianis C., Panoutsou C., Dercas N. (1996).** Spanish thistle artichoke (*C. cardunculus* L.) under Greek conditions. In : Chartier, P., G. L. Ferrero and U. M. Henius et al. (Eds.),

- Biomass for energy and environment (Proceedings of the 9th European Bioenergy Conference, 24-27 June, Copenhagen, Denmark). Elsevier Science, Oxford. 663–668.
- Damartzis T., Vamvuka D., Sfakiotakis S., Zabaniotou A. (2011).** Thermal degradation studies and kinetic modeling of cardoon (*Cynara cardunculus*) pyrolysis using thermogravimetric analysis (TGA). *Bioresource Technology*, 102 : 6230-6238.
- Damato G., Calabrese N. (1991).** Temperatura di germinazione, lavaggio e germinazione degli acheni di carciofo. 2° Congresso nazionale ‘Il vivaismo orticolo’, Foggia (Italy), 193-199.
- Damato G., Calabrese N. (1992).** Influenza della temperatura sulla germinazione degli acheni di 4 cultivar di carciofo. Giornate Scientifiche SOI, Ravello (Italy), 356-57.
- Damato G., Calabrese N. (2005a).** Solid matrix priming influences germination on artichoke achenes. *Acta Hort.*, 681 : 323-328.
- Damato G., Calabrese N. (2005b).** Temperature sensitive phase during germination of artichoke ‘seed’. *Acta Hort.*, 681 : 369-374
- Damato G., Calabrese N. (2007).** Osmoconditioning and germination temperature in “seed” of two artichoke cultivars. *Acta Hort.*, 730 : 331-336.
- Damato G., Calabrese N. (2012).** Effect of conditioning methods, seed characteristics and environment of germination on artichoke achenes. *Acta Hort.*, 942 : 171-176.
- Damato G., Sarli G. (2000).** Age of mother plant and cultural practices on yield and quality of artichoke achens. IV Congress on Artichoke. Valenzano. Bari. p.54.
- Damiano C. (1980).** Strawberry micropropagation. - In Proceedings of the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture: Applications and feasibility. Beltsville, Maryland, USDASEA, Agricultural Research Results, ARR-NE-11. p 11-22.
- Daudet M.M.S., Mergeai G., Baudoine J.P., Toussaint A. (2011).** Culture *in vitro* de *Jatropha curcas* L. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(4) : 567-574.
- De Klerk G.J., Brugge J.T., Marinova S. (1997).** Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphtaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus ‘Jork 9’*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 49 : 39-44.
- De Leo P., Greco B. (1976).** Nuova tecnica di propagazione del carciofo: coltura *in vitro* dei meristemi apicali. In : Atti 2nd Congr. Int. Sul Carciofo, Bari. Ed. Minerva Medica Torino, pp 657-667.
- De Moraes C.F. (2007).** Propagation by shoots and seed germination *In vitro* artichoke. Faculté d’Agronomie et de Médecine Vétérinaire, Université de Passo Fundo, Passo Fundo. 172p.
- De Moraes C.F., Suzin M., Nienow Aa., Grando Mf., Mantovani N., Calvete Eo., Donida BT. (2010).** *In vitro* artichoke seed germination. *Horti. Bras.*, 28:64–69.
- De Vos N.E. (1992).** Artichoke production in California. *Hortech.*, 2 : 438-444.
- Debroux L., Delvingt W., Mbolo M., Amougou A. (1998).** La régénération du Moabi et du Mukulungu au Cameroun. *Bois et forêts des tropiques*, 255 : 5-17.
- Dellacecca V., Magnifico V., Marzi V., Porceddu E., Scarascia G.T. (1976).** Contributo alla conoscenza delle varietà di carciofo coltivate nel mondo. Atti II Congresso Internazionale Studi sul Carciofo, Bari, Ed. Minerva Medica, Torino, 199-316.

- Desjardins Y., Gosselin A., Yelle S. (1987).** Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO<sub>2</sub>-enriched environments and supplementary lighting. - J. Am. Soc. Hortic. Sci. 112(5) : 846-851.
- Devkota A., Jha PK. (2010).** Seed germination responses of the medicinal herb *Centella asiatica*. Braz. J. Plant Physiol., 22(1) : 143-150.
- Devos P., De Langhe E., De Bruijne E. (1975).** Influence of 2, 4-D on the propagation of *Cynara scolymus* L, *in Vitro*. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent., 40(2) : 829-836.
- Díaz-Pérez J.C., Shackel K.A., Sutter E.G. (1995).** Effect of *in vitro*-formed roots and acclimatization of water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. J. amer. Soc. Hort. Sci. 120:435-440.
- Dodds J.H. Roberts L.W. (1985).** Experiments in plant tissue culture. 2nd ed (Cambridge University Press, New York, 232p.
- Donida B.T. (2004).** Production and quality of artichoke seeds. Thèse (Doctorat en sciences et technologie des semences) – Université fédérale de Pelotas, Pelotas. 54p.
- Draoui N., Ghorbel A., Kchouk M.E. (1993).** *In vitro* culture of Globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) in Tunisia: utilization of vitromethods in artichoke improvement. Agricoltura Mediterranea. 123(2) : 139-145.
- Dridi B. (2003).** Un système intégré de micropropagation de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Thèse de doctorat, université de Gent, Belgique. 175p.
- Druart P., Kevers C., Boxus PH., Gasper TH. (1983).** *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases ,Z. P. flanzenphysiol 108, pp.429-3-436.
- Druart P. (1997).** Optimization of culture media for *in vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan. Biologia plantarum, 39(1) : 67-77.
- Dulloo M.E., Ebert A.W., Dussert S., Gotor E., Astorga C., Vasquez N., Rakotomalala J.J., Rabemiasafara A., Eira M., Bellachew B., Omondi C., Engelmann F., Anthony F., Watts J., Qamar Z., Snook L. (2009).** Cost efficiency of cryopreservation as a long term conservation method for coffee genetic resources. Crop Sci., 49 : 2123–2138.
- Dumas E., Monteuisse O. (1995).** *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 40 : 231-235.
- Dumet D., Engelmann F., Chabriange N., Richaud F., Beule T., Durand-Gasselin T., Duval Y. (1993).** Développement de la cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile, avec un procédé amélioré, CIRAD.
- Duncan D.B. (1955).** Multiple range and multiple F tests. Biometrics, 11:1-42.
- Eich J., Baier C., Grun M., Wagenbreth D., Zimmermann R. (2005).** Artichoke leaves used for herbal drug production: Influence of nitrogen fertilization on yield and on pharmaceutical quality. Acta Horticulturae, Berlim, Germany. 681 : 545-551.
- El Boullani R., Elmoslih A., El Finti A., El Mousadik A., Serghini M.A. (2012).** Improved *in vitro* Micropagation of Artichoke (*Cynara Cardunculus* var. *scolymus* L.). European Journal of Scientific Research, 80(4) : 430-436.

- El Boullani R., Elmoslih A., El Finti A., El Mousadik A., Serghini M.A. (2013).** Effect of decapitation and size of explants on *in vitro* multiplication rate of globe artichoke. Acta Hort. (ISHS), 983:325-329.
- El Hamdouni E.M., Lamarti A., Badoc A. (2001).** Germination *in vitro* du fraisier (*fragaria x ananassa duch.*) Cvs 'chandler' et 'tudla'. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 140 : 19-30.
- El Hamdouni E.M., Lamarti A., Badoc A. (2000).** Micropropagation des cultivars 'chandler' et 'tudla' de fraisier (*fragaria x ananassa duch.*). Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 139 : 71-90.
- Elattir H., Skiredj A., Ait-Ben Oussaiden R., Chtaina N. (2009).** Comparaison de cultivars d'artichaut multipliés par semis et plantés sous quatre densités dans la région du Gharb au Maroc. Symposium international « agriculture durable en région Méditerranéenne AGDUMED. Rabat, Maroc 14-16 mai 2009 : 224-234.
- Elia A., Miccolis V. (1996).** Relationship among 104 artichoke (*Cynara scolymus L.*) accessions using cluster analysis. Advances in Horticultural Science, 10 : 158-162.
- Elia A., Conversa G., Montervino C., Lotti C. (2007).** Micropropagation of the early artichoke cultivar 'violet du provence'. Acta Hort., 730 : 127-134.
- Encinar J.M., González J.F., González J. (2001).** Steam gasification of *Cynara cardunculus L.*: influence of variables. Fuel Processing Technology, 75(1) : 27-43.
- Engelmann F., Dussert S. (2000).** Développement de la cryoconservation pour la conservation des ressources génétiques végétales, Cahiers Agricultures. 9(3) : 237-245.
- Engelmann F. (2011).** Germplasm collection, storage, and conservation. In : Arie Altman and Paul Michael Hasegawa, editors, Plant Biotechnology and Agriculture. Oxford : Academic Press, pp. 255-268.
- Engelmann F. (2012).** Germplasm collection, storage and preservation. In : Altman A, Hazegawa PM, editors. Plant biotechnology and agriculture - prospects for the 21st Century. Oxford : Academic Press, p. 255–68.
- Epstein E., Ludwig-Müller J. (1993).** Indole-3-butyric acid in plants : occurrence, synthesis, metabolism and transport. Physiologia Plantarum, 88 : 382-389.
- Eser B., Mohammad J.A., Özen S. (2005).** Effect of apex removal of rooted offshoots on globe artichoke production. Acta Hort., 681:69-74.
- Esteva J., Ayala C., Martinez Tomé J. (2004).** Effect of gibberellic acid on earliness and production of hybrid and open pollinated cultivars of globe artichoke in the Campo de Cartagena. Acta Hort., 660 : 161-164.
- Evans A.S., Mitchell R.J., Cabin R.J. (1996).** Morphological side effects of using gibberellic acid to induce germination: consequences for the study of seed dormancy. American Journal of Botany, 83(5) : 543–549.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities. Comptes Rendus Biologies, 331 : 372-379.
- Fantini N., Colombo G., Giori A., Riva A., Morazzoni P., Bombardelli E., Carai M.A.M., (2011).** Evidence of Glycemia-lowering effect by a *Cynara scolymus L.* Extract in Normal and Obese Rat. Phytotherapy Research, 25 : 463-466.
- FAOSTAT, (2012).** <http://faostat.fao.org/>

- Fernandez C.M., Bertrand C.S. (1988).** Verticilosis: Principal Problem of the alchachofa en la Región V. IPA La Platina, 50: 6-9.
- Fernández J. (1992).** Production and utilization of *C. Cardunculus* L. biomass for energy, paper-pulp and food industry. In : Grassi, G., A. Colina and H. Zibetta (Eds.), Biomass for energy, industry and environment (Proceedings of the 6<sup>th</sup> E. C. Conference, 22–26 April, Athens, Greece). Elsevier Science, London. 312-316.
- Fernández J., Hidalgo M., Del Monte J.P., Curt M.D. (2005).** *Cynara cardunculus* L. as a perennial crop for non-irrigated lands: yields and applications. Proceedings of IV International Congress on Artichoke Editors V.V. Bianco, N. Calabrese, V. Rubatzky. Acta Horticulturae, 681 : 109-115.
- Fernández J., Curt M.D., Aguado P.L. (2006).** Industrial applications of *Cynara cardunculus* L., for energy and other uses. Industrial Crops and Products, 24: 222-229.
- Foti S., Mauromicale G., Raccuia S.A., Fallico B., Fanella F., Maccarone E. (1999).** Possible alternative utilization of *Cynara* spp. Biomass, grain yield and chemical composition of grain. Industrial Crops and Products, 10 : 219-228.
- Foti S., Mauromicale G., Ierna, A. (2005).** Response of seed-grown globe artichoke to different levels of nitrogen and water. Acta Horticulturae, 68 : 237-242.
- Foury C. (1967).** Étude de la biologie florale de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) ; application à la sélection, 1ère partie : données sur la biologie florale, Ann. Amélior. Plantes 17 : 357–373.
- Foury C. (1977).** Trials on gibberellic acid application to a spring crop of globe artichoke (*Cynara scolymus*) cv. Blanc Hyerois. Annales de l'Amélioration des Plantes. 27 : 411-426.
- Foury C., Martin F., Imperiali M. (1978).** Remarques sur la production des semences d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Annales d'Amélioration des Plantes, 28 : 45-60.
- Foury C. (1989).** Quelques caractéristiques des semences de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Acta Hort., 253:45-54.
- Franco E.T.H., Ferreira A.G. (2002).** Pregerminating treatments in *didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch seeds. Ciência Florestal, Santa Maria. 12(1) : 1-10.
- Francois L.E. (1995).** Salinity effects on bud yield and vegetative growth of artichoke (*Cynara scolymus* L.). HortScience, 30 : 69-71.
- Fratianni F., Tucci M., De Palma M., Pepe R., Nazzaro F. (2007).** Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). Food Chemistry, 104 : 1282-1286.
- Frau A., Mallica G., Baghino L., Cadinu M., Repetto A. (2004).** Micropropagation of artichoke spinoso sardo: a valuable tool to increase the productivity of plants. *Italus Hortus*, 11(5) : 38-41.
- Gallard A., Panis B., Dorion N., Swennen R., Grapin A. (2008).** Cryopreservation of *Pelargonium* apices by droplet-vitrification, Cryoletters, 29(3) : 243-251.
- Gallitelli D., Rana GL., Vovlas C., Martelli GP. (2004).** Viruses of globe artichoke: an overview. J. Plant Pathology, 84 (4) : 267-281.
- Galvano G., Scerra V. (1983).** The use of bracts of artichoke (*Cynara scolymus* L.) in the feeding of cattle. World Review of Animal Production, 19 (3) : 41-46.

- Gamborg O.L., Miller R., Ojima K. (1968).** Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50 : 151-158.
- García S.M., Firpo IT., López Anido FS., Cointry EL. (1999).** Application of gibberellic acid in globe artichoke [Aplicación de ácido giberélico en alcaucil]. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 34 (5) : 789-793.
- García S.M., Cointry E.L., López Anido F.S., Cravero V.P., Firpo I.T. (2005).** Atichoke situacion in Argentina, p. 195-200.
- Gebhardt R. (1997).** Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke *Cynara scolymus* L. against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. Toxicology and Applied Pharmacology, 144: 279-286.
- Genève R.L. (1991).** Seed dormancy in eastern redbud (*Cercis canadensis*), J. Am. Soc. Hortic. Sci., 116 : 85-88.
- George E.F., Hall M.A., Jan De Klerk G. (2008).** Plant Propagation by Tissue Culture (3rd Edition), Volume 1. The Background, Springer, ISBN 978-1-4020-5004-6.
- Gill L.S., Jegede J.R.O., Ussani S.W.N. (1996).** Studies in the germination of *Acacia farnesina* (L.) Leguminosae, J. Tree Sci., 5:92-99.
- Gokani S.J., Thaker V.S. (2002).** Role of gibberellic acid in cotton fibre development. J. Agric. Sci., 138 : 255-260.
- Gominho J., Fernández J., Pereira H. (2001).** *Cynara cardunculus* L., a new fiber crop for pulp and paper production. Industrial Crops and Products, 13: 1-10.
- Gominho J., Pereira H. (2006).** Influence of raw-material and process variables in the kraft pulping of *Cynara cardunculus* L. Industrial Crops and Products, 24: 160-165.
- Gominho J., Laurenço A., Curt M., Fernández J., Pereira H. (2009).** Characterization of hairs and pappi from *Cynara cardunculus* capitula and their suitability for paper production. Industrial Crops and Products, 29: 116-125.
- Gonzales J., Perez F., Fernández J., Lezaun J.A., Rodriguez D., Perea F., Romero C., Ochoa M.J., Garcia M. (2004).** Study of *Cynara cardunculus* L. lignocellulosic biomass production in dry conditions. Acta Horticulturae, 660 : 221-227.
- Gonzalez-Arnao M.T., Engelmann F. (2006).** Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane, Cryoletters, 27(3) : 155-168.
- Grando M.F., Comin R.C., Calvete E.O., Augustin, L., Suzin M., Donida B. (2009).** Estabelecimento da multiplicação *in vitro* da cultivar brasileira de alcachofra Nobre-UPF. In : 49 Congresso Brasileiro de Olericultura, Aguas de Lindóia-SP. Horticultura Brasileira. Brasilia : Sociedade Brasileira de Horticultura 27:S1-S8.
- Grando M.F., Augustin L., Suzin M., Calvete E.O., Comin R.C., Costa A.R., Morlin B., Donida B. (2011).** Micropropagation of Globe Artichoke 'Nobre-UPF', a Brazilian Cultivar Used for Industrial Purpose. Acta Hort. (ISHS), 923 : 147-154.
- Grau L.A. (1982).** El cultivo de la alcachofra y del cardo. Espanha: Editorial Sintes S.A. : 83p.
- Groot S.P.C., Bruinsma J., Karssen C.M. (1987).** The role of endogenous gibberellin in seed and fruit development of tomato: studies with a gibberellin-deficient mutant. Physiol. Plant, 71:184-190.

- Gupta S., Reed B.M. (2006).** Cryopreservation of shoots tips of Blackberry and Raspberry by encapsulations-dehydration and vitrification, Cryoletters, 27(1) : 29-42.
- Hamad A.M., Taha R.M. (2009).** Effect of Explants Density on the *in vitro* Proliferation and Growth of Separated and Cluster Shoots of Smooth Cayenne Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). Asian Journal of Plant Sciences, 8 : 313-317.
- Harbaoui Y., Debergh P. (1980).** Multiplication *in vitro* de clones sélectionnées d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). In : Application de la culture *in vitro* à l'amélioration des plantes potagères, Eucarpia, Versailles, pp 1-7.
- Harbaoui Y., Smayn G., Welvaert W., Debergh P.C. (1982).** Assainissement viral de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) par la culture *in vitro* d'apex méristématiques. Phytopathologie Méditerranée, 21: 15-19.
- Heller R. (1953).** Recherches sur la nutrition minérales des tissus végétaux cultivés, *in vitro*. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg., 14 : 1-223.
- Hellwege E.M., Czapla S., Jahnke A., Willmitzer L., Heyer A.G. (2000).** Transeganic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 97: 8699-8704.
- Husain S. (2003).** Effects of Nitrogen Fertilizer Rate and Irrigation on the Annual Culture of Globe Artichoke (*Cynara Scolymus* L.) in Quebec. Thesis, McGill University, Montreal, Quebec, Canada. 154 p.
- Iapichino G. (1996).** Micropropagation of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) from underground dormant buds ("ovoli"). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32(4) : 249-252.
- Iapichino G. (2013).** Micropropagation of Globe Artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*). Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. M. Lambardi, E. A. Ozudogru and S. M. Jain, Humana Press. 994 : 369-380.
- Ierna A., Mauromicale G. (2010).** *Cynara cardunculus* L. genotypes as a crop for energy purposes in a Mediterranean environment. Biomass and Bioenergy, 34: 754-760.
- Ierna A., Mauro R.P., Mauromicale G. (2012).** Biomass, grain and Energy yield in *Cynara cardunculus* L. as affected by fertilization, genotype and harvest time. Biomass and bioenergy, 36: 404-410.
- Jani S., Hoxha S., Papakroni H. (2005).** Planting density and management of seed, seedling and offshoot propagated artichoke. Acta Hort., 681 : 201-206.
- Jaouadi W., Hamrouni L., Souayah N., Khouja M.L. (2010).** Étude de la germination des graines d'*Acacia tortilis* sous différentes contraintes abiotiques. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 14(4), 643-652.
- Jha B.N., Sinha R.P. (1989).** Hardseededness in *Vicia faba* L. FABIS News Letter 24: 37.
- Jouanneau J. (1975).** Protein synthesis requirement for the cytokinin effect upon tobacco cell division. Experimental Cell Research, 91(1) : 184-190.
- Kaldewey H., Scott T. (1984).** Transport and other modes of movement of hormones (mainly auxins). Hormonal regulation of development II. The functions of hormones from the level of the cell to the whole plant, 80-148.

- Kchouk M.F., Tavazza R., Ancora G., Ghorbel A. (1994).** L'artichaut (*Cynara scolymus* L.) : plante récalcitrante. Quel avenir pour l'amélioration des plantes ? Ed. Aupelf-Uref. John Libbey Eurotext. Paris, pp. 87-95.
- Keyes G., Sorrells ME., Setter TL. (1990).** Gibberellic acid regulates cell wall extensibility in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.*, 92 : 242-245.
- Khan A.A. (1992).** Pre-plant physiological seed conditioning. *Horticultural Review*, 13 : 131-181.
- Kim H.H., Yoon J.W., Park Y.E., Cho U.G., Sohn J.K., Kim T.S., Engelmann F. (2006).** cryopreservation of Potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification, *Cryoletters*, 27(4) : 223-234.
- Kraft K. (1997).** Artichoke leaf extract recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. *Phytomedicine*, 4 : 369-378.
- Kyauk H., Hopper N.W., Brigham R.D. (1995).** Effects of temperature and presoaking on germination, root length and shoot length of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Environ. Exp. Bot.*, 35(3) : 345-351.
- La Malfa G., Foury C. (1971).** Aspects de la multiplication végétative de l'artichaut dans le bassin occidental de la méditerranée. *Pép. Hort. Mar.*, 114:19-29.
- Lahlimi-Alami Q., Chlyah B., Chlyah H. (2001).** Callus formation and regeneration *in vitro* du kiwi (*Actinidia chinensis*) à partir de divers explants. *Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc)*. 21(2) : 75-81.
- Lambardi M., De Carlo A. (2003).** Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: Jain SM, Ishii K, editors. *Micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht: Kluwer Ac. Pub. p. 815–40.
- Lanteri S., Di Leo I., Ledda L., Mameli M.G., Portis E. (2001).** RAPD variation within and among populations of globe artichoke cultivar Spinoso sardo'. *Plant Breeding*, 120 : 243-246.
- Lanteri S., Acquadro A., Saba E., Portis E. (2004a).** Molecular fingerprinting and evaluation of genetic distances among selected clones of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 79 : 863-870.
- Lanteri S., Saba E., Cadinu M., Mallica G.M., Baghino L., Portis E. (2004b).** Amplified fragment length polymorphism for genetic diversity assessment in globe artichoke. *Theoretical and Applied Genetics*, 10: 1534-1544.
- Lanteri S., Acquadro A., Comino C., Mauro R., Mauromicale G., Portis E. (2006).** A first linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) based on AFLP, SSAP, M-AFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 347-357.
- Lanteri S., Portis E., Acquadro A., Mauro R.P., Mauromicale G. (2012).** Morphology and SSR fingerprinting of newly developed *Cynara cardunculus* genotypes exploitable as ornamentals. *Euphytica*, 184 : 311-321.
- Lattanzio V., Morone I. (1979).** Variations of the orthodiphenol content of *Cynara scolymus* L. during the plant growing seasons. *Experientia* 35, Birkhauser Verlag, Basel, 993.

- Lattanzio V., Cardinali A., Di Venere D., Linsalata V., Palmieri S. (1994).** Browning phenomena in stored artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads: Enzymic or chemical reactions? *Food Chemistry*, 50 : 1-7.
- Lattanzio V., Kroon P.A., Linsalata V., Cardinali A. (2009).** Globe artichoke: A functional food and a source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, 1: 131-144.
- Lauzer D., Vieth J. (1990).** Micropropagation of seed-derived plants of *Cynara scolymus* L., cv 'Green Globe'. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 21 : 237-244.
- Le Guen-Le Saos F., Hourmant A. (2001).** Stimulation of putrescine biosynthesis via the ornithine decarboxylase pathway by gibberellic acid in the *in vitro* rooting of globe artichoke (*Cynara scolymus*). *Plant growth regulation*, 35(3) : 277-284.
- Linsmaier E.M., Skoog F. (1965).** Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 18 : 100-127.
- Liu Y.G., Liu L.X., Wang L., Gao A.Y. (2008).** Determination of genetic stability in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification. *CryoLetters*, 29 : 7-14.
- Llorach R., Espin J.C., Tomás Barberán F.A., Ferreres F. (2002).** Artichoke (*Cynara scolymus* L.) By products as a Potential Source of Health-Promoting Antioxidant Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3458-3464.
- Lo Bianco C., Micozzi F., Jordan J.R., Jordan A., Crinò P., Temperini A., Pagnotta M.A., Saccardo, F. (2012).**  $F_1$ hybrids of globe artichoke of 'romanesco' type. *Acta Hort.*, 942:133-138.
- Lombardo S., Pandino G., Mauromicale G., Knödler M., Carle R., Schieber A. (2010).** Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Food Chemistry*, 119 : 1175-1181.
- Lumia V., Pasquini G., Barba M. (2003).** Sensitive detection of Artichoke latent virus by one step RT-PCR or tissue imprint hybridization of globe artichoke field samples. *J. Phytopathol*, 151(7-8): 477-479.
- Lynch P.T., Siddika A., Mehra A., Benelli C., Lambardi M. (2007).** The challenge of successful cryopreservation of olive (*Olea europaea* L.) shoot tip. *Adv Hort Sci.*, 21: 211-4.
- Maccarone E., Fallico B., Fanella F., Mauromicale G., Racuia S.A., Foti S. (1999).** Possible alternative utilization of *Cynara* spp. II. Chemical characterization of their grain oil. *Industrial Crops and Products*, EUA, 10: 229-237.
- Macua J.I. (2007).** New horizons for artichoke cultivation. *Acta Hort.*, 730:39-48.
- Mantineo M., D'Agosta G.M., Copani V., Patanè C., Cosentino S.L. (2009).** Biomass yield and Energy balance of three perennial crops for Energy use in the semiarid Mediterranean environment. *Field Crops Research*, 114: 204-213.
- Margara J. (1989).** Bases de la multiplication végétative, Les méristèmes et l'organogenèse. INRA, Paris, p 260.
- Maroto J.V. (2007).** Effects of Gibberellic Acid (GA3) applications on Globe Artichoke production. *Acta Horticulturae*, 730 : 137-142.

- Martelli G.P., Russo M., Rana G.L. (1979).** A survey of *Cynara* species. In : Proceed. 3rd Congress Int. Studi sul Carciofo”, Bari. Ind. Laterza, Bari. pp. 895-920.
- Matsumoto T, Sakai A. (2000).** Cryopreservation of *in-vitro*-cultured axillary shoot tips of *Vitis* by vitrification. Acta Hort., 538 : 173-175.
- Mauro R., Portis E., Acquadro A., Lombardo S., Mauromicale G., Lanteri S. (2009).** Genetic diversity of globe artichoke landraces from Sicilian small-holdings: implication for evolution and domestication of the species. Conservation Genetics, 10, 431-440.
- Mauromicale G. (1984).** The cultivation of artichoke in Sicilia. In : The cultivation of artichoke in Tuscany. Venturina : ETS. p. 35-69.
- Mauromicale G., Ierna A. (1995).** Effects of gibberellic acid and sowing date on harvest time and yields of seed-grown globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). Agronomie 15 : 527-538.
- Mauromicale G., Ierna A. (2000).** Special artichoke. Current knowledge: Panorama varietal and genetic improvement of the artichoke. L'informatore Agrario, Verona, 56(26) : 39-45.
- Mauromicale G., Licandro P., Ierna A. (2004).** Planning of globe artichoke plantlets production in nursery. Acta Horticulturae, 660 : 279-284.
- Medza Mve S.D., Mergeai G., Baudoine J.P., Toussaint A. (2010).** Amélioration du taux de multiplication *in vitro* de *Jatropha curcas* L. Tropicultura, 28(4) : 200-204.
- Melilli M.G., Racchia S.A. (2007).** Inulin and water-soluble-sugars variations in *Cynara* roots during the biological cycle. Acta Hort., 730 : 475-481.
- Mendes R.C., De Oliveira M.A.R., Motoike S.Y., Alexandre R.S., Siqueira D.L. (2008).** Effect of mechanical treatments on *in vitro* germination of citrus seeds. Revista Ceres., 55(5) : 445-449.
- Menin B., Comino C., Moglia A., Dolzhenko Y., Portis E., Lanteri S. (2010).** Identification and mapping of genes related to caffeoylquinic acid synthesis in *Cynara cardunculus*, L. Plant science, 179(4) : 338-347.
- Miccolis V. (1996).** Il carciofo: aspetti di tecnica colturale. Supplemento dell'informatore agrario 33 : 17-20.
- Miccolis V., Elia A., Bianco V.V. (1990).** Timing field production in a germplasm collection of artichoke (*Cynara scolymus* L.). Acta hort., 267:153-162.
- Miguel A., Baixaulli C., Aguilar J.M., Giner A., Maroto J.V., López S., San Bautista A., Pascual B. (2004).** Gibberellic acid concentrations in seed propagated artichoke. Acta Hort., 660 : 167-172.
- Moncousin C. (1979).** Multiplication végétative accélérée et sélection bactérienne de *Cynara scolymus* L. Atti 3rd Congr. Stud. mt. Carciofo, Ban. md. Laterza, p. 219-229.
- Moncousin C. (1981).** Multiplication végétative accélérée de *Cynara scolymus* L., Rev. Hort. Suisse, 54 : 105-111.
- Moncousin C. (1982).** Contribution à la caractérisation biochimique et physiologique de la phase juvénile de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) au cours de sa multiplication végétative conforme et accélérée en culture *in vitro*. Thèse Doct. Ing. Univ., Paris-Sud. Orsay. 179p.

- Moncousin C., Ducreux G. (1984).** Activité peroxydasique et rhizogenèse dans le cas de *Cynara scolymus* L. : évolution au cours de repiquages successifs de boutures cultivées *in vitro*. Comparaison avec de jeunes plantes issues de graines. Agronomie, 4 : 105-111.
- Monette P.L. (1983).** Influence of size of culture vessel on *in vitro* proliferation of grape in a liquid medium. Plant Cell Tissue Organ Culture 2:327 -332.
- Moraes L.M., Faria R.T., Cuquel F.L. (2005).** Activated charcoal for *in vitro* propagation of Brazilian orchids. Acta Hort. 683 : 383-390.
- Morel G., Wetmore R.H. (1951).** Fern callus tissue culture. Am J Bot, 38 : 141-143.
- Morison N., Vaissiere BE., Martin F., Pecaut P., Cambon G. (2000).** Pollinisation de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) par l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) en production de semences hybrides sous abris grillagés. Apidologie, 31 : 115–128.
- Morone Fortunato I., Ruta C. (2003).** Piantine micropagate di carciofo precoce con inoculo di funghi micorrizici arbuscolari. Italus Hortus, 10 : 213-218.
- Morone-Fortunato I., Ruta C., Castrignanò A., Saccardo F. (2005).** The effect of mycorrhizal symbiosis on the development of micropaginated artichokes. Scientia Horticulturae, 106 (4) : 472-483.
- Morone-Fortunato I. (2007).** Artichoke propagation: nursery and innovative technology. Italus Hortus, 14:47-57.
- Morzadec J.M., Hourmant A. (1997).** *In vitro* rooting improvement of globe artichoke (cv. Camus de Bretagne) by GA3. Sci. Hortic. Amsterdam, 72 : 59-62.
- Mura P., Ceccarelli L., Fauci M.T., Rinaldelli E., Mancuso S. (1995).** Improvement of solubility of indolbutyric acid by complexation with alfa-cyclodextrin and rhizogenic activity in *Olea europaea* L., cv Leccio del Corno, Advance in Sci. Hort. 9 : 119-121.
- Murashige T., Skoog F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 15(3) : 473-497.
- Navarro L., Llácer G., Cambra M., Arregui J.M., Juárez J. (1983).** Shoot-tip grafting *in vitro* for elimination of viruses in peach plants (*prunus persica batsch*). Acta Hort., 130:185-192.
- Neffati M. (1994).** Caractérisation morpho-biologique de certaines espèces végétales nord africaines : implication pour l'amélioration pastorale. Thèse de doctorat : Université de Gand (Belgique).
- Negro D., Grieco S., De Lisi A., Sarli G., Sonnante G. (2011).** Chlorogenic acid content variation in artichoke plant parts and physiological stages. Proc. VII IS on Artichoke, Cardoon and Their Wild Relatives Ed. C. Bazinet, Acta Horticulturae, 942 : 469-472.
- Nhut D., An T., Huong N., Don N., Hai N., Thien N., Vu N. (2007).** Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot generation of *Gerbera jamesonii* by receptacle transverse thin cell layer culture. Sci. Hort. 111:146–151.
- Niedz R.P., Bausher M.G. (2002).** Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 38:468–47.
- Niedz R.P. (2008).** *In vitro* Germination of Citrus Seed. Proc. Fla. State Hort. Soc., 21:148-151.
- Nitsch J.P., Nitsch C. (1969).** Haploid plants for pollen grains. Science, 63 : 85–87.

- Oliveira F.C., Araujo E.C.E., Vasconcelos L.F.L. (2002).** Methods to accelerate the germination of bacuri seeds (*Platonia insignis Mart.*). Revista Brasileira de Fruticultura, 24(1):151-154.
- Ordas R.J., Tavazza R., Ancora G. (1990).** *In vitro* morphogenesis in the globe artichoke (*Cynara scolymus L.*). Plant Science. 71 : 233-237.
- Ordiales E., Martín A., Benito M.J., Hernández A., Ruiz-Moyano S., Córdoba M. (2012).** Technological characterization by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in Torta del Casar“cheesemaking. Food Chemistry, 133 : 227-235.
- ORMVAM, (1994).** La culture de l'artichaut dans le périmètre de la Moulouya. Serv. Prod. Agric. Bure. cult. diverses. O.R.M.V.A.Moulouya 19p.
- Pacifici S., Lucchesini M., Curadi M., Graifenberg A. (2007).** Influence of medium composition and vessel ventilation during the micropropagation stages of *Cynara scolymus L.* cv *Grato* 1, Adv. Hort. Sci., 21, 83-88.
- Padma V., Satyanarayana G., Reddy B.M. (1994).** Effect of scarification treatments on the germination of *Leucaena leucocephala*, *Albizia lebbeck* and *Samanea samon*. Seed Res., 22: 54-57.
- Pan M.J., Van Staden J. (1998).** The use of charcoal in *in vitro* culture – A review, Plant Growth Regulation. 26 : 155–163.
- Pandino G., Courts F.L., Lombardo S., Mauromicale G., Williamson G. (2010).** Caffeoylquinic Acids and Flavonoids in the Immature Inflorescence of Globe Artichoke, Wild Cardoon, and Cultivated Cardoon. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 1026-1031.
- Pandino G., Lombardo S., Mauromicale G. (2011a).** Chemical and Morphological Characteristics of New Clones and Commercial Varieties of Globe Artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*). Plant Foods for Human Nutrition, 66: 291-297.
- Pandino G., Lombardo S., Mauromicale G., Williamson G. (2011b).** Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*), germplasm. Journal of Food Composition and Analysis, 24: 148-153.
- Pandino G., Lombardo S., Mauromicale G., Williamson G. (2011c).** Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. Food Chemistry, 126 : 417-422.
- Pandino G., Lombardo S., Mauro R.P., Mauromicale G. (2012).** Variation in polyphenol profile and head morphology among clones of globe artichoke selected from a landrace. Scientia Horticulturae, 138 : 259-265.
- Panis B., Piette B., Swennen R. (2005).** Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*, Plant Science, 168: 45-55.
- Panis B. (2008).** Cryopreservation of Monocots. Plant Cryopreservation: A Practical Guide. B. Reed, Springer New York : 241-280.
- Pant B. Thapa D. (2012).** *In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. African Journal of Biotechnology, 11(42) : 9970-9974.
- Paradiso R., Cuocolo B., De Pascale S. (2007).** Gibberellic Acid and nitrogen rate affect yield and quality of artichoke. Acta Hort., 730:211-216.

- Pasquini G., Barba M. (2000).** Evidence of viral infections in late artichoke cv. Romanesco. In : Proceedings of IV International Congress on Artichoke, October 17-21, 2000. Valenzano, Bari, Italy. p. 96 (résumé).
- Pasquini G., Lumia V., Barba M. (2004).** Diagnosis of *artichoke latent virus* (ArLV) and other relevant viruses in “late” artichoke germoplasm. *Acta Horticulturae*, 660:497-500.
- Paul D., Paul N.K., Basu P.K. (2008).** Seed germination response of *rauwolfia serpentina benth.* to certain physical and chemical treatments. *J. bio-sci.*, 16 : 129-131.
- Pécaut P., Dumas de Vaulx R., Lot H. (1982).** Virus-free clones of globe artichoke (*Cynara scolymus*) obtained after *in vitro* propagation. *In vitro Culture*, XXI IHC 131 : 303-310.
- Pécaut P., Dumas De Vaulx R., Lot H. (1983).** Virus-free clones of globe artichoke obtained after *in vitro* propagation. *Acta Hort.*, 131:303-309.
- Pécaut P., Martin F. (1990).** non-conformity of *in vitro* propagated plants of early mediterranean varieties of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *In Vitro Culture*, XXIII IHC 300 : 363-366.
- Pécaut P. (1992).** Genetic improvement of vegetable crops. Edited by Kalloo, G. and Bergh, O.B. Pergamon Press. Stoev, S., G. Angelov, D. Pavlov (1998) : Some para-clinical investigations in experimental intoxication with ochratoxin A and penicillic acid in chicks. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 4(4) : 565-573.
- Pécaut P., Foury C. (1992).** L’artichaut. In : Amélioration des Espèces Végétales Cultivées : Objectifs et Critères de Sélection (A Gallais & H Bannerot, eds.), INRA. Paris. pp. 460-469.
- Pécaut P., Martin F. (1992).** Non-conformity of *in vitro* propagated plants of early Mediterranean varieties of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Acta Horticulturae*. 300 : 363-366.
- Pécaut P. (1993).** Globe artichoke *Cynara scolymus* L. In: Kalloo G, Bergh BO (eds) Genetic improvements of vegetable crops, 1<sup>st</sup> edn. Pergamon, New York.
- Pécaut P., Martin F. (1993).** Variation occurring after natural and *in vitro* multiplication of early Mediterranean cultivars of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Agronomie*, 13 : 909-919.
- Pena-Iglesias A., Ayuso-Gonzales P. (1974).** The elimination of viruses from globe artichoke *Cynara scolymus* L. by etiolated tip-meristem culture. In : Proceedings of the XIX international horticultural congress, Warsaw, p 63.
- Pesti N.O., Ombòdi A., Szöcs A., Kassai T., Dimény J. (2004).** The effect of sowing dates and seedlings’ state of advancement on the yield and bud quality of globe artichoke in Hungary. *Acta Hort.*, 660 : 423-427.
- Phillips W.S. (1937).** Seedling Anatomy of *Cynara scolymus*. *Botanical Gazette*, 98(4) : 711-724.
- Piazza R., Caccioni D. (2009).** Aspetti commerciali. AA.VV. (2009). Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, 432-439.
- Piscioneri I., Sharma N., Baviello G., Orlandini S. (2000).** Promising industrial energy crop, *Cynara cardunculus*: a potential source for biomass production and alternative energy. *Energy Conversion and Management*, 41(10) : 1091-1105.

- Porceddu E., Dellacecca V., Bianco V.V. (1976).** Classificazione numerica di cultivar di carciofo. Atti II Congresso Internazionale Carciofo, Bari., Ed. Minerva Media, Torino, 1105-1119.
- Quatrano R.S. (1968).** Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing dimethyl sulfoxide. *Plant Physiol.*, 43 : 2057–2061.
- Quoirin M., Boxus PH., Gasper TH. (1974).** Root initiation and isoperoxidases of stem tip cutting from mature *Prunus* plants. *Physiologie Végétale* 12, School of Agriculture, Aristotle University Thessaloniki, Greece, pp.165-174.
- Quoirin M., Silva M.C., Martins K.G., de Oliveira D.E. (2001).** Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 66(3) : 199-205.
- Raccuia S.A., Melilli M.G. (2004).** *Cynara cardunculus* L., a potential source of inulin in mediterranean environment: screening of genetic variability. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55: 693-698.
- Raccuia S.A., Melilli M.G. (2010).** Seasonal dynamics of biomass, inulin and watersoluble sugars in roots of *Cynara cardunculus* L. *Field Crops Research*, 116: 147-153.
- Raha S., Roy S.C., (2001).** *In vitro* plant regeneration in *Holarrhena antidysenterica* Wall., through high frequency axillary shoot proliferation. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 37 : 232-236.
- Reed B.M. (2008).** Cryopreservation - practical considerations. In : Reed BM, editor. *Plant cryopreservation. A practical guide*. New York : Springer. p. 3-11.
- Renau-Morata B., Ollero J., Arrillaga I., Segura J. (2005).** Factors influencing axillary shoot proliferation and adventitious budding in cedar. *Tree Physiology*, 25 : 477–486.
- Rengelink R.H.J., Remeeus P.M. (2009).** Committee Technical report: Validation of a revised method for the germination test of *Cynara cardunculus* using optimal temperatures. 2009 AOSA Rules Proposal 12 – Appendix 12A. 87p.
- Rey Muñoz N.A. (2005).** Preservation and morphological and molecular characterization of ecotypes of artichoke Romanesco type. Thèse de doctorat. Université degli Studi della Tuscia (Italie), 137p.
- Rizzo M., Bassi D., Byrne D., Porter K. (1998).** Growth of immature peach [*prunus persica* (L.) Batsch.] Embryos on different media. *Acta Hort.*, 465:141-144.
- Robles R.F. (2001).** Artichoke: new alternative for Peruvian agriculture. Lima : Prompex. 42p.
- Rolston M.P. (1978).** Water impermeable seed dormancy. *Bot. Rev.*, 44 : 365-396.
- Rondanelli M., Giacosa A., Orsini F., Opizzi A., Villani S. (2011).** Appetite Control and Glycemia Reduction in Overweight Subjects treated with a Combination of Two Highly Standardized Extracts from *Phaseolus vulgaris* and *Cynara scolymus*. *Phytotherapy Research*, 25 : 1275-1282.
- Ronkart S.N., Blecker C.S., Fourmanoir H., Fougnies C., Deroanne C., Van Herck J.C., Paquot M. (2007).** Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis. *Analytica Chimica Acta*, 604 : 81-87.
- Rosell C.H., Villalobos Arambula V.M. (1992).** Fondements théoriques et pratiques de la culture des tissus végétaux. *Food & Agriculture Org.*, 163p.

- Rossi V., De Paoli G. (1990).** Micropropagation for an artichoke of quality. L'Informatore Agrario, 9 : 207-209.
- Rossi V., De Paoli G., (1992).** Micropropagation of artichoke (*Cynara scolymus*). In : Bajaj, Y.P.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry : High-Tech and Micropropagation II, Vol 19. Springer-Verlag, Berlín, pp. 118-134.
- Rottenberg A., Zohary D. (1996).** The wild relatives and the wild ancestry of the cultivated artichoke. Genetic Resources and Crop Evolution. 43:53–58.
- Rottenberg A., Zohary D., Nevo E. (1996).** Isozyme relationships between cultivated artichoke and the wild relatives. Genet. Resour. Crop Evol, 43 : 59–62.
- Rottemberg A., Zohary D. (2005).** Wild Genetic resources of cultivated artichoke and the wild relatives. IV International Congress on Artichoke. Acta Horticulturae, 681 : 307-311.
- Roychowdhury R., Mamgain A., Ray S., Tah J. (2012).** Effect of Gibberellic Acid, Kinetin and Indole 3-Acetic Acid on Seed Germination Performance of *Dianthus caryophyllus* (Carnation). Agriculturae Conspectus Scientificus, 77(3) : 157-160.
- Ruta C., Perrini R., Tagarelli A., Morone Fortunato I. (2009).** Use of arbuscular mycorrhiza for acclimatization of micropropagated plantlets of melon, oregano, artichoke and spanish broom. Acta Hort. (ISHS) 812:473-478.
- Saccardo F., Ancora G. (1985).** The contribution of micropropagation to improve the culture of the artichoke. Recenti acquisizioni del miglioramento genetico italiano in orticoltura e floricoltura. 24-26.
- Saccardo F. (2009).** Genetic improvement. The artichoke and cardoon, scientific coordination N. Calabrese. Collana Cultura&Cultura, Ed. Script Bologna, 287-288.
- Sáenz Rodriguez T., García Giménez D., De la Puerta Vázquez R. (2002).** Choleretic activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. Phytomedicine, 9(8) : 687-693.
- Sakai A., Engelmann F. (2007).** Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification : a review, Cryoletters, 28(3) : 151-172.
- Sakai A. (1995).** Cryopreservation of germplasm of woody plants. In : Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, vol 32. Cryopreservation of plant germplasm I. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 53–69.
- Sakai A. (2000).** Development of cryopreservation techniques. In : Engelmann F, Takagi H (eds) Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application, JIRCAS, Tsukuba/IPGRI, Rome, pp 1-7.
- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. (1990).** Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus Sinensis* Osb. Var. *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell reports., 9: 30-33.
- Saleh S.A. (2003).** Physiological responses of artichoke plants to irrigation and fertilization under special recognition of salinity. Thèse de doctorat, Chair of Vegetable Science, Center of Life Sciences Weihenstephan, Technische Universität München, Freising, Germany.158p.
- Sanatombi K., Sharma G.J. (2007).** Micropropagation of *Capsicum frutescens* L. using axillary shoot explants, Scientia Hort., 113: 96-99.

- Schäfer-Menuhr A., Martin Schumacher H., Mix-Wagner G. (1997).** Cryopreservation of potato cultivars - design of a method for routine application in genebanks. Acta Hort., 447:477-482.
- Schneider F. (2005).** Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa* sp. L.) and globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). Thèse de doctorat, Université Technique de Munich. 145p.
- Schrader W.L. (2005).** Effects of plant growth regulators on heat stress in annual artichoke production. Acta Hort., 681 : 207-214.
- Schrader W.L., Mayberry K.S. (1997).** Artichoke production in California. University of California. Div. of Agr. and Nat. Res. Publication 7221.
- Semal J. (1998).** Reproduire à l'identique : Mythe et réalité .Cahier Agriculture, (7):6-8.
- Shatnawi M.A., Shibli R., Qrunfleh I., Bataeineh K., Obeidat M. (2007).** *In vitro* propagation and cryopreservation of *Prunus avium* using vitrification and encapsulation dehydration methods. J Food Agric Environ., 5 : 204–8.
- Sims W.L., Rubatzky V.E., Sciaroni R.I., Lange W.H. (1977).** Growing globe artichokes in California. UC Leaflet 2675. 11p.
- Singh J.N., Jha B.N., Sinha S.K., Singh R.S.P. (1985).** Effect of seed treatment on dormancy of lentil seeds. Seed Res., 13: 28-32.
- Sinha S.K., Jha B.N., Varshney S.K. (1993).** Effect of various treatments on harseededness in kasurimethi (*Trigonella corniculata* L.). Seed Res., 21 : 114-116.
- Smith R.H. (2000).** Plant Tissue Culture : Techniques and Experiments, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. San Diego, New York. pp 61.
- Soares Filho W.S., Lee L.M., Cunha Sobrinho A.P. (1995).** Influence of pollinators on polyembryony in citrus. Acta Horticulture, 403:256-265.
- Soares Filho W.S., Medrado A.C.M., Cunha MAP., Cunha Sobrinho A.P., Passos O.S. (2002).** Frequency of citrus hybrids from controlled crossings: seed germination in seedbeds *versus in vitro* embryo cultivation. Pesq. Agropec. Bras, 37(7):981-988.
- Sonnante G., De Paolis A., Lattanzio V., Perrino P. (2002).** Genetic variation in wild and cultivated artichoke revealed by RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 49, 247-252.
- Sonnante G., De Paolis A., Pignone D. (2004).** Relationships among artichoke cultivars and some related wild taxa based on AFLP markers. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization, 1: 125–133.
- Sonnante G., Carluccio A.V., De Paolis A., Pignone D. (2007a).** Identification of artichoke SSR markers: molecular variation and patterns of diversity in genetically cohesive taxa and wild allies. Genet Resour Crop Evol (2008) 55:1029–1046.
- Sonnante G., Pignone D., Hammer K. (2007b).** The domestication of artichoke and cardoon: from roman times to the genomic age. Annals of Botany, 100: 1095–1100.
- Stoev S. (1998).** Some metric, antidote and pathomorphological investigations in experimental intoxication with ochratoxin A and penicillic acid in chicks. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 4 (4) : 551-563.
- Swain S.M., Reid J.B., Kamiya Y. (1997).** Gibberellins are required for embryo growth and seed development in pea. Plant J. 12 : 1329-1338.

- Taiz L., Zeiger E. (2002).** Plant physiology. 3rd edition. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland.
- Taski K., Vasic D. (2005).** Different sterilization methods for overcoming internal bacterial infection in sunflower seeds. Proc. Nat. Sci; Matica Srpska 109: 59-64.
- Tassin J. (2004).** Convention programme Forêt sèche / IAC, Fiches Volet III, opérations 8, 9 et 10.
- Tavazza R., Papacchioli R., Ancora G. (2004).** An improved medium for *in vitro* propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) cv. Spinoso sardo. Acta Hortic, 660 : 91-97.
- Tazi M.R. (2003).** Contribution à l'étude de l'écologie et de la biologie de l'arganier « *Argania spinosa* (L.) Skeels » du Nord-Est du Maroc. Thèse de doctorat, Faculté Des Sciences, Oujda. (Résumé)
- Tendille C., Lecerf M. (1974).** La multiplication végétative de l'asperge (*Asparagus officinalis* L.). Action de divers facteurs, en particulier de la nutrition minérale, sur le développement des méristèmes d'asperge, sur la croissance de plantules issues de ces méristèmes et sur la production de plantes adultes. Annales de l'Amélioration des Plantes, 24 : 269-282.
- Tesi R. (1981).** 'Terom', a new globe-artichoke cultivar for Tuscany [Italy]. Rivista della Ortoflorofrutticoltura Italiana, 65(1) : 81-89.
- Tesi R. (1994).** The principles of horticulture and vegetables in Italy. Edagricole, Bologna.
- Thimann K.V., Skoog F. (1933).** Studies on the growth hormones of plants. The inhibition action of growth substance on bud development. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 19: 714-716.
- Thomas D.T. (2008).** The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnol. advances. 26(6) : 618-631.
- Tomes D.T., Ellis B.E., Harney P.M., Kasha K.J., Peterson R.L. (eds.) (1982).** Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture and Industry. Plant Cell Culture Centre, Univ. of Guelph, Ontario, Canada. 231 p.
- Toute Y. (1998).** Génie génétique et biotechnologie, concepts et méthodes : Applications à l'agronomie et aux bio-industries. Ed DUNOD 209p.
- Tran V.N., Cavanagh A.K. (1984).** Structural aspects of dormancy: In: D.R. Murray (ed.) Seed Physiology. V. II. Academic Press, Melbourne, pp. 1-44.
- Vallée C., Bilodeau G. (1999).** Les techniques de culture en multicellules. Les Presses de l'Université Laval, Sainte-Foy (Québec), 394 p.
- Vannella S., Damato G., Calabrese N. (2005).** Influence of temperature and substrate on the germination of artichoke achenes. Acta Hort., 681:361-368.
- Vasudevan R., Van Staden J. (2010).** Fruit harvesting time and corresponding morphological changes of seed integuments influence *in vitro* seed germination of *Dendrobium nobile* Lindl. Plant Growth Regul., 60:237–246.
- Vera D.T., Martin R.P., Oliva S.R. (2010).** Effect of chemical and physical treatments on seed germination of *Erica australis*. Annales Botanici Fennici, 47(5) : 353-360.

- Veríssimo P., Esteves C., Faro C., Pires E. (1995).** The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. Biotechnology letters, 17(6) : 621-626.
- Vieira de Sá F., Barbosa M. (1972).** Cheese-making with a vegetable rennet from Cardo (*Cynara cardunculus*). Journal of Dairy Research, 39: 335-343.
- Vilchez M., Paulus A.O., Mayberry K.S. (2005).** Globe artichoke seed treatment to control seedborne fungi and seed quality evaluation. Acta Hort., 681:581-586.
- Wang M., Simon J.E., Aviles I.F., He K., Zheng Q.Y., Tadmor Y. (2003).** Analysis of Antioxidative Phenolic Compounds in Artichoke (*Cynara scolymus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(3) : 601-608.
- Wang Q., Cuellar W.J., Rajamäki M.L., Hirata Y., Valkonen J.P.T. (2008).** Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips, Molecular, Plant Pathology, 9(2) : 237-250.
- Werbrouck S.P.O., Debergh P. (1996).** Imidazole fungicides and paclobutrazol enhance cytokinin-induced adventitious shoot proliferation in Araceae. Journal of plant growth regulation, 15(2) : 81-85.
- Wiklund A. (1992).** The genus *Cynara* L. (Asteraceae-Cardueae). Bot J Linn Soc, 109:75–123.
- Withers L.A., Engelmann F. (1998).** *In vitro* conservation of plant genetic resources. In : Altman A, ed. Biotechnology in agriculture. New York : Marcel Dekker Inc. 57-88.
- Xu X.B., Cai Z.G., Gu Q.Q., Zhang Q.M. (2006).** Cell Ultrastructure of Kiwifruit (*Actinidia Chinensis*) shoot tips during cryopreservation, Agricultural Sciences in China, 5(8) : 587-590.
- Yoon J.W., Kim H.H., Ko H.C., Hwang H.S., Hong E.S., Cho E.G., Engelmann F. (2006).** Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: effect of subculture of mother-plants and of preculture of shoot tips, Cryoletters, 27(4) : 221-222.
- Ziv M., Kahany S., Lilien-Kipnis H. (1994).** Scaled-up proliferation and regeneration of Nerine in liquid cultures Part I. The induction and maintenance of proliferating meristematic clusters by paclobutrazol in bioreactors. Plant cell, tissue and organ culture, 39(2) : 109-115.
- Zryd J.P. (1988).** Culture de cellules, tissus et organes végétaux Ed. Press. Polytechniques Romandes. Suisse. 308p.
- Zurinsky C., Kane M.E., Philman N. (1994).** Effects of vessel type and subculture duration on *in vitro* multiplication of *pontederia cordata* L. HortScience, 29(5) : 433-434.

---

---

## **Annexe**

---

## Annexes

---

### **Annexe 1 : Préparation de la solution de Javel 1 %**

On veut préparer une solution de javel à 1 % (10 g/l) à partir de l'eau de javel commercial. Javel commercial est à 12°.

$$1^\circ \longrightarrow 3,17 \text{ g/l de chlore actif}$$

$$12^\circ \longrightarrow 38,04 \text{ g/l.}$$

Pour préparer une solution de 10 g/l on utilise l'équation de dilution :

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$\text{Donc } V_i = C_f V_f / C_i$$

Pour préparer 100 ml de cette solution, on va prélever :

$$V_i = 10 * 100 / 38,04$$

$$= 26,288 \text{ ml}$$

Donc on prend 26,29 ml de l'eau de javel commerciale, puis on complète à 100 ml par l'eau distillée et l'on ajoute trois gouttes de Tween 20.

### **Annexe 2 : Composition du milieu de Murashig et Skoog (1962) et Gamborg *et al.* (1968).**

	Murashig et Skoog (1962)	Gamborg <i>et al.</i> (1968)
<b>Macroéléments (mg/l)</b>		
Nitrate de potassium ( $\text{KNO}_3$ )	1900	2500
Nitrate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	1650	-
Chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	440	150
Sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	370	250
Phosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	170	-
dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	-	150
Sulfate d'ammonium ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	-	134
<b>Microéléments (mg/l)</b>		
Sulfate de manganèse ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	22,3	10
Sulfate de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	8,60	2
Acide borique ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	6,20	3
Iodure de potassium (KI)	0,83	0,75
Sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0,025	0,025
Molybdate de sodium ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,25	0,25
Chlorure de cobalt ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0,025	0,025
(FeNaEDTA)	36,70	36,7
<b>Vitamines (mg/l)</b>		
Acide nicotinique	0,5	1
Pyridoxine HCl	0,5	1
Thiamine HCl	0,1	10
Glycine	2,00	-
Myo-Inositol	100	100

**Annexe 3 : Composition de base pour la préparation de 1 litre de milieux de culture (Initiation, multiplication, élongation et enracinement)** (Tavazza : Laboratoire de biotechnologie, ENEA, Italie).

**MACROELEMENT**

Produit	Quantité en mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400
KNO <sub>3</sub>	800
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
CaCl <sub>2</sub>	150

Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O                          1000

**MICROELEMENT**

Produit	Quantité en mg/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	20
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,25
NaMoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025

KI    0,83 mg/l

FeEDTA    36,7 mg/l

**Vitamines**                                        mg/l

Myo-inositol	200
Thiamine	1
Pyridoxine HCl	0,5
Acide nicotinique	0,5
Glycine	2

Saccharose    30 g/l

Plant Agar    7 mg/l (nous avons remplacé ce produit par 0,3 % du phytagel)

**HORMONES**

Hormones (mg/l)	Initiation	multiplication	élongation	Enracinement
Kinétine	-	2	0,5	-
AIB	0,2	0,1	0,1	-
2iP	-	-	0,01	-
BAP	0,8	-	-	-
ANA	-	-	-	2

pH 5,8

Autoclaver à 121°C pendant 20 min.

**Annexe 4 : Composition du milieu de multiplication d'El Boullani et al. (2012).**

composants	Concentrations
Sels de Murashig et Skoog (Produit Segma)	4,3 g/l
Vitamines de Gamborg (Solution Segma)	1 ml
Adénine sulfate	40 mg/l
Phosphate monosodique	50 mg/l
Saccharose	20 g/l
Phytigel	0,3%
Kinétine	1 mg/l
AIB	0,1 mg/l

**Annexe 5 :**

**Article 1 :** Improved *in vitro* Micropropagation of Artichoke (*Cynara Cardunculus* var. *scolymus* L.). European Journal of Scientific Research, (2012). 80(4) : 430-436.

**Article 2 :** Effect of decapitation and size of explants on *in vitro* multiplication rate of globe artichoke. Acta Hort. (ISHS), (2013). 983:325-329.

## **Improved *in Vitro* Micropropagation of Artichoke (*Cynara Cardunculus var. scolymus L.*)**

**Rachida El Boullani**

*University of Ibn Zohr, Faculty of Sciences*

*Laboratory of Biotechnologies and Natural Resources Valorization  
B.P. 8106, Agadir, Morocco*

**Abdelkhalek Elmoslih**

*University of Ibn Zohr, Faculty of Sciences*

*Laboratory of Biotechnologies and Natural Resources Valorization  
B.P. 8106, Agadir, Morocco*

**Aissam El Finti**

*University of Ibn Zohr, Faculty of Sciences*

*Laboratory of Biotechnologies and Natural Resources Valorization  
B.P. 8106, Agadir, Morocco*

**Abdelhamid El Mousadik**

*University of Ibn Zohr, Faculty of Sciences*

*Laboratory of Biotechnologies and Natural Resources Valorization  
B.P. 8106, Agadir, Morocco*

**Mohammed Amine Serghini**

*University of Ibn Zohr, Faculty of Sciences*

*Laboratory of Biotechnologies and Natural Resources Valorization  
B.P. 8106, Agadir, Morocco  
E-mail: maserghini@live.fr*

*Tel: +212 6 61 38 60 90; Fax: +212 5 28 22 01 00*

### **Abstract**

An efficient protocol for *in vitro* multiplication of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) accession Art 21 was developed using axillary buds obtained from seedlings derived from embryos. A high regeneration efficiency (7.56 shoots/explants) was achieved with axillary buds on a proliferation medium containing 1 mg/l kinetin and 0.1 mg/l NAA after removal of apical buds, leaves and roots from seedlings. Decreasing light intensity from 40 to 20  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  and reducing explant density from 6-7 to 3-4 shoots per 132 cm<sup>2</sup> of culture medium increased the rate of multiplication by two-fold. Statistically significant differences were observed for proliferation among four shoot size categories (< 1 cm, 1 to 1.5 cm, 1.5 to 2 cm and > 2 cm) with the highest rate obtained with those of 1-1.5 and 1.5-2 cm in size. To our knowledge, this is the first report on the micropropagation of a Moroccan globe artichoke accession.

**Keywords:** Artichoke, *Cynara cardunculus* var. *scolymus* L., Plant regeneration, Axillary shoot induction, Multiplication

## 1. Introduction

Globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) is a perennial vegetable crop native to the Mediterranean basin. This species has a complex sexual reproduction. Vegetative propagation using suckers from axillary buds is commonly used for multiplication. However, the low rate of multiplication and the potential for disseminating diseases are two major factors that hinder the expansion and development of globe artichoke through vegetative propagation. These problems can be partially circumvented by *in vitro* culture. Progress has been made on the development of *in vitro* culture protocols of globe artichoke. De Leo and Greco (1976) were the first to achieve *in vitro* propagation using material derived from seeds. Harbaoui et al. (1982) developed a method of micropropagation and sanitation using meristem culture. Other authors obtained satisfactory *in vitro* multiplication rates but rooting of neo-formed shoots remained problematic (Moncousin 1981; Ancora et al., 1981; Pecaut et al., 1983; Moncousin and Dureux 1984; Draoui et al., 1993). Taking advantage of new culture media (Tavazza et al., 2004; Elia et al., 2007), growth regulators (Tavazza et al., 2004; Schneider, 2005) and mycorrhizal inocula (Ruta et al., 2005), *in vitro* micropropagation was improved for globe artichoke, facilitating the large-scale production of numerous cultivars and their clones. However, rooting of micropropagated shoots remains difficult. A pre-rooting condition (Moncousin, 1981; Brutti et al., 2000; Brutti et al., 2002; Apostolo et al., 2005) and the use of auxins at different concentrations improved rooting although the rate never exceeded 80%. Using select shoots and  $\beta$ -cyclodextrin, Dridi (2003) achieved 100% rooting at the 12th and 13th subcultures. Despite these advancements, no information is available on the clonal propagation of globe artichoke cultivars grown in Morocco and, to our knowledge, all attempts to establish cultures using meristematic apices have been unsuccessful.

In the present work, we report a reliable protocol for *in vitro* multiplication of a Moroccan accession of globe artichoke starting from seed-derived plants.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Material and Culture Conditions

Seeds of *Cynara cardunculus* var. *scolymus* L. accession Art 21 were obtained from a local nursery (International Nursery, Tin Mansour, Agadir).

Seeds were soaked in sterile distilled water for 24 hours, surface-sterilized for 5 min in 0.5% (w/v)  $HgCl_2$  and then for 15 min in 1% (v/v)  $NaOCl$  containing a few drops of Tween 20, and finally rinsed three times in sterile distilled water. The tegument of seeds was aseptically removed under a stereo-microscope and isolated embryos were individually placed in test tubes containing 20 ml of Murashige and Skoog (MS) medium (Murashige & Skoog, 1962), supplemented with 30 g/l sucrose and 0.3% phytigel (germination medium). The pH of the medium was adjusted to 5.6 prior to the addition of phytigel and autoclaved at 121°C for 20 min. Cultures were incubated at 25±1°C with a photoperiod of 16h light. For proliferation of G0 to G3 subcultures, a light intensity of 40  $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$  was used while 20  $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$  was utilized for G4 and subsequent subcultures. One month after germination, seedlings were used for micropropagation experiments.

### 2.2. Axillary Shoot Induction and Proliferation

Seedlings were transferred on a medium containing MS micro and macro elements supplemented with Gamborg's (B5) vitamins (Gamborg et al., 1968), 20 g/l sucrose, 1 mg/l indole-3-butyric acid (IBA), 0.1 mg/l gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) and 0.3% phytigel (establishment medium). The pH of the media was adjusted to 5.7 prior to autoclaving at 121°C for 20 min. All growth regulators were added to the autoclaved media. Proliferation was achieved with axillary buds obtained after six weeks of culture by

removing apical buds, leaves and roots from plantlets. Explants were transferred on medium with MS micro and macro elements supplemented with B5 vitamins (Gamborg et al., 1968), 20 g/l sucrose, 40 mg/l adenine sulfate, 50 mg/l monosodium phosphate, 1 mg/l kinetin, 0.1 mg/l NAA and 0.3% phytagel (proliferation medium). Axillary shoots that developed at the axils of leaves of plantlets from which the apical buds, leaves and roots were removed were separated and further used to induce multiple shoot buds by sub-culture on a fresh proliferation medium. The tuft of shoots obtained from adventitious buds during the proliferation stage were separated and transferred onto medium for further proliferation.

### 2.3. Effect of Explant Density and Size on Multiplication

The effect of two explant densities (3 to 4 versus 6 to 7 shoots per 132 cm<sup>2</sup> area of culture media) on the multiplication rate was tested using shoots growing on proliferation medium. Similarly, the effect of explant size on axillary bud formation was assessed with four size categories: < 1 cm, 1 to 1.5 cm, 1.5 to 2 cm and > 2 cm. For each size category, ten shoots and three replicates each were transferred on the proliferation medium. The number of shoots developed was recorded after 4 weeks.

### 2.4. Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed to test the significance of the difference of mean number of shoot per explant between generations. When significant differences were found ( $P=0.05$ ), a multiple comparison test of means (Duncan's test) was calculated.

## 3. Results

### 3.1. Axillary Shoot Induction and Proliferation

Seeds of the Moroccan globe artichoke accession Art 21 produced normal plants one week after germination. After 6 weeks of culture on the establishment medium, plantlets reaching 8 to 9 cm in length with 10 to 13 leaves were prepared by removing apical buds, leaves and roots for shoot induction. Following transfer on proliferation medium containing 1 mg/l kinetin and 0.1 mg/l NAA, the axillary buds emerged from the axils of leaves and developed into axillary shoots within 5 weeks. An average of 17 axillary shoots was obtained per explant of the first generation (G0) (Figure 1), whereas explants for which apical buds, leaves and roots were not removed failed to produce multiple shoots.

**Figure 1:** Induction of axillary shoots of globe artichoke on the proliferation medium containing 1 mg/l kinetin and 0.1 mg/l NAA, 6 weeks after sub-culture (bar = 1.5 cm)



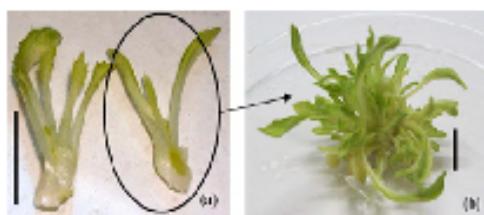
Subsequent subcultures (G1 to G11) were carried out without removal of apical buds and leaves (figure 2). As a result, the number of shoots was drastically lower (Table 1).

Improved in Vitro Micropropagation of Artichoke (*Cynara Cardunculus* var. *scolymus* L.) 433**Table 1:** Mean number of globe artichoke shoots per explant on proliferation medium over 12 consecutive generations.

Number of generation	Explants (no.)	Mean number of shoots per explant
G0	30	17 <sup>a</sup>
G1	30	6.57 <sup>b</sup>
G2	30	2.88 <sup>c</sup>
G3	30	2.33 <sup>c</sup>
G4	30	5 <sup>b</sup>
G5	30	7.33 <sup>b</sup>
G6	30	6.33 <sup>b</sup>
G7	30	7.5 <sup>b</sup>
G8	30	9.5 <sup>c</sup>
G9	30	7.66 <sup>b</sup>
G10	30	9.33 <sup>c</sup>
G11	30	9.33 <sup>c</sup>

Means followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's test ( $P=0.05$ ).

The mean multiplication rate was 7.56 buds per explant for 12 generations (G0 to G11) (Table 1). Reducing the light intensity from 40 to 20  $\mu\text{E.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  increased the multiplication rate from 2.8 to more than 6.5 shoots over three generations. High light intensity substantially increased the number of necrotic leaves and decreased the number of newly formed shoots (data not shown). Also, reducing the explant density from 6-7 to 3-4 explants per  $132\text{ cm}^2$  of growth area increased the multiplication rate from 3 to 6.3 shoots. Our proliferation medium containing monosodium phosphate and adenine sulfate improved the multiplication rate and shoot quality compared to the same medium without these two compounds, as described by Lauzer and Vieth (1990).

**Figure 2:** (a) Shoots of the G0 generation of globe artichoke accession Art 21 on proliferation medium. (b) Tuft of G1 generation after 4 weeks culture of the encircled shoot (a) used as explant for multiplication; bar = 1 cm.

### 3.2. Effect of Size

Using four shoot size categories for subcultures, 7.73 and 7.30 shoots per explants were obtained for the 1-1.5 cm and 1.5-2 cm size categories, respectively (Table 2). In contrast, only 2.76 shoots were obtained for the > 2 cm size category, likely as a result of apical dominance, which inhibits the formation of adventitious buds. Only 1.06 shoot was obtained for the < 1 cm size category, of which 26.6 % became necrotic after two weeks of culture (Table 2).

**Table 2:** Size effect of globe artichoke explants on shoot induction on proliferation medium

Size of explants (cm)	Explants (no.)	Number of shoots per explant $\pm$ SD
< 1	30	1.06 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>
1-1.5	30	7.73 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup>
1.5-2	30	7.30 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>
> 2	30	2.76 $\pm$ 1.01 <sup>b</sup>

Values are means  $\pm$  SD of three experiments with each experiment consisting of 30 explants. Means followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's test ( $P=0.05$ ).

#### 4. Discussion

Vegetative propagation using suckers, offshoots and ovoli is a common practice for *C. cardunculus var. scolymus* L. but the multiplication rate is low (4-7 offshoots per plant/year) due to the heterogeneity of the plants and the dissemination of pathogens is facilitated (Foury, 1976). *In vitro* micropropagation is more adapted for a rapid multiplication of healthy plants. Several explants are used to initiate *in vitro* cultures but shoot tips are the most widely used to produce virus-free globe artichoke plants. However, difficulties in explant disinfection have prompted some researchers to use seeds for culture initiation. In our work, multiplication experiments were performed with seedlings derived from embryo germination on MS medium. Removal of apical buds, leaves and roots from seedlings was very effective to produce multiple shoots, as shown by the production of 17 buds per G0 plant. Thus, the apical dominance of the terminal bud was broken and axillary leaf buds developed into new shoots, likely because auxin production in the shoot apex inhibited the outgrowth of axillary buds (Thimann and Skoog, 1933). The importance of explant preparation for the production of axillary shoot explants was also reported for pepper (Sanatombi and Sharma, 2007).

Our proliferation medium contained NAA and kinetin as growth regulators. The importance of kinetin to induce bud formation was reported for globe artichoke by many researchers (Ancora et al., 1981; Bigot and Foury, 1984; Lauzer and Vieth, 1990; Pécaut and Martin, 1993; Morzadec and Hourmant, 1997; Brutti et al., 2000; Tavazza et al., 2004; Apostolo et al., 2005; Schneider, 2005; Bekheet, 2007).

Our results on the addition of monosodium phosphate and adenine sulfate during the proliferation phase are consistent with those of Lauzer and Vieth (1990), who demonstrated the positive effect of these two compounds on budding. These authors obtained 3.6 shoots per explant using 100 mg/l of inositol and 0.4 mg/l of thiamine as vitamins in the proliferation medium.

The decrease of light intensity to  $20 \mu\text{E.m}^{-2} \text{s}^{-1}$  has increased the multiplication rate by reducing the browning of shoots. This rate was also improved by reducing the density of explants per unit area (3 to 4 explants/ $132 \text{ cm}^2$ ). This low density is in favor of better nutrition of explants and a decrease of exudates concentration from shoots.

The multiplication rates obtained in this work are similar or superior to those previously reported by Debergh et al. (1981), 1.2 to 3.43; Ancora et al. (1981), 1.65 to 4.5; Dridi (2003), 1.9 to 4.5; Elia et al. (2007), 1.3 to 4.5; Brutti et al. (2000), 1 to 5; Lauzer et al. (1990), 1.4 to 6.4; Schneider (2005), 1 to 7, and appeared to be maintained during subcultures. The highest multiplication rate of globe artichoke accession Art 21 was obtained with explants of 1-1.5 cm in size.

#### 5. Conclusion

To date, protocols commonly used for the *in vitro* multiplication of globe artichoke are not satisfactory for Moroccan cultivars. In this work, we report a micropropagation protocol for Moroccan globe artichoke accession Art 21. Our results clearly indicate that removal of apical buds, leaves and roots of seedlings, in the first step of *in vitro* culture, increases the development of axillary buds. In addition, explants of 1-1.5 cm in size were optimal to produce 7.56 shoots per explant during subcultures. The method reported in this study can be used for a rapid and large-scale propagation of globe artichoke accession Art 21. Further work is needed to improve rooting and establishment of plantlets in the greenhouse.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank the financial support from International Nursery, Dr. R. Tavazza for valuable discussion and Dr. M. Fuchs for critical reading of the manuscript.

## References

- [1] Ancora G, Belli-Donini ML, & Cuozzo L (1981) Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid *in vitro* micropagation. *Scientia Hortic.*, 14: 207-213.
- [2] Apostolo NM, Brutti C, & Llorente B (2005) Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. In successive micropagation stages. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41: 307-313.
- [3] Bekheet SA (2007) *In vitro* Preservation of globe artichoke germplasm. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 17: 1-9.
- [4] Bigot C, & Foury C (1984) Multiplication *in vitro* d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) à partir de semences; comparaison au champ de quelques clones à la lignée dont ils sont issus. *Agronomie*, 4: 699-710.
- [5] Brutti CB, Rubio EJ, Llorente BE, Apóstolo NM (2002) Artichoke leaf morphology and surface features in different micropagation stages. *Biologia Plantarum*, 45: 197-204
- [6] Brutti C, Apostolo NM, Ferrarotti SA, Llorente BE, & Krymkiewicz N (2000) Micropagation of *Cynara scolymus* L. employing cyclodextrins to promote rhizogenesis. *Scientia Horticulturae*, 83: 1-10.
- [7] De Leo P, & Greco B (1976) Nuova tecnica di propagazione del carciofo: coltura *in vitro* dei meristemi apicali. In: Atti 2nd Congr. Int. Sul Carciofo, Bari. Ed. Minerva Medica Torino, pp 657-667.
- [8] Draoui N, Ghorbel A, & Kchouk ME (1993) *In vitro* culture of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) in Tunisia: utilization of vitromethods in artichoke improvement. *Agricoltura Mediterranea*. 123: 139-145.
- [9] Dridi B (2003) Un système intégré de micropagation de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Thèse de doctorat, université de Gent, Belgique. 175p.
- [10] Elia A, Conversa G, Montervino C, & Lotti C (2007) Micropagation of the early artichoke cultivar 'violet du provence'. VI International Symposium on Artichoke, Cardoon and Their Wild Relatives. *Acta Horticulturae*, 1: 127-134.
- [11] Fortunato I M (1981). Cyto-histological aspects of *in vitro* vegetative propagation of globe artichoke. *Annali della Facolta di Agraria, Universita di Bari*. 1981-1982, 32: 367-376.
- [12] Foury C (1976) L'Artichaut. *Bul. Tech. Informa.* 311: 415-432. Gamborg OL, Miller R, & Ojima K (1968) Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 50: 151-158.
- [13] Harbaoui Y, Smayi G, Welvaert W, & Debergh PC (1982) Assainissement viral de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) par la culture *in vitro* d'apex méristématiques. *Phytopathologie Méditerranée* 21: 15-19.
- [14] Lauzer D, & Vieth J (1990). Micropagation of seed-derived plants of *Cynara scolymus* L., cv 'Green Globe'. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 21: 237-244.
- [15] Moncousin C, & Ducreux G (1984) Activité peroxydase et rhizogenèse dans le cas de *Cynara scolymus* L.: évolution au cours de repiquages successifs de boutures cultivées *in vitro*. Comparaison avec de jeunes plantes issues de graines. *Agronomie*, 1984, 4: 105-111.
- [16] Moncousin C (1981) Multiplication végétative accélérée de *Cynara scolymus* L., *Rev. Hort. Suisse*, 54: 105-111.
- [17] Morzadec JM, & Hourmant A (1997) *In vitro* rooting improvement of globe artichoke (cv. Camus de Bretagne) by GA3. *Sci. Hortic. Amsterdam*, 72: 59-62.
- [18] Murashige T, & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- [19] Pécaut P, & Martin F (1993) Variation occurring after natural and *in vitro* multiplication of early Mediterranean cultivars of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Agronomie* 13: 909-919.
- [20] Pécaut P, Dumas de Vaulx R, & Lof H (1983) Virus-free clones of globe artichoke (*Cynara scolymus*, L.) obtained after *in vitro* propagation. 21° Congrès Int. Hort. Hambourg, 29 août-4 septembre 1982. *Acta Horticulturae*, 131: 303-309.

436

Rachida El Boullani, Abdelkhalek Elmoslih

Aissam El Finti, Abdelhamid El Mousadik and Mohammed Amine Serghini

- [21] Ramirez-Malagon R, & Ochoa-Alejo N (1996) An improved and reliable chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. *Plant Cell Rep.* 16: 226-231.
- [22] Ruta C, Tagarelli A, & Morone Fortunato I (2005) Mycorrhization on micropropagated artichoke. *Acta Horticultriae* 681: 407-412.
- [23] Sanatombi K, and Sharma GJ (2007) Micropropagation of *Capsicum frutescens* L. using axillary shoot explants, *Scientia Hort.*, 113: 96-99.
- [24] Schneider F (2005) Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa* sp. L.) and globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). Thèse de doctorat, Université Technique de Munich. 145p.
- [25] Tavazza R, Papacchioli V, & Ancora G (2004) An improved medium for *in vitro* propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) cv. *Acta Horticultriae* 660: 91-97.
- [26] Thimann KV, Skoog F (1933) Studies on the growth hormones of plants. The inhibition action of growth substance on bud development. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 19: 714-716.

## Effect of Decapitation and Size of Explants on In Vitro Multiplication Rate of Globe Artichoke

R. El Boullani, A. Elmoslih, A. El Finti, A. El Mousadik and M.A. Serghini  
 University of Ibn Zohr  
 Sciences Faculty  
 B.P 8106, Agadir  
 Morocco

**Keywords:** *Cynara cardunculus* var. *scolymus* L., micropropagation, axillary shoot induction, decapitation, multiplication rate

### Abstract

Growing demand for plants of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) made it necessary to find a rapid method of multiplication for this plant. In vitro micropropagation is an alternative procedure for obtaining healthy, high quality and uniform clones, important to increase the cultivation area of this species. The contamination problem and low in vitro multiplication rate still remain the limiting factors. The objective of this study is to obtain healthy plants of globe artichoke via in vitro culture with a high multiplication rate.

In this work, we report an efficient protocol for in vitro multiplication of globe artichoke using 'decapitated' plantlets (removal of apical buds, leaves and roots) and axillary shoots as explants for multiple bud induction. The size of shoots that may control shoot induction was studied.

To establish the in vitro culture, plants derived from disinfected seeds were cultivated on MS medium containing 1 mg/L IBA and 0.1 mg/L GA<sub>3</sub>, followed by their decapitation and subculture on proliferation medium containing 1 mg/L kinetin and 0.1 mg/L NAA. In order to study the influence of explant size on shoot proliferation, four shoots size categories (<1 cm, 1 to 1.5 cm, 1.5 to 2 cm and >2 cm) were evaluated.

The results show that decapitation of seedlings influenced the efficiency of shoot induction. The greatest propagation ratio (shoot proliferation) was obtained with 'decapitated' explants (17 shoots per explant). The multiplication rate obtained in this work over twelve generations was 7.56. Statistically significant differences were observed for proliferation among the four shoot size categories and the highest rate obtained with those of 1-1.5 cm in size.

### INTRODUCTION

Globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) is propagated vegetatively usually by suckers from axillary buds. This propagation is facing two major problems that hinder the expansion and development of this culture: low ratio of propagation and dissemination of diseases. These problems can be partially solved by in vitro culture techniques. Some interesting work has contributed to progress in understanding the in vitro cultivation of globe artichoke. De Leo and Greco (1976) were the first to approach the problem of in vitro propagation of this plant using material derived from seeds. Harbaoui et al. (1982) developed a method of micropropagation and sanitation by meristem culture. Moncousin (1981), Ancora et al. (1981), Pécaut et al. (1983), Moncousin and Ducreux (1984) and Draoui et al. (1993), obtained satisfactory in vitro multiplication rates but the roots of neo-formed shoots has always been a handicap to the development of this technique. Taking advantage of new composition of culture medium (Tavazza et al., 2004; Elia et al., 2007), new hormones (Tavazza et al., 2004; Schneider, 2005) and mycorrhizal inocula (Ruta et al., 2005), in vitro micropropagation techniques have been developed allowing large-scale production of micropropagated clones of globe artichoke. Dridi (2003) and Schneider (2005) managed to improve the rate of multiplication; they have provided answers to the problems of recalcitrance to rooting and

acclimatization. However, there is no available information about a method for clonal propagation of globe artichoke cultivars cultivated in Morocco.

In the present work, we report an efficient protocol for in vitro multiplication of globe artichoke using plantlets without apical buds, leaves and roots and the best sizes of shoots used for the proliferation step of the in vitro culture of this plant.

The development of a new composition of culture medium, the effect of removal of apical buds, leaves and roots of artichoke plantlets and the best sizes of shoots used for the proliferation step are detailed.

## MATERIALS AND METHODS

Seeds of the *Cynara cardunculus* var. *scolymus* L. accession Art 21 were obtained from a local supplier (International Nursery, Tin Mansour, Agadir, Morocco). For disinfection, seeds were soaked in sterile distilled water for 24 hours, surface-sterilized for 5 min in 0.5% (w/v)  $HgCl_2$  and then for 15 min in 1% (v/v) NaOCl containing few drops of Tween 20, and finally three times rinsed in sterile distilled water. Tegument of seeds was removed and isolated embryos were placed singly in test tubes containing 20 ml of Murashige and Skoog (MS) medium (Murashige and Skoog, 1962), supplemented with 30 g/L sucrose and 0.3% phytigel. The pH of the medium was adjusted to 5.6, before the addition of phytigel, and autoclaved at 121°C for 20 min (germination medium). Cultures were incubated at 25±1°C with photoperiod of 16 h light under a light intensity of 40  $\mu E/m^2$ s. One month after germination, seedlings were used for subsequent experiments.

The seedlings were transferred on the establishment medium containing MS micro and macro elements supplemented with Gamborg's (B5) vitamins (Gamborg et al., 1968), 20 g/L sucrose, 1 mg/L indole-3-butyric acid (IBA), 0.1 mg/L gibberellic acid ( $GA_3$ ) and 0.3% phytigel. The pH of the media was adjusted to 5.7 prior autoclaving. After six weeks, plantlets were 'decapitated' and the explants obtained were transferred on proliferation medium with MS micro and macro elements supplemented with B5 vitamins (Gamborg et al., 1968), 20 g/L sucrose, 40 mg/L adenine sulfate, 50 mg/L of monosodium phosphate, 1 mg/L kinetin, 0.1 mg/L NAA and 0.3% phytigel. Axillary shoots developed, were separated and used for further multiple shoot bud induction by sub-culture on a fresh proliferation medium. The tuft of shoots obtained during the proliferation stage (from adventitious buds), were separated and transferred on the same fresh medium for further proliferation. Ten shoots and three repetitions were used. The number of shoots produced per plant was recorded after 4 weeks of culture, in each sub-culture.

To study the influence of explant size on axillary buds induction (formation), shoots growing on proliferation medium, were used in subsequent experiments. Four sizes categories (cat.) were evaluated (<1 cm, 1 to 1.5 cm, 1.5 to 2 cm and >2 cm). For each size, ten shoots and three replicates each were transferred on the proliferation medium. The number of shoots developed was evaluated after 4 weeks.

Analysis of variance (ANOVA) was performed to test the significance difference of mean number of shoot per explant between generations. When significant differences were found ( $P=0.05$ ), a multiple comparison test of means (Duncan's test) was calculated.

## RESULTS

### Axillary Shoot Induction and Proliferation

Moroccan globe artichoke accession Art 21 seeds produced normal plants one week after germination. After 6 weeks of culture on the establishment medium containing 1 mg/L IBA and 0.1 mg/L  $GA_3$ , plantlets reaching 8 to 9 cm in length with 10 to 13 leaves were 'decapitated' for shoot induction and transfer on proliferation medium containing 1 mg/L kinetin and 0.1 mg/L NAA, the axillary buds emerged from the axils of the leaves and developed into axillary shoots within 5 weeks. An average of 17 axillary shoots was obtained from each 'decapitated' explants ( $G_0$  generation), whereas the no

'decapitated' ones failed to produce multi shoots. The following subcultures ( $G_1$  to  $G_{11}$ ) were carried out without 'decapitation'. The  $G_2$ ,  $G_3$  and  $G_4$  subcultures were characterized by a drastic decrease in the number of shoots produced (Table 1). To solve this problem, some changes were made to plant growing conditions such as: a) the number of plants reduced to 4 plants per jar of 6 cm of diameter; b) the light intensity reduced from 40 to 20  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ .

Present results indicate that the proliferation medium used, containing NAA and kinetin as phytohormones showed a positive effect on budding. Addition of monosodium phosphate and adenine sulfate in the proliferation medium has improved multiplication rate and shoot quality comparing to the same medium without these last two compounds (data not shown). The average of this multiplication rate, calculated on the basis of twelve generations, was 7.56 shoots per explant.

#### **Effect of Size**

Using the four shoots size categories (<1 cm, 1 to 1.5 cm, 1.5 to 2 cm and >2 cm) as starting material for subculture (Fig. 1), the results showed that plant sizes between 1 and 2 cm give rise to 100% of recovery with a number of shoots per explants of 7.73 (1-1.5 cm) or 7.30 (1.5-2 cm) depending on the size categories (Table 2).

Instead, for the extreme categories, it was observed that size over 2 cm produced an average of 2.76 shoots explainable by apical dominance, which inhibits the formation of adventitious buds, while shoots smaller than 1 cm give rise to the lowest number of shoots per explant of which 26.6% became necrotic in the second week of culture (Table 2).

#### **DISCUSSION**

In our work, multiplication experiments were performed on the seedlings derived from the germination of embryos on MS medium. Decapitation – removal of apical buds, leaves and roots of these seedlings – was very effective; this is explained by the large number of buds obtained in  $G_0$  (17). Thus, the apical dominance of the terminal bud was broken and axillary leaf buds developed into new shoots, likely because auxin production in the shoot apex inhibited the outgrowth of axillary buds (Thimann and Skoog, 1933). The importance of explant preparation for the production of axillary shoot explants was also reported for pepper (Sanatombi and Sharma, 2007).

The proliferation medium containing NAA and kinetin used as plant growth regulators, showed its positive effect on formation of buds. The use of kinetin to induce bud formation during the proliferation phase has already been reported for globe artichoke by many researchers (Ancora et al., 1981; Lauzer and Vieth, 1990; Pécaut and Martin, 1993; Morzadec and Hourmant, 1997; Brutti et al., 2000; Tavazza et al., 2004; Apostolo et al., 2005; Schneider, 2005; Bekheet, 2007). Our results concerning the addition of monosodium phosphate and adenine sulfate during the proliferation phase are consistent with those of Lauzer and Vieth (1990).

The multiplication rates obtained in this work are similar or superior to those previously reported by Ancora et al. (1981), 1.65 to 4.5; Dridi (2003), 1.9 to 4.5; Elia et al. (2007), 1.3 to 4.5; Brutti et al. (2000), 1 to 5; Lauzer and Veith (1990), 1.4 to 6.4; Schneider (2005), 1 to 7, and appeared to be maintained during subcultures. The highest multiplication rate of globe artichoke accession Art 21 was obtained with explants of 1-1.5 and 1.5-2 cm in size. This last category is less interesting compared to the first one because it takes a longer time in culture.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank the financial support from University of Ibn Zohr and International Nursery.

#### **Literature Cited**

Ancora, G., Belli-Donini, M.L. and Cuozzo, L. 1981. Globe artichoke plants obtained

- from shoot apices through rapid in vitro micropropagation. *Scientia Hortic.* 14:207-213.
- Apostolo, N.M., Brutti, C. and Llorente, B. 2005. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. In successive micropropagation stages. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41:307-313.
- Bekheet, S.A. 2007. In vitro preservation of globe artichoke germplasm. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 17:1-9.
- Brutti, C., Apostolo, N.M., Ferrarotti, S.A., Llorente, B.E. and Krymkiewicz, N. 2000. Micropropagation of *Cynara scolymus* L. employing cyclodextrins to promote rhizogenesis. *Scientia Horticulturae* 83:1-10.
- De Leo, P. and Greco, B. 1976. Nuova tecnica di propagazione del carciofo: coltura in vitro dei meristemi apicali. In: Atti 2<sup>nd</sup> Congr. Int. Sul Carciofo, Bari. Ed. Minerva Medica Torino, p.657-667.
- Draoui, N., Ghorbel, A. and Kchouk, M.E. 1993. In vitro culture of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) in Tunisia: utilization of vitro methods in artichoke improvement. *Agricoltura Mediterranea* 123:139-145.
- Dridi, B. 2003. Un système intégré de micropropagation de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Thèse de doctorat, université de Gent, Belgium. 175p.
- Elia, A., Conversa, G., Montervino, C. and Lotti, C. 2007. Micropropagation of the early artichoke cultivar 'Violet du Provence'. *Acta Hort.* 730:127-134.
- Gamborg, O.L., Miller, R. and Ojima, K. 1968. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- Harbaoui, Y., Smaiyy, G., Welvaert, W. and Debergh, P.C. 1982. Assainissement viral de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) par la culture in vitro d'apex méristématiques. *Phytopathologie Méditerranée* 21:15-19.
- Lauzer, D. and Vieth, J. 1990. Micropropagation of seed-derived plants of *Cynara scolymus* L., cv 'Green Globe'. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 21:237-244.
- Moncousin, C. 1981. Multiplication végétative accélérée de *Cynara scolymus* L. *Rev. Hort. Suisse* 54:105-111.
- Moncousin, C. and Ducreux, G. 1984. Activité peroxydasique et rhizogenèse dans le cas de *Cynara scolymus* L.: évolution au cours de repiquages successifs de boutures cultivées in vitro. Comparaison avec de jeunes plantes issues de graines. *Agronomie* 4:105-111.
- Morzadec, J.M. and Hourmant, A. 1997. In vitro rooting improvement of globe artichoke (cv. Camus de Bretagne) by GA<sub>3</sub>. *Sci. Hortic. Amsterdam* 72:59-62.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Pécaut, P., Dumas de Vaulx, R. and Lof, H. 1983. Virus-free clones of globe artichoke (*Cynara scolymus*, L.) obtained after in vitro propagation. *Acta Hort.* 131:303-309.
- Pécaut, P. and Martin, F. 1993. Variation occurring after natural and in vitro multiplication of early Mediterranean cultivars of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Agronomie* 13:909-919.
- Ruta, C., Tagarelli, A. and Morone Fortunato, I. 2005. Mycorrhization on micropropagated artichoke. *Acta Hort.* 681:407-412.
- Sanatombi, K. and Sharma, G.J. 2007. Micropropagation of *Capsicum frutescens* L. using axillary shoot explants. *Scientia Hort.* 113:96-99.
- Schneider, F. 2005. Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa* sp. L.) and globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). Ph.D. Thesis, Technical university of Munich, Germany. 145p.
- Tavazza, R., Papacchioli, V. and Ancora, G. 2004. An improved medium for in vitro propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) cv. *Acta Hort.* 660:91-97.
- Thimann, K.V. and Skoog, F. 1933. Studies on the growth hormones of plants. The inhibition action of growth substance on bud development. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 19:714-716.

**Tables**

Table 1. Mean number of globe artichoke shoots per explant obtained for each generation on proliferation medium

Number of generation	Explants (no.)	Mean number of shoots per explant
G <sub>0</sub>	30	17 <sup>d</sup>
G <sub>1</sub>	30	6.57 <sup>b</sup>
G <sub>2</sub>	30	2.88 <sup>a</sup>
G <sub>3</sub>	30	2.33 <sup>a</sup>
G <sub>4</sub>	30	5 <sup>ab</sup>
G <sub>5</sub>	30	7.33 <sup>b</sup>
G <sub>6</sub>	30	6.33 <sup>b</sup>
G <sub>7</sub>	30	7.5 <sup>b</sup>
G <sub>8</sub>	30	9.5 <sup>c</sup>
G <sub>9</sub>	30	7.66 <sup>b</sup>
G <sub>10</sub>	30	9.33 <sup>c</sup>
G <sub>11</sub>	30	9.33 <sup>c</sup>

Means followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's test (P=0.05).

Table 2. Size effect of globe artichoke explants on the shoots induction on proliferation medium.

Size of explants (cm)	Explants (no.)	Number of shoots per explant ± SD
<1	30	1.06±0.83 <sup>a</sup>
1<S<1.5	30	7.73±1.28 <sup>c</sup>
1.5< S<2	30	7.30±1.05 <sup>c</sup>
>2	30	2.76±1.01 <sup>b</sup>

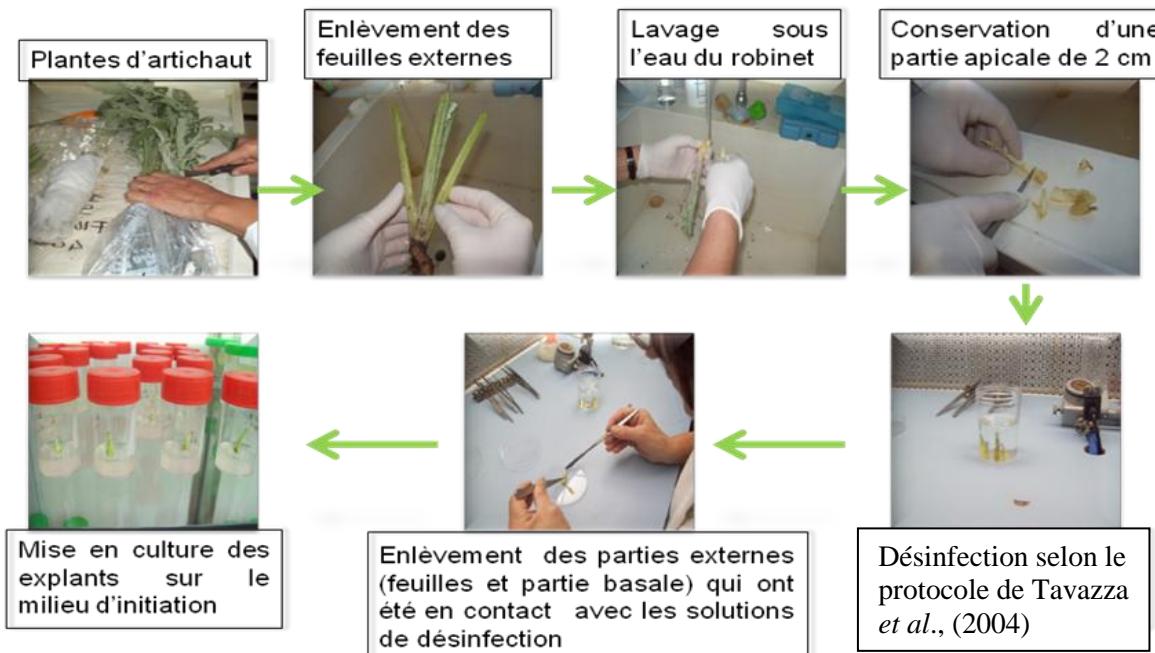
Values are means ± SD of three experiments with each experiment consisting of 30 explants.

Means followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's test (P=0.05)

**Figures**

Fig. 1. Globe artichoke shoots with different sizes used for in vitro propagation. The scale on the right and on the left indicate the size in cm (cat. 1: <1 cm; cat. 2: 1 to 1.5 cm; cat. 3: 1.5 to 2 cm; cat. 4: >2 cm).

## Annexe 6 : Protocole suivi pour la culture d'explants qui sont à l'origine des pousses utilisées en cryoconservation



### 1- Protocole de désinfection du matériel végétal (provenant du champ) (Référence : Tavazza et al. (2004))

1- Parties apicales de 1 à 2 cm (prélevées sur plantes issues du champ ayant une taille de 20 à 30 cm)

2- Lavage à l'eau de robinet

3- Enlèvement des feuilles externes

4- Immersion dans  $\text{HgCl}_2$  (5 g/l) pendant 3 min

5- Trois lavages à la solution antioxydante (l'acide ascorbique et l'acide citrique)

6- Traitement par une solution commerciale d'hypochlorite de sodium à 20 % NaOCl pendant 15 min (1,5 % Cl) (1 :5)

7- Premier lavage rapide

8- Rinçage trois fois à la solution antioxydante

Après la désinfection, les explants sont gardés dans la solution antioxydante jusqu'à l'utilisation.

### 2- Protocole de mise en culture de l'apex d'artichaut

1- Enlever les parties externes (feuilles et partie basale) qui ont été en contact avec les solutions de désinfection en utilisant une boîte de Pétri et des pinces stériles ;

2- Garder une zone apicale de 0,5 à 1 cm ;

3- Mise en culture de l'explant sur le milieu d'initiation (**voir annexe 3**) ;

4- Placer les bocaux en chambre de culture et les couvrir avec du papier aluminium pendant deux ou trois jours ;

5- Enlever le papier aluminium et laisser les explants deux ou trois semaines dans ce milieu ;

6- Trois semaines après, on change le milieu d'initiation par celui de multiplication (**voir annexe 3**).

→ **Les apex des pousses obtenues en phase de multiplication sont utilisés pour la cryoconservation**

**3- Préparation de la solution antioxydante (acide citrique 15 mg/l ; acide ascorbique 10 mg/l)**

Pour 50 ml :

Acide citrique : 7,5 mg	}	Autoclaver et conserver à l'abri de la lumière
Acide ascorbique : 5 mg		
H <sub>2</sub> O distillée : qsp 50 ml		

**Annexe 7 : Composition des solutions pour la vitrification**

**Solution de vitrification (Plant Vitrification Solution 2 : PVS2)**

Macroéléments de Murashige et Skoog	}	Poudre commerciale (Duchefa Biochimie) à raison de 4,4 g/l
Microéléments de Murashige et Skoog		
Vitamines de Murashige et Skoog		
Saccharose		136,8 g/l
Glycérol		237,6 ml/l
Éthylène glycol		135 ml/l
DMSO		136,6 ml/l
pH 5,8		
Stérilisation par filtration (0,2 µm)		

**Composition du milieu MS liquide à 1,2 % de saccharose**

Macroéléments de Murashige et Skoog	}	Poudre commerciale (Duchefa Biochimie) à raison de 4,4 g/l
Microéléments de Murashige et Skoog		
Vitamines de Murashige et Skoog		
Saccharose		12 g/l
pH 5,8		

**Annexe 8 : Composition des milieux de culture utilisés pour la régénération des apex après la cryoconservation.**

**Composition du milieu MS à 0,3M de saccharose**

Macroéléments de Murashige et Skoog  
Microéléments de Murashige et Skoog  
Vitamines de Murashige et Skoog } Poudre commerciale (Duchefa Biochimie) à raison de 4,4 g/l

Acide ascorbique 10 mg/l  
Saccharose 102,6 g/l  
Phyto Agar 7 g/l (Duchefa Biochimie)  
pH 5,8

**Composition du milieu MS à 0,03M de saccharose.**

Macroéléments de Murashige et Skoog  
Microéléments de Murashige et Skoog  
Vitamines de Murashige et Skoog } Poudre commerciale (Duchefa Biochimie) à raison de 4,4 g/l

Acide ascorbique 10 mg/l  
Saccharose 10 g/l  
Phyto Agar 7 g/l (Duchefa Biochimie)  
pH 5,8

**Composition du milieu MS modifié à 0,3M de saccharose**

Macroéléments, microéléments et vitamines de MS modifié décrits par Tavazza *et al.* (2004)  
**(voir annexe 3)**

Acide ascorbique 10 mg/l  
Saccharose 102,6 g/l  
Kinétine 2 mg/l  
AIB 0,1 mg/l  
Phyto Agar 7 g/l (Duchefa Biochimie)  
pH 5,8

**Composition du milieu MS modifié à 0,09M de saccharose**

Macroéléments, microéléments et vitamines de MS modifié décrits par Tavazza *et al.* (2004)  
**(voir annexe 3)**

Acide ascorbique 10 mg/l  
Saccharose 30 g/l

Kinétine 2 mg/l  
AIB 0,1 mg/l  
Phyto Agar 7 g/l (Duchefa Biochimie)  
pH 5,8