

ESSAIS DE MULTIPLICATION IN VITRO PAR ORGANOGENESE DIRECTE D'UNE PLANTE MEDICINALE *ARISTOLOCHIA LONGA L.*



*Saidi F., *H.S. Cherif, *H. Metidji, *A. Rouibia, **C. Chaouia
**M.S. Abdulhussain, *R. Mohamed Said, *M.S. Hamaidi

*Département de Biologie Faculté des Sciences Agronomiques Vétérinaire et Biologique

**Département d'Agronomie Université Saad Dahleb – Blida (Algérie)

Résumé: Le présent travail a porté sur l'étude de la multiplication d'une plante médicinale *Aristolochia longa L.* par la technique de la culture in vitro par voie directe. L'analyse des résultats aboutit à la détermination d'une méthodologie pour une meilleure désinfection des explants. L'utilisation de $HgCl_2$ à 0.6 g/l pendant 10min est plus efficace que l'hypochloride de calcium. Concernant la micropropagation, les résultats obtenus ont montré que les hormones de croissance jouent un rôle important dans les différentes étapes de la multiplication. Le milieu de base Murashige et Skoog complété avec 1.5 mg/l BAP et 0.5 mg/l ANA est le meilleur milieu. Il favorise le développement des bourgeons, alors que, l'élongation est plus favorable sur le milieu MS avec 1.5 mg/l GA_3 et dans MS avec 0.5 mg/l GA_3 et 1 mg/l ANA, l'enracinement est remarqué avec des pourcentages élevés. Dans l'étape de l'acclimatation, 100% des plantules obtenues ont pu survivre dans la tourbe pendant environ 2 mois.

Mots clés : désinfection, multiplication, plante médicinale, acclimatation, organogénèse directe

INTRODUCTION

Aristolochia longa L., plante médicinale herbacée localement connue sous le nom de Barrastam. Elle est fortement utilisée actuellement en médecine populaire Algérienne pour son effet anti-cancérigène. Elle appartient à la famille des Aristolochiaceae. Cette plante est localisée principalement au centre de l'Algérie.

Actuellement, *Aristolochia longa L.* est connue plus particulièrement pour son principe actif, l'acide aristolochique. Ce dernier a la capacité d'augmenter le pouvoir phagocytaire des globules blancs, d'où les propriétés cicatrisantes de cette plante. Elles peuvent être mises à profit au cours du traitement des fistules, ulcère, furonculoses, acnés rebelles et bien d'autres maladies.

Ce travail représente et pour la première fois en Algérie, la multiplication et la conservation de cette espèce. Nous présenterons une approche biotechnologique des différentes étapes de la micropropagation par voie directe.

- Détermination d'un protocole efficace de la stérilisation des différents explants utilisés.
- L'obtention d'un grand nombre de copies rigoureusement conformes par micropropagation directe à partir des explants de tiges.
- Essais d'acclimatation des plantules obtenues.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal: L'étude a porté sur les fragments de tiges d'*Aristolochia longa* L. Les échantillons sont récoltés au niveau de la station de Chréa (BLIDA). Cette récolte s'est effectuée sur deux périodes courant mai 2007 et fin juillet 2007. L'expérimentation de la culture in vitro a été réalisée dans le laboratoire de l'ENARP (Bab El-Ezzouar).

Méthodes

1. Stérilisation du matériel végétal: Deux tests ont été réalisés pour la stérilisation des échantillons. Nous avons fait varier les concentrations en l'hypochlorite de calcium et ceux du chlorure mercurique. Toutes les étapes de désinfection ont lieu sous la hotte à flux laminaire. L'ensemble des expériences est résumé dans le tableau I :

Tableau I

Protocole de stérilisation		
Désinfectant	Concentration	Temps de trempage
Rinçage à l'eau courante		
Bénomyl	1 g/l	30 min
Ethanol	70%	30 secondes
Test 1	Hypochlorite de calcium Ca (OCl ₂)	3 mg/l
		5 mg/l
		8 mg/l
		11 mg/l
Test 2	Chlorure mercurique HgCl ₂	0.2 mg/l
		0.35 mg/l
		0.5 mg/l
		0.8 mg/l
Rinçage 5 fois à l'eau distillée stérile		

L'eau distillée qui sert à la préparation des solutions désinfectantes et de rinçage, la verrerie et les pinces sont stérilisées à l'autoclave à une température de 120 °C pendant une heure.

2. Milieu de culture: Tous les milieux utilisés dans cette étude sont stérilisés à autoclavage à 120 °C, sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes et, après ajustement du pH dont la valeur se situe entre 5.7 et 5.8 soit avec du NaOH ou avec du HCl, selon le milieu, acide ou basique.

Le milieu de culture de base utilisé est celui de Murashige et Skoog (1962) (MS), qui comporte :

- *Sels minéraux* : Les macro-éléments MS; Les micro-éléments MS; Le Fer –EDTA
- *Vitamines de Morel*
- *Antioxydant* : Acide ascorbique ((0.1g/L)
- *Source de carbone* : Mannitol (20g/l)
- *Gélification* : l'agar-agar 7g/l
- *Les régulateurs de croissance*:

Pour obtenir des plantules à partir de fragment de plants, nous avons utilisé la technique de micropropagation par voie directe. Les vitro- plants ont été obtenus directement à partir des explants sans passage par la forme de cal.

2.1. Phase de multiplication :

Les explants utilisés sont les bourgeons axillaires et l'apex de la tige. Leurs longueurs varient entre 0.5 et 1 cm. Les explants sont repiqués dans le milieu de culture de base MS additionné de différentes quantités d'hormones de croissance (tableau II).

Tableau II

Combinaisons hormonales d'organogenèse directe

M ₁	Sans hormones
Première combinaison : BAP + auxines	
M ₂	1 mg/l (BAP) + 0.5 mg/l (AIB)
M ₃	1 mg/l (BAP) + 0.5 mg/l (AIA)
M ₄	1 mg/l (BAP) + 0.5 mg/l (ANA)
M ₅	1 mg/l (BAP) + 0.5 mg/l (2.4-D)
M ₆	1.5 mg /l (BAP) + 0.5 mg/l (ANA)
Deuxième combinaison : Kinétine + auxines	
M ₈	1 mg/l (Kin) + 0.5 mg/l (AIA)
M ₉	1 mg/l (Kin) + 0.5 mg/l (AIB)
M ₁₀	1 mg/l (Kin) + 0.5 mg/l (ANA)
M ₁₁	1 mg/l (Kin) + 0.5 mg/l (2.4-D)

2.2. Phase d'élongation

Nous avons établi des balances hormonales Gibbérelline / Cytokinines (tableau III) dans le but de mettre en évidence leur influence sur l'allongement des pousses et des entre-nœuds de vitro- plants obtenus à partir d'organogenèse directe. Le milieu de base utilisé est proposé par Murashige et Skoog (1962)

Tableau III

Balances hormonales du milieu d'élongation.

	Gibbérelline (GA ₃)	Cytokinines
M ₁	Sans hormones	
M ₂	1 mg/l GA ₃	0.5 mg/l BAP
M ₃	1 mg/l GA ₃	1 mg/l BAP
M ₄	1.5 mg/l GA ₃	0.5 mg/l BAP
M ₅	1 mg/l GA ₃	----

2.3. Phase d'enracinement

La rhizogenèse, comme tout phénomène d'organogenèse, est déclenchée par des interactions entre les hormones de croissance. Le milieu de base MS sans hormone et additionné aux quatre combinaisons hormonales entre le GA₃ et l'effet des auxines a été testé (tableau IV).

Tableau IV

Balances hormonales du milieu d'enracinement

	Gibbérelline (GA ₃)	Cytokinines
M ₁	Sans hormones	
M ₂	0.5mg/l GA ₃	1mg/l 2.4 D
M ₃	0.5 mg/l GA ₃	1 mg/l AIA
M ₄	0.5 mg/l GA ₃	1 mg/l ANA
M ₅	0.5 mg/l GA ₃	1mg/l AIB

2.4. Acclimatation

Il s'agit de la dernière étape qui consiste à acclimater progressivement les micro-plantules enracinées aux conditions externes. Nous commençons en premier lieu, par l'élimination de la gélose de la base des plantules par un lavage à l'eau. Celle-ci contient un fongicide (bénomyl à 1g/l) car le milieu qui subsiste sur les racines. Ce pesticide évite le développement de micro-organismes.

Les pousses enracinées sont transférées vers des gobelets contenant soit de la tourbe préalablement stérilisée à 120 °C pendant 2 heures soit de la tourbe mélangée à de la perlite. Les parties aériennes des plantes sont abritées par un cache en plastique transparent de manière à les maintenir dans un environnement qui avoisine 100 % d'humidité relative. Les échantillons sont introduits dans des tubes à essais (20 x 2 cm) ou dans des boîtes de Pétri. Ils sont installés dans une chambre de culture avec une température de 27 °C. ± 2 °C et une photopériode de 16 heures lumière et 8 heures d'obscurité

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Stérilisation du matériel végétal

La stérilisation du matériel végétal avant la mise en culture est délicate. Les substances stérilisantes utilisées doivent avoir un double effet :

- Eviter l'infection due à la propagation des bactéries et des champignons.
- Eviter le traumatisme des tissus qui pourrait conduire à leur nécrose et à la mort. (Bouderrah, 1988).

Deux désinfectants ont été utilisés avec une variation des concentrations en hypochlorite de calcium et de chlorure mercurique. Les résultats obtenus, sont illustrés dans le graphe suivant (figure1) :

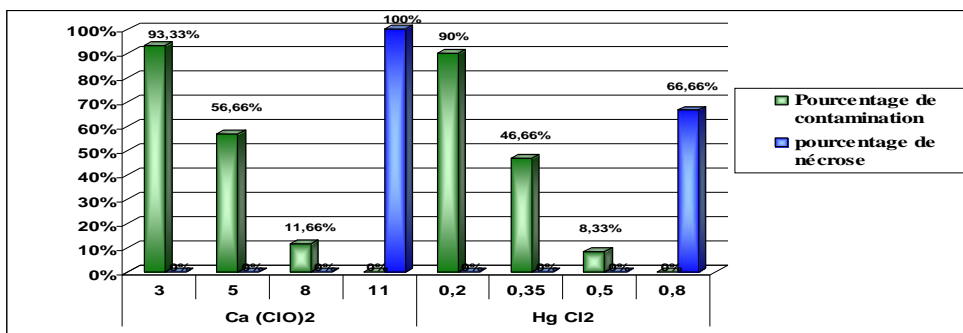


Figure 1. Effet de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ et HgCl_2 sur le taux de contaminations

Ainsi, les résultats montrent que le taux de contamination peut diminuer jusqu'à 8,33 %, par l'utilisation de HgCl_2 à 0,5 mg/l pendant 10 minutes. L'hypochlorite de calcium à 8 mg/l pendant 15 minutes peut abaisser le taux de contamination jusqu'à 11,66 %

Nous avons remarqués aussi, que le taux de contaminations diminuait au fur et à mesure du transfert des explants d'un milieu à l'autre.

Les autres tests se sont avérés inefficaces à cause de :

- Pourcentage élevé de contaminations (93,33% pour $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ à 3 mg/l contre 90% HgCl_2 à 0,2 mg/l).
- Au niveau des fragments apparition des noircissements ayant favorisé la formation des nécroses (l'hypochlorite de calcium à doses supérieures à 8 mg/l et chlorure mercurique à 0,8 mg/l)

Les travaux menés par Gautheret (1959), Auge (1989) et Bajaj (1989) sur la stérilisation du matériel végétal, ont montré que le chlorure mercurique est un produit stérilisant très efficace pour la destruction des micro-organismes. Néanmoins, il doit être utilisé à des doses très faibles, suivi par des rinçages successifs soigneusement faits, car son élimination est difficile. Il a la possibilité de pénétrer dans les tissus, favorisant la formation de nécroses. Ceci a été vérifié au cours de notre essai. Ainsi, nous avons observé une diminution des taux de contaminations et l'apparition de nécroses au fur et à mesure que nous augmentions la concentration.

Au contraire, l'hypochlorite de calcium est utilisé à des concentrations plus élevées et des durées plus longues car il ne pénètre pratiquement pas à l'intérieur des tissus.

Afin d'obtenir des plantules à partir des fragments d'*Aristolochia longa* L., nous avons tenté d'établir un protocole qui vise à obtenir des bourgeons sans le passage par les cals.

2. Phase de multiplication

Les fragments de tige de 1 cm de longueur, qui présentent au moins un noeud sont mis en culture après stérilisation. Le milieu de culture de base est celui de Murashige et Skoog (1962) additionné à des hormones de croissance. Les échantillons sont introduits dans la chambre de culture, la photopériode est la suivante, 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. Nous avons testé plusieurs

combinaisons hormonales pour favoriser le développement des méristèmes préexistants.

2.1. Effet de BAP avec les auxines: Nous avons utilisé des milieux contenant la cytokinine (BAP) et les auxines (AIA, AIB, ANA, 2,4-D) à différentes concentrations. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 2 :

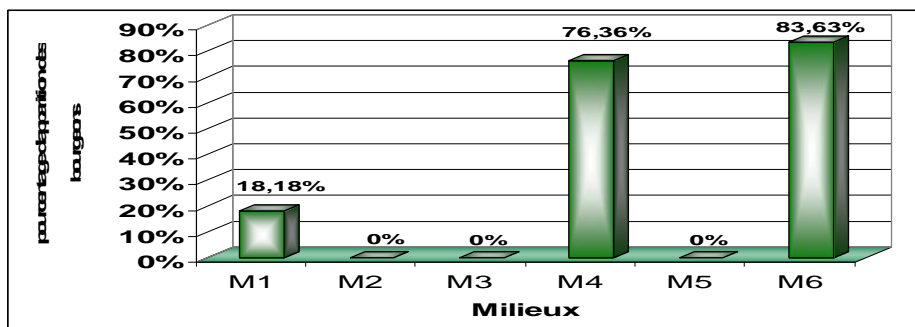


Figure 2. Effet de combinaisons hormonales entre BAP et les auxines sur le développement des bourgeons

Ces résultats sont obtenus après 6 mois de culture. Ils montrent qu'une seule combinaison hormonale est favorable au développement des bourgeons, BAP / ANA. Le reste des combinaisons semble inefficace au développement des bourgeons.

Le milieu sans hormone (témoin) est aussi favorable au développement des bourgeons mais avec un taux très faible de 18 %.

Nous avons remarqué aussi qu'après 10 jours, les explants qui ont été mis en culture dans le milieu M₆, commencent à pousser (figure 16). Ceux du milieu M₄ n'ont donné des résultats qu'après 20 jours. Cette variation remarquable du temps de développement des bourgeons peut être due à l'augmentation de la concentration de BAP à 1.5 mg/l qui a un effet favorable sur le débourrement.

2.2 Effet de Kinétine avec les auxines

Quatre milieux ont été utilisés avec des combinaisons hormonales comportant la Kinétine et quatre types d'auxines. La figure 3 montre les résultats obtenus :

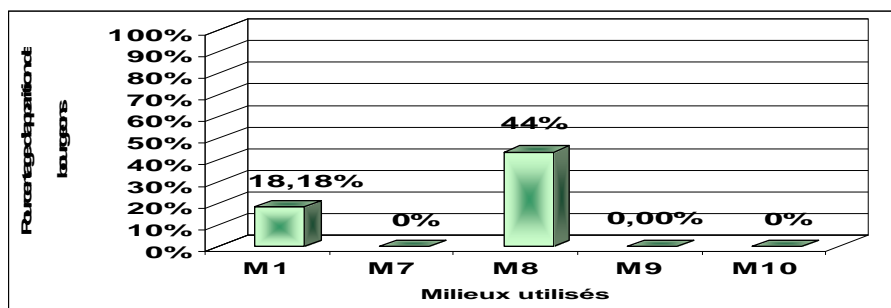


Figure 3: Effet de combinaisons hormonales entre BAP et les auxines sur le développement des bourgeons

Ainsi, les observations qui ont été recueillies sur une période de 6 mois ont montré que parmi les quatre combinaisons hormonales utilisées seule la Kinétine à 1 mg/l et AIA à 0.5 mg/l ont pu déclencher le débourrement des bourgeons, mais avec un pourcentage plus faible 43.69% que celui du milieu M₄ (BAP/ANA).

Selon Margara, (1989), les cytokinines associées aux auxines, favorisent généralement la prolifération in vitro des méristèmes préexistés.

Ces mêmes résultats ont été observés par Auge (1989), qui montra que la concentration élevée de BAP additionnée aux auxines favorise la prolifération des bourgeons.

Selon Skoog (1957), le comportement physiologique de l'explant mis en culture évoluera vers un fonctionnement caulogène lorsque le rapport de l'auxine /cytokinine est élevé.

2.3 Multiplication par fragmentation des vitro- plants obtenus à partir de fragments de la tige et de l'apex

Après 30 jours de la mise en culture (introduction primaire), les vitro- plants développés indemnes de toutes infections et comportant au moins 5 nœuds, sont fragmentés en micro- boutures de 1 cm de longueur.

Les micro- boutures ainsi obtenues sont transférées sur le même milieu frais dont sont issues les plant- mères et seront à leur tour fragmentées après 20 à 30 jours.

Par ailleurs, nous remarquons que certains explants développent des ramifications qui prennent naissance à partir du bourgeon axillaire à la base. Ces ramifications ne présentent pas un bon allongement, ce qui rend leur séparation difficile.

La réponse aux régulateurs de croissance est fort variable selon la plante. Dans le cas de l'espèce *Aristolochia fimbriata*, l'utilisation de la cytokinine BAP à 1 mg/l seule est suffisante pour induire le développement des bourgeons. Le même résultat est observé chez l'espèce *Aristolochia canadense*.

En outre, Auge et al (1989) rapportent que les tissus et les plantules cultivées in vitro présentent une certaine variabilité de croissance d'une culture à l'autre. Ainsi le taux de multiplication et l'intervalle de temps qui sépare deux repiquages peuvent être variables.

3. Phase d'élongation :

Pour faciliter la séparation des pousses et leurs passages en enracinement, nous avons essayé d'améliorer leurs allongements.

Pour cela, les pousses ramifiées, ont été transférées sur des milieux d'allongement.

Le milieu de base utilisé est celui de Murashige et skoog (1962) additionné au GA₃ et BAP à différentes concentrations.

Un contrôle continu des vitro- plants et des mesures de leurs allongements ont été effectués chaque semaine. Après 40 jours de la première introduction dans différents milieux (figure 4), les résultats obtenus ont montré que, le meilleur milieu d'allongement est M₄ avec une longueur des vitro- plants qui a pu atteindre en

moyenne 9,2 cm suivi par le milieu M₂, avec 6,2 cm. Le reste des milieux présentent un allongement presque identique avec 4,9 cm pour M₁, 4,5 cm pour M₃ et 5,45 cm pour M₅.

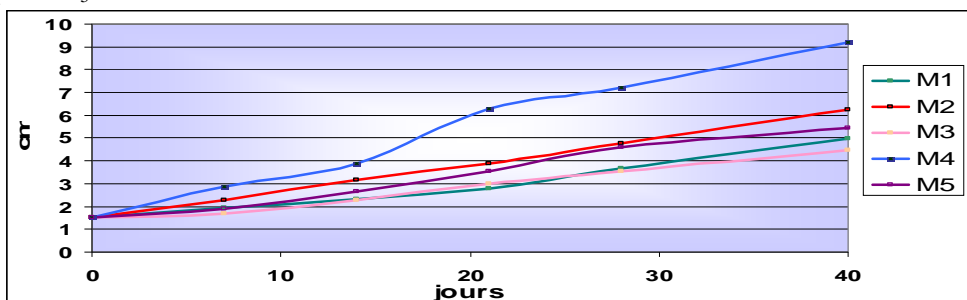


Figure 4. Effet de combinaison hormonale sur l'élongation

L'analyse de la variance effectuée après 40 jours de repiquage dans les milieux d'élongation, au risque $\alpha = 0.05$, révèle un effet significatif des milieux testés sur l'allongement moyen des vitro-plants. Le test de NEWMAN et KEULS, fait apparaître 4 groupes homogènes (tableau V).

Les milieux M₁ et M₃ composent un groupe homogène c'est-à-dire ne présentant pas une différence significative entre eux. La même remarque concerne le milieu M₁ et M₅. En plus, le milieu M₂ représente un groupe seul. Cependant, le milieu M₆, apparaît être le meilleur milieu utilisé, avec une moyenne très élevée par rapport aux autres groupes. Les résultats s'avèrent affirmatifs.

Tableau V

Effet de gibbérelline sur la longueur moyenne de la tige

Milieu	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Moyenne (cm)	4.97±0.67	6.27±0.79	4.47±0.39	9.20±0.54	5.45±0.88
Intervalle de confiance	[4.26 - 5.67]	[5.43 - 7.09]	[4.05 - 4.87]	[8.62 - 9.77]	[4.52 - 6.37]
Groupe homogène	A-B	C	A	D	B

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 NH₄⁺) et une concentration élevée en potassium (K⁺). 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.

Egalement, les travaux de Quoirin (1974) et Druart (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. Si la séparation des vitro-plants est difficile, on permet leur allongement en les cultivant sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance ou additionné de GA₃.

Morel et Muller (1964) ont utilisé l'acide gibbérellique pour favoriser l'élongation in vitro de certaines espèces, c'est l'un de leurs effets physiologiques

les plus fréquents. Leur action s'exerce au niveau de la zone méristématique subapicale en favorisant l'élongation des entre-nœuds de la tige. Par ailleurs, ils affirment que la GA₃ est active pour de nombreux méristèmes qui, en son absence, présentent un aspect globuleux fait d'empilement de nœuds

4. Phase d'enracinement

L'induction des racines est réalisée sur le milieu de base Murashige et skoog (1961). Les observations ont été faites sur deux périodes, après 9 jours de transfert dans le milieu d'enracinement et après un mois de culture.

Les résultats sont illustrés dans la figure 6.

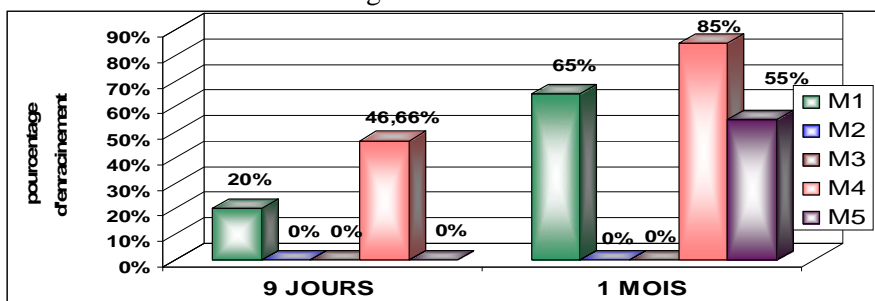


Figure 6. Effet des combinaisons hormonales sur l'enracinement

Après 9 jours de transfert sur le milieu d'enracinement, nous constatons que les milieux M₂, M₃ et M₅ contenant respectivement GA₃ à 0.5 mg/l additionné à 1 mg/l de 2-4 D, ANA, AIB, n'ont aucun effet.

Cependant sur le milieu M₁ sans hormone 20%, les vitro- plants ont donné des racines, alors que le milieu M₄ contenant 0,5 mg/l de GA₃ et 1 mg/l de AIA a provoqué l'enracinement de pratiquement la moitié des micro- boutures (46.66%). C'est le meilleur milieu d'enracinement noté après 9 jours.

Après un mois, nous avons constaté que, les milieux M₂ et M₃ ne favorisent pas l'induction de la rhizogenèse, mais que l'allongement des vitro- plants continue. En ce qui concerne le milieu M₁, le pourcentage des micro- boutures ayant émis des racines a augmenté à 65%.

Il faut toutefois, signaler que les micro- boutures qui n'ont pas réagi après 9 jours de repiquage dans le milieu M₅, émettent des racines pour la moitié des échantillons (55%) après 21 jours. Pour le milieu M₄, il reste toujours le meilleur milieu d'enracinement testé après 21 jours et le taux d'enracinement a augmenté : 85%.

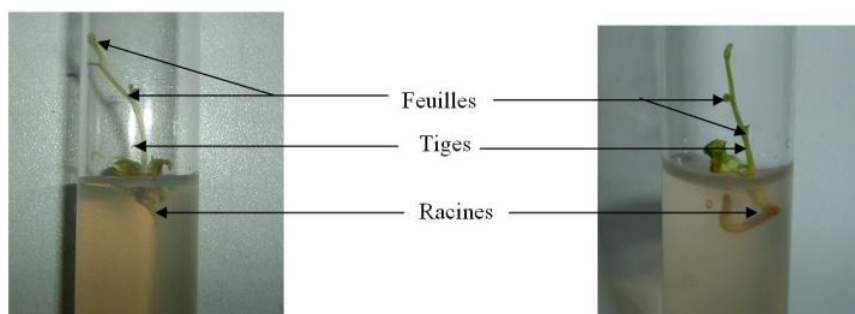


Figure 7. Plantules enracinées issues d'organogenèse directe

Dans la culture in vitro, la phase d'enracinement est généralement favorisée par l'addition des auxines dans les milieux de culture. Selon Margara (1989) et Gallais (1992), les hormones de croissances les plus usuellement utilisées pour stimuler la rhizogenèse sont l'ANA, AIB et IPA.

Selon Zryd (1989), la rhizogenèse peut être déclenchée chez certain type de plantes lors du transfert de sub-culture d'un milieu qui contient des hormones de croissance vers un autre milieu sans hormone. Le même résultat est observé chez *Aristolochia longa* L.

Les travaux de Bravo et al. (1997) sur *Aristolochia fimbriata*, montrent que pour stimuler la formation des racines, les pousses sont cultivées sur le milieu MS basique avec un demi de macroéléments, complété avec de l'AIB ou de l'ANA. Les résultats montrent que L'AIB a produit des racines avec toutes les concentrations examinées, alors que l'ANA seule a seulement initié l'apparition des racines sans leur développement.

Par ailleurs, la phase de rhizogenèse étudiée chez *Aristolochia indica*, a montré que l'introduction des sub-cultures dans des milieux contenant de l'AIB peut donner de très bons résultats (Selvakumar, 2006).

Par ailleurs, Favre (1977) et *al.*, Affirment que, la présence de bourgeons est nécessaire à la rhizogenèse. Elle se traduit par l'obtention de meilleurs résultats au niveau du pourcentage des boutures enracinées, de la cinétique d'apparition des racines néoformées et leur nombre.

Comme les bourgeons, la feuille exerce ordinairement un effet stimulateur sur la rhizogenèse. Sa présence à côté du bourgeon est obligatoire pour la réussite de la micropropagation.

Selon Margara (1989), la néoformation de racines serait déclenchée par l'action d'une substance mobile synthétisée par les feuilles, ensuite, elle migre vers la base de la tige.

Cette substance hypothétique spécifique à la rhizogenèse est appelée « rhizocaline ». Elle est associée aux auxines selon Favre (1977) et Hartmannht (1993).

5. Acclimatation

Les vitro- plants enracinés obtenus par organogenèse directe (figure 8) ont été acclimatés sur deux types de substrat :

- Substrat 1 : tourbe + perlite

➤ Substrat 2 : tourbe seule

Après 2 à 3 semaines du début de l'acclimatation, nous soulevons progressivement les caches en plastique afin de ramener lentement la plante en contact avec l'atmosphère de la mini- serre (figure10).

Par ailleurs, après un mois d'acclimatation, l'effet des milieux utilisés et l'origine des vitro- plants, ont montré une action très hautement significative sur le pourcentage de réussite de l'acclimatation.

En outre, l'utilisation de la tourbe seule est plus efficace. Les plantules obtenues s'adaptent et survivent à 100% sur le substrat 2. Par contre, le pourcentage diminue à 37,50 dans le cas du substrat 1.

En plus, le substrat constitué uniquement de tourbe permet une rétention importante de l'eau. Mais la perlite exige un arrosage fréquent pour compenser les pertes d'eau dues à sa texture.

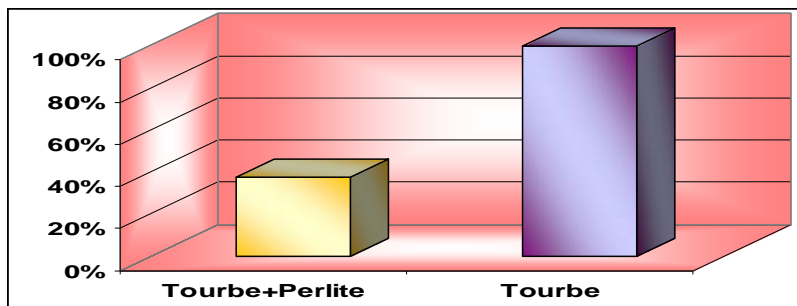


Figure 8. Pourcentage de réussite d'acclimatation des vitro- plants issus d'organogenèse directe

Ainsi, les plantules persistent pendant 2 mois. Ensuite, elles dessèchent et meurent (figure 11). Cela peut être dû à la fragilité des plantules obtenues.



Figure 10. Plantules début d'acclimatation



Figure 11. Développement des plantules après semaines d'acclimatation



Figure 11. Plantules issues d'organogenèse directe après 40 jours

D'après Auge (1989), les facteurs de réussite de l'acclimatation sont basés surtout sur le contrôle des conditions extérieures. Le mélange 2/3 tourbe et 1/3 sable (ou perlite) est fréquemment employé comme substrat d'acclimatation. En plus, l'humidité relative est l'un des facteurs le plus important. Passant d'un micro-climat strictement contrôlé au climat d'une serre, le plant doit être placé le plus rapidement possible dans une atmosphère à humidité relativement élevée et bien contrôlée.

Heller (1982) ajoute que, les stomates de jeunes feuilles cultivées *in vitro* demeurent constamment ouverts et laissent donc s'échapper l'eau de la transpiration de manière continue. Les risques de dessèchement sont très élevés. C'est pour cette raison qu'on recouvre les pots d'acclimatation par un film polyéthylène et on doit attendre la croissance de nouvelles feuilles fonctionnelles avant d'enlever progressivement la pellicule de recouvrement (cache).

Avec certaines espèces tubérifères, il est quelquefois nécessaire de passer par une période de froid pour lever la dormance. En effet, les tubercules peuvent entrer en dormance après leur transfert en pot.

D'après Gaspar (1987), les vitro-plants possédant un cal, au contact du milieu de culture présentent des vaisseaux du système racinaire mal raccordés à ceux de la tige. Ce qui peut expliquer des insuccès lors du transfert en pot.

CONCLUSION

Au terme de ce travail, nous avons pu mettre au point un protocole complet de la micropropagation de l'*Aristolochia longa* L. *in vitro*.

En ce qui concerne l'organogenèse par voie directe, la multiplication des explants de tiges a permis de conclure que :

Le milieu de culture Murashige et Skoog (MS) s'est avéré efficace pour toutes les étapes de multiplication. Cette espèce est caractérisée par une grande capacité au bourgeonnement dans le milieu MS contenant 1,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l ANA. L'élongation est favorisée sur un milieu MS additionné au GA₃ avec une concentration de 1,5 mg/l et 0,5 mg/l BAP. Pour la rhizogenèse, les résultats ont montré que l'enracinement s'améliore après un mois de l'introduction primaire dans le milieu MS, en présence de l'AIA à 1mg/l.

La micropropagation de l'*Aristolochia longa* L. par voie directe a permis d'obtenir un nombre élevé de clones conformes aux pieds-mères adultes sélectionnés. Ainsi, la pré-acclimatation des plantules obtenues par voie directe a marqué plus de succès que des plantules obtenues par voie indirecte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. Auge R. , 1989, La culture in vitro et des applications horticoles, Lavoisier.p.225.
2. Bajaj Y.P.S., 1997, Biotechnology in Agriculture and Forestry: High-tech and Micropropagation, édition Springer, pp. 133.
3. Bouderrah M., 1988,- Comparaison de deux modes de vitropropagation à partir de vitrosemis d'*Eucalyptus camaldulensis* provenance lake albacutya « Micropropagation à partir de bourgeons axillaires, Micropropagation à partir de bourgeons adventifs » et étude de la variabilité du comportement de différents clones, université de NANCY, p.143.
4. Bravo C., Yormann. G, Liorente B., 1977, Micropropagation of *Aristolochia fimbriata*, Congress Medical and Aromatic Plants, pp. 502
5. 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.
6. Favre J.M., 1977, La rhizogenèse, aspects divers d'un processus d'organogenèse végétale, Uni, Paris, pp.37-52.
7. Gallais A, Bannerot. H., 1992, Amélioration des espèces végétales cultivées, objectifs et critères de sélection, édition Quae, pp.768.
8. Gaspar Th, Kevers. C, Debergh. R., 1987, Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects, in : cell and tissue culture in forestry, Volume1, General Principles and Biotechnology, édition: Bonga, Dordrecht, pp.152-166.
9. Gautheret R.J., 1959, La culture des tissus végétaux, techniques et réalisations » édition Masson, pp.863.
10. Heller R., 1982, « Physiologie Végétale, tome 2 Développement» édition Masson, paris, pp.215.
11. Murashige T, Skoog. F., 1962, «A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures» Physiol. Plant 15, pp.473-497.
12. Margara J ., 1989« Bases de la multiplication végétative, Les méristèmes et l'organogenèse » INRA, Paris, p 260.
13. Morel. G, Muller. J.F 1964 «La culture in vitro du méristème apical de la pomme de terre» C.R. 258, pp.5250-5252.
14. 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.

15. Sacristan M. et Melchers G., 1969, the caryological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus cultures of tobacco, *Mol. Gen. Genet.*, p.317-33.
16. Skoog F, Miller. C.O 1957« Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro» *Symp, Soc, Exp, Boil*, pp.118-130.
17. Selvakumar V, Balakumar. T., 2006 « In vitro propagation of the medicinal plant *Aristolochia indica* L. through nodal explants» University of Florida, pp.3019
18. Wright K, Northcote. D1973 «Differences of ploidy and degree of intercellular contact in differentiating and non differentiating sycamore calluses» *J. Cell.Sci*, 12, pp.37-53.
19. Zryd J.P., 1988, *Cultures de cellules, tissus et organes végétaux*, Presses Polytechniques Romandes, p.308.