

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA  
NATURE ET DE LA VIE



N° : .....

DOMAINE : SCIENCES DE LA  
NATURE ET DE LA VIE  
FILIERE : BIOLOGIE VEGETALE  
OPTION : BIOTECHNOLOGIE  
VEGETALE

**Mémoire présenté pour l'obtention  
Du diplôme de Master Académique**

**Par:**

**Bouras Hanane**

**Intitulé**

**Biodiversité et Multiplication *in vitro* de grenadier**

***Punica granatum L.***

**Soutenu devant le jury composé de:**

|                         |                              |            |
|-------------------------|------------------------------|------------|
| Dr HADJI Abbas          | MCB Université M.B de M'Sila | Président. |
| Dr GUETTOUCHI Ahlem     | MCB Université M.B de M'Sila | Encadreur. |
| Dr BELKASSAM Abdelwahab | MCB Université M.B de M'Sila | Examineur. |

**Année universitaire : 2018 /2019**



﴿ وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتٍ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا  
نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ  
وَالزَّيْتُونِ وَالرُّمَّانِ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكَ  
لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴾ (99)..... الانعام



# R emerciements

*Je* tiens à remercier avant tout **Dieu** le tout puissant de m'avoir guidé durant toutes ces années et m'a permis de réaliser ce mémoire en me donnant la force, la patience et la volonté.

*J'*adresse tout d'abord mes remerciements les plus sincères, mes respects et ma profonde gratitude à mon encadreur Docteur **Guettouchi AHLEM**, pour notre directrice de recherche, qui a mis toutes ses connaissances et son expérience à notre disposition, en nous faisant part de ses suggestions les plus judicieuses et de ses critiques les plus constructives. Nous avons vraiment apprécié sa façon de travailler, son efficacité et son enthousiasme. Bref, une directrice de recherche digne de ce nom.

*Je* tiens tout d'abord à remercier le Professeur. **Hdji Abbas**. Président du jury et monsieur l'examineur Docteur. **Belkassam Abdelwahab**, membres de jury pour avoir accepté de juger et d'évaluer ce travail.

*Je* remercie aussi les autorités et de tout le corps académique de l'Université de M'sila en général et en particulier ceux de la Faculté des sciences, ainsi le chef d'option Docteur. **Belkassam Abdelwahab** le chef de département Docteur. **Bouhar Rabe**.

Sans oublier également nos collègues de la promotion 2018-2019 : Biotchnologie végétales.. Je remercie beaucoup Ma collègue Amel Pour m'aider. et n'oublier pas les habitants de Boukmissa pour leur accueil.

*Je* remercie tous les enseignants de la faculté des sciences de vie de l'université de M'sila, qui nous ont enseignés durant les cinq ans d'études.

*J'*exprime mes profonds remerciements aussi à le professeur **Bendif Hamdi** pour leurs aides- moi et encouragez moi en cas de Bousions.

*J'*offre mes sincères remerciements au Professeur **Belkassam Abdelwahab**. qui m'a donné des informations dans mon domaine de recherche

*Je* tiens également à remercier vivement les ingénieurs de Laboratoire de biologie et d'Agronomie **Kamel Seghir** chef des Laboratoire. **Mounire, Asma, Samiha, Leila, Hadjab, Fairouse**, pour leur soutien et encouragement. Et les gents de bibliothèque.

**Hanane**

# *D*édicaces

*C'est avec une immense joie et un grand honneur que je dédie ce modeste travail :*

*A ma mère **Hadaa**.*

*A mon père **Mabkhout** .*

*A,mes sœurs chaima,nesrine,weam,Rokaia,maissa .*

*A mes frères **Khaled, Mansoure, Abdelfatehe** .*

*A toute ma grande famille.*

*A tous mes amis(es) sans exception pour leurs aides et encouragements  
Amel, Rym,Hanadie, Hafsia,Nour,Souad,Anfale,cherifa,Aicha,et les autre*

*A tous mes collègues, de spécialité biothnologie végétale.*

.

*HANANE*

.

## Sommaire

|   |    |
|---|----|
| Remerciement  |    |
| Dédicace  |    |
| Liste des Abréviations                                      |    |
| Liste des Tableaux  |    |
| Liste des Figures   |    |
| Liste des Photos  |    |
| Introduction.....   | 01 |
| <b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>                |    |
| I-1- Historique.....  | 02 |
| I-2- Nomenclature.....                                      | 02 |
| I-3- Etudes botanique .....                                 | 03 |
| I-3-1- Classification botanique .....                       | 03 |
| I-3-2- Arbre .....  | 03 |
| I-3-3- Feuilles.....  | 04 |
| I-3-4- Fleur.....   | 04 |
| I-3-5- Fruit.....   | 05 |
| I-3-6- Système racinaire .....                              | 06 |
| I-4- Origine et répartition géographique .....              | 06 |
| I-5- Stade phréologique de grenadier .....                  | 08 |
| I-6- Exigences écologiques du grenadier .....               | 11 |
| I-6-1- Exigences climatiques.....                           | 11 |
| I-6-2-Exigences édaphiques .....                            | 11 |
| I-7- Eléments de conduite technique de la culture.....      | 11 |
| I-7-1-Entretien régulier.....                               | 11 |
| I-7-2-Amendement.....                                       | 12 |
| I-7-3- Irrigation.....                                      | 12 |
| I-8-1- Production de grenade Au monde .....                 | 12 |
| I-8-2- Production de grenade en Algérie.....                | 13 |
| I-8-3- Production de grenade dans la wilaya de M'sila ..... | 14 |
| I-9-Variétés de grenadier.....                              | 14 |

|   |    |
|---|----|
| I-9-1-Principale variété existence en Algérie.....                    | 14 |
| I-9-2- Description de quelque variété dans le monde.....              | 15 |
| I-10- Principale Ravageurs et maladie de grenadier .....              | 16 |
| I-10-1- Puceron.....  | 16 |
| I-10-2- <i>Ceratitiscapitata</i> Wiedemann .....                      | 16 |
| I-10-3-Zeuzères <i>Zeuzera pyrina</i> L.....                          | 16 |
| I-10-4- Nematodes ( <i>Méloidogynes</i> ) .....                       | 16 |
| I-10-5- <i>Aspergillus castaros</i> .....                             | 16 |
| I-10-6- Acarien de grenadier <i>Tenuipalpus punicae</i> .....         | 17 |
| I-11- Valeur nutritionnelle de la grenade .....                       | 17 |
| I-12- Utilisation du grenadier .....                                  | 18 |
| I-12-1- Utilisation traditionnelle de <i>Punica granatum</i> .....    | 18 |
| I-12-2- Consommation de la grenade .....                              | 18 |
| I-12-3- Utilisation médicinal.....                                    | 18 |
| I-12-3-1- Activités antioxydants .....                                | 18 |
| I-12-3-2- Activités thérapeutiques .....                              | 19 |
| I-12-3-3- Activité anticancéreuses .....                              | 19 |
| I-12-3-4- Protection contre les maladies cardiovasculaires.....       | 19 |
| I-12-3-5- Effet antidiabétique.....                                   | 19 |
| I-13- Récolte et conservation .....                                   | 20 |
| I-14-Modes production de grenadier.....                               | 20 |
| I-14-1- Multiplication Végétative.....                                | 20 |
| I-14-1-a- Semi .....  | 20 |
| I-14-1-b- Bouture .....   | 20 |
| I-14-1-c- Marcottage.....   | 21 |
| I-14-1-d- Drageonnage .....   | 21 |
| I-14-1-e-Greffe.....  | 21 |
| I-14-2-Artificielle par la technique de culture <i>in vitro</i> ..... | 21 |
| I-14-2-a-Micropropagation.....  | 22 |
| I-14-2-b-Culture de méristème .....                                   | 22 |
| I-14-2-c-Embryogénèse somatique.....                                  | 22 |
| I-14-2-d-Grenadier <i>in vitro</i> .....                              | 22 |

## chapitre II : Matériels et méthodes

|  |    |
|--|----|
| II-1- Matériel végétal.....                                    | 24 |
| II-2- Préparation de milieu MS.....                            | 24 |
| II-3-Préparation des solutions mères de milieu MS .....        | 25 |
| II-3-a- Préparation de la solution mère de macro-éléments..... | 25 |
| II-3-b- Préparation de la solution mère de micro-éléments..... | 25 |
| II-3-c- Préparation de la solution mère de Fe-EDTA.....        | 25 |
| II-3-d- Préparation de la solution mère des vitamines.....     | 25 |
| II-4- Préparation du milieu MS pour 1 litre .....              | 26 |
| II-5- Stérilisation de milieu de culture .....                 | 26 |
| II-5-a- Stérilisation des instruments .....                    | 26 |
| II-5-b- Stérilisation de la hotte.....                         | 26 |
| II-6- Ensemencement des explants .....                         | 27 |
| II-7- Chambre de culture.....                                  | 27 |
| II-8- Traitement statistique .....                             | 27 |

## Chapitre III : Résultats et Discussion

|  |    |
|--|----|
| III-1-Régénération et développement de grenadier <i>in vitro</i> dans un milieu MS+ BAP+2-4D chez les deux variétés..... | 29 |
| III-1-1- Types morphologiques obtenus (organogénèse).....  | 29 |
| a- Nombre des feuilles.....  | 29 |
| b- Longueur des feuilles.....  | 31 |
| III-1-2- Formation des cals.....   | 31 |
| III-2- Contraintes de la culture.....  | 32 |
| III-2-1- Contamination par des champignons.....  | 32 |
| III-2-2-Contamination par des bactéries.....   | 33 |
| Conclusion .....   | 34 |
| Références Bibliographiques.....   | 35 |

Résumé



## Liste abrégations

---

|       |                                  |
|-------|----------------------------------|
| BAP   | 6-Benzylaminopurine              |
| 2,4-D | 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid   |
| MS    | Murashig and skoog (1962)medium  |
| DSA   | Direction des services agricoles |
| Mg    | Milligramme                      |
| S     | Semaine                          |

## LISTE DES FIGURES

---

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Figure1</b>  | La grenade et ses différentes parties (Calin Sanchez et <i>al.</i> , 2005)                             | 6  |
| <b>Figure 2</b> | Système racinaire(C)   | 6  |
| <b>Figure 3</b> | Limite de la culture du grenadier dans la zone méditerranéenne et caucasienne (Evreinoff, 1957).       | 7  |
| <b>Figure 4</b> | Répartition géographique de la grenade en Afrique. (A)   | 8  |
| <b>Figure 5</b> | Les stades phénologiques de développement de grenadier ( <i>Punica granatum</i> L.) (Melgarejo, 1997). | 10 |
| <b>Figure 6</b> | Les plus grands pays producteurs des grenades au monde (Melgarejo <i>et al.</i> , 2012).               | 13 |

## Liste des Tableaux

---

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Tableau 01</b> | production de grenade en Algérie (DSA, 2018).   | 13 |
| <b>Tableau 02</b> | Production de grenade dans la wilaya de M'sila (DSA, 2018)                              | 14 |
| <b>Tableau 03</b> | Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie (INRAA, 2006).             | 15 |
| <b>Tableau 04</b> | Caractéristiques des principales variétés de grenade dans quelques pays (Cauard, 2013). | 15 |
| <b>Tableau 05</b> | Valeur nutritionnelle de grenadier (pour 100 g de portion comestible) (Anonyme, 2009).  | 17 |
| <b>Tableau 06</b> | Constituants du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962).                                   | 24 |

## LISTE DES PHOTOS

---

|                |  |    |
|----------------|--|----|
| <b>Photo 1</b> | Arbres du grenadier (Bouras, 2019)                                   | 3  |
| <b>Photo 2</b> | Feuilles lancéolées de <i>Punica granatum</i> L.(Bouras, 2019)       | 4  |
| <b>Photo 3</b> | La fleur de grenadier (Bouras ,2019)                                 | 5  |
| <b>Photo 4</b> | Formation des feuilles dans la concentration 0,5 mg/l (BAP et 2-4D). | 29 |
| <b>Photo 5</b> | Formation des feuilles pour la concentration 1 mg/l (BAP et 2-4D).   | 30 |
| <b>Photo 6</b> | Formation des feuilles pour la concentration 2 mg/l (BAP et 2-4D).   | 30 |
| <b>Photo 7</b> | Formation des cals   | 32 |
| <b>Photo 8</b> | Contamination par des champignons                                    | 32 |
| <b>Photo 9</b> | Contamination par des champignons                                    | 33 |

# Introduction

# Introduction

---

## Introduction :

Le grenadier (*Punica granatum* L.), un gros buisson ou arbuste assez épineux, au feuillage caduc et de bel aspect, appartient à la famille des Punicaceae, division Magnoliophyta , classe Magnoliopsida et à l'ordre des Myrtales. Il est originaire de l'Asie subtropicale et s'est acclimaté à la région méditerranéenne (Sarkhosh et *al.*, 2006).

Il est depuis longtemps cultivé a but ornemental et pour ses fruits comestibles. Ses fruits, contiennent de nombreuses graines, chacun enrobe dans une pulpe gélatineuse rouge cramoisi, le tout enveloppé dans une peau (écorce) coriace dont la couleur peut aller du jaune au rouge foncé. Les fruits sont consommés en frais et sont aussi utilisés pour produire un sirop dont le principal ingrédient est sa pulpe au gout acide. Depuis des milliers d'années, les propriétés astringentes de l'écorce du fruit et de l'arbre sont très prisées en médecine, particulièrement comme vermifuge. Actuellement, la grenade est cultivée dans la plupart des régions à climat chaud, car il a besoin de fortes chaleurs pendant toute la période de fructification (Melgarejo, 1993).

Selon Oukérimi et Oucif (2018), dans la commune de M'sila le nombre totale des arbres fruitiers est de 20998 arbres, répartis en 10 espèces et 24 variétés. Le grenadier avec ces 02 variétés : Tounsi et Khodri occupe la troisième position avec 3690 arbres.

D'après la D.S.A, (2017) les superficies consacrées à la culture de grenadier sont passées à 810 ha, avec une production de 49 600 Qx.

Notre travail, a pour objectif la Multiplication de deux variétés de grenadier *in vitro*.

- Ce mémoire est organisé en trois chapitres :
  - Dans le 1<sup>er</sup> chapitre nous avons rassemblé des études bibliographiques sur le grenadier et la culture *in vitro* ;
  - Le 2<sup>ème</sup> chapitre contient le Matériel et la Méthode pour préparer le milieu MS et faire la Micropropagation des deux variétés ;
  - Le 3<sup>ème</sup> chapitre regroupe l'ensemble des résultats et la discussion ;
  - Une conclusion générale est donnée à la fin de ce travail.

# Chapitre I

## Synthèse bibliographique

## I-1-Historique

Le grenadier est un arbre fruitier appartenant à la famille des Punicacées qui comprend trois espèces différentes, *Punica protopunica*, *Punica nana* et *Punica granatum*, espèce la plus commune. Le nom du genre, *Punica*, a été l'appellation romaine de la ville de Carthage où poussaient les meilleurs grenadiers. (Jurenka, 2008). Cultivé dans les jardins de Babylone depuis plus de 4.000 ans, le grenadier et son fruit tiennent une place importante dans les civilisations anciennes. Dans l'Égypte antique le grenadier accompagne les morts dans l'au delà. (Abbaayes et al., 1963).

La grenade porte le nom de pomme punique, c'est le *Malumpunicum* de Pline, ou pomme de Carthage. Elle sera alors renommée *Punica granatum*. *Punica* en souvenir des guerres puniques ou peut-être pour *puniceus* qui signifie rouge écarlate en latin, et *granatum* pour la multiplicité des graines contenues dans le fruit (Lemoine, 1998).

Les Maures, berbères d'Afrique du Nord, l'introduisirent dans la péninsule ibérique, au VIII<sup>ème</sup> siècle après JC, lors de la conquête de ce territoire. Forts appréciés dans le Sud de l'Espagne, les grenadiers connaissent alors une culture intensive (Lemoine, 1998).

Le grenadier *Punica granatum*, anciennement connue et apprécié de toutes les civilisations par sa beauté et la jutosité de son fruit antique doté de riches applications ethno-médicales (Shah et al., 2011; Chadli et al., 2015).

Les fruits du grenadier, avec leurs graines, écorces, fleurs et jus, ont été consommés durant des milliers d'années, en tant que nourriture et remèdes (Holland et al., 2009 ; Smith, 2014). Il est présent dans les anciens textes grecs, égyptiens, les textes bibliques, le Coran et dans les traditions populaires des différents pays bordant la Méditerranée.

En Egypte, la grenade était considérée comme le fruit des dieux. Le symbole de la fertilité et de la richesse, en raison de l'abondance de ses graines et de sa forme ronde (Ruis, 2015).

## I-2-Nomenclature

Hmid (2013), signale les noms suivants pour désigner cette espèce :

- Nom scientifique : *Punica granatum* (Linné, 1753)
- Nom français: grenadier
- Nom anglais: pomegranate
- Nom espagnol: Granada

- Nom italien: Melograno

- Nom arabe: Rommane.

### **I-3-Etudes botanique**

#### **I-3-1-Classification botanique**

Le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753, D'après (Quezel et Santa, 1963). Telle est cette classification :

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidées

Ordre : Myrtales

Famille : Punicaceae

Genre : *Punica*

Espèce : *Punica granatum* L.

#### **I-3-2-Arbre**

Le grenadier se présente comme un petit arbre de 3 à 4 m. de hauteur (Phto01), donnant de nombreux rejets, on le trouve plus souvent sous forme de cépée, qu'avec une tige unique. Les rameaux sont grêles, parfois épineux. (Evreinoff, 1957). Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon spontanée ou cultivée (photo01). (Garnier, 1961).



**Photo 01:** Arbres du grenadier (Bouras, 2019).

### I-3-3-Feuille

Les feuilles du grenadier sont caduques, opposées, et disposées sur les rejets comme ils peuvent être en touffes sur les pousses courtes, glabres sur les deux faces. Caractérisées par la couleur verte foncé de la face supérieure et à nervure médiane nettement déprimée. La face inférieure, vert clair, montre une nervure médiane très saillante (Evreinoff, 1957).

Ces feuilles entières, brillantes, lancéolées, assez coriaces, présentent un limbe elliptique allongé, de 3 à 8 cm de long. De sommet obtus ou allongé, munies d'un court pétiole rougeâtre (photo 02) (Godet, 1991).



**Photo02:** Feuilles lancéolées de *Punica granatum* L. (Bouras, 2019).

### I-3-4-Fleur

A maturité, les fleurs sont d'un rouge éclatant, pourpre ou grenat selon les variétés mesurant 3 cm de diamètre et ayant cinq à huit pétales, souvent davantage sur les plantes cultivées (photo). Leur nombre est généralement l'équivalent du nombre de sépales d'après les auteurs (Pande et al., 2016; Hmid, 2013; Teixeira da Silva et al., 2013 ; Hollande et al., 2009).

D'aspect froissé et portées par un court pédoncule (Photo03). Elles se trouvent soit, solitaires à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupe de deux ou trois au sommet des branches (Hollande et al., 2009 et Ashton, 2006). Les fleurs axillaires, solitaires ou parfois disposées par deux, présentent un calice épais, coriace, tubuleux et turbiné à 6 lobes triangulaires. La corolle d'un rouge éclatant est formée de 5 à 7 pétales obovales. Elles sont appelées aussi balaustes (quand elles sont sous forme de boutons), Les fleurs sans odeur sont sèches, de saveur astringente et âpre et donnent à la salive une teinte violacée. (Planchon & al., 1875).

Elles sont hermaphrodites, actinomorphes. (Courchet, 1897).



**Photo03:** La fleur de grenadier (Bouras, 2019).

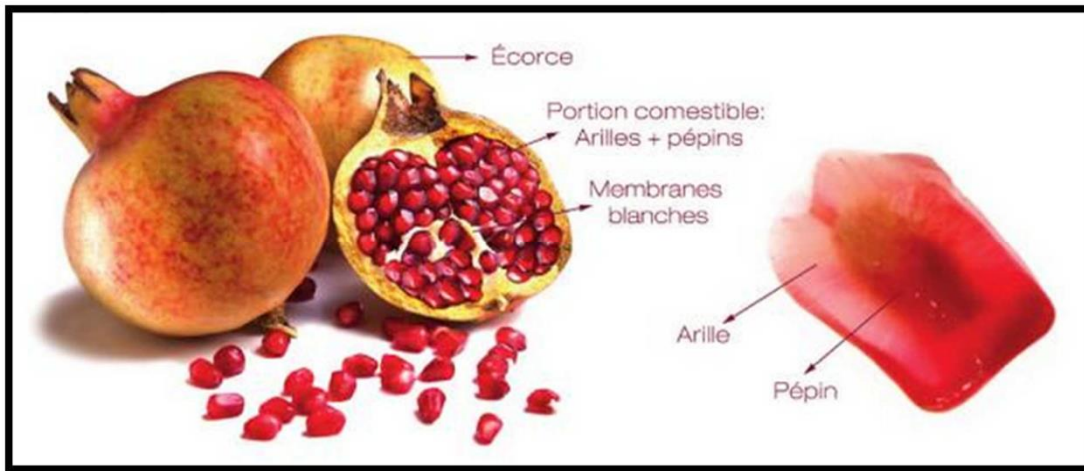
### **I-3-5-Fruit**

Le fruit possède dans ses différentes parties de nombreux composés chimiques d'une valeur biologique élevée : écorce, membranes blanches, arilles et pépins. (Calin Sanchez et *al.*, 2005).

Le fruit du grenadier, la grenade (Figure2), est un balauste, baie complexe (Chakass et *al.*, 2007) presque ronde et charnue de la taille d'une pomme ou d'une orange. Elle mesure entre 6 et 12 cm de large alors que le poids varie entre 200 et 650 grammes (Holland et *al.*, 2009 et Pande et *al.*, 2016).

Le péricarpe du fruit est une coque épaisse, de consistance dure, de saveur amère et astringente qui varie selon les cultivars poussant dans différentes régions du monde. Il est très coloré, généralement de teinte brun-rougeâtre (Chakass et *al.*, 2007) ou rouge vif, peut, selon les variétés, avoir une peau lisse de teinte blanc-jaunâtre, ou jaune foncé marbré de rouge ou encore violet très foncé de l'extérieur et d'un beau jaune à l'intérieur du fruit. Erken et Kader(2011), indiquent qu'il existe plusieurs cultivars exceptionnels avec des écorces de fruits de couleur noire.

La baie renferme de nombreuses graines angulaires ou arilles (Figure01). Le fruit contient en moyenne 600 graines pulpeuses, contenues dans des loges, séparées par des cloisons ténues et nombreuses (Evreinoff, 1957).



**Figure01:** La grenade et ses différentes parties (Calin Sanchez et *al.*, 2005).

### I-3-6-Système racinaire

Le système racinaire de grenadier est :

- Fasciculé.
- De surface (60cm<sup>2</sup>).
- Avec la capacité à s'adapter selon les conditions de sol.

La racine du grenadier est ligneuse, noueuse, dure et pesante. (Figur 02)(Guibourt, 1849) La face externe gris jaunâtre ou brunâtre montre de larges écailles subéreuses, des rides ou de larges fissures. La face interne jaune verdâtre est lisse et finement striée longitudinalement. (Garnier, 1961)L'écorce de la racine se présente sous forme de fragments irréguliers, plus ou moins enroulés ou cintrés, d'un millimètre d'épaisseur environ.



**Figure02:** Système racinaire(C)

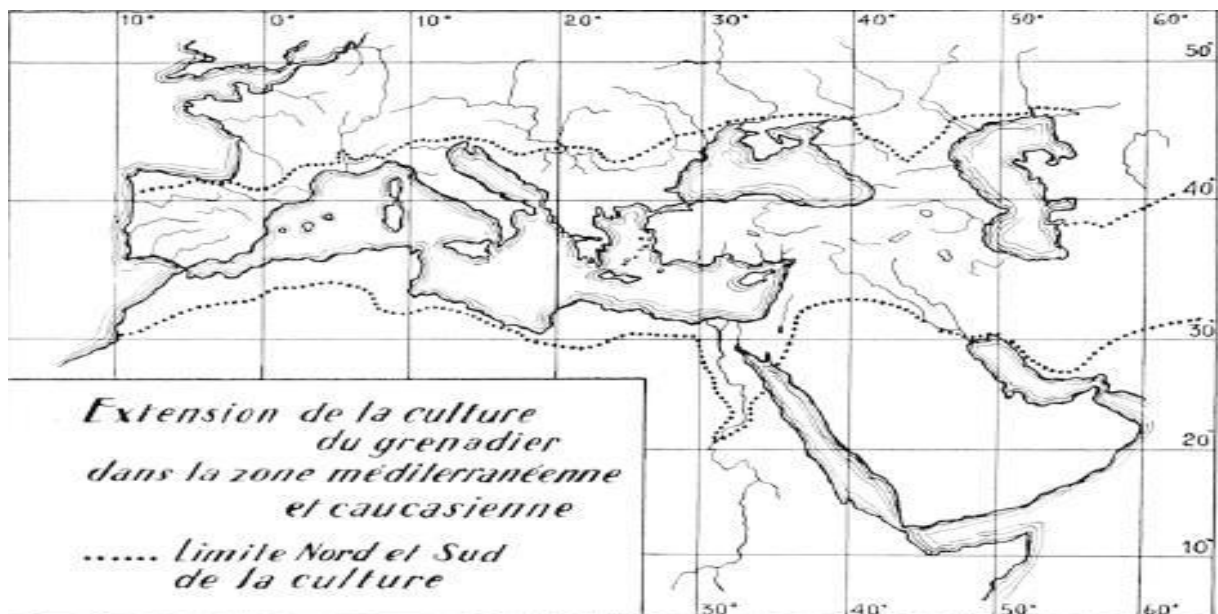
### I-4-Origine et répartition géographique

Le grenadier serait originaire d'Iran et d'Afghanistan, où il croît de façon spontanée de plus de 4000 ans. On le retrouve également sur des bas-reliefs égyptiens datant de 2500 an

savant le Christ et au jardin botanique de Thoutmosis III créé en 1450 avant JC. (Amourettim, 1992 ; Comet, 1992).

La culture du grenadier est considérée comme une domestication d'une espèce sauvage. Elle n'a pas débuté dans la zone méditerranéenne comme on le supposait encore récemment, mais elle a pris naissance en Asie occidentale à l'époque préhistorique. Son extension dans l'antiquité était vers l'Occident (zone méditerranéenne) (Figur03) d'abord, puis vers l'Inde et la Chine (Evreïnoff, 1957).

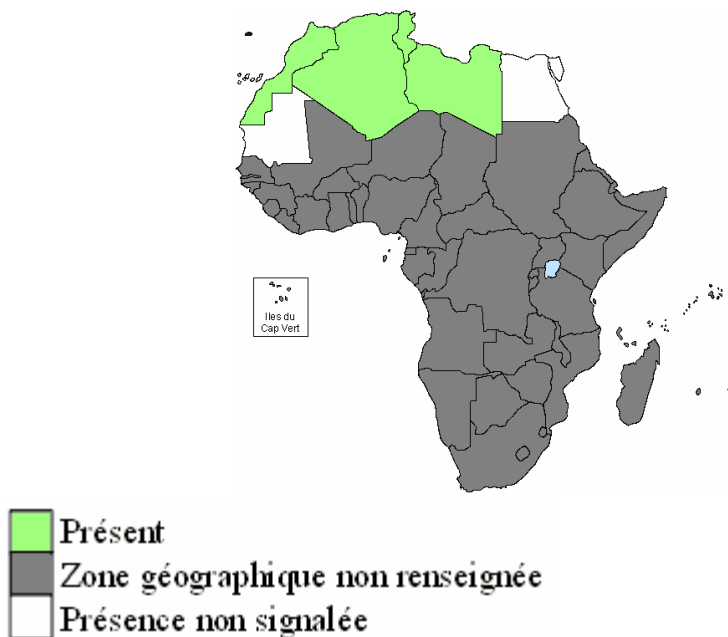
Selon ce même auteur, la partie phylogénétique du grenadier se trouve, selon les derniers travaux des botanistes et pomologues, dans toute la région qui englobe l'Iran, l'Afghanistan et la Transcaucasie orientale, où s'observe une multitude de formes spontanées et de variétés cultivées. Les romains dénommaient la grenade, au début, "*pomme punique*" ou "*pomme de Carthage*".



**Figure03** : Limite de la culture du grenadier dans la zone méditerranéenne et caucasienne (Evreïnoff, 1957).

Le grenadier est fortement représenté au Moyen-Orient, sa terre d'origine. Ainsi, on le trouve fréquemment en Afghanistan, Turquie, Transcaucasie, et en Inde. Il est aussi beaucoup cultivé dans le bassin méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc. (Wald, 2009). On le rencontre déjà plus rarement dans le midi de la France, au Portugal, en Bulgarie et en Crimée. De même en Amérique, la culture du grenadier reste très sporadique. Il

est présent en Californie, dans l'Utah, en Alabama, Louisiane et Floride (Figure04) (Wald, 2009).



**Figure04:** Répartition géographique de la grenade en Afrique(A).

Selon le chercheur russe, Vavilov(1951), le grenadier appartient au centre du Moyen-Orient, qui comprend l'intérieur de l'Asie, l'Iran et le Turkménistan, puis il s'est acclimaté à la région méditerranéenne depuis des temps immémoriaux en raison de la propagation et la germination facile de ses graines, qui sont dispersées par l'homme, les oiseaux ou d'autres animaux (Sanchez-Monge, 1974).

### I-5-Stades phénologique de grenadier

Selon Melgarejo(1997), Les stade phénologiques de développement de grenadier (*Punica granatum* L.) est :

**Stade A:** bourgeon en dormance d'hiver : Le bourgeon est brun grisâtre et complètement fermé, profondément.

**Stade B:** gonflement du bourgeon : Le bourgeon gonfle et devient de plus en plus pâle et arrondi.

**Stade C:** pointe rouge : Le bouton s'ouvre pour montrer la nouvelle pousse, en forme de lance et à pointe rouge.

**Stade D:** germination des premières feuilles : Les premières feuilles apparaissent. Ils sont enroulés et sont rouge vif avec une nervure centrale pâle et le reste de la feuille est rouge vif.

**StadeD2:** séparation des feuilles : Les nouvelles feuilles se séparent.

**Stade D3 :** croissance des feuilles : Les feuilles poussent en longueur et en largeur et changent de couleur du rouge vif au vert clair.

**Stade D4 :** allongement des entre-nœuds : Les interne-nœuds s'allongent et la croissance des pousses est rapide.

**Stade E :** apparition des bourgeons floraux : Les bourgeons floraux apparition parmi les feuilles des pousses ; ils sont d'abord verdâtres mais deviennent rouges .après quelque jours .Les sépales sont visibles et rapprochés.

**Stade E2:** calice enflée : Les boutons grossissent et deviennent en forme de poire ; les différences entre mâle et Les fleurs hermaphrodites se manifestent dans la forme et la couleur du calice : le termina .les branches bourgeonnent avec plusieurs fleurs, généralement des abscisses.

**Stade E3 :** ouverture du calice : Les sépales s'ouvrent pour montrer les pétales rouges pliés à l'intérieur. Vers la fin de cette étape, les pétales se dérouler et les anthères du pistil deviennent visibles.

**Stade F:** fleur ouvert : Le calice s'ouvre totalement et les pétales saillant, pliés et pourpre, se déploient sur les sépale.les pétale semblent être insérés entre deux sépale, sur leur face interne, ce qui donne l'impression d'alterner pétales et sépales. Les anthères de étamine virent au jaune foncé lorsque le pollen est mûr et capables de fertiliser .c'est au cours de cette étape que se produit la pollinisation.

**Stade G :** chute des pétales : Les pétales se flétrissent et tombent, le calice passe du rouge orangé ; les étamines se pli vers l'axe longitudinal de la fleur et Les anthères deviennent jaune grisâtre .la partie terminale du style se fane.

**Stade H:** mise à fruit : L'ovaire Fertilisé grossit et la base du calice gonfle ; les étamines se flétrissent et les fruit glissent du rouge orangé au brun gris.

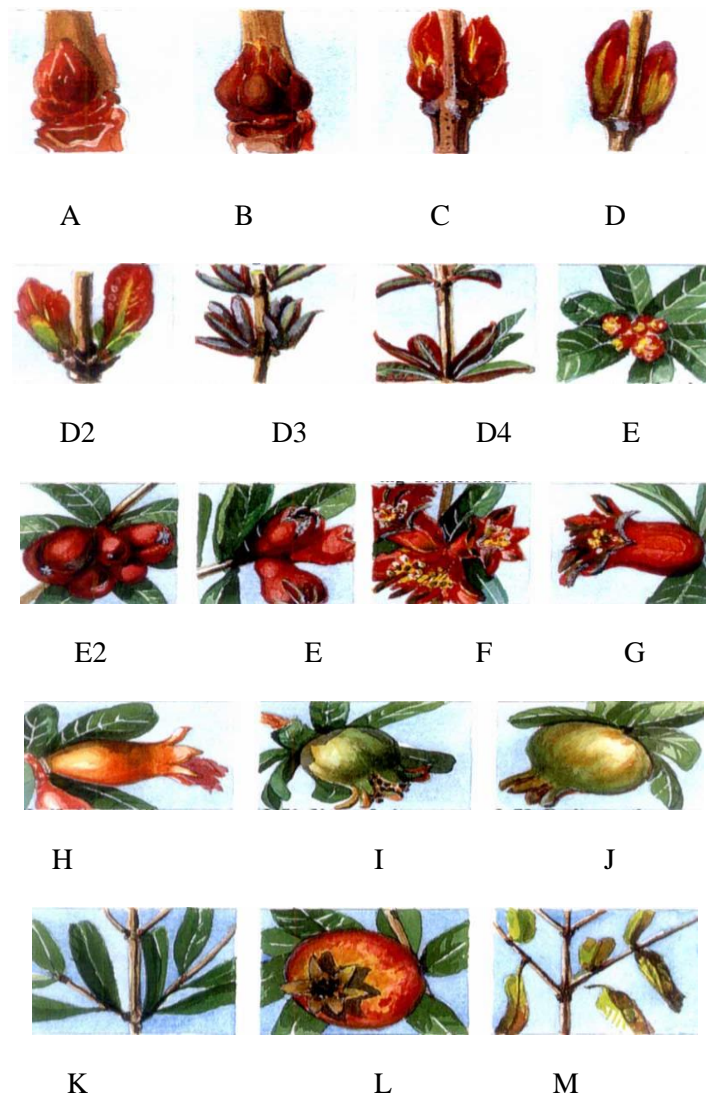
**Stade I :** jeun Fruit : Le fruit augment rapidement et sa couleur passe du brun verdâtre au vert.

**Stade J :** croissance du fruit : Le fruit grossit presque jusqu'à sa taille finale par élargissement des cellules ; Les sépales forment une couronne .les étamines séchées étant à l'intérieure.

**Stade K :** deuxième bourgeon entrain de germer reprise de la croissance des pousses sur l'arbre.

**Stade L :** maturation des fruits : Les parties charnues passent du balance au rouge rosé ou au rouge ; la peau du fruit passe du vert au jaune verdâtre, puis finalement au jaune brunâtre, avec des taches rougeâtres.

**Stade M :** feuilles Tombées : Les feuille devienne jaunâtres et Tombent ; et une fois terminée, la dormance hivernale commence.(Figure05).



**Figure 05:** Les stades phénologiques de développement de grenadier (*Punica granatum* L.) (Melgarejo, 1997).

## **I-6-Exigences écologiques du grenadier**

Il s'agit des exigences climatiques et édaphiques du grenadier.

### **I-6-1-Exigences climatiques**

Le grenadier s'adapte à de nombreux climats, des tropiques aux régions tempérées chaudes. Cependant, c'est le climat austral subtropical, voire tropical, qui lui convient le mieux. Les meilleurs fruits sont obtenus dans les régions subtropicales, où la période des températures élevées concorde avec la maturité des grenades. L'espèce exige une petite dose de froid en période hivernale pour son évocation florale, mais il craint les conditions généralement froides des hautes altitudes (Melgarejo, 1993).

Il supporte très bien la sécheresse, mais cela compromet la qualité de ses fruits. Un climat chaud et sec sera bon pour le grenadier à condition que ses racines ne manquent pas d'eau (Afaq et al., 2005). Il est très intéressant pour les régions arides et semi-arides (Melgarejo and Salazar, 2003).

### **I-6-2-Exigences édaphiques**

Le grenadier est une espèce connue pour sa tolérance au calcaire (Melgarejo et Salazar, 2003). Il donne un bon rendement dans les sols salins, et classé dans le groupe des espèces les plus résistantes à la salinité (Sanchez-capuchino, 1986). Sa tolérance à la sécheresse est relative et se fait au détriment de sa croissance végétative et de sa fructification. Les meilleurs résultats d'installation de plantations sont obtenus en sols d'alluvions profondes avec des disponibilités satisfaisantes en eau (bords des courants d'eau).

Les sols argilo-limoneux irrigués conviennent aussi à la culture du grenadier (Hmid, 2013).

## **I-7-Eléments de conduite technique de la culture**

La culture du grenadier est très simple, elle nécessite les techniques culturales suivantes :

### **I-7-1- Entretien régulier**

Il faut procéder, une fois par an, à un ameublissement du sol et à la destruction des mauvaises herbes. Au cours de l'été, plusieurs sarclages sont nécessaires afin de maintenir les

racines humides (Wald, 2009). Fructifiant sur le bouquet de mai, la taille du grenadier doit préserver ses productions en assurant un léger élagage et la suppression du bois mort (Hmid, 2013).

### **I-7-2-Amendement**

Il faut être prudent avec les engrais, et éviter ceux azotés, qui risquent de faire éclater les fruits sur l'arbre et faire proliférer les brindilles, gourmands et drageons. Ce type d'engrais est à réserver pour des arbres chétifs et en mauvaise santé (Wald, 2009).

Au contraire, des engrais phosphatés ont une influence favorable sur la fructification, et doivent être apportés à l'arbre en hiver (Afaq *et al.*, 2005).

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

L'eau est rarement un problème dans la culture de la grenade. En effet, le plant de grenadier est connu pour être résistant à des longues périodes de sécheresse (Meena *et al.*, 2009). Toutefois, cette résistance peut entraîner des problèmes physiologiques ou de qualité visuelle sur le produit (éclatement du fruit). De même, de trop fortes quantités d'eau peuvent nuire au développement du fruit et réduire le potentiel de production de l'arbre.

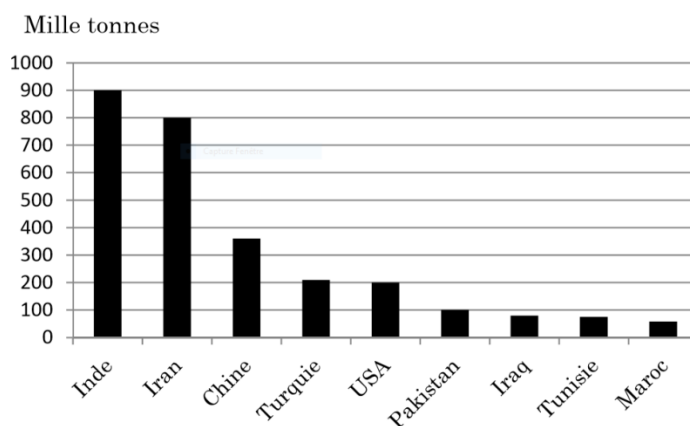
Mais dans la majorité des cas, les précipitations combinées avec une irrigation d'appoint au goutte-à-goutte suffit pour la croissance de la plante (Meshram *et al.*, 2009).

## **I-8- Production de grenade**

### **I-8-1-Production de grenade Au monde**

La surface mondiale dédiée à la culture du grenadier est de 300 000 Ha, dont plus de 76 % sont répartis sur cinq pays (Inde, Iran, Chine, Turquie et USA) (Figure 06). Cependant, l'Espagne, l'Égypte et ont une superficie comprise entre 16 000 et 2400 ha et sont parmi les pays qui ont développé le secteur d'exportation et aussi la sélection de nouvelles variétés (Quiroz, 2009).

D'autres pays pratiquent également cette culture notamment Afghanistan, Pakistan, Arménie, Géorgie, Tadjikistan, Jordanie, Italie, Tunisie, Azerbaïdjan, Libye, Liban, Soudan, Myanmar, Bangladesh, Mauritanie, Chypre et Grèce (Melgarejo *et al.*, 2012).



**Figure06:** Les plus grands pays producteurs des grenades au monde (Melgarejo *et al.*, 2012).

### I-8-2-Production de grenade en Algérie

La production de la grenade en Algérie ainsi que sa superficie sont enregistrés dans le (tableau 01).

**Tableau 01:** production de grenade en Algérie (DSA, 2018).

|                   | Superficie plantée (Ha) | Superficie en rapport(Ha) | Production (Qx) |
|-------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------|
| <b>Djelfa</b>     | 1240                    | 1186                      | 110 760         |
| <b>Mostaganem</b> | 1140                    | 1145                      | 186 261         |
| <b>Relizane</b>   | 723                     | 705                       | 90 565          |
| <b>M'sila</b>     | 486                     | 474                       | 31 960          |
| <b>Tlemcen</b>    | 444                     | 205                       | 1590            |

Selon DSA (2018), la production totale de grenade en Algérie est 421 136 Qx. En remarque que la wilaya de Mostaganem enregistre une grande production avec 186261 Qx, suivi par Djelfa 110 760 Qx. La wilaya de M'sila est classée la quatrième en terme de production de grenade soit 31 960 Qx.

### I-8-3-Production de grenade dans la wilaya de M'sila

La wilaya de M'sila montre une production importante de grenade qui se répartie dans sept régions dont celle de Sidi Ameur est en tête de la production avec 10800 Qx. (Tableau 02) regroupe les informations nécessaires sur la production de grenade dans la wilaya de M'sila.

**Tableau02:** Production de grenade dans la wilaya de M'sila (DSA, 2018).

|                   | Superficie plantée<br>(Ha) | Superficie en<br>rapport(Ha) | Production (Qx) |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------|
| <b>Sidi Ameur</b> | 155                        | 152                          | 10800           |
| <b>Hamamdalâa</b> | 100                        | 98                           | 6250            |
| <b>El Hamel</b>   | 55                         | 55                           | 3830            |
| <b>Maàrif</b>     | 50                         | 49                           | 3220            |
| <b>Maadid</b>     | 35                         | 33                           | 2180            |
| <b>M'sila</b>     | 35                         | 32                           | 2100            |
| <b>Ouledaddi</b>  | 5                          | 5                            | 330             |

### I-9-Variétés de grenadier

Il existe un grand nombre de variétés de grenades qui ne se différencient pas seulement par leur morphologie, mais aussi par leur composition physicochimique, en particulier par leur teneur en sucre, en acide, vitamine C, en polyphénols et leur rendement en jus. Selon cette composition en sucre et en acide, les variétés sont souvent réparties en grenades aigres, aigres-douces et douces (Cemeroglu et al., 1992 ; Megarejo et al., 2000).

#### I-9-1-Principale variété existant en Algérie

Bien que le grenadier soit peu exigeant, les plantations ne sont pas très importantes en Algérie. Il existe de nombreuses variétés de grenades, de qualités très différentes. Les variétés les plus cultivées en Oranie seraient : *Tendral* (appelée *Molla*), *Blanca*, *Si Hueso*, *Colorado*. Plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans des petits jardins en Kabylie, on ne connaît que leur appellation locale (*Lahlou*, *Elmouze*, ..) (Chouaki et al., 2006). (Tableau03) regroupe les différentes variétés de grenade commercialisées en Algérie.

**Tableau03:** Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie (INRAA, 2006).

| Variétés de grenadier commercialisées en Algérie |               |               |
|--|---------------|---------------|
| Selection station                                | Corda travita | Doux de Kolea |
| Messaad  | Sefri         | Zemdautomne   |
| Spanish duoy                                     | Chelfi        | Moller huesso |
| Mellisse   | Sulfani       | Gajin         |
| Espagne rouge                                    | Papers shell  |               |

Selon le tableau, il existe 14 variétés de grenadier qui sont commercialisées dans notre pays.

### I-9-2-Description de quelque variété dans le monde

En Tunisie on trouve les variétés: *Zéri, Gabsi, Chelfi, Tounsi* ou *Tunsi, Maïki, Djelbi*. Au Maroc on trouve la variété: *Meknes* (Wald, 2009).

**Tableau04:**Caractéristiques des principales variétés de grenade dans quelques pays (Cauard, 2013).

| Zone géographique | Variété                   | Couleur externe | Couleur arilles | Goût des arilles |
|-------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| U.S.A.            | <i>wonderful</i>          | Rouge foncé     | Rouge           | Doux / Acide     |
| Espagne           | mollarde Elche            | Rose / Jaune    | Rouge clair     | Doux             |
| Palestine         | herskowitz<br>hershkovitz | Rouge foncé     | Rouge clair     | Acide            |
| Palestine         | acco                      | Rouge           | Rouge foncé     | Doux             |
| /                 | emek                      | Rouge foncé     | Rouge           | Doux / Acide     |
| Inde              | baghwa                    | Rouge clair     | Rouge clair     | Doux             |
| Turquie           | hicaz                     | Rouge           | Rouge clair     | Doux / Acide     |
| Palestine         | shani                     | Rouge           | Rouge foncé     | Doux             |
| Inde              | early Foothill            | Rouge foncé     | Rouge           | Acide            |

## **I-10- Principale Ravageurs et maladie de grenadier**

Le grenadier est peu soumis aux attaques de pathogènes. Les principaux problèmes de cultures sont liés à la fertilisation (éclatement du fruit). Toutefois certains ravageurs peuvent créer des problèmes dans les vergers (Day et Wilkins, 2009).

### **I-10-1-Puceron**

Parmi les principaux ravageurs et maladie du grenadier, il y a le puceron *Aphis punicae* qui colonise les jeunes pousses printanières et contribue à une forte altération qualitative et quantitative de la production (Fakhour& Sekkat, 2006).*Aphis punicae*(Hém. Aphididae) Est le ravageur majeur des grenades en Iran (Firoozi et *al.*, 2015).

### **I-10-2-Ceratitiscapitata Wiedemann**

La mouche méditerranéenne des fruits, *C. capitata* (Diptère, Tephritidae) a été signalé comme ravageur de grenade en Turquie, en Espagne et dans d'autres régions de la Méditerranée (Ozturk & *al.*, 2005 ; Özturk& Ulusoy, 2009 ; Juan & *al.*, 2000 ;Delrio & Cocco, 2012).

### **I-10-3-Zeuzères *Zeuzera pyrina* L.**

Le foreur de la tige (*Zeuzera pyrina* L., Lepidoptera: Tortricidae) est un organisme nuisible important qui attaque les tiges et les troncs qui causent la mort des arbres (Holland et *al.*, 2009).Il a été détecté en Algérie. Et en Tunis Les dégâts sont importants dans les zones côtières du nord (Mars, 1995).

### **I-10-4-Nématodes (*Méloïdogynes*)**

Les nématodes Meloïdogyne (Root-knot nématodes) sont des vers ronds de la famille des Tylenchida. Les symptômes d'une attaque de Meloïdogyne sont caractéristiques et aisés à remarquer. Le système racinaire est envahi de galles (jusqu'à 1 cm de diamètre) qui perturbent l'assimilation des nutriments et le dysfonctionnement racinaire. Ces nématodes provoquent le dépérissement des parties aériennes (chloroses, flétrissement). La croissance est réduite ce qui donne de petits fruits de mauvaise qualité (Bertrand, 2001).

### **I-10-5-Aspergillus castaros**

Une maladie fongique entraîne la pourriture du fruit dont les graines deviennent

noires et impropres à la consommation. Les dégâts sont importants dans les zones fortement humides (Walali & *al.*, 2003 ; Oukabli, 2004).

### **I-10-6-Acarien de grenadier *Tenuipalpus punicae***

Ces acariens sont nuisibles en aspirant le jus dans les feuilles, les pousses et les fruits. Ils apportent des tâches de couleur gris argenté aux sites d'insertion de fruits, arrête le développement des pousses. De plus, les fruits sont susceptibles de rester petits, entraînant la perte de la teneur et de la qualité en sucre des fruits, entraînant la chute des feuilles et des fruits (Jeppson *et al.*, 1975 ; Gerson, 2008).

La peau de fruit perd complètement sa vitalité à la suite d'une nutrition intense et devient dur et a une structure délicate (Doker & *al.*, 2013).

### **I-11-Valeur nutritionnelle de la grenade**

Les valeurs nutritionnelles de grenadier sont portées dans (LeTableau05)

**Tableau05:** Valeur nutritionnelle de grenadier (pour 100 g de portion comestible) (Anonyme,2009).

| <b>Composition</b>        | <b>Quantité</b> |
|---------------------------|-----------------|
| <b>Eau</b>                | 80-82,3 g       |
| <b>Valeur énergétique</b> | 63-78 Kg        |
| <b>Protéines</b>          | 0 ,5-0,95 g     |
| <b>Matières grasses</b>   | 0,3-0,9g        |
| <b>Glucides</b>           | 16.4g           |
| <b>Fibres</b>             | 0,2-0,6g        |
| <b>Cendres</b>            | 0,5g            |
| <b>Phosphore</b>          | 8,0 mg          |
| <b>Fer</b>                | 0,3 mg          |
| <b>Potassium</b>          | 259mg           |
| <b>Calcium</b>            | 3,0mg           |
| <b>Sodium</b>             | 3,0 mg          |

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| <b>Manganèse</b>           | 3,0mg   |
| <b>Cuivre</b>              | 0,07mg  |
| <b>Sélénium</b>            | 0,6mg   |
| <b>Acide pantothénique</b> | 0,596mg |
| <b>Vitamine B1</b>         | 0,03mg  |
| <b>Vitamine B2</b>         | 0,03mg  |
| <b>Vitamine B3</b>         | 0,03mg  |
| <b>Vitamine C</b>          | 04-6mg  |

## **I-12-Utilisation du grenadier**

### **I-12-1-Utilisation traditionnelle de *Punica granatum***

Les fruits de grenadier ainsi que ses graines, son écorce, son épicarpe et ses fleurs sont utilisés depuis des milliers d'années pour leurs propriétés médicinales au Moyen-Orient, en Asie et en Amérique Latine, régions dont cet arbuste est originaire. Il est utilisé historiquement pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires (Afaq & al., 2005).

### **I-12-2-Consommation de la grenade**

La grenade peut être utilisée en fruit de table, ainsi le fruit se mange naturellement ou accompagné de sucre, les grains de grenade peuvent servir à garnir une salade de fruits, lui apportant une saveur sucrée acidulée. La grenade peut aussi être employée pour la confection de sorbets ou coulis, en passant les grains pulpeux au moulin à légumes, afin d'obtenir un jus épais, sombre et parfumé, qui servira de base à ces préparations (Saad, 2013).

Le suc de grenade est également utilisé dans la préparation de gelées alimentaires. Le sirop de grenadine était autrefois réalisé avec des grenades fraîches. La vraie grenadine, de couleur rouge vif, est un sirop concentré de suc de graines de grenade (Saad, 2013).

### **I-12-3-Utilisation médicinal**

#### **I-12-3-1-Activités antioxydants**

Des études *in vitro* ont démontré que le jus de grenade et les extraits de graines du grenadier ont 2 à 3 fois la capacité antioxydante du thé vert en piégeant les radicaux libres

et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux (Basu *& al.*, 2009).

Dans le jus de grenade les principaux polyphénols antioxydants sont les ellagitannins et les anthocyanines. Les ellagitannins comptent pour 92% de l'activité antioxydant du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit (Seeram *et al.*, 2004).

### **I-12-3-2-Activités thérapeutiques**

Toutes les parties du fruit du grenadier semblent avoir des propriétés thérapeutiques et certaines études rapportent que l'écorce, les racines, les feuilles et le tronc ont aussi des effets médicaux bénéfiques. Des recherches actuelles semblent indiquer que les principaux constituants thérapeutiques du grenadier sont les ellagitannins (incluant les punicalagins), l'acide punique, les flavonoïdes, les anthocyanidines, les anthocyanines, les flavonols estrogéniques et les flavones (Jurenka, 2008).

### **I-12-3-3-Activité anticancéreuses**

L'acide ellagique, l'acide caféique, la luteoline et l'acide punique, sont tous des composés avec des actions anticancéreuses connues. Le jus fermenté, l'écorce de grenade, et l'huile de pépins de grenade, lorsqu'ils sont combinés, cet ensemble Inhibe la prolifération, l'invasion et la sécrétion de phospholipase A2 (sPLA2) dans le cancer de la prostate. (Lansky, 2005).

### **I-12-3-4-Protection contre les maladies cardiovasculaires**

L'effet de la consommation de jus de grenade par des patients hypertendus sur leur tension artérielle et sur l'activité l'enzyme de conversion sérique a été décrit, on observe une diminution de l'activité de l'AC sérique et une réduction de la tension artérielle systolique. (Aviram *& al.*, 2001) .

### **I-12-3-5-Effet antidiabétique**

Il a été mentionné que les mécanismes hypoglycémiques de l'extrait de fleurs de grenadier sont similaires à ceux de l'acarbose, 10- $\alpha$ -glucosidase inhibiteur utilisé dans le traitement de la maladie de type 2. (Katz, 2007).

L'extrait aqueux de l'écorce de grenade était également significativement hypoglycémiant, et il est suggéré de l'utiliser pour traiter le diabète type 1 aussi bien que pour type 2. (Katz, 2007).

### **I-13-Récolte et conservation :**

Les grenades parviennent à partir de la fin de l'automne (Dubois, 2006). Il est prudent de faire la cueillette des grenades avant leur complète maturité, quand leur écorce commence à rougir (Afaq et al., 2005). Quand on les cueille un peu plus tôt, on peut les conserver plusieurs semaines dans un endroit frais et sec. L'écorce des fruits est très dure. Épluchez –les au couteau ou coupez – les en quartiers pour pouvoir extraire les grains de leur enveloppe fibreuse sans trop en perdre. (Dubois, 2006).

### **I-14-Modes production de grenadier :**

#### **I-14-1-Multiplication Végétative :**

La multiplication du grenadier peut se faire par semis, par boutures, par marcottage, par drageons ou par greffes (Afaq, 2005).

##### **I-14-1-a-Semi**

Le semis a lieu au printemps, en pépinière, avec la graine récoltée la même année. Il faut choisir, pour cette opération, la graine des variétés à fruits acides et de maturité tardive. En effet, ces variétés sont, en général, plus rustiques que celles à fruits doux et donc mieux adaptés à ce mode de multiplication. Cependant, le semis est peu utilisé, car ce procédé est long et donne des résultats non homogènes (INRA de Béni Mellal, 2008).

##### **I-14-1-b-Bouture**

La bouture est un mode de multiplication végétative. Le bouturage est simple sur le grenadier et donne, en général, de bons résultats (Mars, 1995). En février-mars, on taille les boutures de 20 à 25 cm de longueur et de 0,5 cm d'épaisseur. Puis, ces boutures sont mises en pépinière, de telle sorte qu'un seul œil reste au-dessus du sol, tous les autres étant enterrés. Elles s'enracinent alors facilement et rapidement. Dès le printemps suivant, elles peuvent être mises en place. Cependant, il est plus prudent de les laisser en pépinière pendant deux saisons. C'est ce qu'il est couramment fait (Wald, 2009).

Ce procédé de bouturage favorise une repousse plus vigoureuse et rapide du jeune arbre, mais les racines sont moins développées (Wald, 2009).

### **I-14-1-c-Marcottage**

Le marcottage est un mode de multiplication végétative. La technique du marcottage consiste à multiplier une plante en provoquant l'enracinement d'un rameau, alors que celui-ci est toujours solidaire de la plante mère. La partie de la plante placée en terre émet alors des racines adventives. Lorsque ces racines sont suffisamment développées, la branche est coupée pour séparer le jeune plant de la plante mère. Le marcottage est une technique de multiplication simple, mais un peu longue ; l'enracinement n'intervient parfois qu'au bout d'une année (Wald, 2009).

### **I-14-1-d-Drageonnage**

Le drageon est également un mode de multiplication végétative. Il est issu de la racine d'une plante. Quand celui-ci a acquis suffisamment de force, il est séparé de la plante mère et mis en terre. Cela donne un nouveau pied. La multiplication par drageons chez le grenadier est assez simple car cet arbre en produit parfois abondamment. Ce procédé est, semble-t-il, assez souvent employé dans la région méditerranéenne (Wald, 2009).

### **I-14-1-1-e-Greffe**

La greffe permet de reproduire authentiquement le matériel végétal, associant les caractéristiques du porte-greffe et du greffon. C'est une technique rarement employée chez le grenadier (INRA de Béni Mellal, 2008).

## **I-14-2-Artificielle par la technique de culture in vitro**

### **Historique**

La multiplication *in-vitro* trouve son fondement dans le concept de " totipotence cellulaire"

En 1878, il y a donc plus de 120 ans. Cl Bernnard formulait les principes théoriques de la création d'un système artificiel dans lequel les organes pourraient survivre hors de l'influence de l'organisme entier. Depuis cette orientation de recherche lentement d'abord, d'une manière plus rapide ensuite, a permis de grands développements à la biologie (Nozron et Bancihon, 1972).

- Les catégories de la culture *in vitro* est :

### **I-14-2-a-Micropropagation**

La Micropropagation *in-vitro* apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé (Dris, 2005). Cette technique permet la multiplication végétative de plusieurs plantes alimentaires, médicinales et horticoles (Bretaudeau et Faure, 1992).

### **I-14-2-b-Culture de méristème**

Le méristème est un petit organe composé de cellules méristématiques à division rapide, il constitue le matériel idéal de départ étant donné que le méristème se développe d'une manière génétiquement stable et réduit le niveau d'infection virale (Espinosa et al, 1992). Cette technique est donc utilisée pour obtenir des plantes saines à partir des plantes viroses (Auge, 1989 ; Griffiths et *al.*, 1990).

Dès 1952, George Morel a réussi à obtenir une plante entière à partir d'un méristème (Dris, 2005), et selon Téoulé, chez une plante virose la répartition du virus semble très variable selon l'organe, le méristème en particulier est une structure très protégée et est généralement indemne de virus (Téoulé, 1999).

### **I-14-2-c-Embryogénèse somatique :**

Un apport important de la technique des cultures *in-vitro* à la biologie a montré que des cellules somatiques pouvaient produire des structures comparables à des embryons, méritant l'appellation d'embryons somatiques (Margara, 1982). Ces embryons peuvent se développer à partir des cellules à 2n chromosomes issues de feuilles, racines ou tige (Auge, 1989). L'embryogénèse somatique est un processus par lequel les cellules du sporophyte donnent naissance, sans fusion gamétique (Seabrook et Douglass, 2001), à des embryons qui passent par des stades embryologiques caractéristiques (Redenbaugh, 1993 ; Gray et *al.*, 1995).

### **I-14-2-d-Grenadier *in vitro***

Des études ont été menées sur la Micropropagation des grenadier, ce qui a permis de mettre au point de nouveaux protocoles dans les quels la régénération se faisait par

organogénèse indirect en utilisant des anthères, des feuilles et des cotylédons comme explant (Deepika et Kanwar, 2010 ; Patil et *al.*, 2011).

Des protocoles ont également été établis dans lesquelles des plantules ont été générées par embryogénèse somatique à partir d'explants tels que des pétales (Patil et *al.*, 2011).

# Chapitre II

## Matériel et méthodes

## II-1 -Matériel végétal

On a utilisé les deux variétés de grenadiers suivants:

- Tounsi
- Khodrie

## II-2 -Préparation de milieu MS

Afin de déterminer les conditions nutritives les plus favorables à la croissance des explants nous avons choisi le milieu: MS (Murashige et Skoog, 1962). Les constituants principaux de ce milieu sont l'eau ionisée et les sels minéraux qui se répartissent en deux groupes, les macro-éléments (N, P, K, S, Mg, Ca) et micro-éléments (Fe, B, Mn, Zn, Cu, N, Co, Mo, I). La source de carbone est le saccharose et dans ce milieu, on trouve les vitamines, les acides aminés, les régulateurs de croissance et on réalise la solidification à l'aide de l'Agar. (Tableau06)(Cahier des références technique, 19990).

**Tableau 06:** Constituants du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962).

| Ingrédients                | Solution mère g/l                                     | Volume de prélèvement g | Volume de prélèvement g |
|----------------------------|---|-------------------------|-------------------------|
| Macroéléments              | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                       | 33 000                  | 50ml                    |
|                            | KNO <sub>3</sub>                                      | 38 000                  |                         |
|                            | CaCl <sub>2</sub> - 2 H <sub>2</sub> O                | 8 800                   |                         |
|                            | MgSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O                | 7 400                   |                         |
|                            | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 3 400                   |                         |
| Micro-éléments             | MnSO <sub>4</sub> - H <sub>2</sub> O                  | 2 230                   | 10ml                    |
|                            | ZnSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O                | 860                     |                         |
|                            | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 620                     |                         |
|                            | KI  | 83                      |                         |
|                            | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> - 2 H <sub>2</sub> O | 25                      |                         |
|                            | CuSO <sub>4</sub> - 5 H <sub>2</sub> O                | 2.5                     |                         |
|                            | CoCl <sub>2</sub> - 6 H <sub>2</sub> O                | 2.5                     |                         |
| Fe -EDTA                   | Na <sub>2</sub> EDTA                                  | 3 730                   | 10ml                    |
|                            | FeSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O                | 2 780                   |                         |
| Vitamines et acides aminés | Glycine   | 20 mg pour 100L         | 10ml                    |
|                            | Acide Nicotinique                                     | 5 mg pour 100 L         |                         |
|                            | Pyridoxine. HCl                                       | 5 mg pour 100 L         |                         |
|                            | Thiamine HCl  | 1 mg pour 100 L         |                         |
| Sucre                      | Myo-inositol  | 1 mg pour 100           | 1 mg pour 100           |
|                            | Saccharose  | 30000mg                 |                         |
| Agar                       | Agar  | 10 000 g                | 10 000 g                |

**II-3-Préparation des solutions mères de milieu MS :****II-3-a-Préparation de la solution mère de macro-éléments :**

Elle consiste à :

- Verser 600 ml d'eau distillé dans un bécher de 1 L ;
- Peser et dissoudre chacun des sels indique macro-éléments (Tableau06) ;
- Transférer la solution dans un flacon hermétique de 1litre et compléter à 1 liter avec l'eau distillée ;
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

**II-3-b-Préparation de la solution mère de micro-éléments :**

Elle consiste à :

- Verser 600 ml d'eau distillé dans un bécher de 1 L ;
- Peser et dissoudre chacun des sels indique micro-éléments (Tableau 06)
- Transférer la solution dans un flacon hermétique de 1litre et compléter à 1 liter avec l'eau distillée ;
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

**II-3-c-Préparation de la solution mère de Fe-EDTA :**

Elle consiste à :

- Verser 600 ml d'eau distillé dans un bécher de 1 L ;
- Ajouter quelque gouttes de Na OH (1) et chauffer jusqu'à ébullition ;
- couper la source de chaleur ;
- Ajouter  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  et mélanger jusqu'à dissolution Fe-EDTA(Tablau06) ;
- Ajouter  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et mélanger jusqu'à dissolution ;
- Transférer la solution dans un flacon hermétique de 1litre et compléter à 1liter avec l'eau distillée ;
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

**II-3-d-Préparation de la solution mère des vitamines :**

Préparation des solutions mères de consiste à :

- Verser 70 ml d'eau distillé dans un bécher de 100 L ;
- Peser et dissoudre chacun des sels indique vitamines et acides aminées (Tableau);
- Transférer la solution dans un flacon hermétique de 1 litre et compléter à 1 liter avec l'eau distillée ;
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

**II-4- Préparation du milieu MS pour 1 litre :**

- Verser approximativement 600 ml d'eau distillé dans un bécher de 1 L ;
- Ajouter le volume nécessaire de macro-éléments, micro-éléments, Fer, vitamine, et régulateur de croissance ;
- Ajouter le PH à  $5,7 \pm 0,1$  avec HCl (1N) ou Na OH (1) ;
- Compléter à litre avec l'eau distillée ;
- Peser et dissoudre le saccharose et myo-inositol le en chauffant légèrement au besoin ;
- Chauffer puis ajouter l'Agar graduellement jusqu'à ce que le milieu devienne clair
- Verser dans des flacons pour faire la stérilisation.

**II-5-Stérilisation de milieu de culture :**

La stérilisation milieu de culture, est assurée par l'autoclave à une température de 120° C, et pendant 20 minutes, la technique de la *culture in vitro* exige cette température, afin de s'assurer de la destruction totale des bactéries.

**II-5-a-Stérilisation des instruments :**

Tous les instruments métalliques (pinces, pointes, bistouris ...) ou verreries (béchers, tubes de culture, boites de pétris...) sont enrobés avec du papier aluminium, et sont mis à l'étuve à une température de 120°C pendant 30 min du temps, ils ne sont découverts, que sous la hotte, au moment de leur utilisation.

Au cours de la manipulation les instruments métalliques sont plongés dans l'alcool é 70% puis passés aux flammes du bec Benzène.

**II-5-b-Stérilisation de la hotte :**

Avant de commencer la manipulation, on nettoie la hotte avec de l'eau de javel (1 3%) puis à l'alcool (70%) à l'intérieur des parois et la surface de travail et la mise

en marche de la ventilation. On prépare tout la nécessaire et on laisse la hotte allumer pendant 20 minutes avant de commencer l'ensemencement des explants.

### **II-6-Ensemencement des explants :**

Ensemencement des explants se fait sous la hotte dans des conditions aseptiques.

- Avant de commencer la manipulation, on se lave les mains avec du suivi de l'alcool à 70° ;
- les mains seront frottées souvent à l'alcool (70%), après qu'elles aient été en contact avec du matériel non stérile même sous la hotte à flux laminaire (Boulay, 1993) ;
- Pour stériliser les instruments, on les place dans l'alcool puis les flamber pour la stérilisation totale, on répète cette opération avant chaque utilisation ;
- Il faut ouvrir les tubes à essai dans la zone stérile, les explants sont déposés de façons bien en contact avec le milieu de culture. L'ouverture du tube à repiquer est enflammée avant et après repiquage. Et on le ferme rapidement ;
- Le repiquage des explants sur le milieu de culture est effectué à l'aide de pince stérilisée et de la flamme du bec bunsen ;
- On étiquète les tubes les puis les mettre dans la chambre de culture.
- Repiquage des explants dans le milieu MS avec différent concentration des hormones (BAP et 2-4D).

### **II-7-La chambre de culture :**

Les tubes refermés sont placés dans une la chambre de culture sous une photopériode de 16h et à une température ambiante de 22°C. Des observations ont été effectuée chaque semaine de suivre le développement et la croissance des explants, ainsi que l'élimination des tubes contaminées.

A la fin de chaque semaine, on fait les mesure de nombre de feuilles (NF) émises est compté et la longueur totale des feuilles (LF), nombre de bourgeon (NB) est estimée l'aide du papier millimètre.

### **II-8-Traitement statistique :**

L'interprétation des données concernant l'effet de différentes hormones utilisées, est réalisé par une analyse de variance en utilisant le logiciel STAT-BOX 6,4 a été

utilisée pour traitement des résultats qui consiste à rechercher si l'effet est significatif avec certain risque d'erreurs. Le test suivi appliqué la comparaison des moyennes au NEWMAN KEULS au seuil de caractères présente des différences significatives.

Chapitre III

## Chapitre III

Résultats et discussion

## Résultats et discussion

### III-1-Régénération et développement *in vitro* de grenadier dans un milieu MS+ BAP+2,4D

#### III-1-1-Types morphologiques obtenus (Organogenèse)

##### a-Nombre des feuilles

##### ➤ Nombre des feuilles pour la concentration 0,5 mg/l (BAP et 2-4D)

L'analyse montre que chez les deux variétés l'émission des feuilles apparaissent après une semaine de culture, on a remarqué que :

- ✓ L'apparition d'une seule, deux ou trois feuille dans les vitro plants.
- ✓ La variété Khodri est la plus développée par rapport à la variété Tounsi avec plus de 1feuille dans la quatrième semaine.
- ✓ Après la variété Khodri vient la variété Tounsi avec une moyenne d'apparition de la feuille presque 0.3 dans la première semaine (Photo4).



A = Khodri

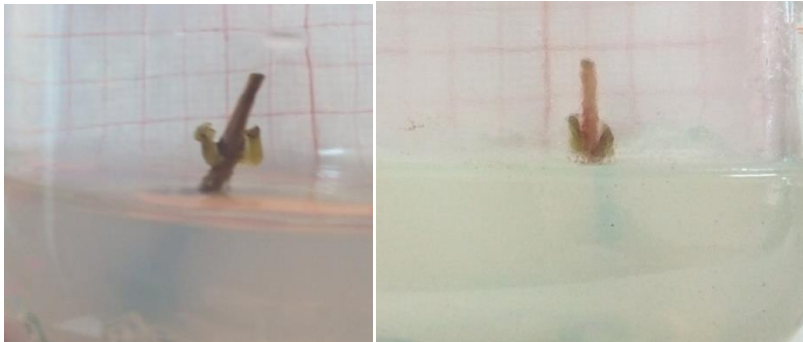
B=Tounsi

**Photo 4:** Formation des feuilles dans la concentration 0,5 mg/l (BAP et 2-4D).

##### ➤ Nombre des feuilles pour la concentration 1 mg/l (BAP et 2-4D) :

L'analyse montre que dans le milieu MS+1mg/l de BAP et 2-4Dmg/l l'émission des feuilles apparaissent après une semaine de culture chez les deux variétés Khodri et Tounsi on a remarqué :

- ✓ La variété Khodri est la plus développée par rapport à la variété Tounsi.
- ✓ La variété Tounsi vient en deuxième position avec presque 0.6 feuille (Photo 5).



A= Khodri 3<sup>ème</sup> semaine      B=Tounsi 3<sup>ème</sup> semaine

**Photo 5:** Formation des feuilles pour la concentration 1 mg/l (BAP et 2-4D).

➤ **Nombre des feuilles pour la concentration 2 mg/l (BAP et 2-4D)**

On a remarqué que :

- ✓ L'émission des feuilles après la première semaine et la deuxième semaine chez les deux variétés est un peu faible dans le milieu MS+2 mg/l de BAP et 2-4D.
- ✓ La variété Khodri se développe mieux que la variété Tounsi après la première semaine (Photo 6).
- ✓ Dans la S3 et S4 de culture on a observé une augmentation du nombre chez la variété Khodrie .



A=Tounsi 2<sup>ème</sup> Semaine

B=Khodri 1<sup>ère</sup> Semaine

**Photo 6:** Formation des feuilles pour la concentration 2 mg/l (BAP et 2-4D).

**b-Longueur des feuilles :****➤ Longueur des feuilles pour la concentration 0,5 mg/l (BAP et 2-4D)**

.On a remarqué que :

- ✓ Le développement de longueur de feuille apparait chez les deux variétés ;
- ✓ Chez la variété Khodrie la moyenne de la longueur de feuille est très élevée et remarquable dans les 4 semaines
- ✓ La variété Khodrie est plus développée par rapport aux variétés Tounsi ce dernier est très faible.

**➤ Longueur des feuilles pour la concentration 1mg/l (BAP et 2-4D)**

On a remarqué que :

- ✓ Dans cette concentration 1mg/l, la croissance de longueur des feuilles est remarquable dans les deux variétés.
- ✓ La variété Khodrie est la plus développée dans les quatre semaines.

**➤ Longueur des feuilles pour la concentration 2mg/l (BAP et 2-4D)**

on a observé que:

- ✓ La longueur des feuilles sont développées chez les deux variétés après une semaine.
- ✓ Pour la longueur des feuilles obtenues la variété khodri est la plus développée.

**III-1-2- Formation des cals :**

On a remarqué :

- ✓ Des cals apparaissent chez les deux variétés après 15 jours de culture mais avec des moyennes différentes La variété Khodrie est la plus développée par rapport à la variété Tounsi. (Photo 7)



A=Khodri 3<sup>ème</sup> Semaine.

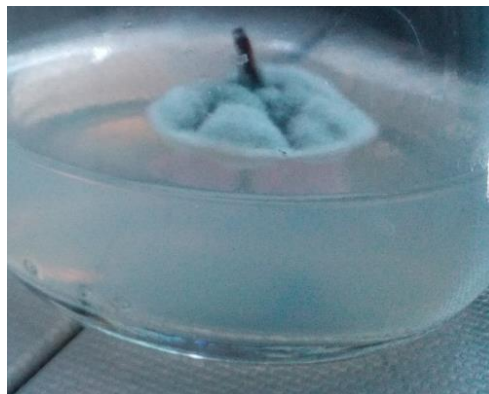
**Photo 7:** Formation des cals.

### III-2- Contraintes de la culture

On a remarqué que les deux variétés Khodrie et Tounsi sont infectées par deux types d'infections soit elle est bactérienne ou fongiques.

#### III-2-1- Contamination par des champignons

- ✓ Après une semaine de la culture la variété Khodri est moins contaminée par rapport la variété Tounsi.
- ✓ Les Contamination augmentent chez la variété Tounsi pendant les 4 semaines par rapport La variété Khodri qui est peu contaminé. (Photo 8).



A=Khodrie 2<sup>ème</sup> Semaine.

**Photo 8:** Contamination par des champignons

### III-2-2- Contamination bactérienne

Après une semaine de la culture la contamination bactérienne présente chez la variété Tounsi et chez la variété Khodri ( photo 9)



B=Tounsi 1<sup>ère</sup> Semaine

**Photo9:** Contamination par des champignons

# Conclusion

## Conclusion

---

### Conclusion

Contrairement à la multiplication traditionnelle, les nouvelles techniques de multiplication *in vitro* d'arbre fruitière à considérablement augmenté au cours des dernières décennies car la difficulté de l'agriculture et la perte de temps, les 30 dernières années ont été marquée par une série d'avancées technologique, dans le domaine de la régénération *in vitro* de grenadier par la culture *in vitro*.

Sur cette base, notre travail était sur la régénération *in vitro* de deux variétés de grenadier. Et après l'expérience on a conclue que :

- Les différentes concentrations de BPA et 2-4D à un effet remarquable sur le développement de nombre de feuille des deux variétés :
  - ✓ Chez la variété Tounsi la meilleure concentration est 1mg/l
  - ✓ Chez la variété Khodrie la meilleure concentration est 0.5mg/l
- Les différentes concentrations de BPA et 2-4D à un effet remarquable sur le développement de la longueur de feuille des deux variétés :
  - ✓ Chez la variété Tounsi la meilleure concentration est 1 mg/l
  - ✓ Chez la variété Khodrie la meilleure concentration est 0.5mg/l
- Concernant la formation des cals les résultats de notre étude nous ont amené à confirmer le milieu utilisé est favorable surtout avec la concentration 2mg/l chez la variété Khodri, et 0.5 mg/l chez la variété Tounsi.
- La contamination infecte les deux variétés. mais la variété Tounsi est plus infectée que la variété Khodrie.

-En perspectives, la poursuite de ces travaux est envisagée, afin d'aboutir à l'amélioration du rendement de la Micropropagation et de prendre en considération les facteurs influençant la culture *in vitro* (stérilisation et type d'explant ...ect) Pour éviter les résultats indésirables.

## Référence bibliographique

---

- **Abbayes, H-Des. (1963).** Botanique-Anatomie - Cycles évolutifs systématiques-Ed. Masson et Cie. p.775.
- **Afaq, F., Malik, A., Syed, D., Maes, D., Matsui M-S. & Mukhtar, H. (2005).** Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes paragraph sign. *Photochemistry and Photobiology*. 81: pp 38-45.
- **Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C-G., Reed, J-D., Mukhtar, H. (2005).** Anthocyanin- and hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulate MAPK and NF-Kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD- mice. *International Journal of Cancer*, 113:Pp 423-433.
- **Amourettim, C., Comet, G. (1992).** Cahier d'histoire des techniques-Des hommes et des plantes : plantes méditerranéennes, vocabulaire et usages anciens. Publications de l'université de Provence. 174 p.
- **Anonyme. (2009).** Document de projet pour une norme régionale pour la grenade.CX/NEA .6p.
- **Ashton, R. (2006).** The Incredible Pomegranate : Plant and Fruit. Third Millennium Publishing. p1-118.
- **Auge, R. (1989).** La culture in-vitro et ses applications horticoles. Editeur:Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France.
- **Aviram, M.; Dornfeld, L. (2001).** Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure-*Atherosclerosis*: Pp 195-198.
- **Basu, A., Penugonda, K. (2009).** Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutr Rev*. 67(1): Pp49-56.
- **Bertrand, C. (2001).** Lutte contre les nématodes à galles (*Meloïdogyne* spp.) en agriculture biologique. [Root knot nematode (*Meloïdogyne* spp.) control in organic farming.] Itab-GRAB.4p.
- **Bretonneau, J., et Faure, Y. (1992).** Atlas d'arboriculture fruitière. Volume I. Editeur: Tec et Doc, Lavoisier. Paris. France.

## Référence bibliographique

---

- Calin Sanchez Angel & Carboneli Banaching Angel A. (2005).** La grenade cultivées en Espagne Punicalogine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Livre. Natural ontioxydant granatum+ et université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, 77p.
- Cauchard, P. (2013).** La grenade : Organisation de la filière, opportunités et contraintes pour son développement. Thèse. Ing. Inst. Nati. agro. Univ. France. 40p.
- Cemeroglu, B., Artik, N., & Erbas S. (1992).** Gewinnungvon Granatap - felsaftund seine Ausammensetzung . *Flussiges Obst*, 59. Pp335-340.
- Chadli, R., Bouzid, A., Bouzid, K-h, Nader, H. (2015).** Bactericidal effect of aqueous extracts of the bark of the pomegranate (*Punica granatum* L.) on Bacteria. *European Journal of Molecular Biotechnology*, vol (7), no 1.Pp.4-11.
- Chakass ,M-A., Carbonnier-Jarreau ,M-C., Verhille ,A-M., Reduron, J-P. (2007).** Étude palynologique de trois variétés du grenadier (*Punica granatum*) au Liban. *Acta Botanica Gallica*, vol (154), no (1). Pp. 27-42.
- Chouaki , S., Bassadlk, F., Chebouti, A., Maamri ,F., Oumata, S., Kheldoun, S., Hamana M-F., Douzene, M., Bellah, F., & Kheldoun, A. (2006 ).** Deuxième rapport national sur l'état des ressources Phytogénétiques . INRAA. 92p.
- Courchet, L. (1897).** Traité de botanique : comprenant l'anatomie et la physiologie végétales et les familles naturelles, à l'usage des candidats au certificat d'études physiques, chimiques et naturelles des étudiants en médecine et en pharmacie -*Editions Baillière*. Pp1019-1023.
- Cahier de reference techniques. (1999).** Ed, CIDES, 21p.
- Day, K., Wilkins, E. (2009).** Commercial Pomegranate (*Punica granatum* L.) Production in California. *In Proceedings of the Second International Symposium on Pomegranate and Minor including Mediterranean Fruits (ISPMMF-2009), Dharwad, Inde.* 275-285pp.
- Del Rrio, G., Coccoa. (2012).** Lutte intégrée contre les parasites d'agrumes dans la région méditerranéenne. Chap. XV. Tephritidae. Vincenzo Vacante et Uri Gerson (Eds) Sciences. Bentham Publishers. pp. 206-222.
- Dubois, C. (2006).** Les arbres fruitiers. Édition Rustica /FLER, Paris .127p.

## Référence bibliographique

---

- **D.S.A. (2017)**. Direction des services agricoles, communication personnelle.
- **D.S.A. (2018)**. Directions des services agricoles.
- **Deepika, R., and Kanwar, K. (2010)**. *In vitro* regeneration of *Punica granatum* L. plants from different juvenile explants. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 18(1):pp5-22.
- **Doker, I., Kazak, C., Karut, K. (2013)**. Türkiye için yeni bir nar zararlısı; Nar yassı akarı, *Tenuipalpus punicae* Pirtchard and Baker (Acari: Tenuipalpidae). *Türk. entomol. Bült*, 3 (2): Pp113-117p.
- **Dris, R. (2005)**. Crops: Growth, quality and biotechnology. Editeur : WFP pub, Helsinki, Finland.
- **Evreinoff, V. (1957)**. Contribution à l'étude du Grenadier - Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée .Pp 124-138.
- **Erkan, M., Kader A-A. (2011)**. Pomegranate (*Punica granatum* L.). In Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Mangosteen to White Sapote. pp. 287-313.
- **Espinoza, N., Lizzarraga, R., Siguenas, C., Buitron F., Brayn, J. et Dodds, J-H. (1992)** Tissue culture : Micropropagation, conservation and export of potato gerplasm. Editeur: CIP Research Guide, International Potato Center, Lima, Peru: p 19.
- **Fakhour, S., Sekkat, A. (2006)**. Première liste des insectes nuisibles sur grenadier dans la plaine du Tadla. Dans : *6ème Congrès de l'AMPP, Rabat, Maroc. MAPM, 2005. Répartition régionale de la superficie et de la production*.
- **Firoozi, A-A., Taha, M-R., & Khan, T-A. (2015)**. Assessment of Nano-Zeolite on Soil Properties, *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, 8(19): Pp292-295.
- **Gray, D-G., Compton, M-E., Harrell, R-C., et Cantliffe, D-J. (1995)**. Somatic embryogenesis and the technology of synthetic seed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 30: Pp 126-151.
- **Griffiths, H-M., Slack, S-A. et Dodds, J-H. (1990)**. Effect of chemical and heat therapy on virus concentrations in in-vitro potato plantlets. *Revue Canadienne de Botanique* 68 (7) :Pp1515-1521.

## Référence bibliographique

---

- Godet, J. (1991).** Arbres et arbustes aux quatre saisons - Les guides pratiques du naturaliste. Editions Delachaux et Niestlé. Pp96 et 170.
- Garnier, G ; Bezanger-BeAuquesne, L. (1961).** Ressources médicinales de la flore française *Editions Vigot Frères*. Tome II. p838-842.
- Guibour, N.(1849).**Histoires naturelles des drogues simples ou cours d'histoire naturelle professé à l'école de pharmacie de Paris -*Editions J.B.Baillière. Paris. 588p.*
- Gerson, U. (2008).** TheTenuipalpidae: an under-explored family of plant-feeding mites. *Systematic and Applied Acarology* , 13 (2): 83-101p.
- Hmid, I. (2013).** Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica Granatum* L.) : Caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Thèse Doc. Sci. Agro. France. 177 p.
- Holland, D., Hatib, K., Bar-Ya'akov, I. (2009).** Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. *Horticultural Reviews*, vol (35). P 127- 191.
- Hmid, I. (2013).** Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica granatum* L.): caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Doctoral dissertation, Université d'Angers, France.
- Holland, D., Hatip, K. & Bar-YA'akov, I. (2009).** Pomegranate: Botany, Horticulture and Breeding. *In: Janick J (eds) Horticultural Reviews. John Wiley & Sons Inc*, pp. 127-191.
- INRAA, (2006).** Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie.
- INRA, (2008).** Institut National de la Recherche Agronomique .de Béni Mellal.
- Jurenka, Jmt. (2008).** Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review. *Altern. Med. Rev.* 13(2): pp128-144.
- Juan, P., Martinez, J -J., Oltra, M -A. & Ferrandez, M. (2000).** Situation actuelle de grenade croissante (*Punica granatum*) à Alicante sud. Lutte chimique contre les ravageurs et les maladies et les coûts financiers. *Options Méditerranéennes série A. Méditerranéennes. Séminaires* 42: 157-161.
- Jurenka, J-S. (2008).** Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Altern Med Rev.* 2008 Jun; 13(2): pp128-44.

## Référence bibliographique

---

- Jeppson, L-R., Keifer, H-H., Baker, E-W. (1975).** Mites Injurious to Economic Plants. University of California Press, California, 615 p.
- Katz, S.(2007).** Punica granatum: heuristic treatment for diabetes mellitus-*Journal of medicinal food*. Pp 213-217.
- Lansky ,E.(2005).**Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel™ - . *Investigational new drugs* . pp 121-122.
- Lemoine, E. (1998).** Guide des fruits du monde-Les fruits de nos régions, les variétés exotiques. Collection les compagnons du naturaliste. Editions Delachaux et Niestlé. 192 p.
- Melgarjo, p ; MartinzValero, R ., Guillamon, J-M;Miro, M;Amoros, A .(1997)** .phenological stages of the pomegranate tree (*punica granatum L*).The *Annales of applie Biology*.130(1): pp35-14.
- Mars, M. (1995).** La culture du grenadier (*Punica granatum L.*) et du figuier (*Ficus carica L.*) en Tunisie. *Ciheam. Options Méditerranéennes*. Pp. 85-95.
- Meshram, D-T., Mittal, H-K., Purohit, R-C. &Gorantiwar, S-D. (2009).** Water Requirement of Pomegranate (*Punica granatum L.*) for Solapur District of Maharashtra State. *In Proceedings of the Second International Symposium on Pomegranate and Minor including Mediterranean Fruits (ISPMMF - 2009), Dharwad, Inde, 23-27 Juin 2009*. pp. 311-322.
- Meena, K-K., Singh, R., Pareek, S. & Kashyap, P. (2009).** Evaluation of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Genotypes for Morphological and Flowering Characteristics under Semi-Arid Climate. *In Proceeding of the Second International Symposium on Pomegranate and Minor including Mediterranean Fruits (ISPMMF-2009), Dharwad, Inde, 23-27 Juin2009*, pp. 233 -237.
- Melgarejo, P. (1993).** Seleccion y tipificacion varietal de granado (*Punica granatum L.*) [Ph.D. thesis]. Valencia. Spain: Univ. Politecnica de Valencia (UPV).
- Melgarejo, P., Salazar, D.M.S. (2003).** Tratado De Fruticultura Para Zonas Áridas Y Semiáridas. Vol. (2): Algarr. 416 p.
- Melgarejo, P. & Salazard -M. (2003).** *Tratado de fruticultura para zonas áridas y semiáridas*. Ed. Mundi-prensa. Espagne. 416 p.

## Référence bibliographique

---

- Melgarejo, P., Valero, D. (2012).** International Symposium on the Pomegranate .Edition Zaragoza. Ciheam. Spain. 337 p.
- Melgarejo, P., Salazardm. & Artes, F. (2000).** Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *European Food Research Technology*. 211.p 185-190.
- Margara J. (1982).** Bases de la multiplication végétative : Les méristèmes et l'organogenèse. Editeur : Institut national de la recherche agronomique, Paris, France : 262.
- Murashige, T., Skoog, F-A. (1962).** Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures . *Physiologia Plantarum*. 15(3). Pp:473-97.
- Nozeran, R. & Bancilhon L. (1972).** Les cultures in-vitro en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes. *Annales de l'Amélioration des Plantes* 22 (2) : pp167-185.
- Oukérimi, K., et Oucif, A. (2018).** La biodiversité des arbres fruitiers dans la commune de M'sila. Mémoire. Master Académique : Sciences de la Nature et de la vie. Fac. Sciences, Université Mohamed Boudiaf.51p.
- Oukabli, A. (2004).** Le grenadier: Des variétés performantes pour la culture. Dans : Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du PNTTA. Transfert de Technologie en Agriculture. Ministère de l'Agriculture, du Développement rural et des Pêches maritimes, n°123.
- Ozturk, N., Ulusoy, M-R., Bayhan, E. (2005).** Pest and natural enemy species determined in pomegranate orchards in the Eastern Mediterranean Region, Turkey. *Turk. J. Entomol.* 29:pp225-235.
- Özturkn et Ulusoy, M-R. (2009).** Pests and natural enemy species determined in pomegranate orchards in Turkey. *Acta Hort.* (ISHS) 818 :Pp277284.
- Planchon, G ; Colline. (1875).** Traité pratique de la détermination des drogues simples d'origine végétale. *Librairie F. Savy*. Tome I 235-236 et 307-308.
- Patil, V-M., Dhande, G-A., Thigale, D-M. and Rajput, J-C. (2011).** Micropropagation of pomegranate (*Punica granatum* L.) 'Bhagava' cultivar from nodal explant. *African Journal of Biotechnology*, 10(79): Pp18130-18136.
- Pande, G., Akoh, C-C. (2016).** Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.).In Nutritional Composition of Fruit Cultivars. Chapter 26. Pp 667-689.

## Référence bibliographique

---

- Quiroz, I. (2009).** Granados, perspectivas y oportunidades de un negocio emergente : Antecedentes de Mercado. Fundacion Chile.72p.
- **Quezel et Santa. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition : Centre National de la recherche Scientifique .Paris. p 1170.
- Redenbaugh, K. (1993)** .Applications of synthetic seeds to crop improvement. Editeur : CRC Press, Florida, USA.
- Ruis, A-R. (2015).** Pomegranate and the Mediation of Balance in Early Medicine. *Gastronomica: The Journal of Critical Food Studies*, vol (15), n°1. p. 22-33. DOI: 10.1525/gfc. 2015.15.1.22.
- Saad, H. (2013).** Développement de bio-composites à base de fibres végétales et de colles écologiques. Thèse. Doct. Fac. Chimie, Université. Pau et des Pays de l'Adour, 107- 109 pp.
- Sanchez-Monge, E. (1974).** Fitogenética: mejora de plantas. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Ministerio de Agricultura . Madrid. P456.
- **Seeram, N-P., Lee R., Heber, D. (2004).** Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clin Chim Acta*; 348(1-2): Pp 63-8.
- Sanchez-Capuchino, V. (1986).** *Rotulación U N E 1034-1 (Vertical)*.Ed. Tébar Flores S.L., Madrid, 28p.
- Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R., Ebadi, A. (2006).** RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum L.*) Genotypes. *Sci .Hortic* . 111(1), Pp 24-29.
- Spichiger, R-E., Savolainen, V-V ., Figeat ,M., Jeanmonod, D. (2004)** . Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. Editions Presses polytechniques et universitaires romandes. Troisième édition. . 413 p.
- **Shah, M., Shah, S., Patel, M. (2011).** Review On: The Aspects of *Punica granatum*. *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research*, vol (1), no 3. p. 154-159.

## Référence bibliographique

---

- **Smith, R.E. (2014).** Pomegranate: Botany, Postharvest Treatment, Biochemical Composition and Health Effects. In: Food and Beverage Composition and Health. Nova Science Publisher. p 1- 173.
  
- Teixeira da Silva, J-A., Rana T.S., Narzary ,D., Verma ,N., Meshram D.T., Ranade S.A. (2013).** Pomegranate biology and biotechnology: a review.Scientia Horticulturae, vol 160.Pp. 85–107
  
- Téoulé E. (1999).** Biotechnologie et Amélioration des plantes. In : Biotechnologie. Editeur : Tec et Doc Lavoisier, Paris, France : Pp597-628.
  
- Vavilov, N-I. (1951).** The origin, variation, immunity, and breeding of cultivated plants. In: F. Verdoom (ed.), K. Starr Chester (translator). Chronica Bot. (13) 1/6.
  
- Wald, E. (2009).** Le grenadier (*Punica granatum L.*): plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse. doc. Fac. Phar., Univ. Henri Poincaré-Nancy, 147 p.
  
- Wald, E. (2009).** Le grenadier *Punica granatum* : Plante historique et évolution thérapeutique récentes. Université Henri Poincare. Thèse. 158p.
  
- Walalil, D., Skiredj, A., & Elattier, H. (2003).** L’amandier, l’olivier, le figuier et le grenadier. Transfert de technologie en agriculture. 105. Pp1 - 4.

### Référence web graphique :

(A)<http://www.tela-botanica.org/eflore/BDAFN/0/nn/148716/chorologie>

(C) <http://www.cehm.net/spip.php?rubrique96>

## Référence bibliographique

---

## Résumé

les 30 dernières années ont été marquées par une série d'avancées technologiques, dans le domaine de la multiplication *in vitro* de grenadier par la culture *in vitro*. Le but de cette étude est de multiplier *in vitro* deux variétés de grenadier (*Punica granatum* L.), la variété Khodrie et la variété Tounsi. Nous avons utilisé le milieu Ms avec l'addition de différentes concentrations des deux hormones BAP et 2-4D, (0.5, 1, 2 mg/l). L'analyse des résultats a déterminé que la meilleure concentration pour le développement de la variété Khodrie est 0.5mg/l, mais le Tounsi c'est 2mg/l pour les deux hormones utilisées.

**Mots clés :** *Punica granatum* L., Khodrie, Tounsi, *in vitro*, BAP, 2-4D

## Abstract

The last 30 years have been marked by series of technological advances, in the field of *in vitro* multiplication of pomegranate by *in vitro* culture, the aim of this study is the *in vitro* propagation of two varieties of pomegranate (*Punica granatum* L.), the Khodrie variety and the Tounsi variety. We used the Ms medium with the addition of different concentrations of the two hormones BAP and 2-4D, (0.5, 1, 2 mg / l). The analysis of the results was determined that the best concentration for the development of the Khodrie variety is 0.5mg / l, but the Tounsi is 2mg / l for both hormones used.

Key words: *Punica granatum* L., Khodrie, Tounsi, *in vitro*, BAP, 2-4D

## المخلص

تميزت السنوات 30 الماضية بسلسلة من التقدم التكنولوجي في مجال تكاثر الرمان في المختبر بواسطة الزراعة النسيجية، الهدف من هذه الدراسة هو إكثار صنفين من الرمان (*Punica granatum* L.) الصنف خضري و الصنف تونسي في المختبر، استعملنا الوسط MS مع إضافة تراكيز مختلفة من الهرمونيين BAP و 2-4D (0.5، 1، 2 مغ/ل)، تحليل النتائج أعطت ان افضل تركيز لتطوير الصنف خضري هو 0.5 مغ/ل لكن الصنف تونسي فالتركيز هو 1 مغ/ل للهرمونيين المستعملين.

**الكلمات المفتاحية:** *Punica granatum* L.، الصنف خضري، الصنف تونسي، زراعة نسيجية، BAP، 2-4D،