

*Régénération par embryogenèse  
somatique de vitroplants de palmiers  
dattiers (variété Degla Beida) en vue de la  
résistance contre le Bayoud*

**Présenter par M. BOUFIS Nazim**

**Directeur de Thèse:** M. KHELIFI L. Maître de Conférences (I.N.A.)

**Soutenu le :** 8 Novembre 2008

Composition du jury : **Présidente :** M<sup>me</sup> KHELIFI M. Maître de Conférences (I.N.A.) **Examineurs :**  
M<sup>me</sup> YAKOUB S. Maître de Conférences (Univ. de Tizi Ouzou) M. BELARBI B. Maître de Conférences  
(I.N.A.) M. KEDAD A. Chargé de Cours (I.N.A.)



# Table des matières

Dédicace . . .	5
ص:خلم . . .	6
Résumé : . . .	7
Summary: . . .	8
Remerciements . . .	9
Introduction . . .	10
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE . . .</b>	<b>12</b>
I- Données générales sur le palmier dattier . . .	12
1- Origine . . .	12
2- Répartition géographique . . .	12
3- Importance économique et socio-écologique . . .	14
4- Taxonomie . . .	15
5- Génétique : . . .	15
6- Caractères botaniques . . .	15
II- Ressources génétiques du palmier dattier . . .	20
1- Evolution génétique . . .	20
2- Notions de cultivars, variétés et clones . . .	20
3- Diversité génétique du patrimoine phœnicicole algérien . . .	21
III- Le Bayoud : principale contrainte au développement de la phœniciculture . . .	21
1- Données générales sur la maladie du Bayoud . . .	22
2- L'agent causal . . .	22
3- Symptômes . . .	22
4- Moyens de lutte contre le Bayoud et stratégie de recherche . . .	23
VI- Multiplication du palmier dattier dans le cadre de la lutte contre le Bayoud . . .	23
1- L'organogenèse . . .	25
2- L'embryogenèse somatique . . .	26
3- Perspectives de recherche . . .	28
<b>MATERIEL ET METHODES . . .</b>	<b>29</b>
I- Matériel végétal . . .	29
II- Initiation de la callogenèse . . .	29
1- Désinfection du matériel végétal . . .	29
2- Milieux d'induction de la callogenèse . . .	30
3- Mise en culture . . .	32
4- Observations réalisées . . .	32
III- Entretien et multiplication des cals . . .	33
1- Milieux solides . . .	33
2- Milieux liquides . . .	33
IV- Induction de l'embryogenèse, maturation et germination des embryons somatiques . . .	36
1- Induction de l'embryogenèse et maturation en milieu liquide agité . . .	36
2- Maturation des embryons somatiques en milieu gélosé . . .	36

3- Germination des embryons somatiques structurés . .	37
V- Analyse statistique . .	38
VI- Protocol e expérimental adopté . .	38
<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX . .</b>	<b>40</b>
I- Pourcentage de contaminations . .	40
II- Initiation de la callogenèse . .	40
1- Brunissement des explants et des milieux de culture . .	40
2- Callogenèse induite . .	43
2-2- Effet des équilibres hormonaux . .	43
3- Sélection des souches réactives . .	45
4- Conclusion: . .	45
III- Entretien et multiplication des cals . .	46
1- Evolution de la callogenèse sur milieu solide . .	46
2- Evolution de la callogenèse en milieux liquides agités . .	56
3- Conclusion . .	60
IV- Induction de l'embryogenèse, maturation et germination des embryons somatiques . .	62
1- Induction de l'embryogenèse en milieu liquide agité . .	62
2- Maturation des embryons somatiques . .	67
3- Germination des embryons somatiques structurés . .	69
4- Conclusion . .	74
<b>DISCUSSION . .</b>	<b>76</b>
I- Contaminations des cultures . .	76
II- Initiation de la callogenèse . .	76
1- Effet des milieux de culture . .	77
2- Effet des équilibres hormonaux . .	77
III- Entretien et multiplication des cals . .	77
1- Evolution de la callogenèse sur milieux solides . .	77
2 - Evolution de la callogenèse en milieux liquides agités . .	79
3 - Souches sélectionnées . .	80
IV – Induction de l'embryogenèse, maturation et germination des embryons . .	80
1- Induction de l'embryogenèse en milieux liquides agités . .	80
2 - Maturation des embryons somatiques . .	80
3- Germination des embryons somatiques . .	81
<b>Conclusion générale . .</b>	<b>83</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES . .</b>	<b>85</b>
<b>ANNEXES . .</b>	<b>92</b>
ANNEXE I . .	92
ANNEXE II . .	95

## Dédicace

*A mes grands-parents, A mon PAPA, à ma MAMAN et à mon frère MEHDI, Aux familles Boufis et Ghanem, A mes amis Redouane, Nabil et Hamza, A tous mes amis de l'INA.*

## ص خ لم:

انتاج غرسات مخبرية من نبتة النخيل صنف دقلة بيضاء باستعمال تقنية توليد الأجنة للمساهمة في مكافحة مرض البيوض. الهدف من هذا العمل هو التحكم في الإكثار، عن طريق توليد أجنة خضرية عند صنف من نبتة النخيل (دقلة بيضاء) للمساهمة في مكافحة مرض البيوض. المخطط المؤدي إلى الحصول على أعداد كبيرة من غرسات مخبرية يتمثل في:

- الحصول على الكتل على قلع من القمة النامية لجبار وإكثار الكلوسات الجنينية في أوساط 2,4 D والأحم الحيوي غذائية صلبة غنية ب

- إكثار العقد في أوساط سائلة محركة ذو تركيبة معدنية خاصة وباستعمال تركيزات ضعيفة من 2,4 D.

- توليد الأجنة في وسط سائل محرك ذو تركيبة معدنية خاصة وخال من هورمونات النمو.

- إستمرار في نضج الأجنة وإنباسها في وسط غذائي صلب ذو تركيبة معدنية خاصة وخال من هورمونات النمو.

كلمات مفتاح: كتل / توليد الأجنة / أجنة خضرية / غرسات *Phoenix dactylofera* مخبرية / دقلة بيضاء / البيوض.

## Résumé :

Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmiers dattiers (Variété Degla Beida) en vue de la résistance contre le Bayoud. L'objectif du présent travail consiste à optimiser l'obtention de vitroplants de palmier dattier (*var.* Degla Beida) par la voie de l'embryogenèse somatique dans le cadre de la lutte contre la maladie du Bayoud. Le schéma conduisant à l'obtention de vitroplants structurés, en grand nombre, s'articule comme suit :

Induction de la callogenèse à partir d'explants issus du sommet du cœur d'un rejet et multiplication des cals embryogènes sur milieux solides contenant de fortes concentrations en 2,4 -D combinées à de fortes doses de charbon actif.

Multiplication des nodules sur milieux liquides sous agitation de composition minérale appropriée en présence de faibles concentrations en 2,4 -D.

Initiation de l'embryogenèse somatique en milieu liquide agité dépourvu d'hormones de croissance et de composition minérale appropriée.

Maturation et germination des proembryons sur milieu gélosé dépourvu d'hormones de croissance de composition minérale appropriée.

Mots clés : Callogenèse/ embryogenèse somatique/ embryons somatiques / vitroplants/ *Phoenix dactylifera* L./ Degla Beida/ Bayoud

## Summary:

Regeneration by somatic embryogenesis of vitroplants of date palms (Variety Degla Beida) with the aim of the resistance against Bayoud. The objective of the present work consists in optimizing the obtaining of vitroplants of date palm (*var.* Degla Beida) by the way of the somatic embryogenesis within the framework of the control against the disease of Bayoud. The plan leading to the obtaining of vitroplants structured, in large number, articulates as like:

Induction of callogenesis was generated from offshoot and proliferation of embryogenic callus on solid media containing a high 2,4-D concentration combined with a high activated charcoal concentration

Proliferation of nodular callus in agitated liquid media containing a lower levels of 2,4 -D.

Initiation of the somatic embryogenesis in agitated liquid media devoid of growth of hormones and of appropriate mineral composition.

Maturation and germination of proembryon on solid media devoid of growth of hormones and of appropriate mineral composition.

Key words: Callogenesis / somatic embryogenesis/ somatic embryos / vitroplants / *Phoenix dactylifera* L. / Degla Beida / Bayoud

## Remerciements

Je suis heureux d'exprimer ici mes remerciements les plus sincères et ma profonde reconnaissance à tous ceux qui, de loin ou de près, m'ont aidé à réaliser ce travail et en particulier :

Monsieur KHELIFI L., maître de conférences à l'I.N.A. d'avoir accepté de diriger ce travail. Les conseils et les remarques qu'il m'a régulièrement prodigués tout au long de la phase expérimentale ont largement contribué à sa réalisation. Son intérêt constant et sa patience lors de la rédaction ont été pour moi de précieux encouragements. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de mes remerciements les plus sincères.

Madame KHELIFI M., maître de conférences à l'I.N.A., qui me fait l'honneur de présider le jury de soutenance. Ses conseils avisés et ses encouragements ont été de précieuses aides durant toute la phase d'expérimentation. Qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère gratitude et de ma grande reconnaissance.

Madame YACOUB S., maître de conférences à l'Université de Tizi-Ouzou. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance avoir accepté d'examiner ce travail.

Monsieur BELARBI B., maître de conférences à l'INA. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Monsieur KEDAD A., chargé de cours à l'INA. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Monsieur MORSLI A., chargé de cours à l'I.N.A., qui, en plus des conseils précieux généreusement accordés n'a jamais ménagé ses efforts pour faciliter le travail expérimental. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements chaleureux.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à tous les personnels du département de phytotechnie et en particulier à Mademoiselle ZAOUID., ingénieur de laboratoire, pour son soutien et sa collaboration efficaces ainsi qu'aux étudiants ayant travaillé au laboratoire ' Ressources génétiques et biotechnologies ' pour leur aide amicale et leur assistance fraternelle.

## Introduction

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une monocotylédone pérenne adaptée aux conditions édapho-climatiques des zones arides et semi arides.

La culture du palmier dattier est concentrée essentiellement dans les pays de l'Afrique du Nord et du Moyen Orient.

En Algérie, la culture du palmier dattier est exclusivement pratiquée pour la production de dattes. Elle est considérée comme une activité stratégique en raison du rôle qu'elle joue sur plusieurs plans : économique, social et écologique. Cependant, le patrimoine phœnicicole algérien caractérisé par une grande diversité variétale est sujet à de nombreuses contraintes (biotiques et abiotiques). La plus menaçante de ces contraintes et qui risquerait de compromettre tout effort de développement de la phœniciculture est la tracheomycose du palmier dattier plus connue sous le nom de la maladie du Bayoud causée par un champignon faisant partie de la mycoflore du sol dénommé *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* W.L. Gordon, (1965).

En effet, depuis son apparition en Algérie vers 1898, au niveau des palmeraies du sud-ouest, elle a été à l'origine de la perte de plus de trois millions de palmiers. Actuellement, la propagation de cette maladie est toujours en progression vers les palmeraies du sud-est, principales régions productrices de dattes. La lutte contre la maladie du Bayoud repose exclusivement sur des mesures prophylactiques puisque aucun moyen de lutte curative efficace n'a pu être mis au point (BENKHALIFA, 2006).

Le seul moyen qui paraît être le plus apte à faire face à cette maladie est de loin la lutte génétique (EL HADRAMI et al., 2005 ; SEDRA, 2005).

L'utilisation des techniques de culture *in vitro* peut jouer un rôle primordial dans le cadre de la lutte contre le Bayoud. En effet, les techniques de culture *in vitro* permettent l'obtention rapide en grand nombre de plants, génétiquement conformes et indemnes de maladies. Deux techniques de micropropagation sont actuellement utilisées (ZAID et al., 2002). Il s'agit de l'organogenèse qui repose sur la capacité de bourgeonnement de différents types d'explants et de l'embryogenèse somatique qui utilise la totipotance, caractéristique des cellules végétales, pour l'obtention d'embryons à partir de cellules somatiques (EL HADRAMI, 1996). De ces deux techniques, c'est l'embryogenèse qui est la plus avantageuse, à savoir un taux élevé de multiplication et une période plus courte pour la régénération par rapport à l'organogenèse malgré quelques risques limités d'apparition de variants (DJERBI, 1991).

Ainsi, la régénération par voie d'embryogenèse somatique représente un outil d'appoint non négligeable (gains de temps et d'espace) pour les recherches portant sur l'amélioration de la résistance variétale (croisements dirigés, mutagenèse, fusion de protoplastes,...) et la compréhension de la relation hôte/pathogène en vue de la lutte contre la maladie du Bayoud.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail expérimental. Notre objectif consiste à optimiser l'obtention de vitro-plants de palmier dattier (*var.* Degla Beida) par la voie de l'embryogenèse somatique. L'étude a été menée en trois étapes :

- Initiation de la callogenèse,

- Entretien et multiplication de la masse callogène,
- Induction de l'embryogenèse et germination des embryons.

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## I- Données générales sur le palmier dattier

### 1- Origine

---

L'origine du palmier dattier demeure encore incertaine. Néanmoins, on s'accorde à admettre qu'il est le résultat d'hybridations naturelles entre plusieurs espèces de palmiers.

Pour ce qui est du lieu de sa domestication, les vestiges archéologiques laissent penser que les palmeraies auraient existé dans le Golfe Arabique depuis 5000 ans av. J.C. (Battesti, 2005) ; plaçant ainsi le palmier dattier comme l'un des plus anciens arbres fruitiers ayant été cultivé par l'homme dans l'ancien monde (BOUGUEDOURA, 1991; Zaid, 2002 *et al.*).

### 2- Répartition géographique

---

#### 2-1- Dans le monde

Le palmier dattier était primitivement cultivé dans les zones arides et semi-arides chaudes de l'ancien monde. Par la suite, il fut propagé en dehors de son aire d'extension et de culture (MUNIER, 1973). Ses limites extrêmes (Fig.1) s'étendent sensiblement entre le 10<sup>ème</sup> et le 39<sup>ème</sup> parallèle de latitude Nord, entre la Somalie et le Turkménistan à l'est et les îles Canaries à l'ouest (TRIKI *et al.*, 2003). Mais les zones les plus favorables à sa culture sont comprises entre 24<sup>ème</sup> et 34<sup>ème</sup> parallèle de latitude Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Egypte, Irak ...) (BENAMAHCENE, 1998; TRIKI *et al.*, 2003).

#### 2-2- En Algérie

En Algérie, la culture du palmier dattier occupe une superficie de 154.372 ha (FAO, 2007). Elle s'étend du versant saharien de l'Atlas saharien au Nord, jusqu'à Tamanrasset au Sud et de Djanet à l'Est jusqu'à Reggane à l'Ouest (Fig.2).

Les principales régions productrices sont celles de l'Est, indemnes de Bayoud mais avec une tendance à la monoculture d'une seule variété, la Deglet Nour (les palmeraies d'El-Oued, Biskra, Ouargla renferment à elles seules 91% des palmiers de la variété Deglet Nour) (M.A.D.R., 2004).

Les palmeraies des régions phœnicicoles de l'Algérie peuvent être classées en trois (03) groupes (MUNIER, 1981):

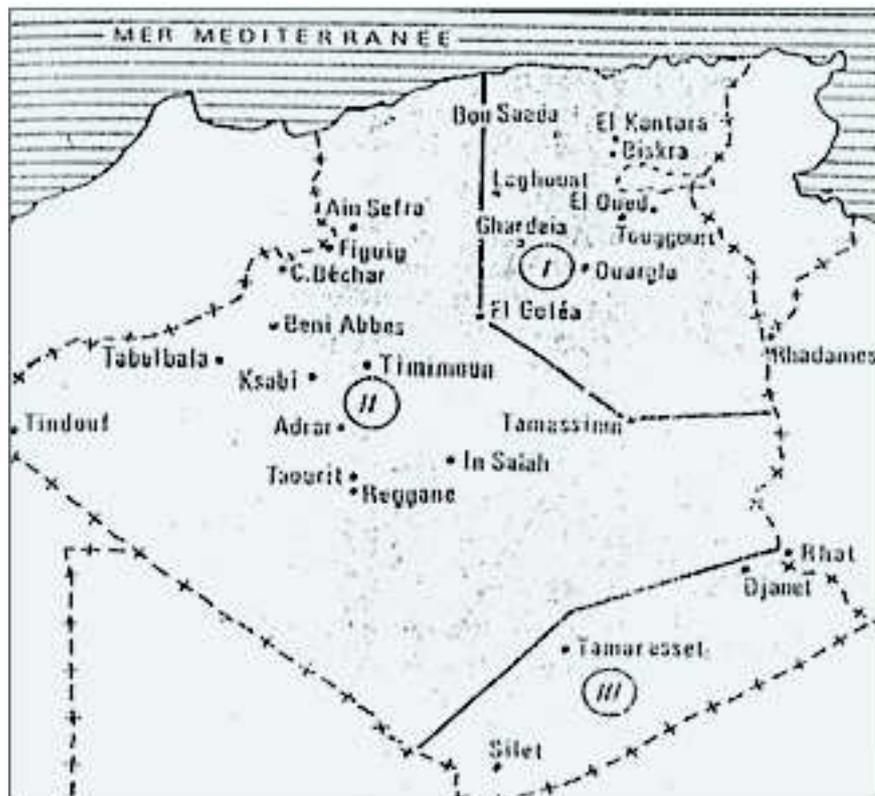
- groupe des palmeraies orientales : les Zibans, l'Oued Ghir, le Souf, Ouargla, Laghouat, le M'zab et El Goléa...
- groupe des palmeraies occidentales : la Saoura, le Touat, le Gourara, le Tidikelt...
- groupe des palmeraies méridionales : Djanet, Tamanrasset,...



*Fig. 1 : Répartition géographique de la culture du palmier dattier dans le monde (MUNIER, 1973).*

— Aires d'origine de la culture du dattier.

● Aires d'introduction.



*Fig. 2 : Régions phéniciques d'Algérie (MUNIER, 1981) :*

I- Groupe des palmeraies orientales,

II- Groupe des palmeraies occidentales,

III- Groupe des palmeraies méridionales.

### 3- Importance économique et socio-écologique

---

#### 3-1- Importance économique

##### 3-1-1- Dans le monde

Avec une production mondiale annuelle de dattes dépassant les 6 millions de tonnes, le palmier dattier compte parmi les principales productions fruitières tropicales et subtropicales.

Le nombre de palmiers dans le monde peut être estimé à plus de 100 millions d'arbres répartis essentiellement au Proche-Orient et en Afrique du Nord (F.A.O., 2007).

Le rendement moyen mondial pour l'année 2005 est de 58,264 q/ha (F.A.O., 2007). Pour l'année 2005, les principaux pays producteurs, par ordre décroissant, sont : l'Egypte, l'Iran, l'Arabie Saoudite, les Emirats Arabes Unis et l'Algérie (tableau 1).

PAYS	ANNEE	2005 (unité = tonne).
EGYPTE		1.170.000
REPUBLIQUE ISLAMIQUE D'IRAN		996.770
ARABIE SAOUDITE		970.448
EMIRATS ARABES UNIS		859.159
ALGERIE		516.293

*Tableau 1 : Principaux pays producteurs de dattes pour l'année 2005 (F.A.O., 2007).*

##### 3-1-2- En Algérie

En Algérie, on assiste depuis 1999 à une augmentation de la production avec de légères fluctuations passant de 427.583 tonnes à 516.293 tonnes en 2005. Cette augmentation peut être expliquée par l'amélioration des rendements mais elle est surtout due aux résultats de l'accroissement des superficies cultivées et à l'entrée en production des palmiers issus de plantations antérieures grâce aux efforts fournis par les autorités à travers le Fonds National pour le Développement Rural Agricole (F.N.D.R.A.) (M.A.D.R.,2004).

En effet, les efforts entrepris pour développer la phœniciculture en Algérie ne sont que le reflet de la place que tient cette activité, d'une part dans l'économie des régions productrices où elle constitue le plus souvent la principale ressource économique des populations et d'autre part au niveau de l'économie nationale. A titre d'exemple, durant l'année 2005, l'Algérie a exporté 10.830 tonnes pour une valeur dépassant les 18 millions de dollars (F.A.O., 2007).

#### 3-2- Importance sociale et écologique

En plus de l'importance économique que revêt la phœniciculture en Algérie, celle-ci joue également un rôle social car elle assure une certaine stabilité aux populations des Oasis (la datte et ses sous-produits constituent, le plus souvent, la base alimentaire humaine et animale).

Par ailleurs, elle assure un rôle écologique. En effet, le palmier dattier constitue l'élément fondamental de l'écosystème oasien, en freinant l'avancée du désert tout en créant sous son couvert un microclimat favorable au développement de nombreuses cultures sous-jacentes (arbres fruitiers, céréales, légumes...) (TIRICHINE, 1997 ; BATTESTI, 2005).

## 4- Taxonomie

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* par Linné en 1753.

*Phoenix* dérive de Phoinix, nom du palmier dattier chez les Phéniciens.

*Dactylifera* vient du latin dactylus dérivant du grec daktulos, qui signifie doigt, en raison de la forme du fruit (Munier, 1973).

Selon Dransfield et Uhl (1986, in Zaid et al., 2002), la classification du palmier dattier se présente comme suit :

- Ordre : *Palmea*
- Famille : *Palmaceae*
- Sous-famille : *Coryphoideae*
- Tribu : *Phoeniceae*
- Genre : *Phoenix*
- Espèce : *Phoenix dactylifera* L.

Le genre *Phoenix* comporte d'après Auguste Chevallier (1952, in MUNIER, 1973) douze (12) espèces : *Phoenix dactylifera* L., *P. atlantica* A. Chev., *P. canariensis* Chabaud., *P. reclinata* Jacq., *P. sylvestris* Roxb., *P. humilis* Royle., *P. hanceana* Naudin., *P. robelinii* O'Brien., *P. farinifera* Roxb., *P. rupicola* T. Anders., *P. acaulis* Roxb., *P. paludosa* Roxb.

En plus du palmier dattier, cinq autres *Phoenix* (*P. atlantica* A. Chev., *P. reclinata* Jacq., *P. humilis* Royle., *P. farinifera* Roxb. et *P. acaulis* Roxb.) peuvent produire des fruits comestibles mais de qualité médiocre.

Tous les *Phoenix* sont utilisés comme arbres ornementaux mais le plus apprécié reste le *P. canariensis* Chabaud., communément dénommé palmier des Iles Canaries. Par contre, *P. sylvestris* Roxb. est largement utilisé en Inde comme source de sucre (ZAID et al., 2002).

## 5- Génétique :

Les *Phoenix* ont 36 chromosomes somatiques ( $2n = 36$ ,  $x = 18$ ). Les palmiers se caractérisent par la facilité à s'hybrider entre eux. Ainsi, il existe de nombreux hybrides résultant de croisements naturels tels que *P. dactylifera* L. x *P. sylvestris* Roxb. (Inde) ; *P. dactylifera* L. x *P. reclinata* Jacq. (Sénégal) et *P. dactylifera* L. x *P. canariensis* Chabaud. (Maroc et Algérie).

Chez *Phoenix dactylifera* L. des variations du nombre chromosomique entre variétés mais aussi au sein d'une même variété ont été rapportées (ZAID et al., 2002).

## 6- Caractères botaniques

### 6-1- Système racinaire

D'après MUNIER (1973), le système racinaire du dattier est fasciculé, les racines ne se ramifient pas et n'ont relativement que peu de radicelles. Le bulbe, ou plateau racinal, est volumineux et émerge au-dessus du niveau du sol. Le système racinaire présente quatre (04) zones d'enracinement (Fig.3):

- Racines respiratoires (zone I) : ne dépassent pas les 0,2 à 0,25 m de profondeur. Elles ont un rôle respiratoire.
- Racines de nutrition (zone II) : représentent la plus forte proportion des racines du système. Elles se situent entre 0,3 et 1,2 m de profondeur.
- Racines d'absorption (zone III) : elles sont plus ou moins importantes selon le mode de culture et la profondeur du niveau de la nappe phréatique.
- Racines d'absorption de profondeur (zone IV) : elles peuvent être importantes ou non, selon que le niveau de la nappe est élevé ou non.

L'extension de ces zones d'enracinement est variable, en fonction de la nature du sol, du mode de culture, de la profondeur du niveau aquifère, ainsi que des cultivars et de l'origine du sujet.

### **6-2- Le stipe (ou tronc)**

Au-dessus de sa partie basale, il est généralement de forme cylindrique pouvant atteindre ou dépasser une hauteur de 20 mètres. Son élongation se fait à partir de la partie coronaire par le bourgeon terminal ou phyllophore (Fig.3).

### **6-3- Les palmes (ou feuilles)**

Les palmes sont issues du bourgeon terminal. Ce sont des feuilles composées, pennées. Les folioles sont régulièrement disposées en position oblique le long du rachis, isolées ou groupées, pliées longitudinalement en gouttière ou transformées en épines sur la partie inférieure du limbe (Fig.4).

A l'aisselle de chaque palme, se trouve un bourgeon adventif ou axillaire qui en se développant, peut donner naissance à une inflorescence dans la région coronaire, à un rejet dans la région basale (permettant la multiplication végétative du palmier dattier) et à un gourmand dans la région moyenne et sous-coronaire.

Chaque année, il apparaît jusqu'à trente (30) palmes, et en bon état de végétation, on peut avoir jusqu'à 125 palmes actives.

La longueur des palmes varie entre 3 et 6 m et chaque palme a, en conditions normales de végétation, une durée de vie de 3 à 6 ans (ZAID et *al.*, 2002).

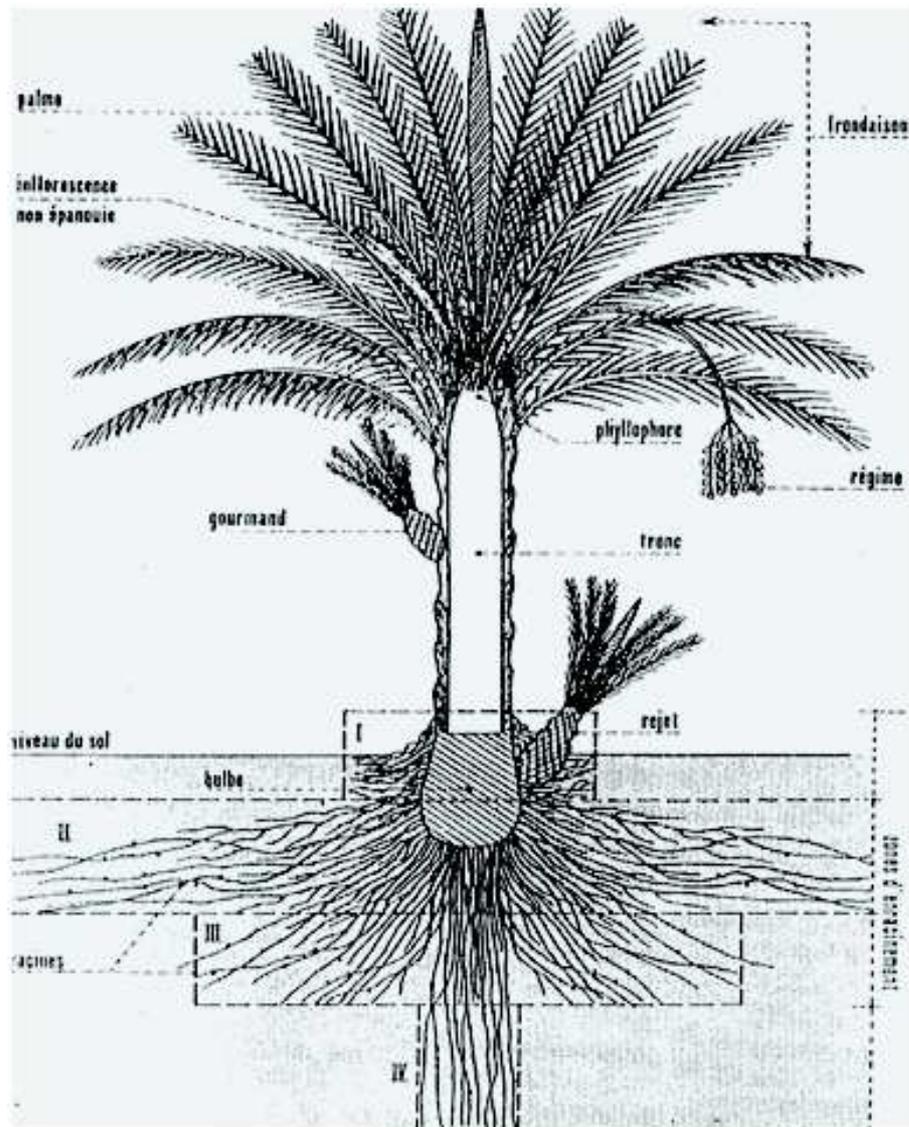


Fig. 3 : Figure schématique du dattier (MUNIER, 1973).

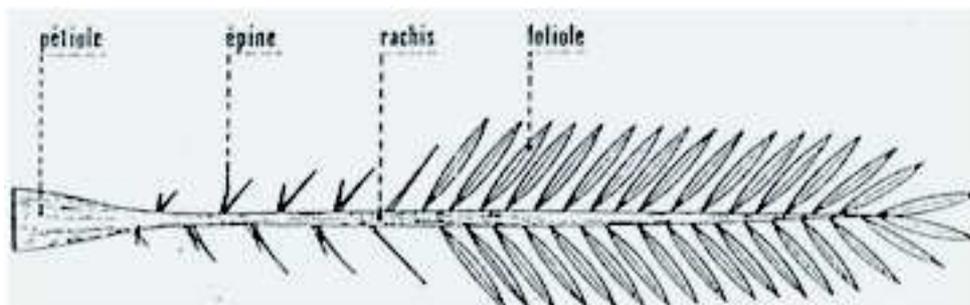


Fig. 4 : Schéma d'une palme (MUNIER, 1973).

#### 6-4- Les organes floraux

Le palmier dattier est une plante dioïque, ce qui nécessite l'intervention de l'homme pour obtenir une bonne pollinisation au niveau de la palmeraie. L'inflorescence du palmier

(mâle ou femelle) a pour origine la région coronaire. Celle-ci se présente sous forme d'un épi composé appelé spadice (qui sera recouvert avant la floraison par une bractée ou membrane entièrement fermée appelée spathe) (Fig.5).

Selon le sexe, on peut distinguer deux types de fleurs (MUNIER, 1973) :

- Fleurs femelles : de forme globulaire avec un calice légèrement bordé en vert et une corolle de couleur blanc ivoire. La formule florale est comme suit :  $(3S) + 3P + 6E + 3C$ .
- Fleurs mâles : de forme légèrement allongée avec un calice et une corolle de couleur blanc ivoire. La formule florale est comme suit :  $(3S) + 3P + 6E$ .

En moyenne, un pied femelle peut produire une douzaine de spathes (ZAID et *al.*, 2002).

### **6-5- Le fruit (ou datte)**

Les fruits proviennent du développement d'un carpelle après fécondation de l'ovule. Ce sont des drupes qui forment de longues grappes ou régimes. Selon le type de datte, on peut distinguer des variétés à dattes molles, demi-molles ou sèches.

### **6-6- La graine (ou noyau)**

Comme le fruit, les caractéristiques de la graine à savoir les dimensions ainsi que le poids varient en fonction de la variété, des conditions environnementales et culturelles du pied-mère (ZAID et *al.*, 2002).

La graine (Fig.6) est de forme allongée, plus au moins volumineuse, lisse ou pourvue de protubérances latérales en arête ou en ailette, avec un sillon ventral. Sa consistance est dure et l'embryon est dorsal (MUNIER, 1973).

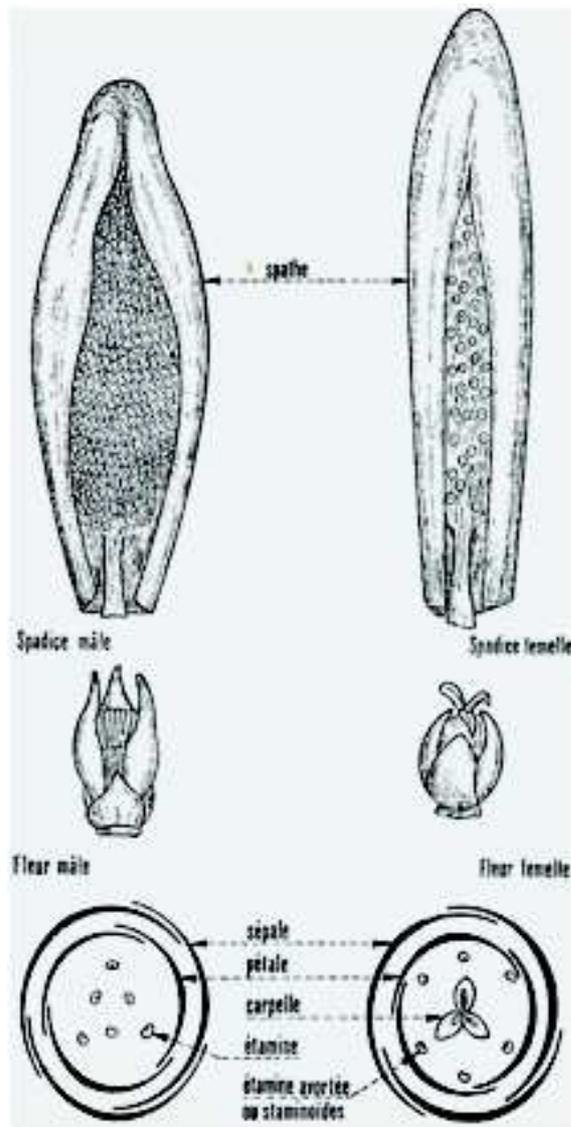
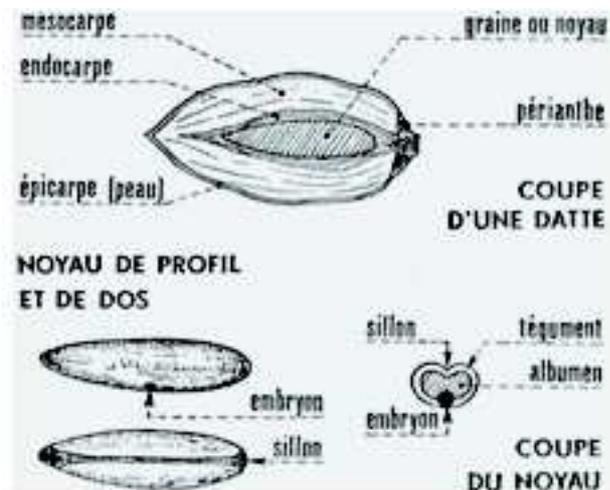


Fig. 5 : Inflorescences et fleurs du dattier (MUNIER, 1973).



*Fig. 6 : Fruit et graine du dattier (MUNIER, 1973).*

## II- Ressources génétiques du palmier dattier

### 1- Evolution génétique

---

L'allogamie stricte, mode de reproduction du palmier dattier, favorise l'obtention d'hybrides, ce qui entraîne un nombre de génotypes sans cesse croissant.

Les palmiers les plus intéressants sont multipliés par la voie végétative pour donner, dans une région donnée, un ensemble de cultivars adaptés aux conditions écologiques de la région où ils sont sélectionnés ou à des régions à conditions édapho-climatiques similaires. En d'autres termes, un groupe de cultivars déterminé est toujours adapté à une région donnée ou à des régions à conditions édapho-climatiques semblables (TIRICHINE, 1997).

A l'intérieur de ce pool génétique et pour une même région, on peut distinguer des types ayant des possibilités d'adaptation beaucoup plus élastiques que d'autres. Ainsi, ce matériel génétique est fortement influencé par les conditions climatiques. La plupart des cultivars sélectionnés perdent de leur valeur en sortant de leur région d'origine, par exemple les dattes de la variété Deglet Nour collectées à Tolga ou à Biskra sont de très bonne qualité alors que celles provenant du Mzab sont généralement plus sèches et plus petites, donc de qualité nettement inférieure. (TIRICHINE, 1997).

### 2- Notions de cultivars, variétés et clones

---

#### 2-1- Variété

Les différences existantes dans la qualité et la morphologie des fruits ont permis de distinguer ce que l'on appelle communément des "variétés" qui ne sont, en réalité que, des races ou métis ou phénotypes (MUNIER, 1973; BOUGUEDOURA, 1991; TIRICHINE, 1997)

La notion de variété repose essentiellement sur les caractéristiques du fruit. On ne peut donc appliquer le concept qu'aux individus femelles car les individus mâles n'en produisent pas. Cependant, il est courant que l'on donne le nom d'une variété femelle à un arbre mâle dont l'apparence extérieure rappelle celle de l'arbre femelle. Cette analogie n'est en fait évidente que pour les phœniciculteurs. Aussi, il serait plus simple d'utiliser le terme "cultivar" surtout lorsqu'il s'agit de palmier mâle (BOUGUEDOURA, 1991).

#### 2-2- Cultivar

Selon BENABDALLAH (1990 in TIRICHINE, 1997), un cultivar (variété cultivée) désigne un ensemble d'individus aux caractéristiques phénotypiques homogènes et portant localement le même nom.

#### 2-3- Clone

Au cours des siècles, des sélections furent opérées sur des "francs" (plants issus de semis volontaires ou non). Celles-ci étaient basées sur les caractéristiques du fruit, la productivité et l'adaptation des plants aux conditions locales. Par la suite, les individus les

plus intéressants sont fixés par voie végétative puis propagés (MUNIER, 1973). C'est ainsi qu'actuellement les cultivars connus ne sont que des clones issus d'une sélection millénaire. Ces clones peuvent être représentés par une dizaine d'individus, pour les uns et jusqu'à une centaine de milliers, voire de millions d'individus, pour d'autres (HANNACHI *et al.*, 1998) .

### 3- Diversité génétique du patrimoine phœnicicole algérien

Le patrimoine phœnicicole mondial renferme plus de trois mille (3000) variétés réparties dans son aire de culture d'origine (ZAID *et al.*, 2002).

Pour ce qui est de l'Algérie, le patrimoine phœnicicole national est représenté par différentes catégories de ressources génétiques. Il est composé d'une part importante de cultivars femelles et dans une moindre proportion de cultivars mâles " dokkars ". L'ensemble forme le stock génétique phœnicicole algérien (TIRICHINE, 1997).

Plusieurs travaux d'inventaire variétal ont été réalisés depuis la période coloniale, malheureusement, le plus souvent réalisés dans des zones géographiques limitées. Ce n'est que récemment que l'on peut affirmer qu'il existe en Algérie un inventaire variétal englobant l'ensemble des régions phœnicicoles.

Ce travail publié en 1998 et réalisé par une équipe de quatre (04) chercheurs a permis de recenser 940 cultivars dont les 2/3 ont été échantillonnés sur une quinzaine de régions naturelles. Ces données confirment l'énorme diversité génétique, déjà soupçonnée, que renferme la palmeraie algérienne. Cette diversité se présente comme suit (HANNACHI *et al.*, 1998) :

- Palmeraies du sud-ouest : celles-ci renferment une diversité très appréciable et c'est justement cette diversité qui a permis aux palmeraies de rester productives malgré le fléau du Bayoud.
- Palmeraies potentielles du sud-est : malgré la prédominance de la variété Deglet nour, la diversité est aussi considérable.
- Palmeraies marginales : elles conservent également la plus grande diversité.

## III- Le Bayoud : principale contrainte au développement de la phœniciculture

A la lecture de ce qui a été décrit précédemment, on peut conclure que la palmeraie algérienne dispose d'un stock génétique considérable. Celui-ci évolue dans l'espace et dans le temps sous l'effet de plusieurs contraintes qui peuvent mettre en péril son existence risquant ainsi de compromettre, tout effort de développement du secteur phœnicicole dans le pays.

Ces contraintes peuvent être classées en deux groupes :

- Contraintes abiotiques : on peut citer la sécheresse (déficit hydrique) caractéristique des zones sahariennes, la salinité (des sols et des eaux d'irrigation), la désertification (ensablement) mais aussi l'action non négligeable de l'homme qui, par l'orientation de la culture vers quelques cultivars produisant des dattes à haute valeur commerciale (plus précisément Deglet Nour) contribue à favoriser ainsi l'érosion génétique (BELGUEDJ, 2002 ; ACOURENE *et al.*, 2007).

- Contraintes biotiques : elles correspondent aux pathologies du palmier dattier, et plus particulièrement le Bayoud (Tracheomycose du palmier), sévissant depuis plus d'un siècle, qui est incontestablement la maladie la plus destructrice et la plus menaçante en Algérie.

## 1- Données générales sur la maladie du Bayoud

---

Elle fut observée pour la première fois vers 1870 dans la Vallée de Draa au Maroc. Elle a fait son apparition en Algérie vers 1898, et depuis, sa progression s'est effectuée du sud-ouest vers le centre-sud décimant plus de trois (03) millions d'arbres sur son passage.

De nos jours, les régions les plus atteintes sont Beni Ounif, la Saoura, le Gourara, le Touat, le Tidikelt à l'ouest et les palmeraies du M'zab au centre atteignant la région de Zelfana située entre Ghardaia et Ouargla (BENKHALIFA, 2006).

Cette maladie a causé non seulement la perte d'un aliment de base et une source de revenus au niveau local mais elle a, aussi, accéléré la désertification suite à la réduction des surfaces protégées par le dattier qui permettait l'installation des cultures sous-jacentes (BENKHALIFA, 2006).

## 2- L'agent causal

---

L'agent causal est un champignon faisant partie de la mycoflore de la rhizosphère dénommé *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* W.L. Gordon, (1965) (E.P.P.O., 1997). Il se conserve pendant très longtemps sous forme de chlamydospores dans les tissus de palmiers malades particulièrement au niveau des racines mortes. Il peut aussi survivre au niveau d'autres espèces telles que le henné, la luzerne et le trèfle..., sans que celles-ci présentent des symptômes visibles (= porteurs sains) (BOUNAGA et al., 1990; ZAID et al., 2002).

Les chlamydospores germent dès que les conditions sont favorables et les tubes germinatifs pénètrent dans les tissus vasculaires des racines, à partir desquels le mycélium atteint le tronc. Dans les vaisseaux, le mycélium produit des microconidies qui seront par la suite transportées vers les parties supérieures de la plante par la sève ascendante. La mort du palmier intervient lorsque le champignon atteint avec ses toxines le bourgeon terminal (phyllophore).

En général, les conditions favorables à une croissance rapide du palmier dattier favorisent aussi le développement de la maladie. La température de croissance optimale du pathogène se situe entre 21 et 27°C mais la croissance reste importante à 18° et à 32°C et s'arrête à 7°C et moins ainsi qu'à 37°C et plus (E.P.P.O., 1997).

## 3- Symptômes

---

Le Bayoud attaque aussi bien les jeunes palmiers que les sujets adultes de même que leurs rejets basaux utilisés dans la multiplication végétative (ZAID et al., 2002). Les symptômes externes sont connus ; sur un arbre à l'origine sain, une palme de la couronne moyenne se dessèche et blanchit ; d'où l'appellation Bayoud qui dérive de l'arabe Abiad (= blanc) ; les folioles se dessèchent de bas en haut et se replient vers le rachis. La palme prend l'aspect caractéristique d'une plume mouillée. Les palmes voisines sont atteintes à leur tour et la totalité du bourgeon terminal finit par se dessécher, entraînant la mort du palmier, dans des délais qui peuvent varier de quelques semaines à plusieurs mois (BOUNAGA et al., 1990)

---

#### 4- Moyens de lutte contre le Bayoud et stratégie de recherche

---

Le *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* peut se disséminer par les rejets, les tissus infectés en particulier les portions de rachis ou par le déplacement du sol par l'Homme ainsi que par des porteurs sains contaminés provenant de zones infestées. L'eau d'irrigation circulant dans des palmeraies infectées est également un moyen de propagation. Dans une palmeraie, la maladie se dissémine aussi par contact entre racines saines et malades. L'étendue de cette dispersion dépend des pratiques culturales et des conditions climatiques. Par contre, les graines et les fruits ne disséminent pas le Bayoud (E.P.P.O., 1997).

La lutte contre le Bayoud repose sur des mesures prophylactiques car aucun moyen de lutte curatif n'a été trouvé jusqu'à nos jours (ZAID et al., 2002). En effet, la mise en quarantaine des zones " Bayoudées " par le contrôle strict des échanges de matériel végétal qui peuvent exister entre ces dernières et les zones indemnes a permis d'arrêter la progression de cette maladie vers les oasis de l'Est du pays, première région productrice à l'échelle nationale.

Le seul moyen qui paraît être le plus apte à faire face à cette maladie est de loin la lutte génétique qui consiste à rechercher dans un premier temps des cultivars présentant une résistance naturelle, mais dont les fruits sont généralement de qualité médiocre. Et dans un second temps, transférer cette capacité de résistance au niveau d'autres cultivars de haute qualité dattière mais sensibles à la maladie (EL HADRAMI, 2005; SEDRA, 2005).

Cette approche ne peut être efficace qu'avec l'utilisation des techniques de culture in vitro qui permettent la multiplication de cultivars résistants pouvant remplacer ceux déjà perdus à cause de la maladie du Bayoud, mais aussi sauvegarder la diversité existante menacée actuellement par l'avancée de cette maladie (FERRY et al., 1998).

## VI- Multiplication du palmier dattier dans le cadre de la lutte contre le Bayoud

Traditionnellement, le palmier dattier est propagé par voie végétative réalisée par la transplantation des rejets émis au niveau de la base du tronc, permettant la reproduction à l'identique des caractères du pied-mère (multiplication végétative clonale), ce qui ne peut être réalisable avec le semis de graines (graine portant la moitié du stock génétique de chacun des parents = origine de la non-conformité génétique).

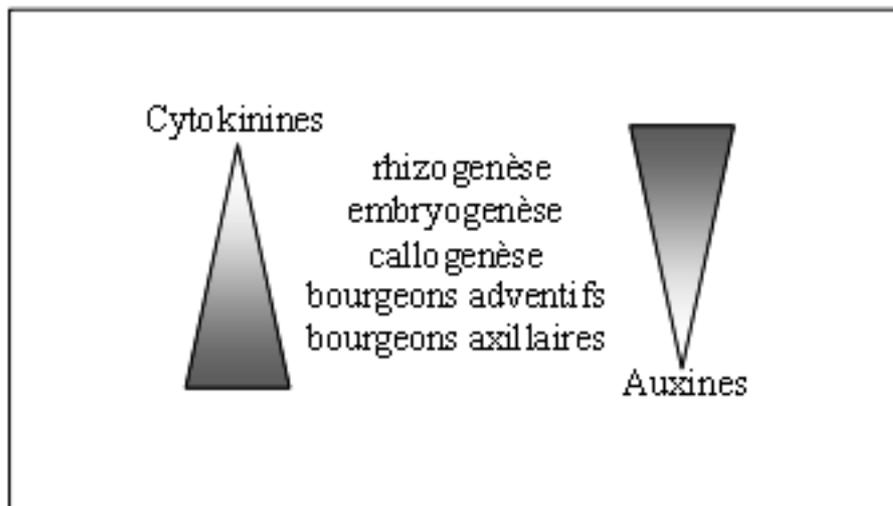
Cependant, la voie végétative présente des limites. En effet, les rejets sont émis uniquement pendant la phase jeune du dattier et leur nombre est limité (en moyenne 12 rejets pour les cultivars algériens). En outre, ce mode de multiplication est la principale cause de la propagation de la maladie du Bayoud (EL HADRAMI, 1995).

Aussi les techniques de cultures in vitro (C.I.V) représentent la solution idéale pour pallier aux insuffisances des méthodes de multiplication traditionnelles. Ces techniques reposent sur le fait que les cellules végétales sont totipotentes. Cette propriété fondamentale signifie que des cellules d'un tissu déjà spécialisées, donc différenciées, peuvent d'abord perdre cette spécialisation en revenant à un état méristématique, observé au niveau d'un cal (amas de cellules dédifférenciées) puis se différencient de nouveau pour redonner des cellules spécialisées d'un autre tissu.

Les C.I.V consistent par conséquent à faire pousser en milieu aseptique des plantes entières, des fragments, des organes voire des cellules dans des milieux liquides ou solides et dans des conditions environnementales (température et photopériode) contrôlées. Tout cela en présence de régulateurs de croissance (phytohormones) naturels et/ou de synthèse qui permettent d'orienter le programme cellulaire vers les cals, les racines ou même la régénération de plantes entières (LABERCHE, 1999).

Schématiquement, on peut admettre selon SKOOG et MILLER (1957) (*in* ZRYD, 1988), que le comportement physiologique d'un explant mis en culture en présence des deux principales hormones de croissance (auxine et cytokinine) serait comme suit (Fig.7) :

- si le rapport auxine / cytokinine est élevé, on obtient un fonctionnement de type rhizogène ;
- si le rapport auxine / cytokinine est faible, l'explant évoluera vers un fonctionnement de type caulogène ;
- enfin, si le rapport est voisin de l'unité, on aura un comportement de type callogène et/ou embryogène.



**Fig. 7 :** Equilibres auxines/cytokinines déterminant l'orientation de l'organogénèse en C.I.V (ZRYD, 1988).

Ainsi, l'application au palmier dattier des techniques de C.I.V présente de nombreux avantages :

- Reproduction conforme des caractères des parents et cela indépendamment de la période de prélèvement pendant l'année (car en conditions environnementales contrôlées l'effet de l'alternance des saisons est annulé).
- Production rapide et en grand nombre de plants indemnes de maladies, sélectionnés pour leur qualité dattière et/ou leur résistance au Bayoud.
- Outils d'appoint aux programmes d'amélioration génétique : croisement dirigé, hybridation somatique, mutagenèse et transformation génétique.

Au vu des avantages qu'apportent ces techniques, de nombreux pays phœnicicoles ou non se sont orientés vers celles-ci produisant annuellement des milliers de vitroplants acclimatés (FERRY et *al.*, 1998; ZAID et *al.* 2002; KUNERT et *al.*, 2003).

Les principales techniques utilisées actuellement sont l'organogenèse et l'embryogenèse. Ces techniques font toujours l'objet de recherches afin d'optimiser toutes les étapes de la régénération.

## 1- L'organogenèse

### 1-1- Définition

L'organogenèse est une technique qui repose sur la réactivation des bourgeons axillaires et des zones méristématiques préexistantes à la base des jeunes feuilles de rejets, jeunes inflorescences et bourgeons axillaires indifférenciés de palmiers dattiers adultes (EL HADRAMI, 1996).

### 1-2- Phases de l'organogenèse

Le cycle de production comprend quatre (04) phases :

1. Initiation de tissus organogènes : Elle se fait à partir de sites potentiellement méristématiques préexistants au niveau des explants. Cette phase se déroule à l'abri de la lumière (obscurité) et aboutit à la formation de souches réactives, nécessitant l'action d'hormones à dominance auxinique (DJERBI, 1991; AL KAABI, 2001).
2. Multiplication des bourgeons : Elle s'effectue à la lumière dans un milieu où la teneur en cytokinines est augmentée. On assiste durant cette phase à une initiation de bourgeons qui, après formation, seront repiqués pour être multipliés (BENABDALAH, 1989). Cette étape est répétée autant de fois qu'il faut pour atteindre le nombre de bourgeons désirés (DJERBI, 1991).
3. Allongement des bourgeons et enracinement des pousses : Cette phase nécessite au moins deux (02) milieux différents et doit déboucher vers la formation de plants vigoureux et bien constitués ayant la structure d'un petit poireau (DJERBI, 1991; AL KAABI, 2001).
4. Acclimatation : Il s'agit durant cette phase de soumettre progressivement les vitroplants aux conditions naturelles de plantation.

### 1-3- Avantages et inconvénients de l'organogenèse

L'organogenèse présente l'avantage de produire des vitroplants conformes aux plants d'origine et cela est assuré lorsque le développement provient de méristèmes axillaires, sans le passage par le stade cal (siège des vitrovariations) (DJERBI, 1999; FERRY et *al.*, 1998; AZEQOUR et *al.*, 2002).

Aussi l'utilisation des inflorescences comme source d'explants pourrait être en faveur d'une stabilité génétique permettant la multiplication rapide de palmiers résistants au Bayoud issus de programmes d'amélioration et qui sont le plus souvent représentés par un seul individu (ABAHMANE, 2006).

Il est à signaler ici que la conformité variétale peut être altérée (ZAID, 1991; ZAID et *al.*, 2002) par :

- Les techniques de propagation utilisées ;
- L'origine des explants (variations chimériques) ;
- Le type de phytohormones synthétiques utilisé ;

- Le type d'explant ;
- L'âge de la culture (à partir d'un an de culture) ;
- La surexploitation de la souche ;
- La faible fréquence de repiquage ou variations brutales des conditions de culture.

Malgré l'avantage considérable de la conformité génétique des vitroplants, l'organogenèse présente de nombreux inconvénients la rendant peu efficace (VERAMENDI et *al.*, 1997) :

Nombre restreint d'explants organogènes ;

Temps nécessaire à l'initiation de l'organogenèse long ;

Forte influence de la variété ;

Taux de multiplication faible par rapport à l'embryogenèse, ce qui la rend peu rentable par rapport aux efforts mis en jeu.

## **2- L'embryogenèse somatique**

---

### **2-1- Définition**

L'embryogenèse utilise la dédifférenciation et la différenciation cellulaires pour la formation d'embryons à partir de cellules somatiques issues de différents types d'explants (EL HADRAMI, 1996).

Les embryons somatiques sont produits selon les même étapes que les embryons zygotiques issus d'une fécondation (ZRYD, 1988; MARGARA, 1989).

### **2-2- Phases de l'embryogenèse somatique**

Le cycle de production comprend quatre (04) phases :

- Initiation de la callogenèse et multiplication des cals embryogènes:

Selon MARGARA (1989), le cal est un tissu de néoformation issu d'une dédifférenciation de cellules spécialisées (retour à l'état méristématique). Il peut être à croissance active ou lente, homogène ou nodulaire, plus ou moins dissocié ou compact, incolore et plus rarement chlorophyllien ou anthocyané. Sa formation (la callogenèse) résulte à la fois de la levée de l'inhibition consécutive à la séparation de l'explant et de l'action excitatrice des substances trophiques (milieu minéral, sucres,...) et des régulateurs de croissance (auxines, cytokinines,...) du milieu de culture.

Pour le palmier dattier, les explants provenant du sommet du cœur de rejets ainsi que des inflorescences sont les plus utilisés. Le prélèvement doit se faire à des stades précis de leur développement et doit être soumis à des conditions de culture bien définies car ces dernières (état physiologique et composition du milieu) conditionnent le type de cal obtenu (DRIRA et *al.*, 1996). Le génotype joue un rôle dans le temps de réponse des explants à la callogenèse (SAKA, 1996).

L'induction de la callogenèse est lente. Elle peut durer jusqu'à 6 mois voire un an de culture (EL BELLAJ et *al.*, 2000). Parmi les différents types de cals obtenus à partir de tissus du palmier dattier seuls les cals de structure nodulaire, plus ou moins friables, et de couleur blanchâtre à brune sont embryogènes (BAAZIZ, 1996 ; SAKA, 1996). L'induction de cals embryogènes chez le palmier dattier est généralement obtenue sur un milieu à base d'auxine (SAKA, 1992).

La croissance du cal peut être indéfinie (MARGARA, 1989). L'entretien et la multiplication de la masse de cals embryogènes se fait par repiquages successifs sur milieu frais solide ou bien liquide. En effet, selon FKI (1998), le passage des cals sur un milieu liquide agité de même composition hormonale que le milieu d'induction favorise leur prolifération.

Le principal facteur entravant le bon développement des explants mis en culture est le phénomène de brunissement des tissus et des milieux. Ceci serait dû à l'oxydation des polyphénols (secrétés par les tissus suite à un stress biotique ou abiotique) et à la formation de quinones toxiques pour les tissus. Afin de minimiser l'action négative du phénomène de brunissement, ZAID (1984) a résumé les différentes actions qui peuvent être menées :

- Le prétraitement des explants (avant la désinfection) avec une solution d'anti-oxydants (150mg/l d'acide citrique et 100 mg /l d'acide ascorbique) ;
- Utilisation de combinaison d'adsorbant avec de l'adénine, glutamine, citrate ;...
- Modification au niveau de la composition minérale des milieux de culture ;
- Utilisation d'explants de petite taille avec repiquages fréquents et excision des parties ayant brunies.
- Utilisation d'adsorbants : le charbon actif est le plus utilisé. Cependant il est préconisé d'augmenter les concentrations d'hormones utilisées car le charbon réduit leur disponibilité dans le milieu (VAN WINKLE, 2000).
- Initiation de l'embryogenèse et obtention d'embryons somatiques

Les embryons somatiques se développent lorsque le cal embryogène est transféré dans un milieu sans auxine ou contenant une faible dose de celle-ci (ZRYD, 1988).

Le milieu d'induction de l'embryogenèse peut être solide ou liquide. Ce dernier peut paraître plus intéressant car il présente les avantages suivants :

- Il permet une meilleure observation et un suivi plus simple de tous les stades de l'embryogenèse somatique (ZRYD, 1988).
- Il permet d'avoir des embryons à la fois isolés, typiques et viables (FKI, 1998).
- Il stimule la multiplication du nombre d'embryons somatiques, améliore la synchronisation de leur croissance, contribue à leur individualisation et raccourcit le temps de leur germination, surtout lorsqu'ils subissent une légère déshydratation (OTHMANI et al., 2006).
- Selon FKI et al (2003 ; 2006) la culture en suspension (milieu liquide) permet d'obtenir un nombre d'embryons somatiques supérieur à celui obtenu sur un milieu solide.
- Germination des embryons :

Les embryons obtenus ayant une taille convenable sont replacés dans un milieu de germination qui peut être solide, semi-solide ou même liquide sans hormones de croissance ou en plus faibles concentrations (EL KHAYRI et al., 2003). Les repiquages successifs permettront d'obtenir des plants bien constitués avec le moins d'anomalies possibles (DJERBI, 1991).

- Acclimatation :

La réussite de cette étape dépend, pour beaucoup, des techniques de C.I.V appliquées lors des étapes précédentes. L'acclimatation consiste à transférer les vitroplants dans des serres sous des conditions contrôlées d'humidité saturante, de température et de photopériode.

Ces conditions seront modifiées graduellement jusqu'à atteindre les conditions naturelles de plantation (ZAID et *al.*, 2002). Cette phase de durcissement est nécessaire afin de permettre aux vitroplants de s'accommoder progressivement aux conditions ambiantes et être prêts au terme de trois (03) ans d'élevage à être plantés en plein champ (SAKA, 1992).

### 2-3- Avantages et inconvénients de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique reste une technique très avantageuse par rapport à l'organogenèse, à savoir un taux élevé de multiplication et une période moins longue pour la régénération malgré quelques risques limités d'apparition de variants (DJERBI, 1991).

De nombreux travaux sur cet aspect de la conformité génétique des palmiers issus d'embryogenèse ont été réalisés sur la base d'observations morphologiques, histocytologiques ou en utilisant des marqueurs enzymatiques et moléculaires.

Les résultats de ces travaux restent contradictoires mais reflètent une certitude que le risque de vitrovariations existe. Il devra être maîtrisé par la mise en place de tests précoces afin de caractériser et d'évaluer la stabilité génétique du matériel multiplié (EL HADRAMI, 1996; ZAID et *al.*, 2002; KUNERT et *al.*, 2003).

## 3- Perspectives de recherche

---

La recherche et l'identification précise des génotypes ainsi que la création d'hybrides dans le cadre de la lutte contre la maladie du Bayoud ont démarré au début de la 2<sup>ème</sup> moitié du siècle passé. Elles ont abouti à la sélection d'un nombre réduit de génotypes résistants à la maladie mais produisant des dattes de qualité moyenne. De plus, la plantation d'un nombre restreint de cultivars au niveau des zones Bayoudées peut engendrer un contournement de la résistance par le parasite (FERNANDEZ et *al.*, 1995; ELHADRAMI et *al.*, 2005).

Devant les limites enregistrées lors des programmes classiques d'amélioration génétique entrepris, les techniques de biotechnologie sont apparues comme des outils incontournables afin d'augmenter le potentiel de sélection. Ainsi l'exploration des biotechnologies s'est orientée vers la mutagenèse induite par irradiation (ABED et *al.*, 2006; KHELAFI et *al.*, 2006) et dernièrement vers le développement de la fusion de protoplastes (ABED et *al.*, 2006; CHABANE et *al.*, 2007).

Cependant, l'utilisation des biotechnologies ainsi que l'établissement de contrôles précoces de la résistance effective au bayoud restent tributaires de la maîtrise des techniques de culture in vitro seul moyen de régénération de plantules complètes à partir de la variabilité créée (ANJARNE et *al.*, 2005).

Aussi, la maîtrise des étapes de régénération in vitro (suspensions cellulaires, cals, embryons somatiques,...) permettront l'évolution de la compréhension des mécanismes de la relation palmier dattier/*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis* (hôte/pathogène) (DAAYF et *al.*, 2003; DIHAZI et *al.*, 2003; JAITI et *al.*, 2004; ELHADRAMI et *al.*, 2005).

---

# MATERIEL ET METHODES

L'objectif du présent travail consiste à optimiser l'obtention de vitroplants de palmier dattier (*var.* : Degla Beida) par la voie de l'embryogenèse somatique dans le cadre de la lutte contre le Bayoud. L'étude a été menée en trois étapes :

- initiation de la callogenèse,
- entretien et multiplication de la masse callogène,
- induction de l'embryogenèse et germination des embryons.

## I- Matériel végétal

Le matériel végétal que nous avons utilisé a été récolté au niveau d'une palmeraie située à El-Méniaa (Centre Nord du Sahara). Il s'agit d'un rejet de la variété Degla Beida d'un poids d'environ 6 Kg (Planche 1-A).

Avant la dissection, nous avons éliminé à l'aide d'une scie et d'un sécateur la partie racinaire et les palmes épineuses ainsi que leur gaines fibreuses jusqu'aux deux dernières palmes protégeant les parties tendres du cœur (Planche 1-B et C). Par la suite, seul le sommet du cœur (S.C.) regroupant le méristème apical, les ébauches foliaires, les bourgeons axillaires ainsi que la base des jeunes feuilles a été utilisé.

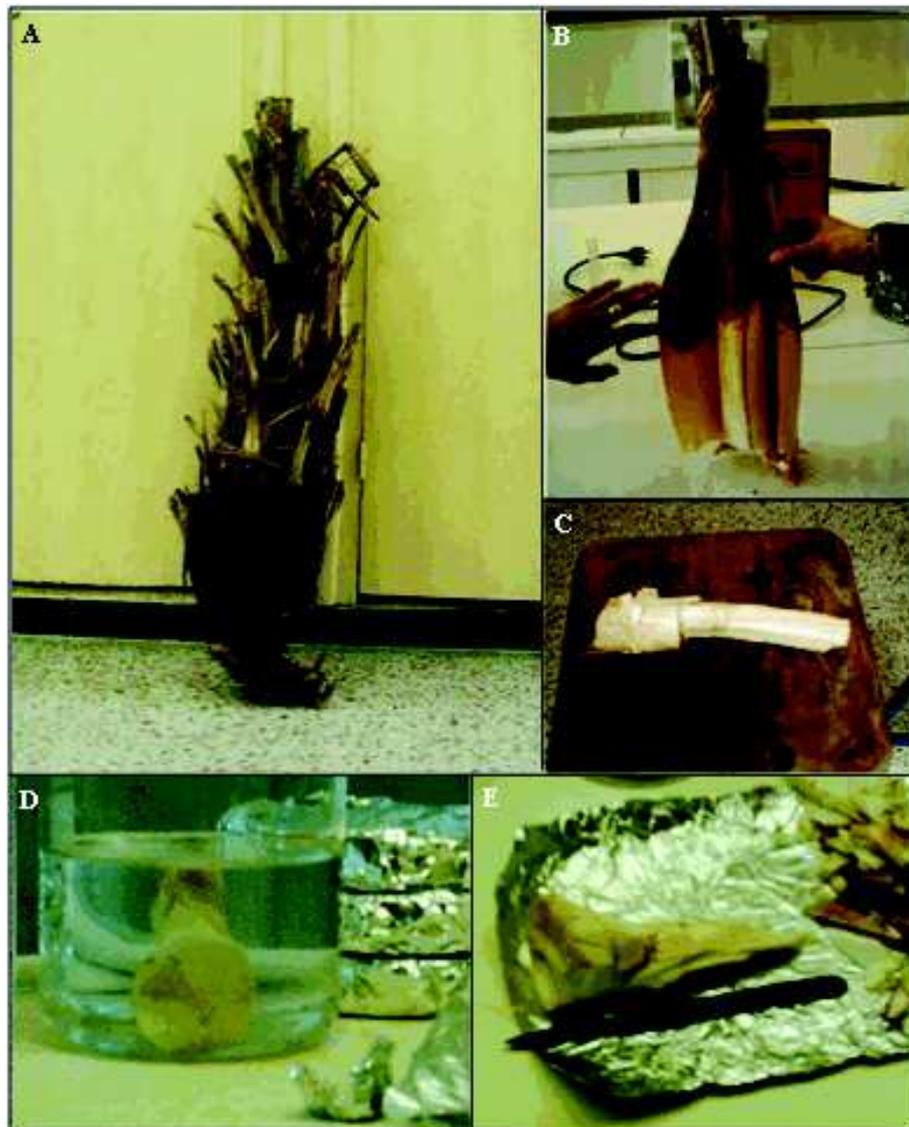
## II- Initiation de la callogenèse

### 1- Désinfection du matériel végétal

---

Pour désinfecter le cœur du rejet, nous avons procédé comme suit:

- Première immersion dans une solution de chlorure mercurique ( $\text{HgCl}_2$ ) à une concentration de 150 mg/l pendant une (01) heure.
- Nettoyage et élimination des deux palmes apparentes.
- Deuxième immersion dans la solution de  $\text{HgCl}_2$  (150 mg/l) pendant une (01) heure (Planche 1-D).
- Rinçages (03 fois) à l'eau distillée stérile.
- Elimination des parties ayant bruni suite à l'immersion dans du  $\text{HgCl}_2$  (Planche 1-E).



*Planche 1: Préparation du matériel végétal.*

- **A** : Rejet de la variété Degla Beida utilisé (G=1/20).
- **B** : Cœur du rejet protégé par les deux dernières palmes (G=1/10).
- **C** : Cœur du rejet après l'élimination des deux dernières palmes (1/10)
- **D** : Immersion de la partie apicale du cœur du rejet dans du HgCl<sub>2</sub>. (G=1/2)
- **E** : Fin de la désinfection (G=1/2).

## 2- Milieux d'induction de la callogenèse

---

### 2-1- Composition des milieux solides de culture

Le milieu de base est celui de MURASHIGE et SKOOG (1962) (dont la composition est rappelée dans le tableau 2) additionné de :

- 100 mg/l de myo-inositol ;
- 100 mg/l de glutamine ;

- 40 mg/l d'adénine ;
- 45 g/l de saccharose ;
- 7 g/l de gélose (Agar) ;
- Additifs de TISSERAT (1979) : 170 mg/l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mg/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 350 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

	<b>Eléments</b>	<b>Concentrations en mg/l</b>
<b>Macroéléments (MS)</b>	$\text{KNO}_3$	1900
	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
<b>Microéléments (MS)</b>	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2
	KI	0,83
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
<b>Fe-EDTA</b>	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37,25
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,85
<b>Vitamines (MS)</b>	Myoinositol	100
	Glycine	2
	Pyridoxine	0,5
	Acide nicotinique	0,5
	Thiamine HCl	0,1
<b>Additifs organiques</b>	L-Glutamine	100
	Adénine	40
<b>Additifs minéraux</b>	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	<b>350</b>
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	<b>170</b>
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	<b>100</b>
<b>Divers</b>	Sucre	45.000
	Agar	7.000
	Charbon actif	0 à 3.000

**Tableau 2 : Composition du milieu de base MURASHIGE et SKOOG (1962) + divers additifs.**

Ainsi l'absence ou la présence des éléments minéraux additifs nous a permis de tester deux types de composition de base :

- Milieu de culture témoin (T) caractérisé par l'absence des additifs minéraux de TISSERAT (1979).
- Milieu de culture modifié (M) caractérisé par la présence des additifs minéraux de TISSERAT (1979).

Le pH du milieu de culture est ajusté à 5,6~5,8 avant l'addition des hormones et avant l'autoclavage.

## 2-2- Equilibres hormonaux

Pour chacun des deux milieux de culture utilisés, sept équilibres hormonaux ont été testés et sont décrits dans le tableau 3.

Tableau 3 : Equilibres hormonaux testés sur les explants de la variété Degla Beida pour chacun des deux milieux de culture testés.

Traitements	0	1	2	3	4	5	6*
2,4-D (mg/l)	0	1	5	10	50	100	5
BAP (mg/l)	0	1	1	1	1	1	5
Rapport : 2,4-D / BAP	0	1	5	10	50	100	1
Charbon actif : (30mg de C.A. pour 1mg/l de 2,4 -D)	0	30	150	300	1500	3000	150

\* Balance hormonale / témoin bibliographique (EL HADRAMI, 1995).

## 3- Mise en culture

---

Avant la mise en culture, les milieux définitifs sont autoclavés à une température de 120°C pendant 20 minutes. A la sortie de l'autoclave, les milieux contenus dans des tubes à essais standard (160 x 24 x 1,2 mm) sont agités puis refroidis dans de la glace afin de maintenir le charbon actif dans le milieu de culture en suspension homogène.

Les explants de 0,5 cm issus du cœur du rejet préalablement stérilisés sont mis en culture à raison d'un explant par tube à essai afin de réduire les risques de contamination. Le nombre d'explants utilisé est résumé dans le tableau 4.

Tableau 4 : Nombre d'explants par traitement et pour chaque milieu de culture testé pour la variété Degla Beida.

Traitements hormonaux	Milieu de culture témoin T : sans additifs	Milieu de culture modifié M: avec additifs
0	12	11
1	12	13
2	10	12
3	12	12
4	12	12
5	6	12
6	12	12
Total	76	84

Les explants ainsi mis en culture sont placés dans l'obscurité durant toute la phase de la callogenèse à une température de 25°-+ 2°C. Le transfert des explants sur des milieux frais est réalisé au bout de deux mois de culture.

## 4- Observations réalisées

---

Pour chaque milieu de culture et pour chaque équilibre hormonal, des observations ont été réalisées et un bilan a été établi au bout de deux mois de culture. Ainsi les observations ont porté sur :

- Les contaminations,
- Les brunissements,
- La callogenèse induite au niveau des explants mis en culture.

### III- Entretien et multiplication des cals

Durant cette étape, nous avons utilisé deux types de milieux :

#### 1- Milieux solides

##### 1-1- Mise en culture

L'ensemble des explants issus de la première phase ont été soumis aux mêmes conditions de culture (milieu de culture) et environnementales (température et obscurité) que celles de départ et repiqués sur un milieu frais tous les deux mois avec, à chaque fois, l'élimination des contaminations et des explants nécrosés et la fragmentation des cals lorsque leur volume recouvre la totalité de la surface du milieu contenu dans les tubes à essai utilisés.

##### 1-2- Observations réalisées

Les observations ont été réalisées durant dix subcultures ayant succédé à la phase de l'induction avec établissement d'un bilan avant chaque repiquage pour l'ensemble des milieux et traitements testés. Elles ont porté sur l'évolution, en fonction du temps, du nombre d'explants caractérisés par:

- Une absence ou un arrêt de développement causé par la présence de polyphénols.
- Une callogenèse simple.
- Une callogenèse nodulaire.

#### 2- Milieux liquides

##### 2-1- Composition des milieux liquides de culture

Au terme du 4<sup>ème</sup> repiquage c'est-à-dire après environ dix mois de culture, les cals présentant une nodulation intense (cals nodulaires) sont mis dans des milieux de culture liquides, de même composition de base que les milieux de culture solides ayant permis leur obtention (M et T) mais avec des modifications rapportées dans le tableau 5.

**Tableau 5 : Modifications apportées aux milieux de base pour la prolifération des cals nodulaires en milieu liquide agité.**

	Milieu liquide de base témoin (T')	Milieu liquide de base modifié (M')
Macroéléments (MS)	Réduits de moitié	Réduits de moitié
Microéléments (MS)	Réduits de moitié	Réduits de moitié
Fe-EDTA	Réduits de moitié	Réduits de moitié
Additifs minéraux	-----néant-----	Réduits de moitié
Sucre	30.000 mg/l	30.000 mg/l
Charbon actif	300mg/l	300mg/l
Agar	0 mg/l	0 mg/l

## 2-2- Equilibres hormonaux

Le choix des balances hormonales a été fait en fonction des observations réalisées lors du 4<sup>ème</sup> repiquage. Seuls les équilibres hormonaux présentant une callogenèse nodulaire en évolution ont été retenus (Tableau 6).

Traitement	Milieux de culture témoins (T')			Milieux de culture modifiés (M')				
	T'T*	T'2	T'5	M'T*	M'2	M'3	M'4	M'5
<b>2,4-D (mg/l)</b>	<b>1</b>	5	100	<b>1</b>	5	10	50	100
<b>BAP (mg/l)</b>	<b>0</b>	1	1	<b>0</b>	1	1	1	1

*Tableau 6: Balances hormonales retenues pour la prolifération des cals nodulaires en milieux liquides agités.*

\* Balance hormonale / témoin bibliographique (FKI, 1998).

## 2-3- Mise en culture

Les cals nodulaires obtenus sur les milieux solides d'un poids d'environ 0,4 g sont légèrement fragmentés dans des boîtes de Pétri stériles à l'aide d'un scalpel puis placés dans des flacons horizontaux stériles de 650 ml destinés aux cultures cellulaires, contenant 150 ml de milieu liquide (4 flacons/traitement) (Planche 2-A et B).

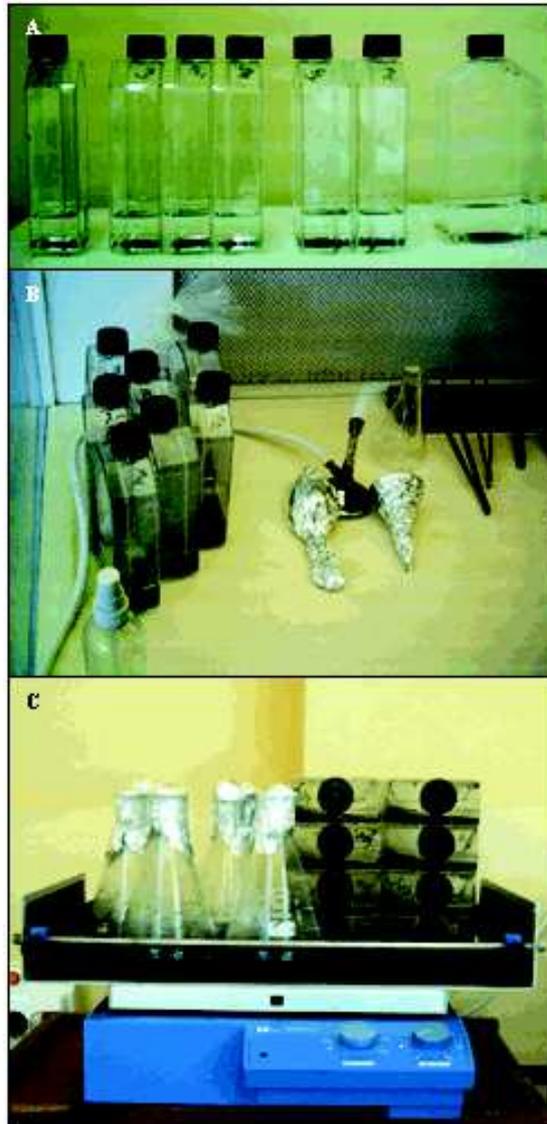
Le tout est mis en agitation sur un agitateur orbital à une vitesse de 100 rotations par minute (rpm) (Planche 2-C), sous une photopériode de 16 heures de lumière et une température de 25° +- 2°C. Les milieux liquides sont renouvelés au bout d'un mois de culture.

Les cals amplifiés sont par la suite transférés à la fin du deuxième mois de culture, dans des boîtes de Pétri contenant des milieux de culture solides de même composition ayant permis l'induction de la callogenèse nodulaire (M et T) mais avec le maintien des équilibres hormonaux ayant permis leur amplification (retour sur milieux solides).

## 2-4- Observations réalisées

Des pesées sont effectuées à l'introduction, au renouvellement du milieu (après un mois) et avant le retour en milieu solide (après deux mois). Les observations effectuées sont les suivantes :

- Facteurs de multiplication obtenus (poids final/poids initial) sur milieux et traitements hormonaux testés à la fin de chacune des deux subcultures réalisées.
- Le comportement (réactivité) des cals amplifiés après le retour sur milieux solides.



**Planche 2** : Matériel employé lors de l'utilisation du milieu liquide agité.

**A** : Flacons utilisés pour la prolifération des cals nodulaires (G=1/9).

**B** : Préparation de la hotte pour l'initiation de la phase liquide (G=1/12).

**C** : Dispositif utilisé lors de la prolifération de cals nodulaires (flacons horizontaux) et de l'induction de l'embryogenèse somatique (Erlen ).(G=1/10).

## IV- Induction de l'embryogenèse, maturation et germination des embryons somatiques

### 1- Induction de l'embryogenèse et maturation en milieu liquide agité

---

#### 1-1- Techniques et conditions de culture

Le matériel de départ consiste en un cal ayant toutes les caractéristiques d'un cal embryogène (nodulaire plus ou moins friable) obtenu sur milieux solides (T ou M) lors de l'étape précédente.

L'induction de l'embryogenèse somatique est réalisée en milieux liquides dépourvus d'hormones de croissance de même composition de base ayant permis l'induction de ces cals nodulaires (T ou M) mais avec des modifications. Ces dernières sont consignées dans le tableau 7.

Tableau 7: Composition du milieu liquide d'induction de l'embryogenèse

	Milieu liquide d'induction de l'embryogenèse (TE).	Milieu liquide d'induction de l'embryogenèse (ME).
<b>Macroéléments (MS)</b>	Réduits de moitié	Réduits de moitié
<b>Microéléments (MS)</b>	Réduits de moitié	Réduits de moitié
<b>Fe-EDTA</b>	Réduits de moitié	Réduits de moitié
<b>Additifs minéraux</b>	-----néant-----	Réduits de moitié
<b>Sucre</b>	30.000 mg/l	30.000 mg/l
<b>Charbon actif</b>	300mg/l	300mg/l
<b>Agar</b>	0 mg/l	0 mg/l

La mise en place des suspensions dans le but d'initier l'embryogenèse somatique consiste à hacher le cal nodulaire sélectionné dans une boîte de Pétri sous hotte à l'aide d'un scalpel.

Les fragments d'un poids d'environ 0,4 g sont divisés puis transférés et écrasés en présence de 150 ml de milieu liquide sur un tamis de 500 µm de maille. L'ensemble est placé dans un Erlen de 500 ml.

Les suspensions obtenues (3 suspensions/milieu) sont ensuite placées sur agitateur orbital réglé à une vitesse de 100 rpm. Les conditions de culture sont réglées à une photopériode de type jours longs (16h) et à une température de 25°-+2°C.

Les milieux liquides sont renouvelés au bout d'un mois de culture après décantation de la suspension.

#### 1-2- Observations réalisées

Les observations au cours de cette étape ont porté sur le développement des suspensions en milieux liquides agités dépourvus d'hormones TE et ME.

### 2- Maturation des embryons somatiques en milieu gélosé

---

#### 2-1- Techniques et conditions de culture

---

Après trois mois de culture sous agitation en milieu liquide ME dépourvu d'hormones (les suspensions mises en milieu liquide TE ont été éliminées), la fraction des suspensions qui n'a pas abouti à la formation d'embryons somatiques structurés est isolée et étalée dans des Erlen de 500 ml contenant 150 ml de milieu solide (MG<sub>1</sub>) ou semi-solide (MG<sub>2</sub>).

Ces derniers ont la même composition de base que le milieu liquide mais avec apport de l'agar comme élément gélifiant (tableau 8).

**Tableau 8 : Composition des milieux gélosés dépourvus d'hormones de croissance MG<sub>1</sub> (solide) et MG<sub>2</sub> (semi-solide).**

	Milieu gélosé solide MG <sub>1</sub>	Milieu gélosé semi- solide MG <sub>2</sub>
<b>Macroéléments (MS)</b>	Réduits de moitié	Réduits de moitié
<b>Microéléments (MS)</b>	Réduits de moitié	Réduits de moitié
<b>Fe-EDTA</b>	Réduits de moitié	Réduits de moitié
<b>Additifs minéraux</b>	Réduits de moitié	Réduits de moitié
<b>Sucre</b>	30.000 mg/l	30.000 mg/l
<b>Charbon actif</b>	300mg/l	300mg/l
<b>Agar</b>	7 .000 mg/l	3.500 mg/l

Les suspensions (amas de proembryons) étalées sur milieux gélosés (6 Erlen/milieu) sont mises en culture en conditions photopériodiques de type jour long (16h) et sous une température de 25°-+2°C.

## 2-2- Observations réalisées

Les observations au cours de cette étape ont porté sur le développement des étalements (proembryons) en milieux gélosés dépourvus d'hormones de croissance : MG<sub>1</sub> (solide) et MG<sub>2</sub> (semi-solide).

## 3- Germination des embryons somatiques structurés

### 3-1- Techniques et conditions de culture

Les embryons somatiques structurés obtenus à partir de la mise en suspension de cals nodulaires tamisés ainsi que ceux issus de la maturation en milieux gélosés sont mis en germination comme suit :

**Tableau 9 : Milieux de germination utilisés.**

Origine des embryons structurés	Milieux gélosés de germination
Milieu liquide	MG <sub>1</sub> ou MG <sub>2</sub>
Milieu solide	MG <sub>1</sub>
Milieu semi-solide	MG <sub>2</sub>

Les embryons somatiques structurés (toutes origines confondues) sont mis en germination dans des tubes à essais contenant 20 ml de milieux gélosés (MG<sub>1</sub> ou MG<sub>2</sub>)

renouvelés tous les 15 jours. Ces embryons sont placés en conditions photopériodiques de type jour long (16h) et à une température de 25°-+ 2°C.

### **3-2- Observations réalisées**

Les observations réalisées ont porté sur les taux de germination, d'organogenèse et d'embryogenèse secondaire au niveau des embryons somatiques structurés obtenus dans différents milieux : liquide, solide et semi-solide.

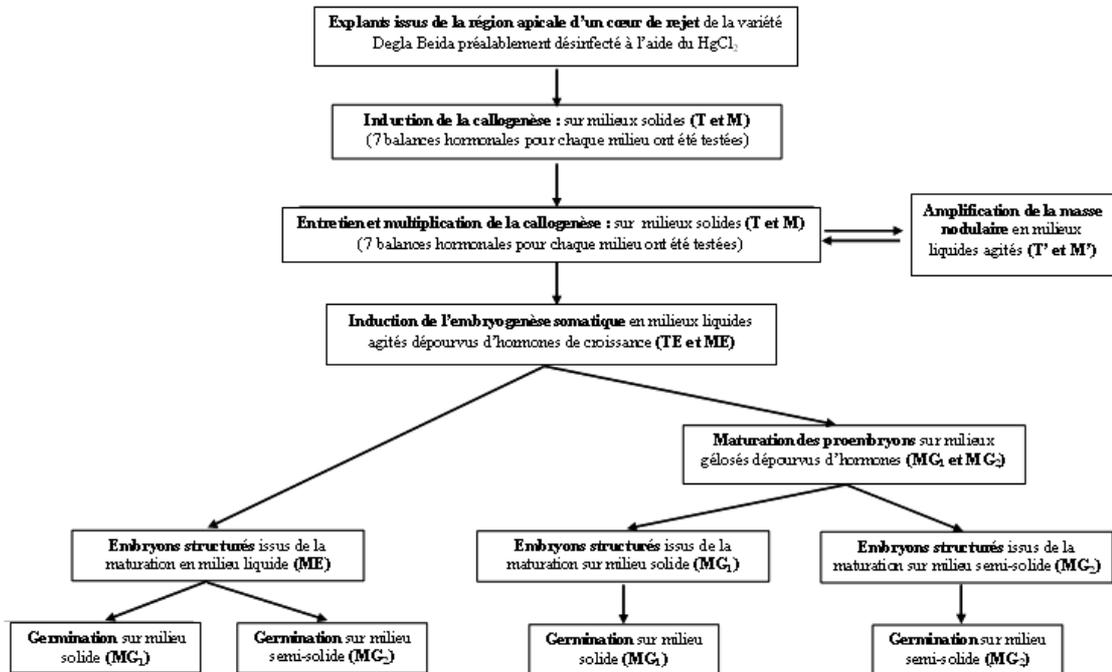
## **V- Analyse statistique**

L'analyse statistique consiste en une analyse de la variance en utilisant le logiciel STATGRAPHICS (Centurion XV). Le test ANOVA a été réalisé dans le but de voir s'il existe des effets significatifs des milieux ou des traitements appliqués.

Dans le cas où l'effet est confirmé, l'analyse de la variance est complétée par une comparaison des moyennes, deux à deux, en utilisant le test LSD de Fisher (Least Significant Difference) au seuil de 5%. Ce dernier test nous permet de dégager les groupes homogènes.

## **VI- Protocole expérimental adopté**

La figure 8 résume l'ensemble des étapes du protocole expérimental adopté lors de cette étude.



*Fig. 8: Protocole adopté lors de la réalisation de notre travail expérimental sur la variété Degla Beida.*

# RESULTATS EXPERIMENTAUX

## I- Pourcentage de contaminations

L'initiation de la callogenèse a été réalisée à partir d'explants, issus du sommet d'un cœur de rejet de la variété Degla Beida. Ceux-ci ont été préalablement désinfectés à l'aide du chlorure de mercure  $HgCl_2$ .

Ainsi, au bout des deux premiers mois de culture, l'apparition de quelques contaminations a été relevée. En effet, sur les 160 explants mis en culture 7 contaminations fongiques ont été enregistrées, ce qui équivaut à un taux de 4,37 % (tous milieux confondus). Au-delà de cette période, l'apparition des contaminations était ponctuelle et limitée. Elles seraient dues à des erreurs de manipulation.

## II- Initiation de la callogenèse

### 1- Brunissement des explants et des milieux de culture

---

L'apparition des premiers brunissements, dus à la présence de polyphénols sécrétés par les explants dans les milieux de culture, a été constatée à partir du 1<sup>er</sup> mois de culture engendrant un ralentissement, un arrêt de la réactivité ou même la nécrose (mort) de quelques explants.

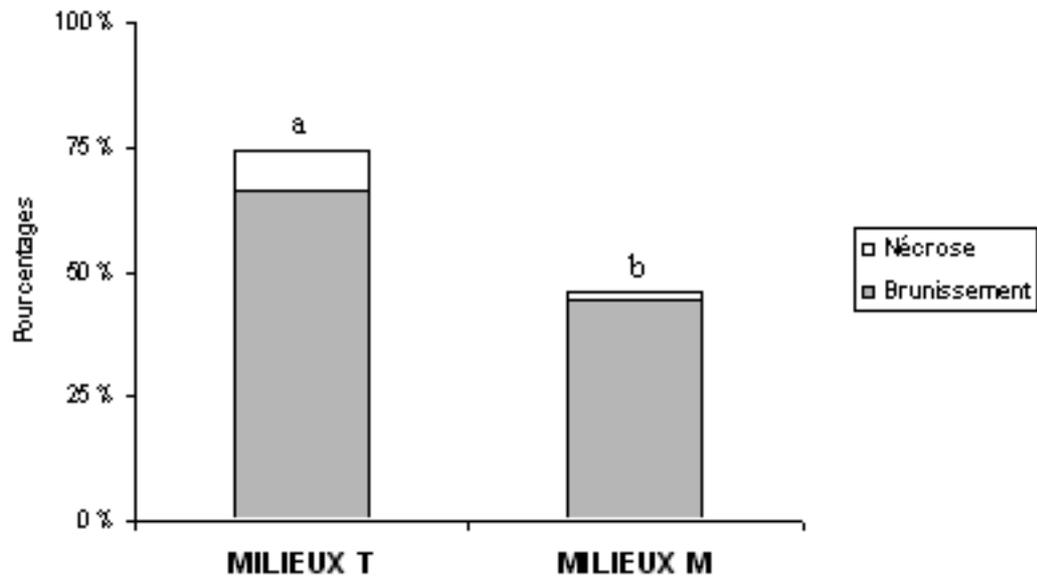
Le brunissement des explants et des milieux de culture a été estimé en fonction de deux paramètres :

- La composition des milieux de culture ;
- Les équilibres hormonaux.

#### 1-1- Effet des milieux de culture

L'apparition du phénomène de brunissement pendant la phase d'induction de la callogenèse primaire nous a permis de noter des différences entre les milieux de base. En effet, les explants mis en culture sur les milieux de base T (non enrichi) ont montré les plus forts taux de brunissement (66,21%) et de nécrose (8,10%) comparativement avec les explants mis en culture sur les milieux de base M (enrichi) dont les taux de brunissement et de nécrose ont été respectivement de 44,30% et 1,26%(Fig.9). Il est à signaler ici que l'essentiel des explants ayant présenté une nécrose étaient des fragments de jeunes feuilles.

L'analyse statistique effectuée à la fin de deux mois de culture révèle une différence significative entre les milieux testés (T et M) avec l'identification de deux groupes homogènes (a et b) (Annexe I). Les milieux de type M sont les moins touchés par le phénomène de brunissement.



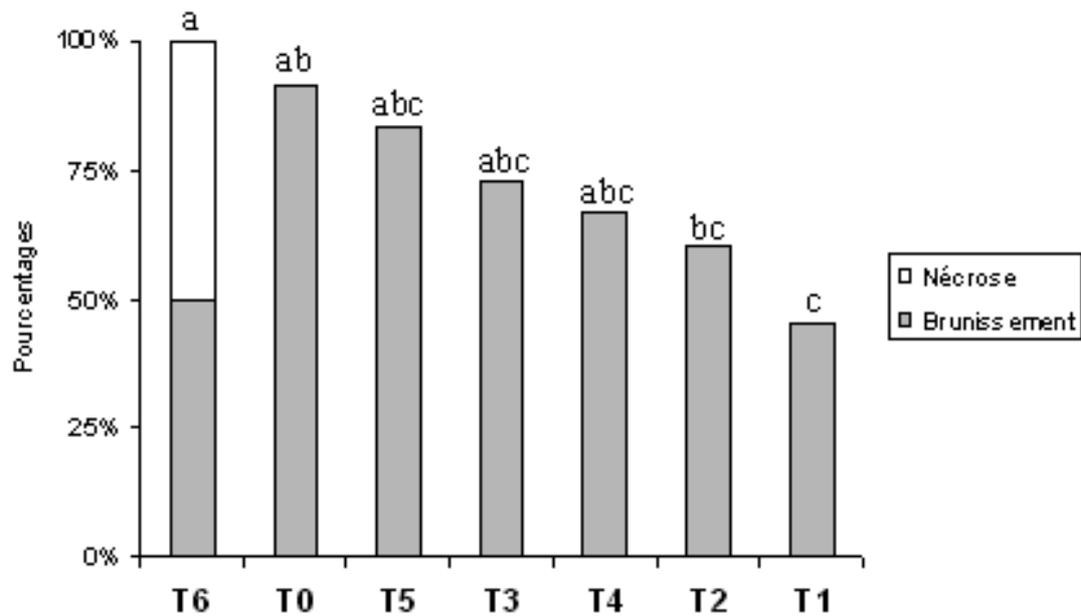
**Fig. 9 :** Effet des milieux de culture sur le phénomène de brunissement après deux mois de culture ( $F_c = 14,15, ddl1/151, p = 0,0002, ***$ ).

### 1-2- Effet des équilibres hormonaux

Tous les équilibres hormonaux testés ont présenté un brunissement avec, cependant, des taux variables.

Ainsi, pour les traitements hormonaux appliqués sur le milieu T, le plus fort taux de brunissement (100 %) a été enregistré au niveau des traitements  $T_6$  (5mg/l 2,4-D, 5mg/l BAP), où la moitié des explants ayant bruni avec cette balance hormonale a fini par se nécroser, suivi de  $T_0$  (0 mg/l 2,4-D, 0mg/l BAP) avec 91,16 %. Le plus faible taux de brunissement (45,45%) a été enregistré au niveau du traitement  $T_1$  (1mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) (Fig.10).

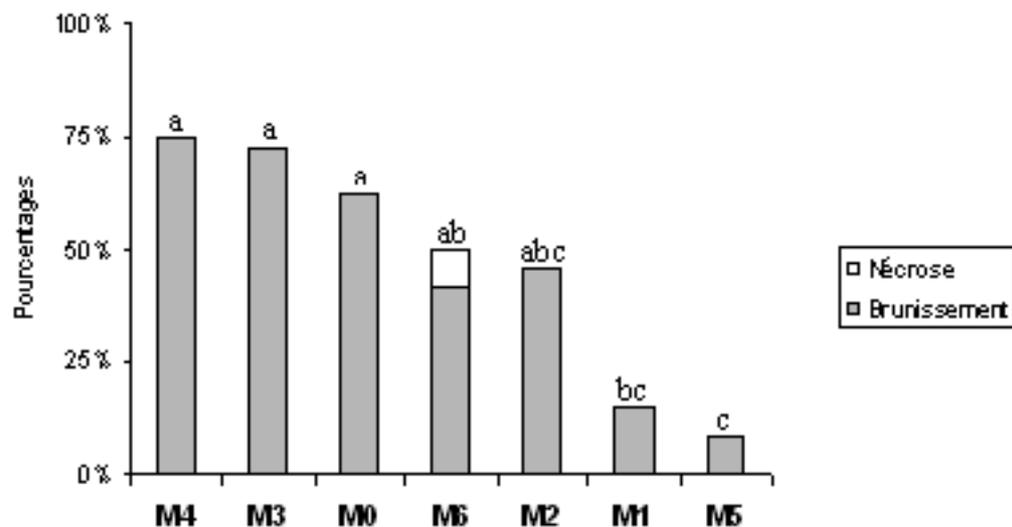
L'analyse statistique effectuée à la fin de deux mois de culture révèle une différence significative entre les différents traitements appliqués sur milieu T avec l'identification de trois groupes homogènes (a, b et c) (Annexe I).



**Fig. 10 :** Effet des traitements hormonaux en présence du milieu T sur le phénomène de brunissement après deux mois de culture ( $F_c = 2,28$ ,  $p = 0,0460$ , \*).

Pour ce qui est des traitements hormonaux appliqués sur le milieu M, les plus forts taux de brunissement ont été enregistrés au niveau des traitements M<sub>4</sub> (50mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) et M<sub>3</sub> (10mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) avec respectivement des taux de 75% et 72%. Le plus faible taux a été noté au niveau des explants mis en culture sur le traitement M<sub>5</sub> (100mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) et qui a été de 8,33% (Fig.11).

L'analyse statistique effectuée à la fin de deux mois de culture révèle une différence significative entre les différents traitements appliqués sur milieu M avec l'identification de trois groupes homogènes (a, b et c) (Annexe I).



**Fig. 11 :** Effet des traitements hormonaux en présence du milieu M sur le phénomène de brunissement après deux mois de culture ( $F_c = 4,06$ ,  $p = 0,0015$ , \*\*).

## 2- Callogenèse induite

La réactivité des explants s'est manifestée dès le 10<sup>ème</sup> jour de culture et s'est traduite par un gonflement total ou partiel des explants. A partir du 20<sup>ème</sup> jour, des structures de couleur blanchâtre au niveau des explants réactifs ont été observées, indiquant l'initiation de la dédifférenciation cellulaire évoluant par la suite en un cal proprement dit.

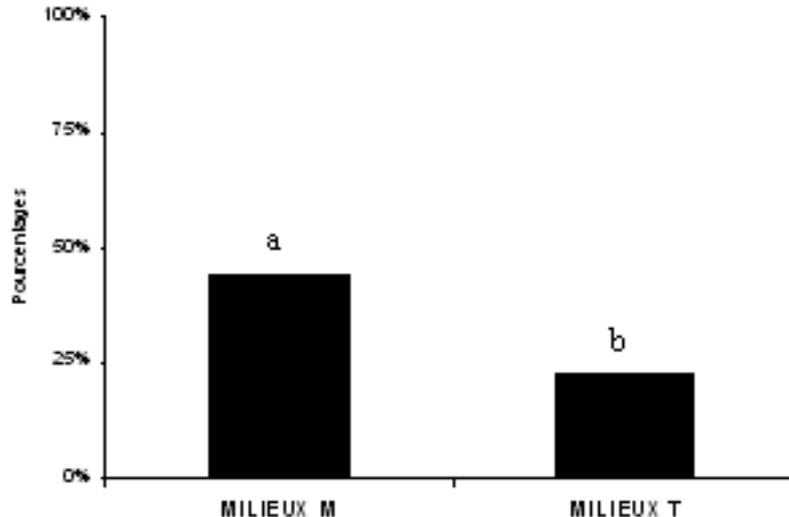
La callogenèse induite (callogenèse primaire) au niveau des explants mis en culture s'est toujours manifestée sous forme de cals hyperhydriques friables ou compacts. Elle varie cependant, en fonction de deux paramètres:

### 2-1- Effet des milieux de culture

Les deux milieux de culture testés M et T ont permis d'aboutir à la réactivité des explants mis en culture avec respectivement des taux de 87,34% et 83,78 % de réactivité totale (gonflement et callogenèse), tous traitements hormonaux confondus.

Cependant, des différences ont été constatées par rapport à l'apparition de la callogenèse. En effet, les explants mis en culture sur les milieux de culture de type M ont été les premiers à montrer une callogenèse et ont présenté à la fin des deux premiers mois de culture le plus fort taux de callogenèse primaire 44,30 % contre 22,97 % pour les explants mis en culture sur le milieu de type T (Fig.12).

L'analyse statistique effectuée à la fin de deux mois de culture révèle une différence significative entre les deux milieux testés (T et M) avec l'identification de deux groupes homogènes (a et b) (Annexe I).



*Fig. 12: Effet des milieux de culture sur l'induction de la callogenèse après deux mois de culture (F<sub>c</sub>= 8,06, p = 0,0052, \*\*).*

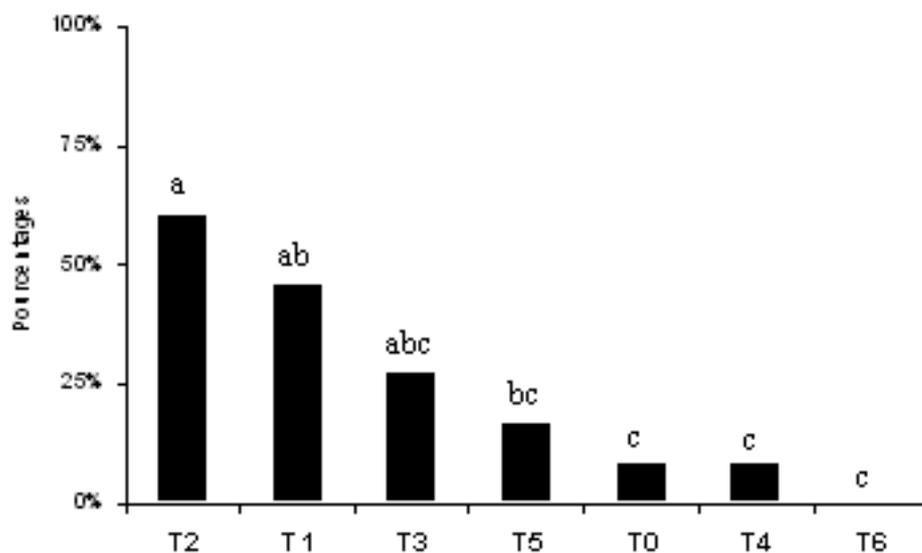
### 2-2- Effet des équilibres hormonaux

Tous les équilibres hormonaux ont induit une réactivité des explants mis en culture même en l'absence d'hormones de croissance. Cependant, des différences ont été enregistrées

par rapport au temps de réponse et au taux de callogenèse après les deux premiers mois de culture.

En effet, pour les traitements appliqués sur le milieu T, les traitements T<sub>2</sub> (5mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) et T<sub>1</sub> (1mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) ont été les premiers à montrer une callogenèse avec les taux les plus élevés, respectivement 60 % et 50 %. Le plus faible taux a été de 8,33%, enregistré au niveau des traitements T<sub>0</sub> (0mg/l 2,4-D, 0mg/l BAP) et T<sub>4</sub> (50mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP). Les explants mis en culture sur T<sub>6</sub> (5mg/l 2,4-D, 5mg/l BAP = témoin bibliographique) n'ont pas présenté de callogenèse (Fig.13).

L'analyse statistique effectuée à la fin de deux mois de culture révèle une différence significative entre les différents traitements appliqués sur milieu T avec l'identification de trois groupes homogènes (a, b et c) (Annexe I).



**Fig. 13 :** Effet des traitements hormonaux en présence du milieu T sur l'induction de la callogenèse après deux mois de culture ( $F_c = 3,49$ ,  $p = 0,0046$ , \*\*).

Pour ce qui est des traitements appliqués sur milieu M, les explants en présence des traitements M<sub>1</sub> (1 mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP), M<sub>2</sub> (5mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) et M<sub>6</sub> (5mg/l 2,4-D, 5mg/l BAP = témoin bibliographique) ont été les premiers à induire une callogenèse. Ils ont présenté à la fin des deux premiers mois de culture respectivement des taux de 69,23%, 58,33 % et 54,54% de callogenèse induite. Les plus faibles taux ont été notés avec les traitements M<sub>3</sub> (10mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) et M<sub>4</sub> (50mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) respectivement 27,27 % et 25% de callogenèse induite (Fig.14).

L'analyse statistique (analyse de la variance à un seul facteur) effectuée à la fin de deux mois de culture ne révèle pas d'effet significatif en relation avec les traitements appliqués sur milieu M (Annexe I). L'absence de l'effet des traitements hormonaux dans ce cas serait due à l'hétérogénéité des réponses obtenues entre les explants au sein du même traitement. L'hétérogénéité intragroupe aurait masqué l'hétérogénéité intergroupe.

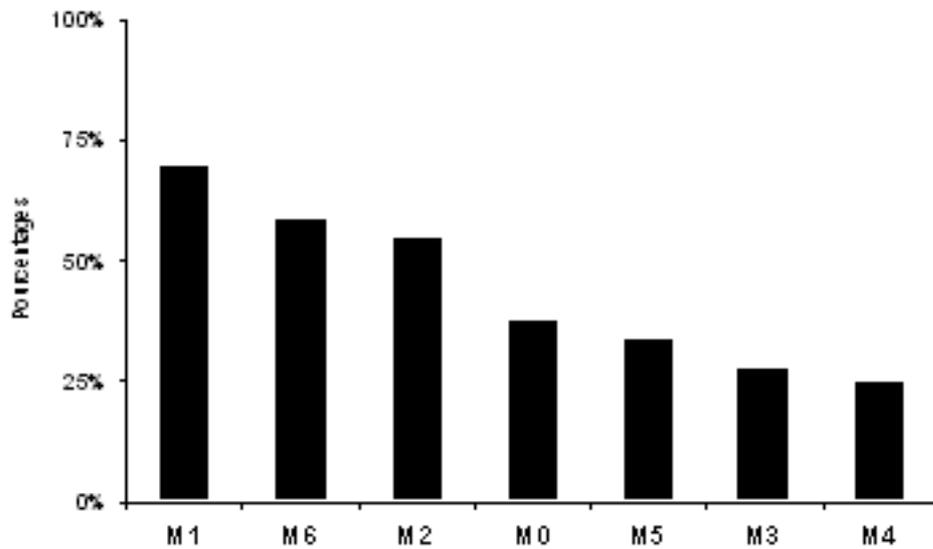


Fig. 14 : Effet des traitements hormonaux en présence du milieu M sur l'induction de la callogenèse après deux mois de culture ( $F_c = 1,45, p = 0,2063, n.s.$ ).

### 3- Sélection des souches réactives

Les explants ayant présenté une callogenèse intense ont été marqués (numérotés) et cela dès le 2<sup>ème</sup> mois de culture et des fragments de cals ont été transférés lors du premier repiquage dans des boîtes de Pétri contenant les mêmes milieux et les mêmes traitements hormonaux ayant permis leur obtention ; réalisant ainsi une première sélection dans le but de constituer un stock de souches réactives (Tableau 10).

Tableau 10: Nombre de souches sélectionnées au niveau des deux milieux de culture T et M.

Traitements	Equilibres hormonaux	Nombre de souches sélectionnées sur milieux T	Nombre de souches sélectionnées sur milieux M
Témoin	0 mg/l 2,4-D/ 0mg/l BAP	1	3
1	1 mg/l 2,4-D/1mg/l BAP	5	9
2	5 mg/l 2,4-D/1mg/l BAP	6	6
3	10mg/l 2,4-D/1mg/l BAP	3	3
4	50mg/l 2,4-D/ 1mg/l BAP	1	3
5	100mg/l 2,4-D/1mg/l BAP	1	4
6	5 mg/l 2,4-D/ 5mg/l BAP	0	7
		Total = 17	Total =35

### 4- Conclusion:

Le tableau 11 , récapitule l'ensemble des résultats obtenus lors de l'étape initiation de la callogenèse primaire (friable ou compacte) où seules les meilleures combinaisons (milieux de culture balances hormonales) sont présentées :

**Tableau 11** : Résumé des meilleures combinaisons (milieux de culture équilibrés hormonaux) obtenus lors de la phase de l'initiation de la callogenèse primaire (friables ou compactes) classés par ordre décroissant.

Types de réaction	Milieux de culture	Equilibres hormonaux
<b>Brunissement</b>	<b>M</b> (enrichi)	- <b>M<sub>5</sub></b> (100mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) - <b>M<sub>1</sub></b> (1mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) - <b>M<sub>2</sub></b> (5mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) - <b>M<sub>6</sub></b> (5mg/l 2,4-D, 5mg/l BAP)
	<b>T</b> (non enrichi)	- <b>T<sub>1</sub></b> (1mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) - <b>T<sub>2</sub></b> (5mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) - <b>T<sub>4</sub></b> (50mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) - <b>T<sub>3</sub></b> (10mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP)
<b>Callogenèse primaire</b> (friable ou compacte)	<b>M</b> (enrichi)	- <b>M<sub>1</sub></b> (1mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) - <b>M<sub>6</sub></b> (5mg/l 2,4-D, 5mg/l BAP) - <b>M<sub>2</sub></b> (5mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP)
	<b>T</b> (non enrichi)	- <b>T<sub>2</sub></b> (5mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) - <b>T<sub>1</sub></b> (1mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) - <b>T<sub>3</sub></b> (10mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP)

### III- Entretien et multiplication des cals

#### 1- Evolution de la callogenèse sur milieu solide

Les explants issus de la phase précédente de culture présentant ou non une callogenèse ont été transférés tous les deux mois environ dans des milieux de culture frais de même composition avec :

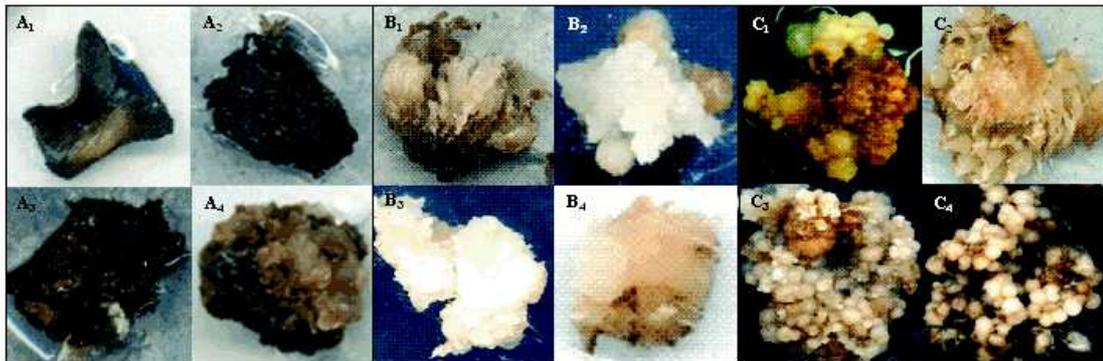
- fragmentation des explants ayant recouvert la surface du milieu contenu dans des tubes à essai (Ø24 mm),
- élimination des explants nécrosés.

A la fin de chaque subculture un bilan a été établi. L'unité de mesure a été l'explant (présentant ou non une callogenèse) contenu dans un tube à essai. Les contaminations dues à des erreurs de manipulation n'ont pas été comptabilisées. A l'issue de dix subcultures successives, trois groupes d'explants en fonction de leur réponse ont été identifiés:

- Groupe 1 : caractérisé par l'absence de callogenèse ou un arrêt de développement (Planche 3 : A<sub>1</sub> à A<sub>4</sub>).
- Groupe 2 : caractérisé par la présence de callogenèse primaire (friable ou compacte) sans formation de nodules (Planche 3 : B<sub>1</sub> à B<sub>4</sub>).
- Groupe 3 : caractérisé par la présence de callogenèse nodulaire (Planche 3 : C<sub>1</sub> à C<sub>4</sub>).

L'estimation de l'évolution du nombre d'explants représentant chacun des groupes de réponse décrits précédemment au cours des dix subcultures a été réalisée en fonction de deux paramètres:

- Effet des milieux de culture ;
- Effet des équilibres hormonaux.



**Groupe 1 :** Brunissement et nécrose.

- A<sub>1</sub> : Explant (jeune feuille) nécrosé sur le milieu M.  
 A<sub>2</sub> : Explant nécrosé au stade début callogenèse sur le milieu M.  
 A<sub>3</sub> : Explant nécrosé au stade début callogenèse sur le milieu M.  
 A<sub>4</sub> : Brunissement accentué d'un cal sur le milieu M.

**Groupe 2 :** Callogenèse simple.

**Groupe 2 :** Callogenèse simple.

- B<sub>1</sub> : Callogenèse friable sur le milieu M.  
 B<sub>2</sub> : Redémanage d'une callogenèse granulaire sur le milieu M.  
 B<sub>3</sub> : Callogenèse friable légèrement hydratée sur le milieu M.  
 B<sub>4</sub> : Callogenèse compacte sur le milieu M.

**Groupe 3 :** Callogenèse nodulaire.

- C<sub>1</sub> : Redémanage de la callogenèse nodulaire sur le milieu T.  
 C<sub>2</sub> : Callogenèse nodulaire friable sur le milieu M.  
 C<sub>3</sub> : Redémanage intense de la callogenèse nodulaire sur le milieu M.  
 C<sub>4</sub> : Callogenèse nodulaire sur le milieu M.

*Planche 3 : Types de réponse des explants mis en culture sur milieux solides lors des dix subcultures réalisées (G=8).*

### 1-1- Absence ou arrêt de développement

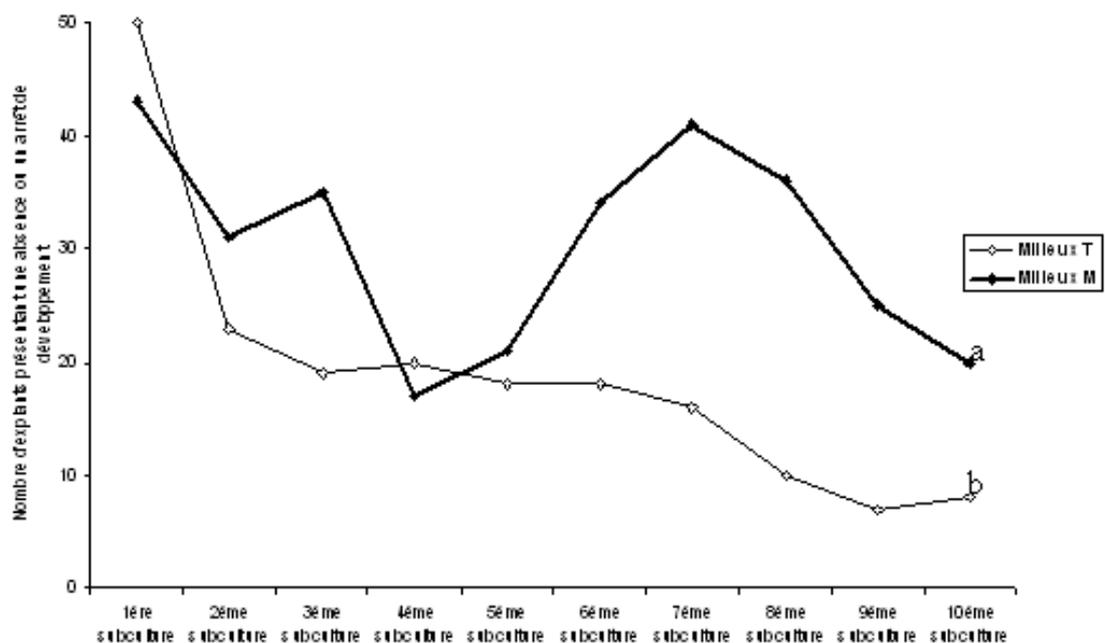
Comme mentionné précédemment, la sécrétion des polyphénols par les explants qui s'est traduite par un brunissement de ces derniers et des milieux de culture a été observée dès le premier mois de culture. Elle s'est poursuivie tout au long des dix subcultures, engendrant une absence de réactivité pour certains explants, un arrêt de développement chez d'autres ou même leur perte (nécrose).

#### 1-1-1- Effet des milieux de culture

L'apparition du phénomène de brunissement s'est maintenue tout au long des dix subcultures mais avec des répercussions différentes sur le devenir des explants mis en culture.

En effet, les explants mis en culture sur le milieu de type M se sont maintenus même en présence de polyphénols, alternant des périodes caractérisées par une absence de réactivité ou un arrêt de développement suivies de périodes caractérisées par l'initiation ou la reprise de la réactivité. Par contre, les explants mis en culture sur le milieu de type T ont été sensibles au phénomène de brunissement, ce qui a engendré une faible réactivité mais surtout la nécrose d'un grand nombre d'explants (Fig.15).

L'analyse de la variance effectuée sur l'ensemble des dix subcultures révèle un effet significatif des milieux testés (T et M) avec l'identification de deux groupes homogènes (a et b) (Annexe II). Les milieux M étant les plus favorables pour le développement de la callogenèse que le milieu T.



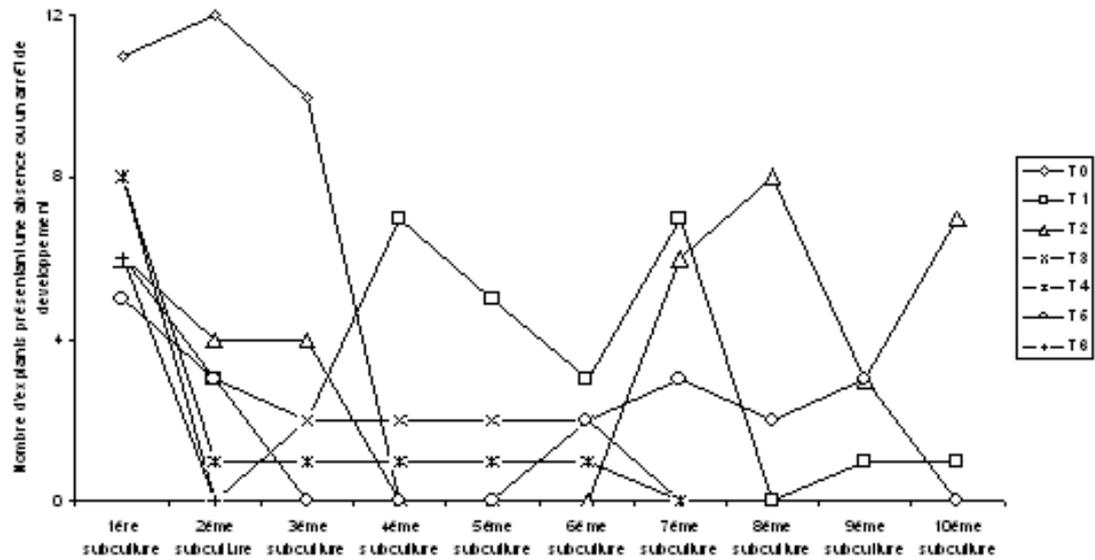
**Fig. 15:** Effet des milieux de culture sur le nombre d'explants présentant une absence de réactivité ou un arrêt de développement au cours des dix subcultures ( $F_c = 5,63$ ,  $p = 0,0290$ , \*).

### 1-1-2- Effet des équilibres hormonaux

La manifestation du phénomène de brunissement a été observée au niveau de tous les équilibres hormonaux mais des différences ont été constatées par rapport à la réponse des explants mis en culture.

Pour les traitements hormonaux appliqués sur le milieu T, les équilibres hormonaux qui ont permis une certaine résistance au phénomène de brunissement sont dans l'ordre décroissant  $T_5$  (100mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP),  $T_1$  (1mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) et  $T_2$  (5mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP). Le reste des traitements ( $T_0$ ,  $T_3$ ,  $T_4$ ,  $T_6$ ) ont été perdus à cause de la nécrose de la totalité des explants (Fig.16).

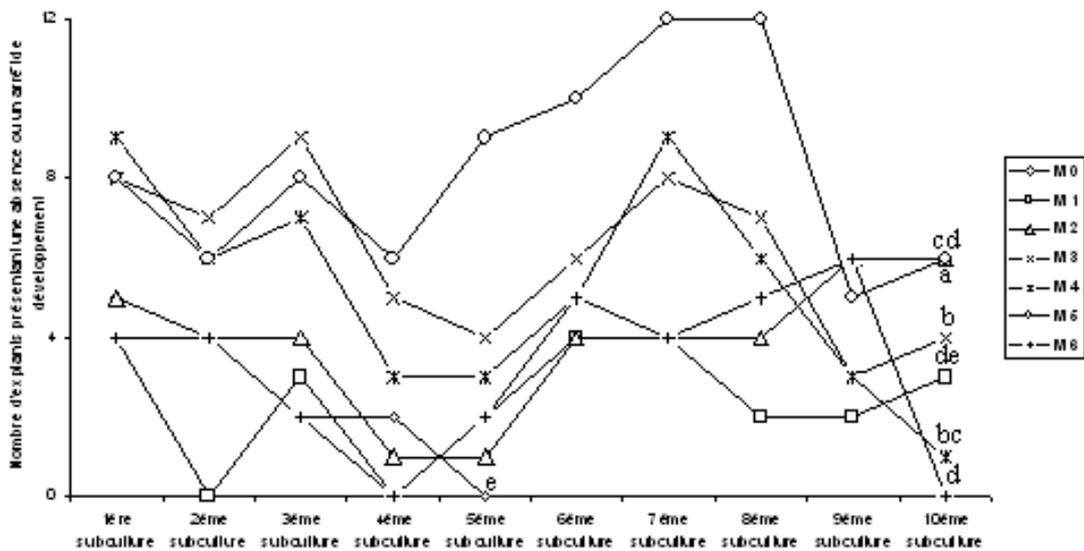
L'analyse de la variance effectuée sur l'ensemble des dix subcultures ne révèle pas d'effet significatif des traitements appliqués sur le milieu T (Annexe II).



**Fig. 16:** Effet des traitements hormonaux en présence du milieu T sur le nombre d'explants présentant une absence de réactivité ou un arrêt de développement au cours des dix subcultures ( $F_c = 17,3$ ,  $p = 0,1282$ , n.s.).

Pour les traitements appliqués sur le milieu M, les explants des traitements M<sub>5</sub> (100mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP), M<sub>4</sub> (50mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) et M<sub>3</sub> (10mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) ont été les plus résistants au brunissement (Fig.16).

L'analyse de la variance effectuée sur l'ensemble des dix subcultures révèle un effet significatif des différents traitements appliqués sur le milieu M avec l'identification de cinq groupes homogènes (a, b, c, d et e) (Annexe II).



**Fig. 17:** Effet des traitements hormonaux en présence du milieu M sur le nombre d'explants présentant une absence de réactivité ou un arrêt de développement au cours des dix subcultures ( $F_c = 12,50$ ,  $p = 0,0000$ , \*).

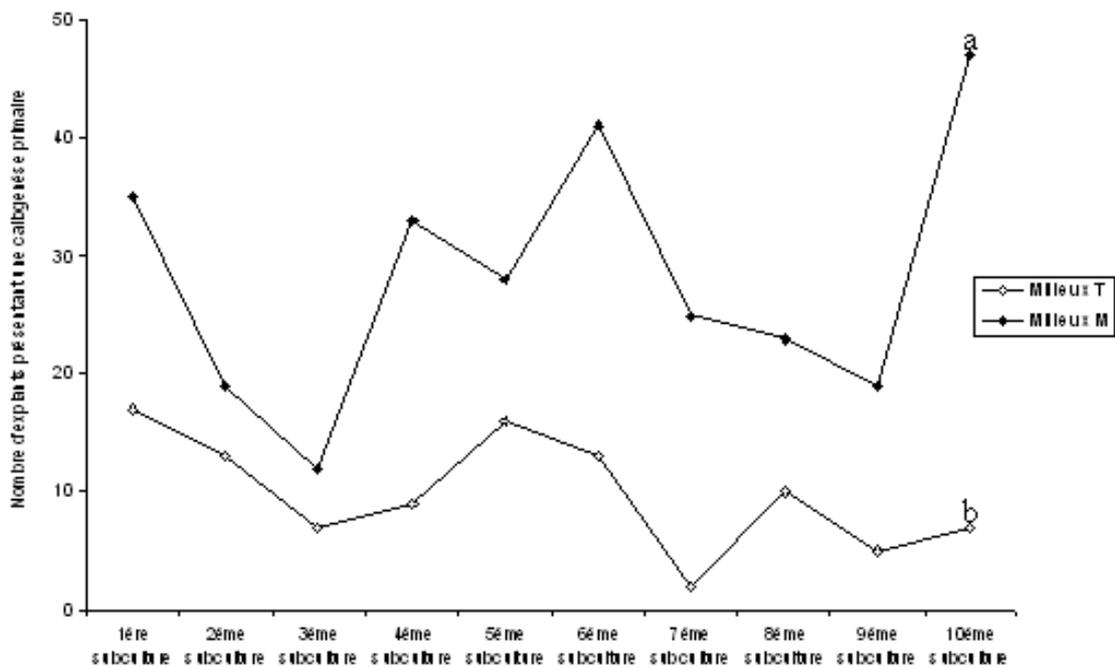
## 1-2 - Callogenèse primaire

L'induction de la callogenèse primaire a été observée dès le 20<sup>ème</sup> jour de mise en culture et s'est poursuivie tout au long des dix subcultures. Dans un premier temps, elle avait pour origine les explants de départ (issus de la partie apicale du rejet) puis par la suite les nodules néoformés (réversion).

### 1-2-1- Effet des milieux de culture

Les deux milieux de culture testés ont favorisé l'induction de la callogenèse primaire sans formation de nodules. Mais c'est le milieu de type M qui a permis le maintien et l'amplification de cette callogenèse alternant des périodes de forte et de faible intensité (Fig.18).

L'analyse de la variance effectuée sur l'ensemble des dix subcultures révèle un effet significatif des milieux testés (T et M) avec l'identification de deux groupes homogènes (a et b) (Annexe II).



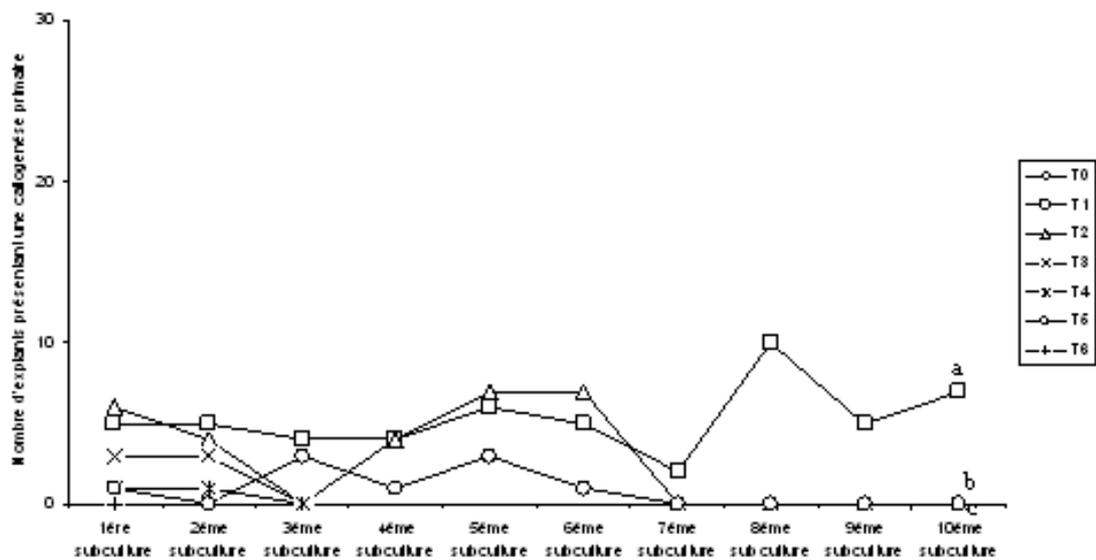
**Fig. 18:** Effet des milieux de culture sur le nombre d'explants présentant une callogenèse de type primaire au cours des dix subcultures ( $F_c = 23,80$ ,  $p = 0,0001$ , \*).

### 1-2-2- Effet des équilibres hormonaux

Tous les traitements testés ont induit une callogenèse simple mais avec des degrés d'intensité variables.

Ainsi pour les traitements hormonaux appliqués sur le milieu T, seul le traitement T<sub>1</sub> (1mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) a montré une callogénèse de type simple à partir de la 7<sup>ème</sup> subculture (Fig.19).

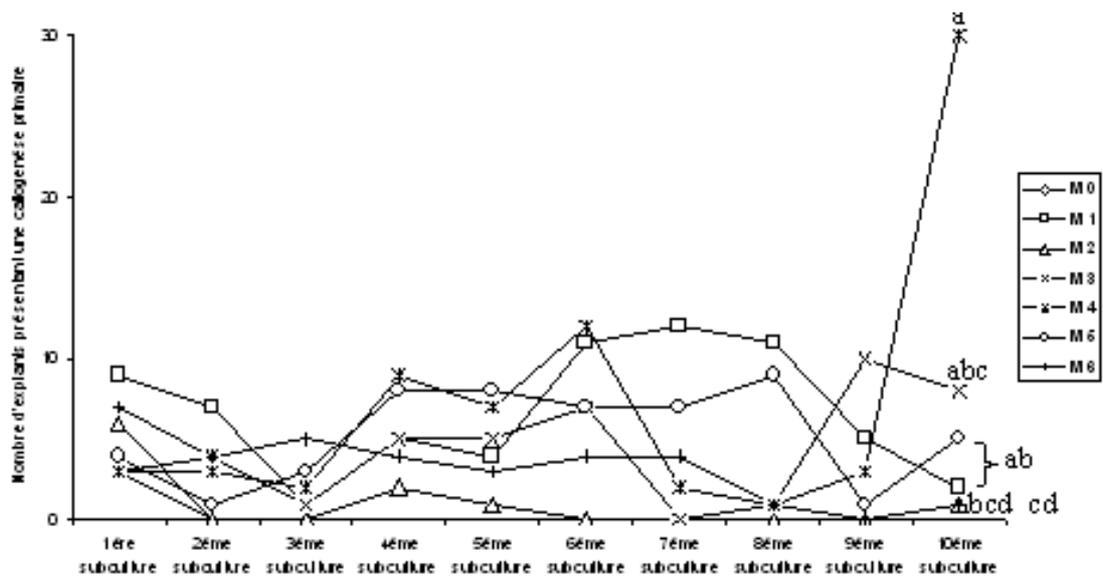
L'analyse de la variance effectuée sur l'ensemble des dix subcultures révèle un effet significatif des différents traitements appliqués sur le milieu T avec l'identification de trois groupes homogènes (a, b et c) (Annexe II).



**Fig. 19:** Effet des traitements hormonaux en présence du milieu T sur le nombre d'explants présentant une callogénèse de type primaire au cours des dix subcultures ( $F_c = 15,43$ ,  $p = 0,0000$ , \*).

Pour les traitements hormonaux appliqués sur le milieu M, le plus grand nombre d'explants présentant une callogénèse de type simple après dix subcultures a été de 30. Il a été enregistré avec le traitement M<sub>4</sub> (50mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) suivi de M<sub>3</sub> (10mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) et M<sub>5</sub> (100mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) avec respectivement 8 et 5 calcs de type primaire. Aussi le traitement M<sub>1</sub> (1mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) a favorisé la callogénèse primaire mais à partir de la 8<sup>ème</sup> subculture le nombre de calcs de type simple a diminué à cause du phénomène de brunissement (Fig.20).

L'analyse de la variance effectuée sur l'ensemble des dix subcultures révèle un effet significatif des différents traitements appliqués sur le milieu M avec l'identification de quatre groupes homogènes (a, b, c et d) (Annexe II).



**Fig. 20:** Effet des traitements hormonaux en présence du milieu M sur le nombre d'explants présentant une callogenèse de type primaire au cours des dix subcultures ( $F_c = 4,12$ ,  $p = 0,0015$ , \*).

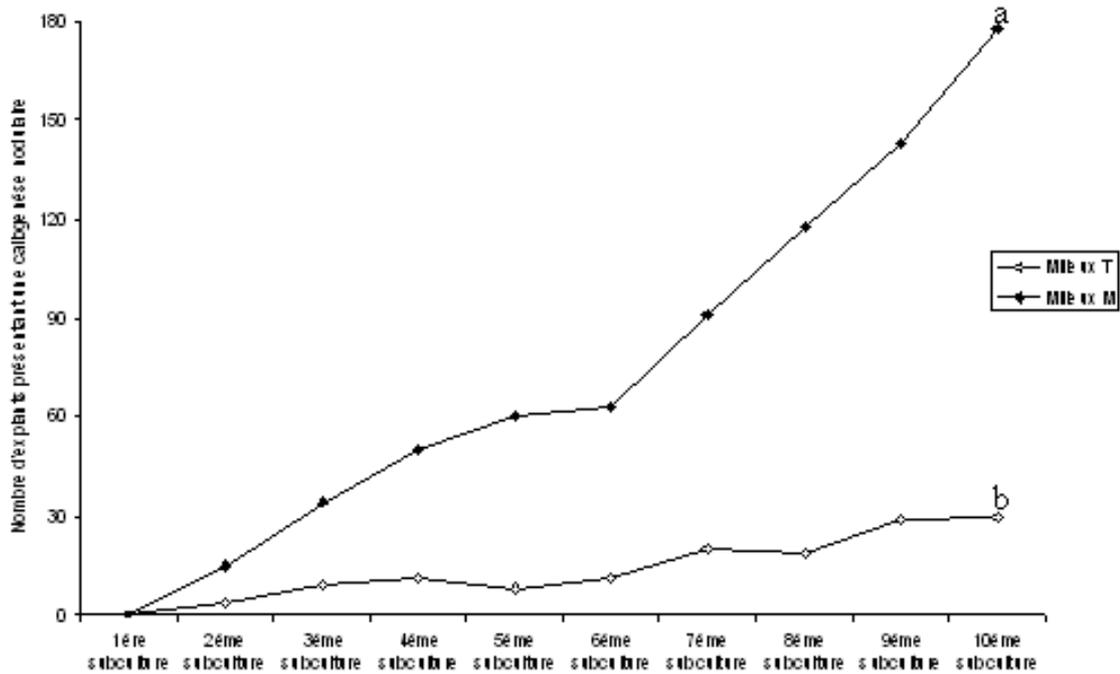
### 1-3- Callogenèse nodulaire

Elle est issue du développement de la callogenèse primaire plus au moins compacte. L'apparition de la callogenèse secondaire (nodulaire) a été observée à partir du 4<sup>ème</sup> mois de la mise en culture (2<sup>ème</sup> subculture). Elle s'est poursuivie tout au long des dix-huit mois suivants.

#### 1-3-1- Effet des milieux de culture

Les deux types de milieux de culture ont favorisé l'induction de la callogenèse nodulaire. Cependant, c'est au niveau du milieu de base M qu'on a eu les premières apparitions et le plus fort taux d'induction de ce type de callogenèse. En effet, à la fin de la 2<sup>ème</sup> subculture le taux de callogenèse nodulaire au niveau du milieu M a été de 23,07 % contre 10% pour le milieu T. Par la suite et au bout de dix-huit mois de culture (à la 10<sup>ème</sup> subculture) c'est toujours au niveau du milieu M qu'on a obtenu le plus grand nombre de cals de type nodulaire (178 contre 30 pour le milieu T) (Fig.21).

L'analyse de la variance effectuée sur l'ensemble des dix subcultures révèle un effet significatif des milieux testés (T et M) avec l'identification de deux groupes homogènes (a et b) (Annexe II).



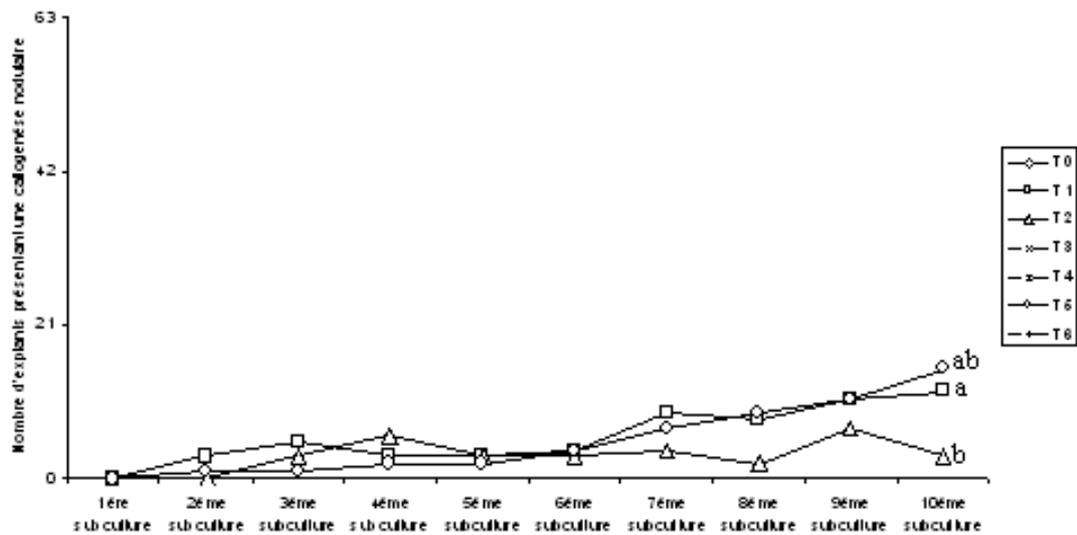
**Fig. 21:** Effet des milieux de culture sur le nombre d'explants présentant une callogenèse de type nodulaire au cours des dix subcultures ( $F_c = 11,14$ ,  $p = 0,0037$ , \*).

### 1-3-2- Effet des équilibres hormonaux

L'apparition des premiers nodules a été constatée au niveau des faibles concentrations hormonales mais par la suite c'est au niveau des fortes concentrations hormonales qu'on a enregistré, au bout de la 10<sup>ème</sup> subculture, le plus grand nombre d'explants présentant une callogenèse nodulaire.

Pour les traitements hormonaux appliqués sur le milieu T, l'apparition des premiers nodules a été constatée au niveau du traitement T<sub>1</sub> (1mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) où on a obtenu le plus fort taux d'induction de la callogenèse nodulaire qui a été de 27,27% à la fin de la 2<sup>ème</sup> subculture. Cependant, le plus grand nombre d'explants (soit 15) présentant une callogenèse nodulaire à la fin de la 10<sup>ème</sup> subculture a été obtenu avec le traitement T<sub>5</sub> (100mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) (Fig.22).

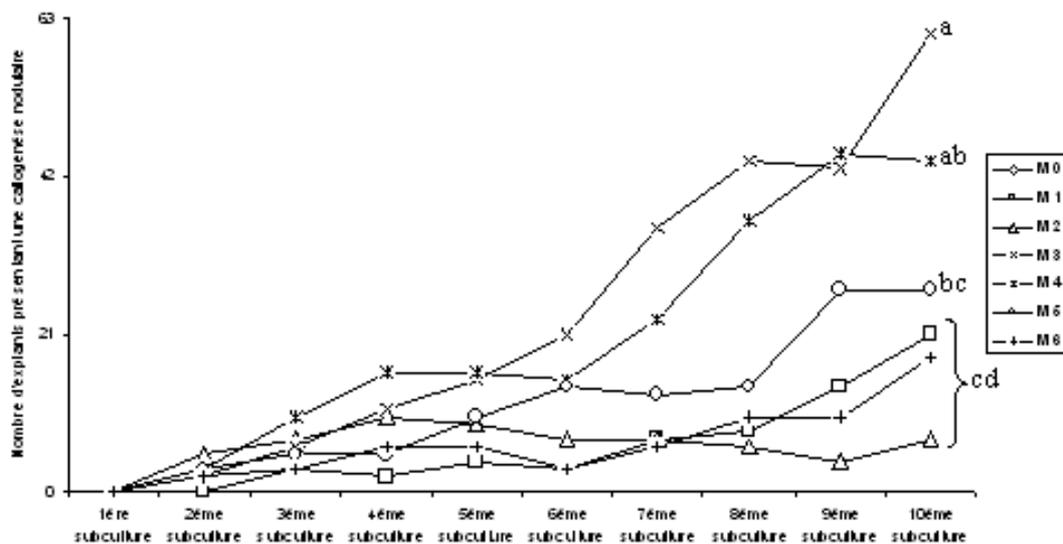
L'analyse de la variance effectuée sur l'ensemble des dix subcultures révèle un effet significatif des différents traitements appliqués sur le milieu T avec l'identification de trois groupes homogènes (a, b et c) (Annexe II).



**Fig. 22:** Effet des traitements hormonaux en présence du milieu T sur le nombre d'explants présentant une callogénèse de type nodulaire au cours des dix subcultures ( $F_c = 10,52$ ,  $p = 0,0000$ , \*).

Pour les traitements hormonaux appliqués sur le milieu M, l'apparition des premiers nodules a été constatée avec le traitement M<sub>2</sub> (5mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) qui a montré, à la fin de la 2<sup>ème</sup> subculture, un taux d'induction de callogénèse nodulaire de 55,55 %. Par la suite, le plus grand nombre de cals nodulaires à la fin de la 10<sup>ème</sup> subculture a été enregistré au niveau du traitement M<sub>3</sub> (10mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) avec 61 explants présentant une callogénèse nodulaire (Fig.23).

L'analyse de la variance effectuée sur l'ensemble des dix subcultures révèle un effet significatif des différents traitements appliqués sur le milieu M avec l'identification de quatre groupes homogènes (a, b, c et d) (Annexe II).



**Fig. 23:** Effet des traitements hormonaux en présence du milieu M sur le nombre d'explants présentant une callogenèse de type nodulaire au cours des dix subcultures (F<sub>c</sub>= 6,11, p = 0,0000, \*).

**1-4- Bilan des souches sélectionnées**

Lors de la première phase (induction de la callogenèse), les explants ayant présenté une callogenèse ont été sélectionnés (numérotés) et un fragment de chaque cal a été mis en culture dans une boîte de Pétri. A la fin des dix subcultures, un bilan des souches sélectionnées a été établi, ce qui nous a permis de faire les constatations suivantes :

- An niveau des tubes à essai, seules 2 souches sur le milieu T se sont maintenues sur les 17 sélectionnées durant la phase de l'initiation de la callogenèse, le reste des souches a été perdu (nécrosé) à cause du phénomène de brunissement. Pour ce qui est des souches sur milieu M, 9 souches se sont maintenues sur les 35 sélectionnées.

De l'ensemble des souches qui se sont maintenues après dix subcultures au niveau des tubes à essai, c'est la souche M<sub>4</sub> (1) qui a abouti au plus grand nombre de cals nodulaire (24) (Tableau 12).

- Au niveau des boîtes de Pétri, les 17 souches sélectionnées au niveau du milieu T ont été perdus dans leur totalité alors qu'au niveau du milieu M, 11 souches sur 45 sélectionnées au départ se sont maintenues. Ainsi, à la fin des dix subcultures, c'est la souche M<sub>5</sub> (4) qui a abouti au plus grand nombre de boîtes contenant des cals nodulaires (21) (Tableau 13).

Milieux	Traitements	Equilibres hormonaux	Numéro de la souche	Nombre de cals nodulaires issus de la souche	Total par traitement
T	1	1mg/l 2,4-D/ 1mg/l BAP	1	10	10
	5	100mg/l 2,4-D/ 1mg/l BAP	1	15	15
M	1	1mg/l 2,4-D/ 1mg/l BAP	6	14	14
	2	5mg/l 2,4-D/ 1mg/l BAP	4	7	7
	3	10mg/l 2,4-D/ 1mg/l BAP	3	6	6
	4	50mg/l 2,4-D/ 1mg/l BAP	1	24	24
	5	100mg/l 2,4-D/ 1mg/l BAP	1	6	22
			3	16	
6	5 mg/l 2,4-D/ 5mg/l BAP	4	1	4	
		6	3		
		7	1		

**Tableau 12 :** Nombre de cals nodulaires (tubes à essais) pour chaque souche à l'issue des dix subcultures au niveau des milieux solides M et T.

Milieux	Traitements	Equilibres hormonaux	Numéro de la souche	Nombre de boîtes de Pétri par souche	Total par traitement
M	1	1mg/l 2,4-D/ 1mg/l BA	2	2	8
			6	6	
	2	5mg/l 2,4-D/ 1mg/l BAP	4	6	6
	3	10mg/l 2,4-D/ 1mg/l BAP	1	5	8
			4	3	
	4	50mg/l 2,4-D/ 1mg/l BAP	1	3	17
			2	4	
			3	10	
	5	100mg/l 2,4-D/ 1mg/l BAP	1	2	23
			4	21	
	6	5mg/l 2,4-D/ 5mg/l BAP	5	4	4

**Tableau 13:** Nombre de boîtes de Pétri (de 5 à 20 amas de cals par boîte) pour chacune des souches à l'issue des dix subcultures au niveau du milieu solide M.

## 2- Evolution de la callogenèse en milieux liquides agités

### 2-1- Amplification de la masse de cals nodulaires

Dans le but d'amplifier la masse de cals nodulaires (nodules) obtenus en milieux de culture solides T et M, l'utilisation du milieu liquide agité a été retenue. Ainsi, pour l'élaboration des milieux liquides, la composition de base des deux milieux de culture testés lors de l'induction a été maintenue mais avec des modifications (T'et M').

Le choix des traitements hormonaux est basé sur les observations réalisées au cours de la 4<sup>ème</sup> subculture où seuls les équilibres hormonaux présentant une callogenèse nodulaire en évolution ont été maintenus.

Lors de la mise en culture en milieu liquide agité (0,4 g de cals dans 150ml de milieu), l'origine du cal nodulaire (milieu et traitement) a été respectée sauf pour l'équilibre hormonal témoin bibliographique de cette étape (FKI, 1998).

L'utilisation de flacons de culture horizontaux (04 par traitement) stériles nous a permis d'observer le comportement des cals nodulaires mis en milieux liquides agités, qui peut être décrit comme suit :

- Une période de latence d'environ dix jours : les cals légèrement fragmentés ne présentent aucun développement apparent.
- Un démarrage plus au moins observable à l'œil nu jusqu'au renouvellement des milieux liquides (entre le 10<sup>ème</sup> et le 30<sup>ème</sup> jour de culture) caractérisés par l'apparition de nodules néoformés.
- Après renouvellement des milieux liquides (au delà d'un mois de culture), on a assisté soit à une augmentation rapide du volume des suspensions soit à sa régression mais aussi des signes d'hyperhydratation.

L'estimation de la croissance des cals nodulaires (facteur de multiplication) en milieux liquides agités s'est basée sur le poids de la masse nodulaire obtenue et a été appréciée en fonction de deux paramètres:

- Effet des milieux de culture ;
- Effet des équilibres hormonaux.

### 2-1-1- Effet des milieux de culture

Les deux milieux liquides de culture testés (T' et M') ont favorisé une amplification de la masse de cals nodulaires. Cependant, c'est le milieu liquide de type M' qui a donné le meilleur facteur de multiplication moyen à la fin du 2<sup>ème</sup> mois de subculture et qui a été de 2,65 (calculé pour les quatre traitements testés) contre 1,64 (calculé pour les trois traitements testés) pour le milieu liquide de type T' (Fig.24).

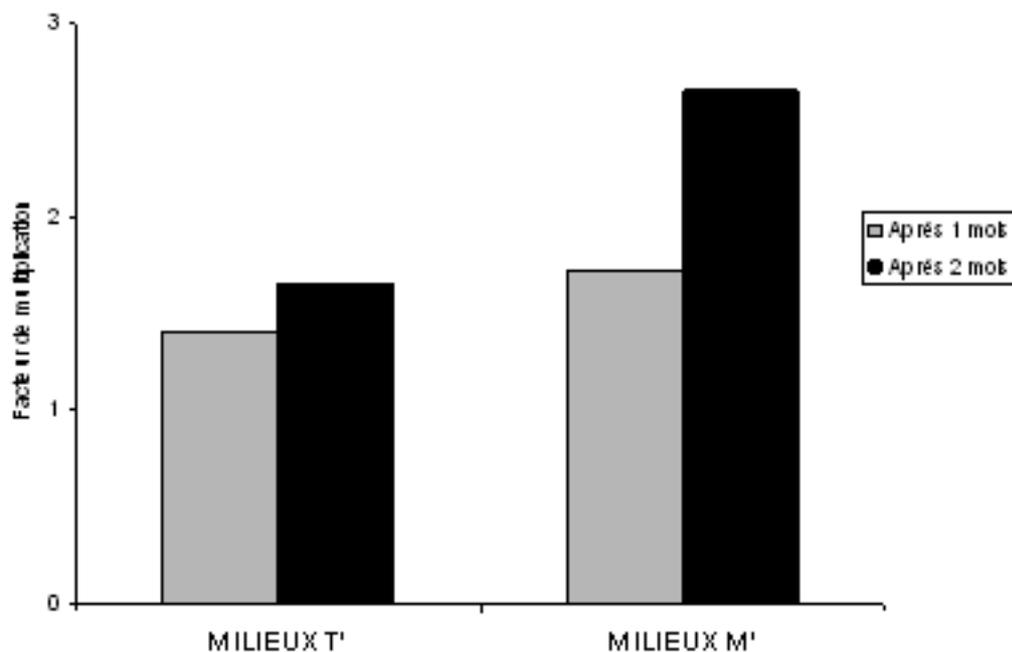


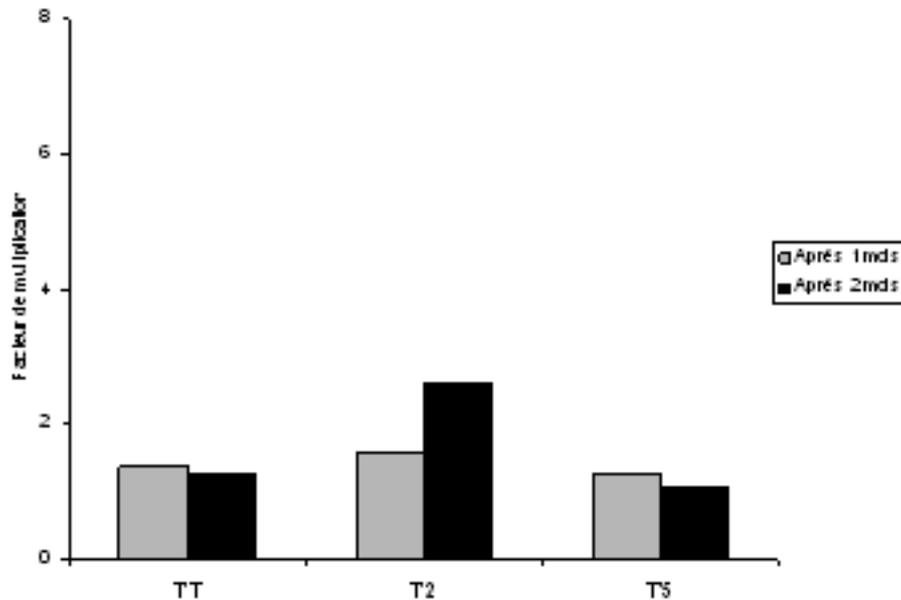
Fig. 24: Effet des milieux de culture sur l'évolution de la masse nodulaire.

### 2-2-2- Effet des équilibres hormonaux

Des différences entre équilibres hormonaux testés ont été constatées.

Pour les traitements hormonaux appliqués sur le milieu liquide T', seul le traitement T'<sub>2</sub> (5mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) a permis une amplification de la masse de cals nodulaires avec un facteur de multiplication de 2,16 à l'issue de deux mois de culture (Planche 4). Les traitements T'<sub>1</sub> (1mg/l 2,4-D, 0mg/l BAP) et T'<sub>5</sub> (100mg/l 2,4-D, 0mg/l BAP) ont induit une amplification au cours du premier mois de culture mais qui s'est arrêtée après le renouvellement du milieu (au-delà d'un mois). Ceci serait dû à la présence de polyphénols induisant une dégénérescence des nodules en suspension (Fig. 25).

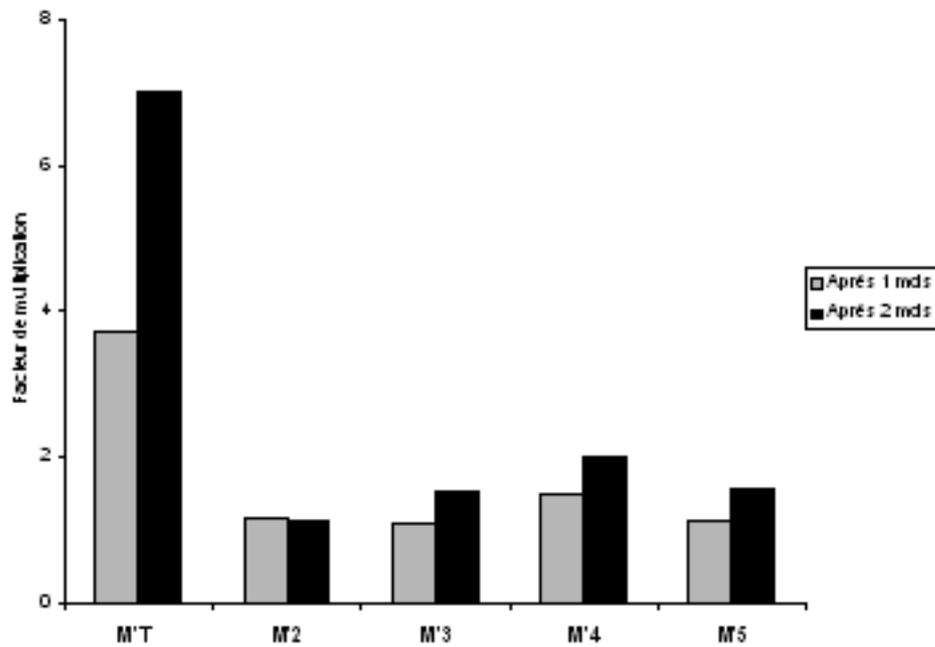
L'analyse statistique (analyse de la variance à un seul facteur) effectuée à la fin des deux mois de culture ne révèle pas de d'effet significatif des différents traitements appliqués sur le milieu T'.



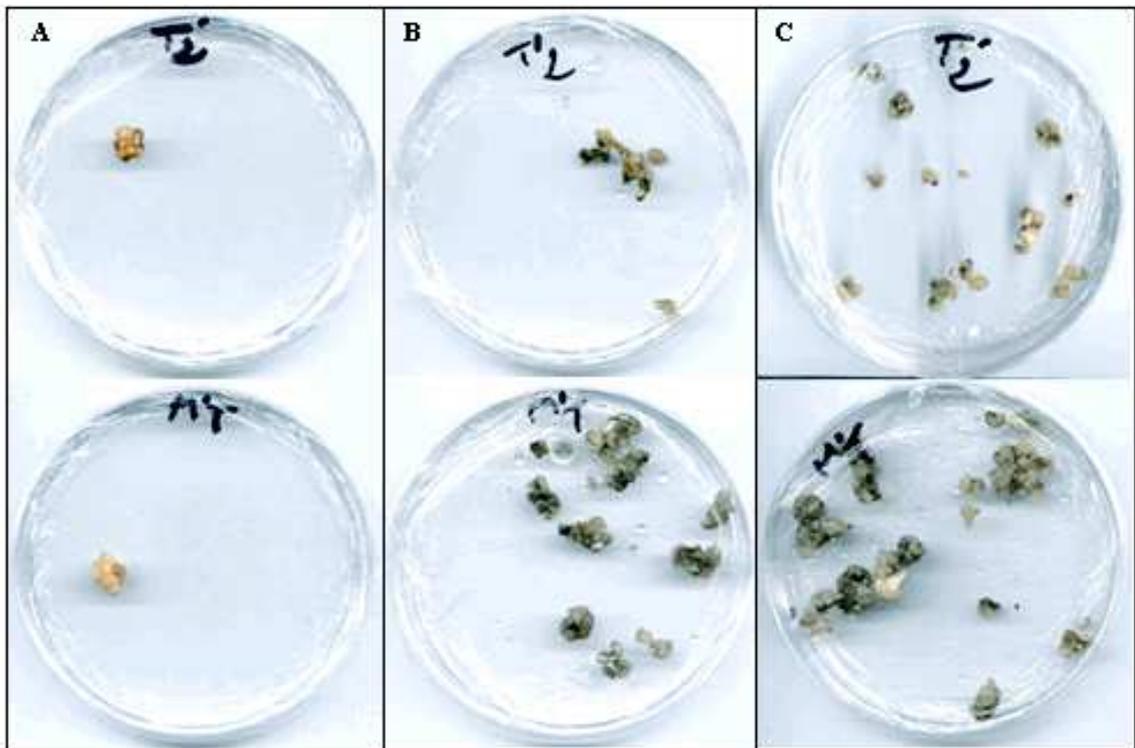
**Fig. 25:** Effet des traitements hormonaux appliqués sur milieu T' sur l'évolution de la masse nodulaire ( $F_c = 2,40$ ,  $p = 0,1458$ , n.s.).

Pour ce qui est des traitements hormonaux appliqués sur le milieu liquide M', le meilleur facteur de multiplication a été de 7. Il a été obtenu au niveau du traitement M'1 (1mg/l 2,4-D, 0mg/l BAP) (Planche 4). Pour les traitements M'3 (10mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP), M'4 (50mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) et M'5 (100mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP), les facteurs de multiplication ont été inférieurs respectivement de 1,55, 2 et 1,55 après deux mois de mise en suspension. Par contre, au niveau du traitement M'2 (5mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP), la présence de polyphénols a conduit à la dégénérescence des nodules au-delà d'un mois de subculture (Fig. 25).

L'analyse statistique (analyse de la variance à un seul facteur) effectuée à la fin des deux mois de culture ne révèle pas d'effet significatif des différents traitements appliqués sur le milieu M'. L'absence de l'effet des traitements hormonaux dans ce cas serait due à l'hétérogénéité des réponses obtenues entre les cals nodulaires introduits initialement au sein du même traitement. L'hétérogénéité intragroupe aurait masqué l'hétérogénéité intergroupe. Néanmoins le traitement M'1 (1mg/l 2,4-D, 0mg/l BAP) se distingue des autres traitements.



**Fig. 26:** Effet des traitements hormonaux appliqués sur milieu M'sur l'évolution de la masse nodulaire (Fc= 14,15, p = 0,0505, n.s.).



**Planche 4 :** Evolution des cals nodulaires en milieux liquides au niveau des traitements T'2 et M'7 (G=1/2).

**A :** Cals nodulaires introduit initialement en milieux liquides.

**B :** Cals nodulaires après un mois de culture en milieux liquides.

C : Cals nodulaires après deux mois de culture en milieux liquides.

## 2-2- Retour sur milieux solides

Les cals multipliés en milieu liquide ont été remis à la fin de cette phase sur milieux solides d'induction (M et T) dans des boîtes de Pétri en respectant les mêmes équilibres hormonaux utilisés lors de l'amplification en milieu liquide.

Tous les cals présentent une période de latence (3 à 4 semaines) durant laquelle on a pu observer un brunissement au niveau des milieux de culture.

Après quatre mois, la reprise de la nodulation a été observée au niveau de tous les traitements mais elle a été plus rapide au niveau des milieux aux plus faibles concentrations en 2,4-D. Cinq milieux ont particulièrement manifesté une bonne reprise de la nodulation avec une faible intensité de brunissement : T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> et M<sub>3</sub> (Tableau 14).

Milieux	Traitements	Equilibres hormonaux	Intensité du brunissement	Intensité de la reprise
T	1	1 mg/l 2,4-D/0mg/l BAP	++	+++
	2	5mg/l 2,4-D/1mg/l BAP	+	+++
	5	100mg/l 2,4-D/1 mg/l BAP	+	+
M	1	1 mg/l 2,4-D/0mg/l BAP	++	+++
	2	5mg/l 2,4-D/1mg/l BAP	+	+++
	3	10mg/l 2,4-D/1mg/l BAP	+	+++
	4	50mg/l 2,4-D/1mg/l BAP	+	++
	5	100mg/l 2,4-D/1 mg/l BAP	+	+

**Tableau 14** : Caractérisation de la croissance des cals au cours des quatre premiers mois après le retour sur milieux solides T et M.

+faible intensité ++moyenne intensité +++ forte intensité

## 3- Conclusion

Les tableaux 15 et 16, récapitulent l'ensemble des résultats obtenus lors de l'étape de l'entretien et de la multiplication de la callogenèse en milieux solides où seules les meilleures combinaisons (milieux de culture balances hormonales) sont présentées :

**Tableau 15** : Résumé des résultats obtenus au niveau des deux milieux solides testés lors de la phase de l'entretien et de multiplication de la callogenèse sur milieux solides à la fin des dix subcultures réalisées.

Types de réaction	Critères d'évaluation	Milieux de culture solides de type M	Milieux de culture solides de type T
Absence ou arrêt de développement	Nombre d'explants	20	8
	Pourcentages	8,16 %	17,77 %
Callogenèse primaire (friable ou compacte)	Nombre d'explants	47	7
	Pourcentages	19,18 %	15,55 %
Callogenèse nodulaire	Nombre d'explants	178	30
	Pourcentages	72,65 %	66,66 %

Types de réaction	Critères d'évaluation	Equilibres hormonaux de type M	Equilibres hormonaux de type T
<b>Absence ou arrêt de développement</b>	Nombre d'explants	- $M_1$ (10mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 4 - $M_2$ (50mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 1 - $M_3$ (100mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 6	- $T_2$ (1mg/l 2,4-D, 5mg/l BAP) = 0
	Pourcentages	- $M_1$ (10mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 5,47 % - $M_2$ (50mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 1,33 % - $M_3$ (100mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 15,78 %	- $T_2$ (1mg/l 2,4-D, 5mg/l BAP) = 0 %
<b>Callogenèse primaire</b> (friable ou compacte)	Nombre d'explants	- $M_1$ (10mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 8 - $M_2$ (50mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 30 - $M_3$ (100mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 5	- $T_2$ (1mg/l 2,4-D, 5mg/l BAP) = 0
	Pourcentages	- $M_1$ (10mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 10,95 % - $M_2$ (50mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 40 % - $M_3$ (100mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 13,15 %	- $T_2$ (1mg/l 2,4-D, 5mg/l BAP) = 0 %
<b>Callogenèse nodulaire</b>	Nombre d'explants	- $M_1$ (10mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 61 - $M_2$ (50mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 44 - $M_3$ (100mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 27	- $T_2$ (1mg/l 2,4-D, 5mg/l BAP) = 15
	Pourcentages	- $M_1$ (10mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 83,58 % - $M_2$ (50mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 58,66 % - $M_3$ (100mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 71,05 %	- $T_2$ (1mg/l 2,4-D, 5mg/l BAP) = 100 %

**Tableau 16 :** Résumé des meilleures balances hormonales ayant permis l'entretien et la multiplication de la callogenèse sur les deux milieux solides testés à la fin des dix subcultures réalisées.

Le tableau 17 , récapitule l'ensemble des résultats obtenus lors de l'amplification des nodules en milieux liquides agités. Seules les meilleures combinaisons (milieux de culture balances hormonales) sont présentées.

**Tableau 17 :** Résumé des résultats obtenus lors de l'amplification en milieux liquides agités.

Facteur de multiplication	Milieux liquides	Equilibres hormonaux
	- M (enrichi) = 2,65	$M' T$ (1mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 2,16
	- T (non enrichi) = 1,46	$T' 2$ (2mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) = 7

## IV- Induction de l'embryogenèse, maturation et germination des embryons somatiques

### 1- Induction de l'embryogenèse en milieu liquide agité

---

L'utilisation d'un milieu liquide sous agitation a été retenue pour la réalisation de cette étape qui avait pour objectif l'induction de l'embryogenèse somatique. La composition de base des deux milieux de culture testés lors de l'induction de la callogenèse (T et M) a été maintenue mais avec des modifications (TE et ME).

#### 1-1- Tests préliminaires

Des tests préliminaires ont été réalisés dès le 10<sup>ème</sup> mois de culture (4<sup>ème</sup> subculture). Trois balances hormonales ont été testées et cela pour chacun des deux milieux de cultures liquides ME et TE (Tableau 18) :

**Tableau 18 : Equilibres hormonaux utilisés lors des tests préliminaires dans le but d'induire l'embryogenèse somatique en milieux liquides agités (TE et ME).**

Traitements	Equilibres hormonaux	Remarques
0	0mg/l 2,4-D/0mg/l BAP	Témoin expérimental dépourvu d'hormones de croissance.
1	1mg/l 2,4-D/1mg/l BAP	Retenu de l'étape précédente car ayant été le plus rapide à montrer une callogenèse nodulaire et ayant présenté lors du 10 <sup>ème</sup> mois des pseudo-germinations de nodules.
T	1mg/l 2,4-D/0mg/l BAP	Retenu de la bibliographie (FKI et <i>al.</i> , 2003).

Pour ce qui est des cals utilisés comme matériel de départ lors de cette étape, ils ont été sélectionnés au niveau des traitements présentant le plus grand nombre de cals nodulaires viables au 10<sup>ème</sup> mois de culture (4<sup>ème</sup> subculture), c'est-à-dire des cals nodulaires réactifs plus ou moins friables, blancs ou beiges (ne présentant pas de brunissement).

C'est ainsi qu'on a utilisé un cal originaire du traitement T<sub>1</sub> (1) (1 mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) pour l'induction de l'embryogenèse au niveau du milieu liquide TE et un cal originaire du traitement M<sub>4</sub>(1) (50 mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) pour l'induction de l'embryogenèse en milieu liquide ME.

Trois répétitions pour chacun des traitements testés au niveau des deux milieux liquides utilisés ont été réalisées. Des observations ont été effectuées durant deux mois de culture. Elles ont porté sur le comportement général des suspensions mises en culture. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 19.

Milieux	Traitements	Equilibres hormonaux	Observations lors des deux mois de subculture
TE	0	0mg/l 2,4-D/0mg/l BAP	- Forte réactivité des suspensions, - Développement intense mais asynchrone des suspensions, - Brunissement du milieu (présence de polyphénols) dès le premier mois de culture.
	1	1mg/l 2,4-D/1mg/l BAP	- Très faible réactivité des suspensions, - Arrêt du développement après le premier renouvellement, - Très fort brunissement du milieu (présence de polyphénols) dès le premier mois de culture.
	T	1mg/l 2,4-D/0mg/l BAP	- Réactivité moyenne des suspensions, - Ralentissement du développement (asynchrone) après le premier renouvellement du milieu, - Fort brunissement au niveau du milieu (présence de polyphénols) dès le premier mois de culture.
ME	0	0mg/l 2,4-D/0mg/l BAP	- Forte réactivité des suspensions, - Développement intense mais asynchrone des suspensions, - Faible brunissement (présence de polyphénols) sans incidence sur le développement ultérieur des suspensions.
	1	1mg/l 2,4-D/1mg/l BAP	- Faible réactivité des suspensions, - Arrêt du développement après le premier renouvellement du milieu, - Très fort brunissement du milieu (présence de polyphénols)
	T	1mg/l 2,4-D/0mg/l BAP	- Réactivité moyenne des suspensions, - Ralentissement du développement (asynchrone) après le premier renouvellement du milieu, - Fort brunissement au niveau du milieu (présence de polyphénols).

**Tableau 19 : Résultats des tests préliminaires portant sur l'induction de l'embryogénésomatique en milieu liquide agité.**

Les résultats ainsi obtenus lors des essais préliminaires, nous ont incité à retenir les milieux liquides TE et ME dépourvus d'hormones pour l'induction de l'embryogénésomatique.

**1-2- Essais proprement dits**

Une expérimentation proprement dite pour l'induction de l'embryogénésomatique a été lancée en se basant sur l'utilisation de milieux liquides (TE et ME) dépourvus d'hormones de croissance. Pour chacun de ces deux milieux liquides retenus, trois (03) manipulations ont été réalisées à partir d'un même cal. Ainsi 0.4 g de cal nodulaire (haché et tamisé à l'aide d'un tamis de 500 µm de maille) a été mis en culture dans 150 ml de milieu liquide contenu dans un Erlen de 500 ml. Le tout a été mis sous agitation à 100 rpm et sous une photopériode de type jour long (16 h).

Les milieux de culture sont renouvelés à la fin de chaque mois de culture, ce qui nous a permis au bout de trois mois d'aboutir aux résultats suivants:

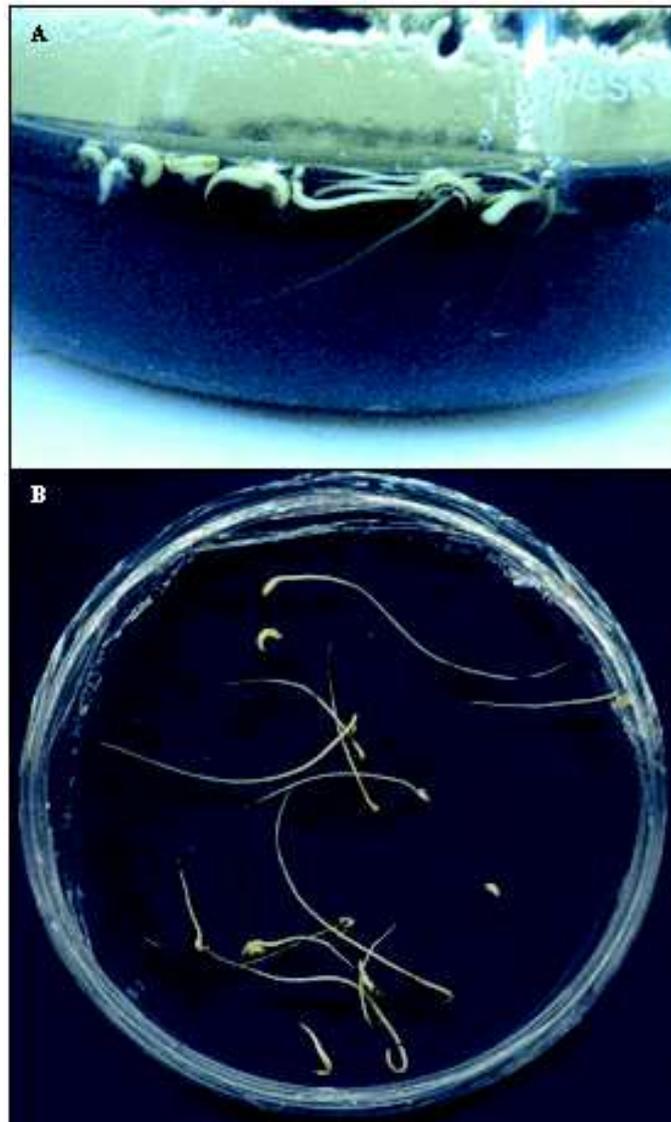
- L'existence d'une période de latence de 7 à 10 jours après la mise en place des suspensions où aucune évolution n'a été décelée à l'œil nu. Par la suite, les particules en suspension ont montré une certaine réactivité (augmentation de volume) et cela pour les deux milieux liquides TE et ME. Au cours de cette première période de culture, on a pu constater l'apparition de pseudo-embryons filiformes chétifs flottant au niveau des milieux liquides et qui se dessèchent rapidement au contact de l'air (Planche 5).
- Après le premier renouvellement (c'est-à-dire au-delà d'un mois de culture), on a observé l'apparition d'une coloration brunâtre au niveau du milieu liquide indiquant la présence de polyphénols. Ce qui a causé la dégénérescence et la perte des trois essais réalisées sur le milieu TE.

Pour ce qui est du milieu ME, l'apparition des polyphénols n'a pas eu d'incidences néfastes sur le développement ultérieur des suspensions. Ceci a permis de continuer l'observation des différents stades de l'embryogenèse somatique (globulaire, post globulaire et embryon somatique structuré).

Durant cette 2<sup>ème</sup> subculture, l'induction de l'embryogenèse somatique secondaire s'est manifestée par la néoformation de petits nodules embryogènes au cours des différents stades de développement de l'embryogenèse. Ces nodules se détachent sous l'effet de l'agitation et se développent par la suite en embryons structurés (Planches 6 et 7).

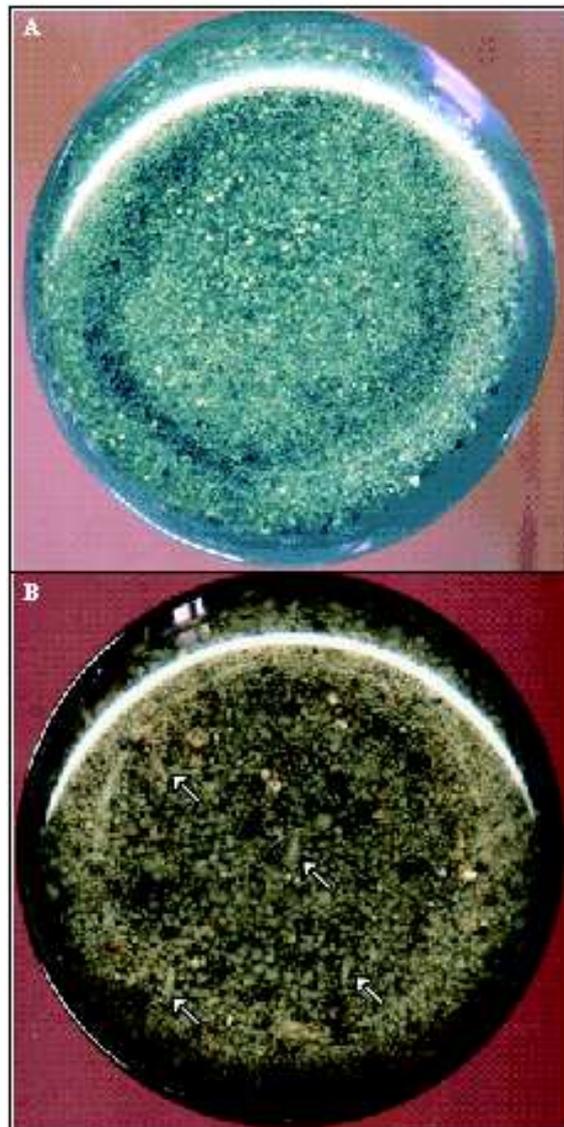
- Après le deuxième renouvellement (c'est-à-dire au-delà de deux mois de culture), le développement des suspensions se poursuit aboutissant à des embryons structurés.

D'une manière générale, même si l'utilisation du milieu liquide en agitation nous a permis d'avoir des suspensions plus au moins homogènes, évoluant individuellement (agrégats séparés avec faibles proportions d'embryons accolés), le développement de celles-ci n'a pas été synchronisé, c'est-à-dire qu'à partir du deuxième mois tous les stades de l'embryogenèse somatique étaient simultanément présents.



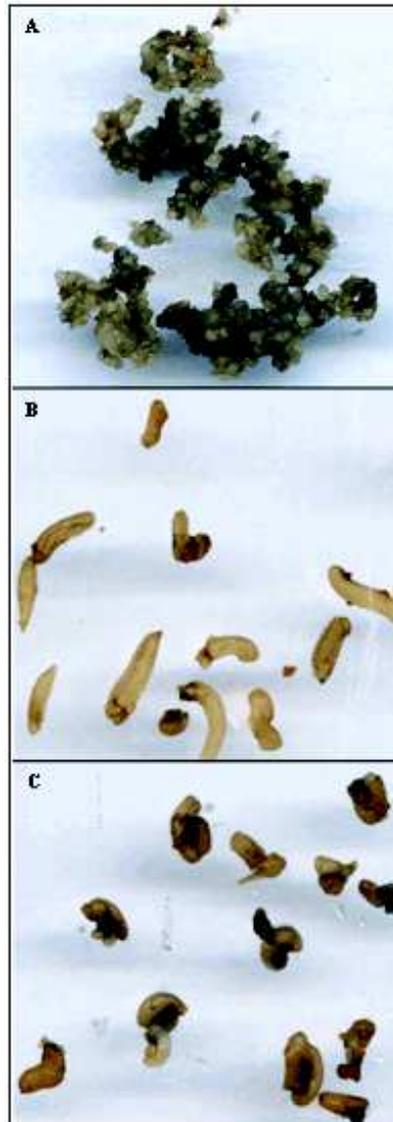
**Planche 5** : *Pseudo-embryons filiformes chétifs.*

- **A** : Pseudo-embryons filiformes flottant au niveau du milieu liquide ME au cours du premier mois de culture (G=1).
- **B** : Pseudo-embryons filiformes desséchés après leur isolation du milieu liquide (G=1).



**Planche 6** : Aspect des suspensions ( $G=1/2$ ).

- **A** : Développement des suspensions après un mois de culture.
- **B** : Embryogenèse somatique à différents stades de développement après trois mois de culture- Embryons somatiques structurés.



*Planche 7 : Structures morphogénétiques observées au niveau du milieu liquide d'induction de l'embryogenèse somatique ME (G=2).*

- **A** : Amas de proembryons.
- **B** : Embryons somatiques à différents stades de développement.
- **C** : Embryons somatiques accolés.

## 2- Maturation des embryons somatiques

### 2-1- Maturation des pro-embryons en milieu liquide

L'utilisation du milieu liquide agité dépourvu d'hormones de croissance a permis d'obtenir des embryons somatiques structurés après trois mois de culture.

En effet, les fragments de cal tamisés (sur tamis de 500  $\mu\text{m}$  de maille) se sont développés durant le premier mois de culture en petits nodules embryogènes qui ont donné naissance au cours du deuxième mois à des formes globulaires (stade globulaire) puis à des

formes sphériques montrant une légère invagination (stade post-globulaire). Ainsi au terme du troisième mois de culture les structures précédentes poursuivent leur développement pour aboutir à la formation d'embryons somatiques structurés individualisés (forme allongée de 6 à 7 mm présentant une légère invagination) (Planche 8-A).

Le nombre moyen d'embryons somatiques obtenu à partir de 0,4 g de cals nodulaires est de 48,66.

## **2-2- Maturation des proembryons étalés sur milieux gélosés**

Comme décrit précédemment, l'emploi du milieu liquide ME en agitation a permis à partir de 0,4 g de cal nodulaire l'obtention, au terme de trois mois de culture, d'un nombre d'embryons somatiques ; mais également un grand nombre de proembryons qui n'ont pas pu accomplir leur développement en embryons structurés d'un poids moyen d'environ 40,49g/ 0,4g de cals nodulaire.

Les amas de proembryons ont été sortis du milieu liquide puis placés dans des boîtes de Pétri pendant 24 heures à une température de 26°C afin de leur faire subir une légère déshydratation (Planche 8-B). Par la suite, ces amas ont été étalés dans six Erlen contenant chacun 200 ml pour chacun des deux milieux gélosés testés : MG<sub>1</sub> (solide) et MG<sub>2</sub> (semi-solide). Le poids moyen de ces amas étalés au niveau de chaque Erlen a été de 9,84 g après déshydratation.

### **2-2-1- Maturation des proembryons étalés sur milieu solide**

La réactivité des amas de proembryons étalés sur milieu solide (MG<sub>1</sub>) a été constatée à l'œil nu dès le troisième jour de culture. Elle a abouti au bout de 15 jours à la formation d'un grand nombre d'embryons somatiques structurés ayant envahi la totalité de la surface du milieu contenu dans les Erlen de 500 ml utilisés et présentant de légers signes d'hyperhydratation (Fig. 8-C).

Le phénomène d'embryogenèse secondaire s'est poursuivi, même après étalement donnant naissance à de nouvelles générations d'amas de nodules et d'embryons somatiques accolés (Fig.8-D).

Le nombre moyen d'embryons somatiques obtenu à partir d'étalements de proembryons, issus de la mise en suspension est d'environ 520 embryons somatiques structurés / 0,4 g de cal nodulaire.

### **2-2-2- Maturation des proembryons étalés sur milieu semi –solide**

La réactivité des amas de proembryons étalés sur milieu semi-solide (MG<sub>2</sub>) n'a été visible à l'œil nu qu'à partir de la deuxième semaine et a abouti au bout de trente jours à la formation d'embryons somatiques structurés répartis sur la surface du milieu contenu dans les Erlen de 500 ml et présentant des signes d'hyperhydratation.

Une forte induction d'embryogenèse secondaire (nodules néoformés ou embryons accolés) a également été observée sur ce milieu.

Le nombre moyen d'embryons somatiques obtenu est d'environ 290 embryons somatiques structurés/ 0,4g de cals nodulaire (Fig.8-D).

---

### 3- Germination des embryons somatiques structurés

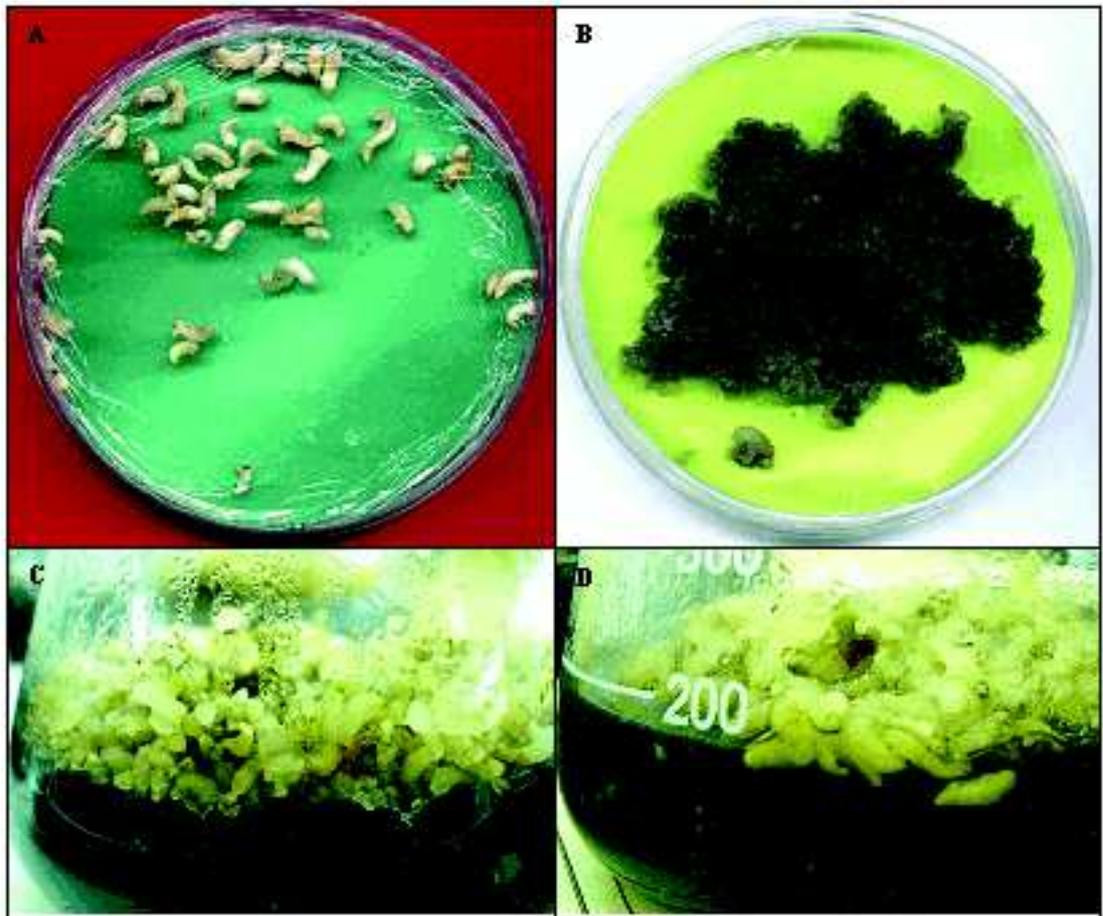
---

Les embryons somatiques obtenus sur les différents milieux de maturation sont placés dans des tubes à essai contenant les milieux gélosés MG<sub>1</sub> ou MG<sub>2</sub> afin d'initier leur germination. Ils sont transférés sur des milieux frais tous les quinze jours. Ainsi, au bout de huit semaines, les embryons mis en milieu de germination ont présenté trois types de réaction (Planche 9 et 10):

- Germination : qui s'est traduite par l'émergence en premier de la partie aérienne (feuille cotylédonaire) suivie par l'apparition d'une radicule qui se développera ultérieurement en un système racinaire pivotant. Ce type de réaction a été décelé dès la première semaine de culture.
- Embryogenèse secondaire : poursuite de la formation au départ des cals constitués de petits nodules accolés les uns aux autres et qui se développent par la suite en donnant naissance à des vitroplants accolés en touffes. L'embryogenèse secondaire continue de faire son apparition même après la germination des embryons somatiques.
- Rhizogenèse (organogenèse) : constatée sur un nombre réduit d'embryons somatiques. Ce type de réaction s'est manifesté par l'émission de la racine inhibant le développement ultérieur de la partie aérienne aboutissant à la nécrose donc à la perte des embryons.

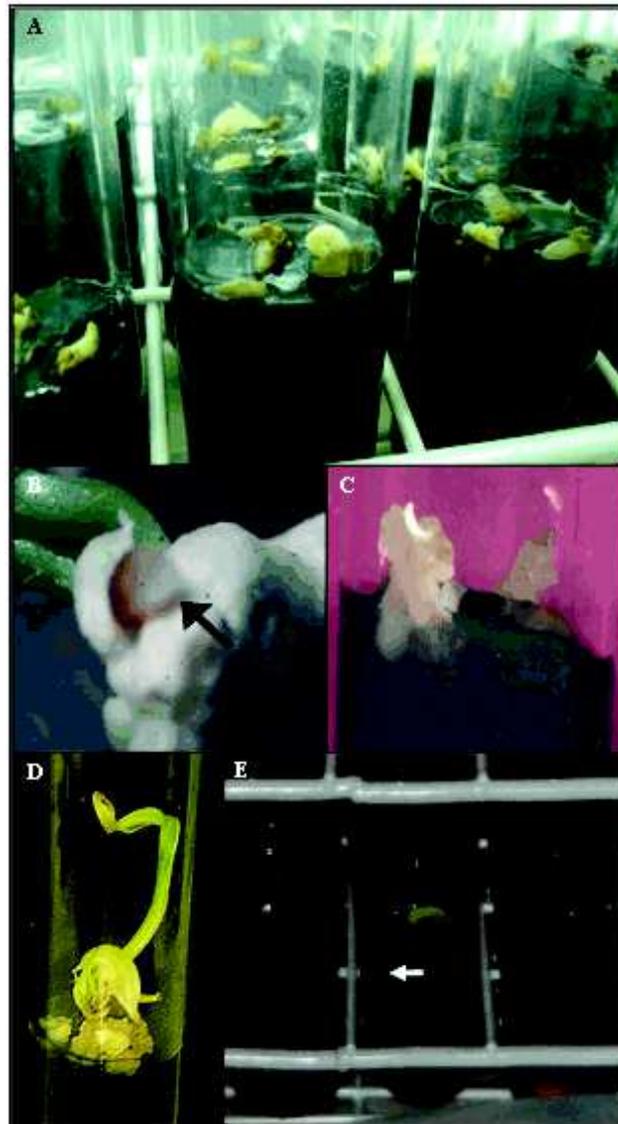
Le reste des embryons somatiques se sont nécrosés. En effet, dès la première semaine de l'ensemencement, un brunissement intense de ces embryons a été constaté annulant tout développement ultérieur (nécrose).

Il est à signaler ici qu'un début de test a été entrepris dans le but de favoriser le développement des vitroplants issus de la germination des embryons somatiques obtenus. Il ressort des premières observations que le milieu semi-solide dont la composition de base a été réduite de moitié (MG<sub>2</sub>/2) ainsi que le milieu liquide statique à base de KNOP (1865 *in* MARGARA, 1989) favorisent un bon développement racinaire ce qui augmenterait les chances de réussite de l'acclimatation des vitroplants (Planche 10).



**Planche 8 :** Structures morphogénétiques obtenues en milieu liquide et aspect des étalements en milieux gélésés

- **A :** Embryons somatiques structurés après une légère déshydratation issus de la maturation en milieu liquide agité ME (G=3/4).
- **B :** Amas de proembryons issus du milieu liquide ME et étalés sur les milieux gélésés (G=3/4).
- **C :** Embryogenèse somatique à différents stades de développement sur milieu solide MG<sub>1</sub> (G=1).
- **D :** Embryogenèse somatique à différents stades de développement sur milieu semi-solide MG<sub>2</sub> (G=1).



**Planche 9 : Réactivité des embryons somatiques structurés mis sur milieux de germination.**

- **A** : Embryons somatiques en germination sur milieu gélosé (G=2).
- **B** : Emergence de la feuille cotylédonaire suivie de l'apparition de la radicule (G=10).
- **C** : Embryogenèse secondaire au niveau des embryons somatiques (G=2).
- **D** : Embryogenèse secondaire au niveau des vitroplants en développement (G=1).
- **E** : Rhizogenèse sans développement ultérieur (G=9/10).



**Planche 10 :** Vitroplants issus de la germination des embryons somatiques structurés obtenus chez la variété Degla Beida.

- **A :** Différents stades de développement des vitroplants issus de l'embryogenèse somatique (G=1/2).
- **B :** Poursuite de l'embryogenèse secondaire au cours du développement du vitroplant (G=1).
- **C :** vitroplants accolés (en touffe) issus de l'embryogenèse secondaire (G=1).
- **D :** Développement du système racinaire en milieu liquide statique à base de KNOP (G=1).

### 3-1- Germination des embryons issus du milieu liquide

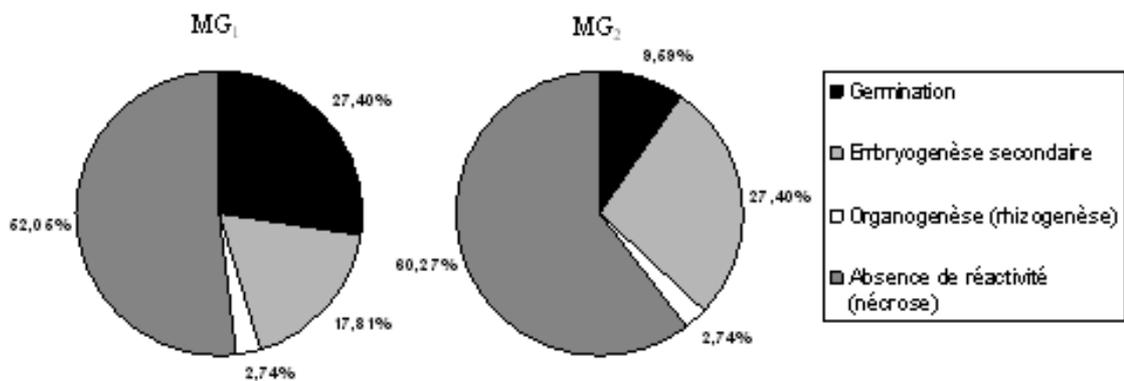
Les embryons somatiques ayant atteint leur maturité structurale en milieu liquide agité ME présentaient une hyperhydratation ce qui a nécessité le recours à une légère déshydratation. Ainsi les embryons obtenus ont été mis dans des boîtes de Pétri stériles pendant 24 heures à une température de 26 °C afin de réduire leur teneur en eau. Les

embryons sont ensemencés à raison de trois par tubes à essais contenant les milieux de germination solide (MG<sub>1</sub>) ou semi-solide (MG<sub>2</sub>). Au terme de huit semaines, des différences entre milieux de germination par rapport à la réactivité de ces embryons ont été constatées (Fig.27). En effet, les embryons mis sur le milieu de germination solide MG<sub>1</sub> ont été plus réactifs (47,95 %) que ceux mis au niveau du milieu de germination semi-solide MG<sub>2</sub> (39,73 %). Le plus fort taux de germination (27,40 %) a été obtenu sur le milieu MG<sub>1</sub> contre 9,59 % sur le milieu MG<sub>2</sub>.

L'apparition de l'embryogenèse secondaire a été plutôt favorisée sur le milieu MG<sub>2</sub> avec un taux de 27,40 % contre 17,81 % sur le milieu MG<sub>1</sub>.

Le taux de rhizogenèse suivie de nécrose a été de 2,74 % au niveau de chacun des deux milieux de germination testés.

Par la suite, le développement en vitroplants a été plus important au niveau du milieu semi-solide.



**Fig. 27 :** Réactivité des embryons placés sur milieu de germination solide (MG<sub>1</sub>) ou semi-solide (MG<sub>2</sub>)

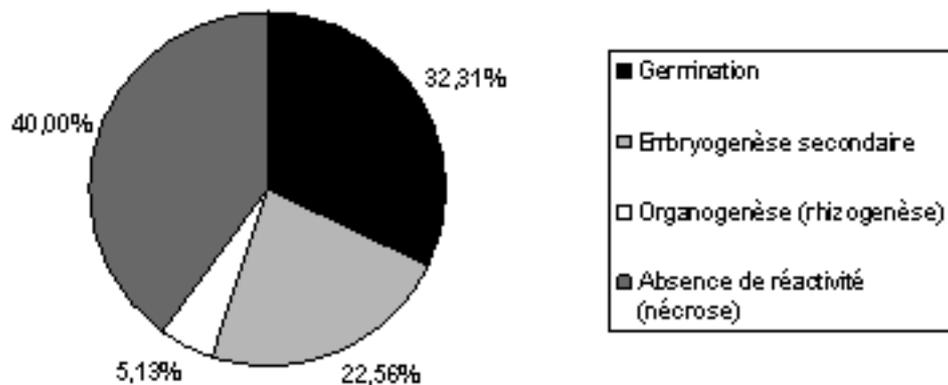
(Origine : milieu liquide ME).

### 3-2- Germination des embryons structurés issus de l'étalement sur milieux gélosés

#### 3-2-1- Germination des embryons structurés issus du milieu solide

Les embryons issus de la maturation en milieu de maturation MG<sub>1</sub> ont été isolés au bout de quinze jours et ont été ensemencés à raison de trois par tube à essais contenant le même milieu ayant permis leur maturation.

Les embryons ainsi isolés ont montré une réactivité dès le troisième jour d'ensemencement et ont abouti au bout de huit semaines à un taux de réactivité totale de 60 % dont 32,31 % de germination et 22,56 % d'induction de l'embryogenèse secondaire. Le taux d'émission direct de racines (organogenèse suivie de nécrose) n'a été que de 5,13 % (Fig. 28).



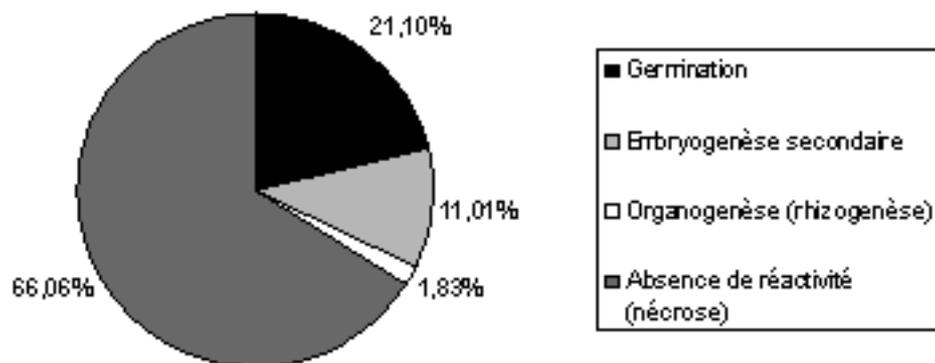
**Fig. 28 :** Réactivité des embryons placés sur milieu solide MG<sub>1</sub>

(Origine : milieu solide MG<sub>1</sub>).

### 3-2-2- Germination des embryons structurés issus du milieu semi-solide

Les embryons issus de la maturation en milieu de maturation MG<sub>2</sub> ont été isolés au bout de trente jours et ont été ensemencés à raison de trois par tube à essais contenant le même milieu qui a permis leur maturation.

Les embryons isolés ont montré une réactivité à partir de la deuxième semaine d'ensemencement et ont abouti au bout de deux mois à un taux de réactivité totale de 33,94 % dont 21,10 % de germination et 11,01 % d'induction de l'embryogenèse secondaire. Le taux enregistré de rhizogenèse (suivie de nécrose) a été de 1,83 % (Fig. 29).



**Fig. 29 :** Réactivité des embryons placés sur milieu semi-solide MG<sub>2</sub>

(Origine : semi-solide MG<sub>2</sub>).

## 4- Conclusion

Le tableau 20 , récapitule les résultats obtenus lors de l'étape de l'initiation de l'embryogenèse somatique, maturation et germination des embryons somatiques.

Origines des embryons somatiques structurés	Nombre d'embryons somatiques obtenus	Taux de germination	
		Sur milieu solide (MG <sub>1</sub> )	Sur milieu semi-solide (MG <sub>2</sub> )
<b>liquide (ME)</b>	48	27,40 %	9,59%
<b>liquide (ME)/solide (MG<sub>1</sub>)</b>	520	32%	-----
<b>liquide (ME)/semi-solide(MG<sub>2</sub>)</b>	290	-----	21%

*Tableau 20 : Résumé des résultats obtenus au niveau des milieux de maturation et de germination testés.*

# DISCUSSION

## I- Contaminations des cultures

Les explants utilisés ont pour origine le sommet du cœur d'un rejet de palmier dattier de la variété Degla Beïda. Ils ont été désinfectés à l'aide du chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) à une concentration de 150mg/l, ce qui nous a permis d'avoir à la fin des deux premiers mois de culture un faible taux de contaminations (4,37%) et exclusivement de nature fongique.

Au-delà de cette période, l'apparition des contaminations a été ponctuelle et limitée. Elle serait due à des erreurs de manipulation. Ce résultat révèle l'efficacité de l'utilisation du  $\text{HgCl}_2$  comme produit stérilisant lors de l'initiation de travaux de culture in vitro sur le palmier dattier. Plusieurs auteurs ont déjà signalé son utilisation (SHARMA *et al.*, 1980 ; BEKHEET *et al.*, 1998 ; YADAV *et al.*, 2001; CHAIBI *et al.*, 2002 ; BHARGAVA *et al.*, 2003; FKI *et al.* ; 2003, OTHMANI *et al.*, 2006 ; ASEMOTA *et al.*, 2007). Cependant l'utilisation de doses excessives de  $\text{HgCl}_2$  durant la désinfection pourrait avoir un effet inhibiteur induisant la mort des explants (CHABANE, 1995).

## II- Initiation de la callogenèse

Les explants préalablement désinfectés sont mis en culture sur deux milieux ayant chacun une composition minérale différente et au niveau desquels sept traitements hormonaux ont été testés.

La réactivité (gonflement) des explants s'est manifestée dès le 10<sup>ème</sup> jour de culture suivie par l'apparition à partir du 20<sup>ème</sup> jour de culture des premiers cals. Cette callogenèse s'est toujours manifestée sous forme de cals blanchâtres hyperhydratés friables ou compacts (TISSERAT, 1979; SHARMA *et al.*, 1980 ; MATER, 1986; CHABANE, 1995; ZAID *et al.*, 1983; VERAMENDI *et al.*, 1997; YADAV *et al.*, 2001; EKE *et al.*, 2005).

Au-delà d'un mois de culture des brunissements sont apparus au niveau des explants et des milieux de culture. Cela concorde avec les observations déjà faites lors de la réalisation de différents travaux portant sur l'initiation de la callogenèse chez le palmier dattier (TISSERAT, 1979 ; SHARMA *et al.*, 1980, TISSERAT, 1982 ; ZAID, 1984; AL KUWARI *et al.*, 1998; ADEL RAHIM *et al.*, 1998; IBRAHIM *et al.*, 2001).

L'apparition de brunissements est synonyme de présence de polyphénols sécrétés par les explants suite aux stress causés par la dissection du cœur du rejet, à la fragmentation des explants et à leur mise en culture sur milieux synthétiques (ZAID *et al.*, 2002).

Par la suite, on a pu observer un ralentissement de la réactivité et même la nécrose de certains explants. Cet effet inhibiteur de la callogenèse est dû à la présence de quinones, produit de l'oxydation des polyphénols par des oxydases endogènes (EL HADRAMI *et al.*,

---

1996; AIT- CHITT et *al.*, 1996; EL BELLAJ et *al.*, 2000; IBRAHIM et *al.*, 2001; ZAID et *al.*, 2002 ; BAAZIZ et *al.*, 2006).

## 1- Effet des milieux de culture

---

Les deux milieux de culture testés (T et M) ont permis d'obtenir un taux élevé de réactivité totale (gonflement et callogenèse). Cependant, ce sont les explants mis en culture sur milieux de type M (enrichi) qui ont été les plus rapides à montrer une callogenèse et ont présenté le plus fort taux de callogenèse et le plus faible taux de brunissements à la fin des deux premiers mois de culture contrairement aux explants mis en culture sur milieu de type T (non enrichi).

Ceci s'explique par l'effet positif des additifs minéraux de TISSERAT (1979) sur l'induction de la callogenèse primaire mais aussi par la réduction de l'effet inhibiteur du phénoène de brunissement sur la réactivité des explants mis en culture (BRAND, 1993 ; AL KUWARI et *al.*, 1998 ; ASEMOTA et *al.*, 2007).

## 2- Effet des équilibres hormonaux

---

Tous les équilibres hormonaux au niveau des deux milieux de culture testés ont initié une callogenèse. Cependant, les taux obtenus à la fin des deux premiers mois et le temps de réponse des explants diffèrent.

Ainsi c'est au niveau des milieux contenant peu ou pas de 2,4-D (0,1 et 5mg/l) que les explants ont été les plus rapides à initier une callogenèse avec des taux élevés par rapport aux explants mis en culture sur milieux contenant de fortes concentrations en 2,4-D (10, 50 et 100mg/l). Ces derniers ont présenté une callogenèse moins intense et plus tardive. Cela pourrait être expliqué par la présence d'auxines endogènes ce qui permet d'obtenir rapidement une callogenèse en présence de faibles doses de 2,4-D (HVOSLEF- EIDE et *al.*, 2005 ; MUJIB et *al.*, 2005).

Ces observations viennent confirmer celles déjà constatées lors de travaux antérieurs. ELHADRAMI (1995) a obtenu des taux élevés de callogenèse sur des milieux vingt fois réduits en 2,4-D par rapport au milieu conventionnel de 100mg/l de 2,4-D. FKI (1998) a initié une bonne callogenèse sur milieu contenant de faibles doses ( <- à 0,5mg/l) de 2,4-D. SANE et *al.* (2006) ont obtenu une callogenèse en présence de 2 mg/l de 2,4-D. CHABANE et *al.* (2007) ont obtenu de forts taux de callogenèse avec 2 mg/l de 2,4-D.

L'apparition du phénomène de brunissement a été suivie par un ralentissement de la réactivité au niveau de tous les traitements allant jusqu'à la perte de certains explants par nécrose au niveau des traitements contenant (5 mg/l de 2,4-D, 5 mg/l de BAP). Ceci serait dû à l'apport élevé en cytokinine connue pour être l'un des facteurs favorisant la sécrétion des polyphénols (ZAID, 1984 ; ZAID et *al.*, 2002).

## III- Entretien et multiplication des cals

### 1- Evolution de la callogenèse sur milieux solides

---

L'ensemble des explants, présentant ou non une callogenèse, ont été transférés tous les deux mois dans des milieux de culture frais de mêmes compositions minérales, organiques et hormonales initiales. Cette phase du travail expérimental nous a permis de faire les constatations suivantes :

- La callogenèse nodulaire fait suite à l'évolution de la callogenèse primaire (friable ou compacte). Les premiers nodules sont apparus dès le 4<sup>ème</sup> mois de la mise en culture des explants issus du cœur du rejet et ce conformément aux résultats de nombreux auteurs. (TISSERAT, 1979; SHARMA *et al.*, 1980 ; TISSERAT, 1982 ; ZAID *et al.* 1983, MATER, 1986 ; CHABANE *et al.*, 1995 ; VERAMENDI *et al.*, 1997 ; BEKHEET *et al.*, 1998 ; EKE *et al.*, 2005).
- Le transfert successif des cals obtenus sur milieux frais a permis d'entretenir et de multiplier la masse callogène en présence des mêmes équilibres hormonaux qui ont été à l'origine de leur initiation pendant une durée supérieure à 24 mois. Il est à signaler que les repiquages successifs pourraient engendrer des variations somaclonales mais aussi la perte de la capacité embryogène des cals multipliés (ZAID *et al.*, 2002 ; KUNERT *et al.*, 2003).
- Le phénomène de brunissement a été présent tout au long des différentes subcultures avec des périodes de faible et de forte intensité engendrant dans le cas le plus extrême la nécrose des explants mis en culture. Cette alternance d'intensité pourrait être expliquée par les retards de réalisation des transferts sur milieux frais.

### **1-1- Effet des milieux de culture**

Les deux milieux testés ont permis l'initiation de la callogenèse nodulaire ainsi que la multiplication de la masse callogène. Cependant le temps nécessaire à l'initiation et l'intensité de développement de la callogenèse nodulaire (multiplication) diffèrent.

En effet ce sont les milieux de type M qui ont permis une rapidité d'initiation de la callogenèse nodulaire ainsi que son maintien et son développement ultérieur, contrairement aux milieux de type T dont le temps d'initiation a été plus long et l'intensité de multiplication plus faible mais avec apparition intense de brunissements induisant la perte d'un grand nombre d'explants.

Ceci est dû à l'action double des additifs de TISSERAT (1979) apportés au niveau des milieux culture de type M qui favorisent le développement de la callogenèse tout en limitant l'effet inhibiteur de la présence de polyphénols (BRAND, 1993 ; AL KUWARI *et al.*, 1998 ; ASEMOTA *et al.*, 2007).

### **1-2- Effet des équilibres hormonaux**

Tous les équilibres hormonaux testés à l'exception des témoins expérimentaux (0 mg/l) ont induit une callogenèse nodulaire. Cependant le temps nécessaire à son initiation et l'intensité du développement ultérieur diffèrent.

En effet pour les explants mis en culture sur des milieux contenant de faibles doses de 2,4-D (1 et 5 mg/l) et de charbon actif (30 et 150 mg/l) l'initiation de la callogenèse nodulaire a été plus rapide mais avec un développement ultérieur faible et des brunissements intenses conduisant le plus souvent à des nécroses.

Contrairement aux explants mis en culture sur des milieux contenant de fortes doses de 2,4-D (10, 50 et 100 mg/l) et de charbon actif (300, 1500 et 3000 mg/l) où la callogenèse

a été plus lente à apparaître mais s'est poursuivie avec une forte intensité de multiplication et moins de brunissements qui n'a pas eu d'incidence néfaste sur le devenir des explants. Ceci serait dû à l'effet de la combinaison de fortes doses de 2,4-D avec de fortes doses de charbon actif. Ce qui confirme ce qui a été déjà signalé par plusieurs auteurs (TISSERAT, 1979 ; SHARMA *et al.*, 1980 ; TISSERAT, 1982 ; ZAID *et al.* 1983 ; MATER, 1986 ; CHABANE *et al.*, 1995 ; VERAMENDI *et al.*, 1997 ; BEKHEET *et al.*, 1998 ; AL KUWARI *et al.*, 1998 ; MOHAMED *et al.*, 2001).

## 2 - Evolution de la callogenèse en milieux liquides agités

Dans le but d'augmenter la masse de cals nodulaires afin de pallier à l'insuffisance du matériel végétal, nous avons opté pour l'utilisation du milieu liquide agité.

Des cals nodulaires (0,4g/150 ml de milieu) ont été mis en culture en présence des mêmes concentrations hormonales ayant permis leur obtention sur deux milieux liquides différents (T' et M'). Cette démarche nous a permis d'aboutir aux conclusions suivantes:

- l'existence d'une période de latence de dix jours environ, correspondant au temps nécessaire d'adaptation aux nouvelles conditions culturales (environnementales et nutritionnelles) (HVOSLEF- EIDE *et al.*, 2005).
- l'augmentation rapide de la masse callogène, en effet l'un des principaux intérêts de la culture en milieu liquide est la facilité qu'ont les explants cultivés (cals nodulaires) à assimiler les éléments nutritifs (MARGARA *et al.*, 1989 ; AUGÉ *et al.*, 1989 ; HVOSLEF-EIDE *et al.*, 2005).
- la dégénérescence de certains nodules suivie de la sécrétion de polyphénols et l'hyperhydratation (vitrification) de la masse callogène obtenue à la fin des deux mois de culture. La limitation des échanges gazeux au niveau des milieux liquides serait à l'origine de la nécrose et de l'hyperhydratation (HVOSLEF- EIDE *et al.*, 2005).

### 2-1- Effet des milieux de culture :

Les deux types de milieux liquides testés ont abouti à l'augmentation de la masse de cals nodulaires. Cependant, c'est au niveau du milieu liquide de type M' que le plus fort taux de multiplication a été relevé. Le retour sur milieux solides d'origine a montré une rapidité de réactivité au niveau des milieux de type M.

Ainsi l'apport de l'azote et du potassium par les additifs de TISSERAT (1979), réduits de moitié lors de l'élaboration des milieux liquides, a eu un effet positif sur la croissance des cals en suspension. (AL KUWARI *et al.*, 1998).

### 2-2- Effet des équilibres hormonaux

Au bout de deux mois de culture en milieux liquides, tous les traitements ont abouti à une augmentation de la masse nodulaire. Toutefois, c'est le milieu témoin contenant 1 mg/l de 2,4-D qui a permis l'obtention du facteur de multiplication le plus élevé confirmant ainsi les résultats obtenus par FKI (1998, 2003).

Par la suite et après le transfert des cals amplifiés sur les mêmes milieux solides d'origine qui ont permis leur amplification, tous les traitements testés ont montré une reprise de la réactivité avec une intensité au niveau des faibles concentrations 2,4-D. Ceci conforte le fait que l'alternance des milieux de culture (solide-liquide) favorise le maintien de

l'intensité de la callogenèse nodulaire en présence de faibles doses d'auxines (FKI, 1998 ; MUJIB et *al.*, 2005).

### 3 - Souches sélectionnées

---

Dix huit 18 souches se sont maintenues, après 26 mois, sur les 52 sélectionnées à la fin des deux premiers mois de culture.

Les mêmes effets des milieux de culture observés au niveau des tubes à essais ont été constatés au niveau des boîtes de Pétri. Cependant, au niveau de ces dernières, le phénomène de brunissement a été plus intense. Il serait dû aux conditions moins favorables de culture (réduction des échanges gazeux et concurrence entre explants) (ZAID, 1984 ; ZAID et *al.*, 2002). Ceci pourrait expliquer par conséquent, la perte de la totalité des souches sélectionnées et mises en culture sur milieux T (non enrichi) dans des boîtes de Pétri.

## IV – Induction de l'embryogenèse, maturation et germination des embryons

### 1- Induction de l'embryogenèse en milieux liquides agités

---

L'initiation de l'embryogenèse somatique a été obtenue à partir de la mise en culture sur milieu liquide agité de cals nodulaires plus ou moins friables préalablement hachés et tamisés sur tamis de 500 µm de maille. Ce résultat vient confirmer ceux obtenus lors de travaux antérieurs (FKI et *al.*, 2003 ; ZOUINE et *al.*, 2004 ; SANE et *al.*, 2006 ; ZOUINE et *al.*, 2007)

Selon de nombreux auteurs (TISSERAT, 1979 ; TISSERAT, 1982 ; MUJIB et *al.*, 2005 ; HVOSLEF- EIDE et *al.*, 2005) l'initiation de l'embryogenèse somatique fait suite à la réaction de la suspension aux stress auxinique et nutritionnel exercés par le milieu de culture. En effet, durant notre expérimentation, l'expression du potentiel embryogène des fragments de cals tamisés a été mise en évidence sur milieux liquides dépourvus d'hormones de croissance et dont la composition minérale, ayant permis l'induction de la callogenèse nodulaire, a été réduite de moitié.

Aussi, il est à signaler ici que les fragments de cals tamisés mis en culture sur milieu liquide agité de type T'ont initié une embryogenèse somatique lors des tests préliminaires mais par la suite lors du lancement de notre expérimentation, les suspensions de type T'ont perdu leur potentiel embryogène. Cette perte de potentiel s'est manifestée par une nécrose des particules en suspension. Ceci serait dû au déficit du milieu de type T en éléments minéraux dont est issu le cal nodulaire mais aussi du milieu d'initiation de l'embryogenèse T'(BRAND, 1993).

### 2 - Maturation des embryons somatiques

---

L'utilisation du milieu liquide agité dépourvu d'hormones de croissance nous a permis l'initiation de l'embryogenèse mais aussi la maturation d'un certain nombre d'embryons

somatiques au bout de 3 mois de culture. Les conclusions suivantes peuvent alors être faites :

- Observation des différents stades de développement de l'embryogenèse somatique (stade nodule, stade globulaire, stade post-globulaire et stade embryon somatique structuré) caractéristiques du palmier dattier (FKI, 1998 ; FKI et *al.*, 2003 ; SANE et *al.*, 2006 ; SGHAIR et *al.*, 2008).
- Apparition de l'embryogenèse somatique secondaire tout au long des trois mois de culture. Ce phénomène s'est traduit par la néoformation de nodules qui se détachent, par la suite, sous l'effet de l'agitation donnant ainsi naissance soit à d'autres nodules soit à des embryons somatiques. Ce phénomène serait favorisé par l'utilisation du milieu liquide agité (HVOSLEF- EIDE et *al.*, 2005 ; SANE et *al.*, 2006).
- Développement asynchrone des suspensions malgré le hachage et le tamisage des cals nodulaires ayant permis leur obtention (FKI et *al.*, 2003 ; SANE et *al.*, 2006). Ceci peut être optimisé par la filtration régulière au cours des différentes périodes de culture (VERAMENDI et *al.* 1997 ; LETOUZE et *al.*, 1998 ; HVOSLEF- EIDE et *al.*, 2005).

A la fin des trois mois de culture, l'utilisation du milieu liquide a abouti à partir de 0,4 g de cals nodulaires (hachés et tamisés) à la formation d'environ 48 embryons somatiques structurés et d'un grand nombre de proembryons à différents stades de développement.

Les amas de proembryons ont été étalés sur des milieux gélosés (solide et semi-solide) de même composition que celle du milieu liquide dont ils sont issus. Ceci a permis d'obtenir au niveau du milieu solide 520 embryons structurés après 15 jours d'étalement et au niveau du milieu semi-solide 219 embryons structurés après un mois d'étalement.

Ainsi le transfert des embryons sur milieux gélosés a abouti à la formation d'un grand nombre d'embryons somatiques structurés essentiellement au niveau du milieu solide. Ce résultat corrobore l'utilité déjà mise en évidence avec le recours de l'étalement sur milieu gélosé, après induction sur milieu liquide, dans le but d'augmenter le nombre d'embryons somatiques individualisés (HVOSLEF- EIDE et *al.*, 2005).

### 3- Germination des embryons somatiques

Tous les embryons obtenus (toutes origines confondues) ont présenté des signes d'hydratation avec une forte intensité au niveau des embryons issus du milieu liquide, phénomène inhérent à l'utilisation du milieu liquide et qui serait dû aux conditions culturelles (faiblesse de la luminosité, manque d'aération, déficit ou déséquilibre de la composition minérale du milieu, ...) (AL KUWARI et *al.*, 1998 ; HVOSLEF- EIDE et *al.*, 2005).

FKI et *al.* 2003 ont procédé à la déshydratation physique (exposition à des températures plus ou moins élevées pendant un temps déterminé) afin de réduire l'hyperhydratation des embryons structurés à partir du milieu liquide. En effet, selon les mêmes auteurs, un abaissement de la teneur en eau de 90% à 75% des embryons relèvera le taux de germination de 25 % à 90%.

Lors de notre expérimentation, les embryons somatiques ayant atteint leur maturité structurale en milieu liquide ont été mis dans des boîtes de Pétri pendant 24 heures à une température de 26° C sans que le taux de germination ne dépasse par la suite les 28 %. Ceci peut être expliqué par la méthodologie utilisée qui n'a pas eu d'effet sur la réduction consécutive de la teneur excessive en eau des embryons issus du milieu liquide.

Les embryons somatiques structurés (toutes origines confondues) ont été mis sur milieux de germination gélosés (solide et semi solide) de même composition que ceux utilisés lors de la maturation. Il en ressort aussi que le passage, durant la phase maturation, du milieu liquide vers le milieu gélosé favoriserait l'augmentation du taux de germination des embryons structurés obtenus ainsi que leur développement ultérieur. En effet l'alternance des milieux liquide-solide est l'un des moyens reconnu efficace pour l'optimisation de la maturation des embryons somatiques et la réduction de l'effet négatif de l'hyperhydratation sur la germination et le développement ultérieur des vitroplants (VERAMENDI et *al.* 1997 ; HVOSLEF- EIDE et *al.*, 2005).

---

# Conclusion générale

La reconstitution des palmeraies détruites par le Bayoud, la sauvegarde de la diversité existante mais menacée ainsi que la création de variétés de palmier dattier à la fois résistantes et pouvant produire des dattes de haute qualité nécessitent la maîtrise de la régénération par voie de l'embryogenèse somatique et la mise au point de protocoles fiables, simples et de reproductivité élevée

C'est dans cette perspective que notre travail expérimental a été orienté. Ainsi, on a obtenu des embryons somatiques à partir de cals nodulaires initiés sur des explants issus du sommet du cœur d'un rejet d'une variété de palmier dattier (Degla Beida). Les conclusions suivantes peuvent alors être faites :

- L'utilisation du HgCl<sub>2</sub> comme produit désinfectant réduit fortement les risques de contaminations.
- L'apport des additifs de TISSERAT (1979) combinés à des sources d'azote inorganique (adénine et glutamine) favorise la réactivité des explants au cours des différentes étapes de culture réalisées.
- L'utilisation de fortes concentrations en 2,4-D combinées à de fortes doses de charbon actif favorise l'initiation et la multiplication (croissance) des cals nodulaires sur milieux solides en condition d'obscurité totale.
- L'utilisation de faibles concentrations en 2,4-D favorise l'amplification de la masse de nodules en milieux liquides agités.
- L'utilisation du milieu liquide agité, dont la composition de base en éléments minéraux a été réduite, en absence de régulateurs de croissances favorise l'initiation de l'embryogenèse sous une photopériode de 16 heures.
- L'alternance de milieux (liquide/solide) améliore le rendement en embryons somatiques structurés d'un point de vue quantitatif (nombre d'embryons structurés obtenus) et qualitatif (taux de germination).

Dans nos conditions expérimentales, le temps nécessaire à l'obtention d'embryons somatiques structurés pourrait être estimé à 10 mois dont 5 mois pour induire une callogenèse nodulaire potentiellement embryogène.

Le temps nécessaire à l'induction de l'embryogenèse pourrait être réduit en utilisant des souches déjà sélectionnées. En effet durant notre expérimentation 18 souches ont été sélectionnées sur la base de l'intensité de la callogenèse primaire induite lors des deux premiers mois de culture. Cependant, l'utilisation de fortes doses durant notre travail et les transferts répétés peuvent engendrer des variations somaclonales. Ainsi, des tests de conformité génétique de la descendance par des méthodes moléculaires doivent être réalisés dans le futur.

En perspective, des recherches complémentaires sont toutefois indispensables :

- Réalisation d'études histologiques ainsi que biochimiques au cours des différents stades de développement des embryons somatiques permettant ainsi une meilleure maîtrise du processus de régénération *in vitro*.

- Etude des facteurs physico-chimiques permettant d'aboutir à l'acclimatation des plantules issus de la germination des embryons somatiques en conditions contrôlées
- Définition des facteurs physico-chimiques inhérents à l'utilisation des milieux liquides agités afin d'assurer un développement optimum des suspensions embryogènes, qui sont une source idéale pour l'isolation de protoplastes. Ceci, permettra dans l'avenir la régénération de plantules dont le matériel génétique a été volontairement modifié par hybridation somatique, mutagenèse ou transformé par les méthodes de génie-génétique.
- Etude des possibilités de conservation du matériel végétal obtenu : par enrobage des embryons somatiques (semences artificielles) ou bien cryoconservation à différents stade de culture (cal, suspension cellulaire et embryon somatique structuré).
- Mise au point de protocoles fiables afin d'établir précocement la résistance à la maladie du Bayoud du cultivar ou du mutant multiplié par voie d'embryogenèse somatique en exerçant une pression sélective telle que des extraits actifs de l'agent causal de la maladie.

---

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABAHMANE L., 2006. Utilisation des inflorescences pour la micropagation des clones de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) résistants à la maladie du Bayoud. In recueil des résumés de la Conférence régionale: mutagenèse induite et biotechnologies d'appui pour la protection du palmier dattier contre le Bayoud. Alger, Algérie, 17-18 Juin 2006.
- ABED F., KHELAFI H., DJELLAL, L., AKHOU, M.S., YETTA D., AMARA B., SEDRA M.Y., 2006. Mutagenèse induite chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). In recueil des résumés de la Conférence régionale: mutagenèse induite et biotechnologies d'appui pour la protection du palmier dattier contre le Bayoud. Alger, Algérie, 17-18 Juin 2006.
- ABED, F.; YETTA D., KHELAFI H., YAKHOU M.S., AMARA B., DJELLAL L., 2006. Optimisation de la technique d'obtention de suspension cellulaire et de protoplastes en vue d'une hybridation somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) In recueil des résumés de la Conférence régionale: mutagenèse induite et biotechnologies d'appui pour la protection du palmier dattier contre le Bayoud. Alger, Algérie, 17-18 Juin 2006.
- ACOURENE S., ALLEM A., TALEB B., TAMA M., 2007. Inventaire des différents cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) des régions de Oued-Righ et de Oued-Souf (Algérie). Cahiers sécheresse. Volume, 18 (2). pp. 135-142.
- ADEL RAHIM E.A., ADEL FATEH O.M., EL SHEMY H.A., ABD EL SAMEI M.B., 1998. Growth of date palm callus as affected by amino acids as organic nitrogen source. In proceedings of the First International Conference on Date Palms. Al-Ain, UAE, 8-10 March 1998.
- AIT-CHITT M., 1989.-Multiplication in vitro du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par organogenèse : Problèmes rencontrés. Compte rendu du deuxième séminaire maghrébin sur la multiplication rapide du palmier dattier par les techniques de culture in vitro. FAO/PNUD/RAB/88/024. pp.37-41.
- AL KAABI H.H., RHISS A., HASSAN M.A., 2001. Cytokinins on the in vitro production of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) bud generative tissues and on the number of differentiated buds. In proceedings of the Second International Conference on Date Palms. Al-Ain, UAE, March 25-27 2001.
- ANJARNE M., BOUGUERFAOUI M., ABAHMANE L., 2005. La culture de tissus : un outil d'amélioration génétique du palmier dattier. In recueil des résumés du Symposium international : développement agricole durable des systèmes oasiens. Erfoud, Maroc, 07-10 Mars 2005.
- ANJARNE M., BOUGUERFAOUI M., ABAHMANE L., 2005. Les techniques de micropagation du palmier dattier ; expérience de l'INRA Maroc. In recueil des

- résumés du Symposium international : développement agricole durable des systèmes oasiens. Erfoud, Maroc, 07-10 Mars 2005.
- ASEMOTA O., EKE C.R., ODEWAL J.O., 2007. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. African Journal of biotechnology vol.6 (20).pp. 2353-2357.
- AUGE R., BEAUCHESNE G. B., BOCCON GIBOD L., DECOURTYE L., GET, B., JALOUZOUT R., MUNIER R., MORAN J., CI REYNOLD, J. P., STRULLY D.G., VIDALLIE H., 1989. La culture *in vitro* et ses applications horticoles. 3ème Ed. Tec et Doc. LAVOISIER, Paris. 207p.
- AZEQUOUR M. ; AMSSA, M., 2002. Identification de la variabilité intraclonale des vitroplants de palmier issus de la culture *in vitro* par organogenèse : étude morphologique. C. R. Biologie, 325. pp. 947-956.
- BAAZIZ M., BRAKEZ Z., BENDIAB K., AISSAM F., EL HADRAMI I., 1996. Apport des marqueurs biochimiques et moléculaires dans la micropropagation du palmier dattier. In rapport de synthèse de l'atelier « culture *in vitro* du palmier dattier ». CIHEAM – options méditerranéennes n° 28, pp. 170-171.
- BAAZIZ M., QACIF N., BENDIAB K., AOUAD A., 2006. Les peroxydases des plantes: aspects théoriques et applications pratiques. Congrès International de biochimie. Agadir, Maroc, 9-12 Mai 2006, pp.17-21.
- BATTESTI V., 2005. Les jardins du désert. I.R.D Editions. 440p.
- BEKHEET S.A., SAKER M.M., 1998. *In vitro* propagation of egyptian date palm: II- Direct and indirect shoot-tip explants of *Phoenix dactylifera* L. cv. Zaghlool. In proceedings of the First International Conference on Date Palms. Al-Ain, UAE, 8-10 March 1998.
- BELEGUEDJ M., 2002. Caractéristiques des cultivars de dattiers dans les palmeraies du Sud-Est algérien. Revue Recherche Agronomique Annuelle2002;1 : 1-289.
- BEN ABDELLAH A., 1989. Multiplication par organogenèse du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : Les cultivars tunisiens. Compte rendu du deuxième séminaire Maghrébin sur la multiplication rapide du palmier dattier par la technique de culture *in vitro*. FAO/PNUD/RAB/88/024.p. 37-41.
- BENAMAHCENE S., 1998. Contribution à l'amélioration de quelques aspects de la conduite du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Thèse de magister. I.N.A., Alger, 173p.
- BENKHALIFA A., 2006. Situation de la lutte contre le Bayoud. In recueil des résumés de la Conférence régionale: mutagenèse induite et biotechnologies d'appui pour la protection du palmier dattier contre le Bayoud. Alger, Algérie, 17-18 Juin 2006.
- BRAND M.H., 1993. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. Plant. Cell. Tiss. n° 35, pp. 203-209.
- BHARGAVA S.C., SAXENA S.N., SHARMA R., 2003. *In vitro* multiplication of *Phoenix dactylifera* L. J. Plant Biochemistry and Biotechnology vol.12.p. 43-47.
- BOUGUEDOURA N., 1991. Connaissance de la morphogenèse du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : Etude *in situ* et *in vitro* du développement morphogénétique des appareils végétatifs et reproducteurs. Thèse de doctorat. U.S.T.H.B. Alger, 210p.

- BOUNAGA N., DJERBI M., 1990. Pathologie du palmier dattier. Options méditerranéennes Les systèmes agricoles oasiens. Série A (11). pp.127-132.
- CHABANE D., 1995. Etude des aptitudes morphogénétiques des divers explants des rejets de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) chez deux variétés Takerbucht et Deglet Nour pour induire une embryogenèse somatique. Thèse de magister. U.S.T.H.B., Alger, 103p.
- CHABANE D., 1996. Réactions morphogénétiques *in vitro* de divers explants de palmier dattier. U.R.B.F.A., 4<sup>ème</sup> journée scientifique de U.R.B.F.A., 19-20 mars 1996.
- CHABANE D., 2007. Amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par fusion de protoplastes de deux cultivars Deglet Nour sensible et Takerboucht résistant au Bayoud. Thèse de doctorat. U.S.T.H.B. Alger, 96p.
- CHABANE D., ASSANI A, BOUGUEDOURA N., HAICOUR R., DUCREUX G., 2007. Induction of callus formation from difficile date palm protoplasts by means of nurse culture. C.R. Biologies N°330, pp. 392-401.
- CHAIBI N., BEN ABDALLAH A., HARZELLAH H., LE POIVRE P., 2002. Potentialités androgénétique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et culture *in vitro* d'anthères. Biotechnol. Agro.Soc. Enviro. n° 6(4), pp. 201-207.
- DAAYF F., EL BELLAJ M., EL HASSNI M., J'AITI F., EL HADRAMI I., 2003. Elicitation of soluble phenolocs in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) callus by *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* culture medium. Environmental and Experimental Botany n° 49, pp.41-47.
- DIHAZI A., JAITI F., EL HADRAMI A., EL HASSNI M., EL HADRAMI I., 2004. Effect of salicylic acid on phenolic compounds related to date palm resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Phytopathol. Mediterr. n° 42, pp. 9-16.
- DJERBI M., 1991. Biotechnologie du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : Voies de propagation des clones résistants au Bayoud et de haute qualité dattière. Options méditerranéennes. Séries séminaires n°14, pp. 31-38.
- DJERBI M., 1991. La multiplication rapide du palmier dattier par les techniques de culture « *in vitro* » au Maghreb : Résultats et contraintes. Bulletin du Réseau Maghrébin de recherche sur la phœniciculture et la protection du palmier dattier. Janv.-Mar.1991. vol.1 n°2, pp. 7-12.
- DRIRA N., MASMOUDI R., MEZIOU B., 1996. Aptitudes organogènes des organes végétatifs et floraux du palmier dattier. In : rapport de synthèse de l'atelier « culture *in vitro* du palmier dattier ». In rapport de synthèse de l'atelier « culture *in vitro* du palmier dattier ». CIHEAM – options méditerranéennes n° 28, pp. 173.
- EKE C.R., AKOMEAH P., ASEMOTA O., 2005. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from Zebia and Loko landraces. African Journal of biotechnology vol.4 (3), pp. 244-246.
- EL BELLAJ M., EL HADRAMI I., EL JAAFARI S., 2000. L'AIA oxydase : régulateur et marqueur potentiel de l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier. Cahiers d'études et de recherches francophones / Agricultures vol. 23, pp. 193-195.
- EL HADRAMI I., CHEIKH R., BAAZIZ M., 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from shoot-tip explants in *Phoenix dactylifera* L. Biologia Plantarum n° 37, pp. 205-211.

- EL HADRAMI I., 1996. Rapport de synthèse de l'atelier «culture *in vitro* du palmier dattier ». CIHEM – Options méditerranéennes n° 28, pp. 167-177.
- EL HADRAMI I., BAAZIZ M., CHEIKH R., COUMANS M., MACHAUX J.J., 1996. L'embryogenèse somatique chez *Phoenix dactylifera* L. : importance des composés phénoliques dans le brunissement et l'acquisition des potentialités embryogènes. In rapport de synthèse de l'atelier «culture *in vitro* du palmier dattier ». CIHEM-Options méditerranéennes n° 28, pp. 173.
- EL HADRAMI A., EL IDRISSE-TOURANE A., EL HASANI M., DAAYF F., EL HADRAMI I., 2005. Toxin-based *in vitro* selection and its potential application to date palm for resistance to the bayoud *Fusarium* wilt. Comptes rendus biologie 328. pp. 732-744.
- EL KHAYRI J.M., 2003. *In vitro* germination of somatic embryos in date palm effet of auxin concentration and strength MS salt. Current Science, vol.48 (5), pp. 680-683.
- EL KUWARI S.D.A., AL SAAD H.S., AL FATIH M.M., 1998. Effect of nitrate concentration on recovery of date palm vitrified embryos. In proceedings of the First International Conference on Date Palms. Al-Ain, UAE, 8-10 March 1998.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 1997. *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. In: Quarantine Pest for Europe, 2<sup>nd</sup> ed., CABI international, Wallingford, pp.758-763.
- FAO (Food and Agriculture Organisation), 2007.FAOSTAT database query. In: [www.fao.org](http://www.fao.org) .
- FERNANDEZ D., LOURD M., OUITEN M., TANTAOUI A., GEIGER J.P., 1995. Le Bayoud du palmier dattier : une maladie qui menace la phoeniciculture. Phytoma. La Défense des végétaux. n° 249, pp.36-39.
- FERRY M., BOUGUEDOURA N., EL HADRAMI I., 1998. Patrimoine génétique et techniques de propagation « *in vitro* » pour le développement de la culture du palmier dattier. Cahiers sécheresse. Volume 9, pp. 139-146.
- FKI L., 1998. Embryogenèse somatique et régénération de plants de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à partir de cultures en suspension. Diplôme d'études approfondies. E.N.I.S, Sfax. 74p.
- FKI L., MASMOUDI R., MAHJOUR A., MZID R., SEDRA M.Y., DRIRA N., 2006. Biotechnology for date palm propagation, improvement and preservation. In recueil des résumés de la Conférence régionale: mutagenèse induite et biotechnologies d'appui pour la protection du palmier dattier contre le Bayoud. Alger, Algérie, 17-18 Juin 2006.
- FKI, L., MASMOUDI R., DRIRA N., RIVAL A., 2003. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L, c.v. Deglet Nour . Plant cell Rep., 21. pp.517-524.
- HANNACHI S., KHITRI D., BENKHALIFA A., BRAC DE LA PERRIERE R.A., 1998. - Inventaire variétal de la palmeraie algérienne. Alger : Agence nationale d'édition et de publicité (A.N.E.P), 1998.
- HVOSLEF-EIDE A.K., PREIL W., 2005. Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Published by Springer. 578p.

- IBRAHIM A.M.F., HEGGAG M.N., SABROUT M.B.E., EL ASSAR A.M., 2001. Effect of explants and incubation conditions on growth of the in vitro cultured tissues of two date palm cultivars. In proceedings of the Second International Conference on Date Palms. Al-Ain, UAE, March 25-27 2001.
- JAITI F., DIHAZI A., EL HADRAMI A., EL HASSNI M., EL HADRAMI I., 2004. Effect of exogenous application of jasmonic acid on date palm defence reaction against *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Phytopathol. Mediterr.* n° 43, pp. 325-331.
- KHELAFI H., ABED F.; YETTA D., DJELLAL L., YAKHOU M.S., SEDRA M.Y., 2006. Evaluation de mutants de la variété Deglet Nour de palmier dattier pour la résistance au Bayoud. In recueil des résumés de la Conférence régionale: mutagenèse induite et biotechnologies d'appui pour la protection du palmier dattier contre le Bayoud. Alger, Algérie, 17-18 Juin 2006.
- KUNERT K.J., BAAZIZ M., CULLIS C.A., 2003. - Techniques for determination of true-to-type date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Emirates journal of agricultural science* n° 15(1), pp.1-16.
- LABERCHE, J.C., 1999.-Biologie végétale. Ed. DUNOD. 226p.
- LETOUZE R., DAGUIN, F., SATOUR P., HAMAMA L., MARIONNET F., 1998. Somatic embryogenesis and mass propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) : Characterization and genetic stability of regenerated plantlets by RAPD markers. In proceedings of the First International Conference on Date Palms. Al-Ain, UAE, 8-10 March 1998.
- MADR (Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural-Algérie), 2004. Données macro-économiques : filière phoeniciculture.
- MARGARA J., 1989. La multiplication végétative, le méristème et l'organogenèse. Ed. INRA. Paris, 230 p.
- MATER A.A., 1986. *In vitro* propagation of *Phoenix dactylifera* L. - *Date palm Journal* n°4, pp. 137-152.
- MOHAMED S.M., EL SHARABASY S.F., BOSILA H.A., IBRAHIM I.A., REFAY, K.A., 2001.- Micropropagation studies on Zaghlool ans Sewi cultivars of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). In proceedings of the Second International Conference on Date Palms. Al-Ain, UAE, March 25-27 2001.
- MUJIB A., SAMAJ J., 2005. - Somatic embryogenesis. *Plant Cell Monographs* vol.2. Published by Springer-Verlag.
- MUNIER P., 1973. Le palmier dattier. Coll. Techniques agricoles et productions tropicales. Ed.G.P. Maisonneuve et Larousse, XXIV, France, 221p.
- MUNIER P., 1981.-Origine de la culture du palmier dattier et sa propagation en Afrique. *Fruits*, vol. 36 n° 9, pp. 536-550.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* n°15, pp. 473-502.
- OTHMANI M., BAYOUDH Ch., HEDFI J., DRIRA N., TRIFI M., MERRAKCHI M., 2006. In recueil des résumés de la Conférence régionale: mutagenèse induite et biotechnologies d'appui pour la protection du palmier dattier contre le Bayoud. Alger, Algérie, 17-18 Juin 2006.

- SAKA H., 1992. La multiplication végétative « *in vitro* » du palmier dattier. Recueil des communications du Symposium de la datte. Biskra, Algérie, 24-25 Nov.1992.
- SAKA H., 1996. La régénération *in vitro* des différents cultivars du palmier dattier par embryogenèse somatique à partir d'organes de rejets. U.R.B.F.A, 4<sup>ème</sup> journée scientifique de l'U.R.B.F.A, 18-20 Mars 1996, pp. 22.
- SANE D., ABERLENC-BERTOSI F., GASSAMA-DIA Y.K., SAGNA A., TROUSLOT M.F. ; DUVAL Y. ; BORGEL A., 2006. Histological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Annals of Botany n°98, pp.301-308.
- SEDRA M.Y., 2005. Caractérisation des clones sélectionnés du palmier dattier pour combattre la maladie du Bayoud. Symposium international : développement agricole durable des systèmes oasiens. Erfoud, 07-10 Mars 2005.
- SGHAIER B., BAHLOUL M., GAROURI BOUZID R., DRIRA N., 2008. Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour: Comparative study. Scientia Horticulturae n°116, pp.169-175.
- SHARMA R.K., CHOWDHURY J.B., 1980. *in vitro* culture of female date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues. Euphytica n°29, pp. 169-174.
- SKOOG F., MILLER CO., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. n° 11, pp. 8-131.
- TIRICHINE A., 1997. Etude des ressources génétiques du palmier dattier. In: web: [http:// agromzab. multimania.com/contrib-aissa.htm](http://agromzab.multimania.com/contrib-aissa.htm).
- TISSERAT B., 1979. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. J. Exp. Bot. n° 30, pp.1275-1283.
- TISSERAT B., 1982. Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures. Euphytica n° 31, pp. 201-214.
- TISSERAT B., 1981. Production of free-living date palms through tissue culture. Date palm J 1(1), pp.43-54.
- TRIKI M.A., ZOUBA A., KHOUALDIA O., BEN MAHMOUD O., 2003. "Maladie des feuilles cassantes " or brittle leaf disease of date palms in Tunisia: biotic or abiotic disease. Journal of Plant Pathology n° 85(2), pp. 71-79.
- VAN WINKLE S.C., 2000. The effect of activated carbon on the organic and elemental composition of plant tissue culture medium. Doctoral thesis, Atlanta, Georgia. 224p.
- VERAMENDI J., NAVARRO L., 1997. Influence of explant sources of adult date palm (*Phoenix dactylifera* L.) on embryogenic callus formation. Journal of Horticultural Science n° 72, pp.665-671.
- YADAV N.R., YADAV R.C., CHOWDHURY V.K., CHOWDHURY J.B., 2001.- Explant and cultivar response to *in vitro* clonal propagation of female date palm (*Phoenix dactylifera* L. In proceedings of the Second International Conference on Date Palms. Al-Ain, March 25-27, 2001.
- ZAID A., TISSERAT B., 1983. *In vitro* shoot tip differentiation in *Phoenix dactylifera* L. Date Palm Journal n° 2, pp.162-182.

- ZAID A., 1984. – *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm culture. Date Palm Journal, vol. 3, pp.269-275.
- ZAID A., 1991. Réflexions sur la conformité génétique des vitroplants : cas du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Bulletin du réseau maghrébin de recherche sur la phœniciculture et la protection du palmier dattier. vol. 1. n° 4, Sep.-Déc.1991, pp. 21-28.
- ZAID A., 2002. Production industrielle de plants de palmier dattier par voie embryogène aux Emirats Arabes Unis. Workshop palmier dattier. Marrakech, Maroc, 12-15 Déc. 2002.
- ZAID A., ARIAS- JIMENEZ E.J., 2002. Date palm cultivation. F.A.O 2002.
- ZOUINE J., EL HADRAMI I., 2004. Somatic embryogenesis in *Phoenix dactylifera* L.: effect of exogenous supply of sucrose on protein, sugars, phenolics and peroxidases activities during the embryogenic cell suspension culture. Biotechnology n° 3 (2), pp.114-118.
- ZOUINE J., EL HADRAMI I., 2007. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Scientia Horticulturae n° 112, pp.221-226.
- ZRYD J.P., 1988. Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Ed.Presses Polytechniques Romandes.

# ANNEXES

## ANNEXE I

### I- Induction de la callogenèse

#### 1- Brunissement des explants et des milieux de culture

##### 1-1- Effet des milieux de culture

Variable à expliquer: Brunissement.

Facteur: Milieux de culture.

Nombre d'observations: 153

Nombre de niveaux: 2

#### - Analyse de la variance:

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	3,15926	1	3,15926	14,15	0,0002
Intra-groupes	33,7166	151	0,223288		
Total (Corr.)	36,8758	152			

#### - Tests des étendues multiples

Méthode: 95,0 % LSD

Milieu	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
M	79	0,455696	b
T	74	0,743243	a

#### 1-2- Effet traitements hormonaux

##### 1-2-1- Effet traitements T

Variable à expliquer: Brunissement.

Facteur: Traitements T.

Nombre d'observations: 74

Nombre de niveaux: 7

#### - Analyse de la variance

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	2,39586	6	0,399311	2,28	0,0460
Intra-groupes	11,7258	67	0,175011		
Total (Corr.)	14,1216	73			

### - Tests des étendues multiples

Méthode: 95,0 % LSD

Traitement	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
T1	11	0,454545	c
T2	10	0,6	cb
T4	12	0,666667	cba
T3	11	0,727273	cba
T5	6	0,833333	cba
T0	12	0,916667	ba
T6	12	1,0	a

### 1-2-2- Effet des traitements M

Variable à expliquer: Brunissement.

Facteur: Traitements M.

Nombre d'observations: 79

Nombre de niveaux: 7

### - Analyse de la variance

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	4,95187	6	0,825312	4,06	0,0015
Intra-groupes	14,6431	72	0,203376		
Total (Corr.)	19,5949	78			

### - Tests des étendues multiples

Méthode: 95,0 % LSD

Traitement	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
M5	12	0,0833333	c
M1	13	0,153846	cb
M2	11	0,454545	cba
M6	12	0,5	ba
M0	8	0,625	a
M3	11	0,727273	a
M4	12	0,75	a

### 2- Callogénèse induite

### 2-1- Effet des milieux de culture

Variable à expliquer: Callogenèse induite.

Facteur: Milieux de culture.

Nombre d'observations: 153

Nombre de niveaux: 2

#### - Analyse de la variance :

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	1,73853	1	1,73853	8,06	0,0052
Intra-groupes	32,5883	151	0,215816		
Total (Corr.)	34,3268	152			

#### - Tests des étendues multiples

Méthode: 95,0 % LSD

Milieu	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
T	74	0,22973	b
M	79	0,443038	a

### 2-2- Effet traitements hormonaux

#### 2-2-1- Effet traitements T

Variable à expliquer: Callogenèse induite.

Facteur: Traitements T.

Nombre d'observations: 74

Nombre de niveaux: 7

#### - Tableau de l'analyse de la variance :

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	3,11884	6	0,519806	3,49	0,0046
Intra-groupes	9,97576	67	0,148892		
Total (Corr.)	13,0946	73			

#### - Tests des étendues multiples

Méthode: 95,0 % LSD

Traitement	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
T6	12	0,0	c
T4	12	0,0833333	c
T0	12	0,0833333	c
T5	6	0,166667	cb
T3	11	0,272727	cba
T1	11	0,454545	ba
T2	10	0,6	a

## 2-2- Effet des traitements M

Variable à expliquer: Callogenèse induite.

Facteur: Traitements M.

Nombre d'observations: 79

Nombre de niveaux: 7

### - Analyse de la variance :

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	2,10702	6	0,351169	1,45	0,2063
Intra-groupes	17,3867	72	0,241481		
Total (Corr.)	19,4937	78			

## ANNEXE II

### II- Entretien et multiplication des cals

#### 1- Evolution de la callogenèse sur milieu solide

##### 1-1- Absence ou arrêt de développement

##### 1-1-1- Effet des milieux de culture

Variable à expliquer: Absence ou arrêt de développement.

Facteur: Milieux de culture.

Nombre d'observations: 20

Nombre de niveaux: 2

### - Analyse de la variance

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	649,8	1	649,8	5,63	0,0290
Intra-groupes	2077,0	18	115,389		
Total (Corr.)	2726,8	19			

**- Tests des étendues multiples**

Méthode: 95,0 % LSD

Milieu	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
T	10	18,9	b
M	10	30,3	a

**1-1-2- Effet des traitements hormonaux**

**1-1-2-1- Effet des traitements T**

Variable à expliquer: Absence ou arrêt de développement.

Facteur: Traitements T.

Nombre d'observations: 70

Nombre de niveaux: 7

**- Analyse de la variance**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	93,1429	6	15,5238	1,73	0,1282
Intra-groupes	564,7	63	8,96349		
Total (Corr.)	657,843	69			

**1-1-2-2- Effet traitements M**

Variable à expliquer: Absence ou arrêt.

Facteur: Traitements M.

Nombre d'observations: 70

Nombre de niveaux: 7

**- Analyse de la variance**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	332,343	6	55,3905	12,50	0,0000
Intra-groupes	279,1	63	4,43016		
Total (Corr.)	611,443	69			

**- Tests des étendues multiples**

Méthode: 95,0 % LSD

Traitement	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
M0	10	1,3	e
M1	10	2,4	ed
M6	10	3,2	d
M2	10	3,9	dc
M4	10	5,2	cb
M3	10	6,1	b
M5	10	8,2	a

## 1-2- Callogenèse primaire

### 1-2-1- Effet des milieux de culture

Variable à expliquer: Callogenèse primaire.

Facteur: Milieux de culture.

Nombre d'observations: 20

Nombre de niveaux: 2

- Analyse de la variance

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	1674,45	1	1674,45	23,80	0,0001
Intra-groupes	1266,5	18	70,3611		
Total (Corr.)	2940,95	19			

### - Tests des étendues multiples

Méthode: 95,0 % LSD

MILIEUX	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
T	10	9,9	b
M	10	28,2	a

## 1-2-2- Effet des traitements hormonaux

### 1-2-2-1- Effet des traitements T

Variable à expliquer: Callogenèse primaire.

Facteur: Traitements T.

Nombre d'observations: 70

Nombre de niveaux: 7

- Analyse de la variance

**Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmiers dattiers (variété Degla Beida) en vue de la résistance contre le Bayoud**

---

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	231,486	6	38,581	15,43	0,0000
Intra-groupes	157,5	63	2,5		
Total (Corr.)	388,986	69			

**- Tests des étendues multiples**

Méthode: 95,0 % LSD

TRAITEMENT T	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
T6	10	0,0	c
T0	10	0,1	c
T4	10	0,2	c
T3	10	0,6	c
T5	10	0,9	c
T2	10	2,8	b
T1	10	5,3	a

**1-2-2-2-Effet des traitements M**

Variable à expliquer: Callogenèse primaire.

Facteur: Traitements M.

Nombre d'observations: 70

Nombre de niveaux: 7

**- Analyse de la variance**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	425,543	6	70,9238	4,12	0,0015
Intra-groupes	1084,4	63	17,2127		
Total (Corr.)	1509,94	69			

**- Tests des étendues multiples**

Méthode: 95,0 % LSD

Traitement	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
M0	10	0,3	d
M2	10	1,0	dc
M6	10	3,3	dcb
M3	10	4,4	cba
M5	10	5,3	ba
M1	10	6,7	ba
M4	10	7,2	a

### 1-3- Callogenèse nodulaire

#### 1-3-1- Effet des milieux de culture

Variable à expliquer: Callogenèse nodulaire.

Facteur: Milieux de culture.

Nombre d'observations: 20

Nombre de niveaux: 2

#### - Analyse de la variance

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	18666,0	1	18666,0	11,14	0,0037
Intra-groupes	30154,5	18	1675,25		
Total (Corr.)	48820,5	19			

#### - Tests des étendues multiples

Méthode: 95,0 % LSD

Milieu	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
T	10	14,1	b
M	10	75,2	a

### 1-3-2-Effet des traitements hormonaux

#### 1-3-2-1- Effet des traitements T

Variable à expliquer: Callogenèse nodulaire.

Facteur: Traitements T.

Nombre d'observations: 70

Nombre de niveaux: 7

#### - Analyse de la variance

**Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmiers dattiers (variété Degla Beida) en vue de la résistance contre le Bayoud**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	418,886	6	69,8143	10,52	0,0000
Intra-groupes	418,1	63	6,63651		
Total (Corr.)	836,986	69			

**- Tests des étendues multiples**

Méthode: 95,0 % LSD

Traitement	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
T0	10	0,0	c
T6	10	0,0	c
T3	10	0,0	c
T4	10	0,0	c
T2	10	3,1	b
T5	10	5,2	ba
T1	10	5,8	a

**1-3-2-2-Effet des traitements M**

Variable à expliquer: Callogenèse nodulaire.

Facteur: Traitements M.

Nombre d'observations: 70

Nombre de niveaux: 7

**- Tableau de l'analyse de la variance**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	4482,97	6	747,162	6,11	0,0000
Intra-groupes	7702,4	63	122,26		
Total (Corr.)	12185,4	69			

**- Tests des étendues multiples**

Méthode: 95,0 % LSD

Traitement	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
M0	10	0,0	d
M2	10	6,2	dc
M1	10	6,2	dc
M6	10	6,4	dc
M5	10	11,8	cb
M4	10	20,8	ba
M3	10	23,8	a

**2- Evolution de la callogenèse en milieux liquides agités**

**2-1- Amplification de la masse de cals nodulaires****2-1-1- Effet des traitements hormonaux****2-1-1-1- Effet des traitements T**

Variable à expliquer: Facteur d'amplification.

Facteur: Traitement T.

Nombre d'observations: 12

Nombre de niveaux: 3

**- Analyse de la variance**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	6,67188	2	3,33594	2,40	0,1458
Intra-groupes	12,4926	9	1,38806		
Total (Corr.)	19,1644	11			

**2-1-1-2- Effet des traitements M**

Variable à expliquer: Facteur d'amplification.

Facteur: Traitement M.

Nombre d'observations: 20

Nombre de niveaux: 5

**- Analyse de la variance**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	88,2876	4	22,0719	3,05	0,0505
Intra-groupes	108,691	15	7,24609		
Total (Corr.)	196,979	19			