

**Institut national d'agronomie El Harrach (Alger) INA**  
Thèse présentée à l'INA pour l'obtention du grade de MAGISTER  
Biotechnologies appliquées à la protection des plantes

***Régénération par embryogenèse  
somatique de vitroplants de palmier dattier  
(cultivars Deglet Nour et Akerbouch) en  
vue de la résistance contre le Bayoud.***

**Par Zakia DJILLALI**

Mme KHELIFI M. Maître de conférence INA Directeur de thèse  
Année 2008

Membres du jury : Mr KHELIFI L. Maître de conférence INA Président Mme YAKOUB S. Maître  
de conférence Université de Tizi ousou Examineur Mr BELARBI B. Maître de conférence INA  
Examineur Mr MORSLI A. Chargé de cours INA Examineur



# Table des matières

Remerciements . .	5
Dédicace . .	6
Résumé . .	7
Abstract . .	8
ص غلم . .	9
LISTE DES ABREVIATIONS . .	10
introduction . .	11
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE . .	13
I - Caractéristiques du palmier dattier . .	13
II - Répartition géographique . .	13
III - Stature de la culture du palmier dattier . .	15
1 - Intérêt de la culture du dattier . .	15
2 - Production mondiale et nationale . .	16
3 - Situation de la culture du dattier en Algérie et contraintes de développement : . .	17
IV - Multiplication traditionnelle du dattier : . .	18
V - Applications des biotechnologies sur le palmier dattier : . .	19
1 - Organogenèse de bourgeons à partir de rejets : . .	20
2 - Réversion végétative d'ébauches florales : . .	20
3 - Embryogenèse somatique et suspensions cellulaires : . .	21
4 - Culture de protoplastes : . .	22
MATERIEL ET METHODES . .	24
I - Objectifs du travail . .	24
II - Matériel Végétal . .	24
III - Techniques expérimentales . .	24
1. Initiation des cals . .	24
2. Prolifération des cals . .	26
3. Induction de l'embryogenèse somatique et suspensions cellulaires . .	27
4. Régénération des embryons somatiques . .	29
IV - Observations et mesures . .	30
V - Analyse statistique . .	30
VI - Protocole expérimental . .	31
RESULTATS ET INTERPRETATIONS . .	33
I - Initiation et croissance des cals . .	33
1 - Méthode de désinfection . .	33
2 - Initiation et prolifération des cals chez les deux cultivars Deglet Nour et Akerbouch . .	33
3 - Évolutions organogènes des cals chez les deux cultivars : . .	44
II - Induction de l'embryogenèse somatique en milieux liquides . .	47
1 - Les cultures conduites en système continu ouvert . .	47
2 - Les cultures conduites en système continu fermé . .	50

3 - Les cultures conduites en système « batch » . . .	55
III - Régénération des embryons somatiques . . .	59
1 - Régénération après passage par le milieu liquide. . .	59
2 - Régénération sans passage par le milieu liquide : . . .	64
DISCUSSIONS . . .	66
I - Initiation et prolifération des cals chez les deux cultivars DN et AK . . .	66
1 - Induction de la callogenèse . . .	66
2 - Développement des cals en milieux d'initiation . . .	69
3 - Amplification des cals en milieux liquides . . .	69
II - Induction de l'embryogenèse somatique dans les trois systèmes de culture des suspensions cellulaires . . .	70
1 - Stades de développement des embryons somatiques . . .	70
2 - Comparaison entre les trois systèmes de conduite des suspensions . . .	71
III - Effet de la dessiccation et de la composition minérale des milieux de culture sur la régénération des embryons somatiques . . .	73
IV - L'embryogenèse sans passage par le milieu liquide . . .	74
CONCLUSION . . .	75
Références bibliographiques . . .	78
ANNEXES . . .	90

## Remerciements

Ce travail a été effectué au laboratoire des ressources génétiques et biotechnologies (LRGB) de l'INA, dirigé par Mr KHELIFI qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Selon un Hadith, on ne remercie pas Dieu si on ne sait pas remercier les personnes.

Je tiens à remercier Mr KHELIFI pour la confiance qu'il m'a accordé, et pour le suivi de mes essais tout au long de l'expérimentation.

Je remercie Mme KHELIFI, ma directrice de thèse qui m'a encadré depuis l'ingénierat, de m'avoir donné la liberté nécessaire pour l'accomplissement de mes travaux tout en gardant un œil critique et avisé. Aussi pour son soutien pendant la rédaction de cette thèse.

J'adresse mes remerciements à Mme YAKOUB, Mr BELARBI et Mr MORSLI d'avoir accepté de faire partie de ce jury, et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Mes remerciements vont à Mr BENKHALIFA de nous avoir octroyé les rejets.

Merci à ma mère, à ma famille, à mes amis qui se reconnaîtront, de m'avoir aidé, encouragé et soutenu surtout dans les moments difficiles.

Une grande pensée aux étudiants qui sont passé par le laboratoire durant ces trois années, et qui ont contribué à son ambiance de travail agréable.

Sans oublier DJAMILA, l'ingénieur de labo, pour sa gentillesse, sa bonne humeur et la patience dont elle a fait preuve. Je lui exprime ma profonde sympathie et je lui souhaite beaucoup de bien.

## Dédicace

*Je dédie cette thèse À ma mère avec tout mon amour. À la mémoire de mon père que Dieu l'accueil dans Son vaste paradis. À mon frère, son épouse et à la petite Sarah. À mes sœurs, leurs époux et aux petits Zakariah et Youcef. À mon frère et à tous les membres de la famille soucieux de mon état d'avancement.. À Soumeya, Lynda, Majda, Abderrahmane, Safia, Chafia, Kacem, Naima, Lylia et Radia, en témoignage de ma profonde amitié. À tous mes amis.*

---

## Résumé

Les différentes phases de l'embryogenèse somatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) chez deux cultivars Deglet Nour (DN) et Akerbouch (AK), ont été étudiées à partir d'explants de cœur de rejet. Pour l'induction de la callogenèse, nous avons testé deux milieux de culture : MS simple (Murachig et Skoog, 1962) et MS modifié (MS additionné de 170 mg/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mg/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, et 350 mg/l de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) et six balances hormonales 2,4-D/ BAP : 1/1, 10/1, 20/1, 50/1, 100/1 et 5/5. Pour le cultivar DN, l'initiation des cals était supérieure sur les milieux MS sans additifs, et ce quelque soit la concentration hormonale utilisée. Alors que chez le cultivar AK, les équilibres 1/1 et 5/5 en présence ou en l'absence d'additifs ont permis les meilleurs pourcentages de callogenèse. La texture des cals était essentiellement de nature granuleuse chez AK et de nature mixte chez DN. Le passage des cals en milieu liquide avec 1 mg/l de 2,4-D a conduit au développement d'un grand nombre d'embryons globuleux et bipolaires à partir des cals essentiellement initiés sur les milieux T1 et M1 (1/1) pour AK et sur les milieux M4 (50/1) pour DN.

Aussi nous avons défini deux modes de conduite des suspensions cellulaires pour une induction rapide et efficace des embryons somatiques : le système batch et le système continu ouvert. Enfin nous avons préconisé un milieu de régénération composé de ½ des minéraux MS semi solide et sans hormones de croissance. L'addition de 0.1 mg/l d'ANA et de 0,05 mg/l de BAP a amélioré l'enracinement des pousses feuillées (56%) et a favorisé la mise en place de l'embryogenèse secondaire.

**Mots clés :** Palmier dattier / *Phoenix dactylifera* L./ Callogenèse/ 2,4-D/ Suspension cellulaire/ Embryons somatiques/ micropropagation / Deglet Nour/ Akerbouch/ Embryogenèse.

## Abstract

The different phases of somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) were studied from explants of offshoots of two cultivars Deglet Nour (DN) and Akerbouch (AK). For callus induction, we have tested two culture media: MS simple (Murachig and Skoog, 1962) and MS amended (MS added 170 mg/l of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mg/l of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, et 350 mg/l of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) and six hormonal balances 2,4-D/BAP : 1/1, 10/1, 20/1, 50/1, 100/1 and 5/5. For the cultivar DN, the initiation of callus was superior on the MS medium without additives, whatever hormonal concentration used. While with the AK cultivar, the balance 1/1 and 5/5 in the presence or absence of additives, have allowed the best percentages of Callus initiation. The texture of callus was essentially granular in AK cultivar, and mixed in DN. The transfer of callus to liquid medium with 1 mg/L of 2,4-D has led to the development of a large number of globular and bipolar embryos from callus mainly initiated on T1-M1 (1/1) medium for AK and on the M4 (50/1) for DN.

Also we identified two culture systems of cell suspensions for a quick and efficient induction of somatic embryos: the batch culture and the open continuous culture. Finally we have recommended a regeneration medium composed of half-strength MS salts, hormone-free and with semi-solid consistence. The addition of 0.1 mg/l of ANA and 0.05 mg/l BAP has improved rooting (56%) of embryos that formed only shoots and has promoted the establishment of secondary embryogenesis.

**Key words:** Date palm/ *Phoenix dactylifera* L./ Callus/ 2,4-D/ Cell suspension/ Somatic embryogenesis/ micropropagation/ / Deglet Nour/ Akerbouch.

## ص خلم

تمت دراسة مختلف مراحل تطور الأجنة الجسدية عند نوعين من النخيل (*Phoenix dactylifera*.L): دقلة نور (DN) و أكربوش (AK) ، انطلاقاً من أنسجة لب الجبار ، من أجل مرحلة التكلس. إختبرنا نوعين من الأوساط الغذائية MS بسيط و MS مضاف إليه (170مغ/ل من  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ، 100مغ/ل من  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  و 350مغ/ل من  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) و 6 تركيزات هرمونية BAP/2.4-D (1/1، 1/10، 1/20، 1/50، 1/100، 5/5).

عند النوع DN، نسب التكلس كانت أعلى في الأوساط MS البسيطة و هذا مهما كانت نسبة BAP / 2.4-D المستعملة.

بينما مع النوع AK، كان التكلس متوقفاً في الأوساط المحتوية على نسبة BAP / 2.4-D التي تساوي (1/1) و (5/5). الكالوسات كانت أساساً ذات طبيعة حبيبية عند AK ومختلطة عند DN .

الوسط السائل المكون من 1 مغ/ل 2.4-D، أدى إلى ظهور عدد كبير من الأجنة الجسدية كروية وقطبية الشكل خاصة انطلاقاً من الكالوسات المكونة في الأوساط  $\text{T}_1$  و  $\text{M}_1$  (1/1) عند AK وفي الوسط  $\text{M}_4$  (1/50) عند DN .

كما حددنا نظامين لتسيير الخلايا المعلقة، يؤديان إلى إنتاج سريع وفعال للأجنة الجسدية: النظام "Batch" و النظام المستمر المفتوح .

وأخيراً إختبرنا وسطاً ملائماً من أجل إنتاش الأجنة الجسدية وهو نصف أملاح MS ، ويكون نصف صلب ، وخالي من الهرمونات.

إن إضافة 0.1 مغ/ل من ANA و 0.05 مغ/ل من BAP ، أدى إلى تحسين تجذر البراعم (56%) وساعد على تكون أجنة ثانوية.

## كلمات المفتاح:

النخلة / *Phoenix dactylifera*.L / التكلس / 2.4-D / الخلايا المعلقة / الأجنة الجسدية / دقلة نور / أكربوش.

## LISTE DES ABREVIATIONS

- **2,4-D:** Acide 2,4 Dichlorphenoxyacétique.
- **2ip:** 2 Isopentenyl adénine.
- **AIB:** Acide Indolbutyrique.
- **AK:** Akerbouch.
- **BAP:** 6 Benzylamino purine.
- **DN:** Deglet Nour.
- **FAO:** Food Agriculture Organisation.
- **HPLC:** High Performance Liquide Chromatography.
- **INRA:** Institut National de la Recherche Agronomique.
- **LRZA:** Laboratoire de Recherche sur les Zones Arides.
- **PCR :** Polymerase chain reaction.
- **PEG:** Polyethylen glycol.
- **PNDRA:** Programme National de Développement Rural et Agricole.
- **RAPD :** Random Amplified Polymorphic DNA

---

## introduction

Le palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L. est une espèce fruitière pérenne de grande importance dans plusieurs pays chauds du Maghreb et du Moyen Orient.

En Algérie, on compte environ seize millions de palmiers dattiers représentés par plus de 940 cultivars (TIRICHINE et *al.*, 2005). Différents facteurs perturbent la phœniciculture nationale à savoir, le vieillissement des palmiers, l'orientation vers la culture monovariétale dans les nouvelles plantations, le nombre limité de rejets par cultivar, et la maladie du Bayoud causée par un champignon vasculaire : le *Fusarium oxysporum f. sp. Albidinis*.

Le Bayoud a déjà infesté les palmeraies de l'Ouest et du centre de l'Algérie, en détruisant 3 millions de palmiers (TIRICHINE, 1997). Le bilan des pertes occasionnées par ce fléau est lourd ; non seulement il y a perte des meilleurs cultivars mais aussi l'accentuation du phénomène de désertification.

La seule stratégie de lutte actuellement disponible, repose sur l'existence de cultivars résistants. En Algérie, un seul cultivar Takerboucht, est résistant (BAAZIZ et *al.*, 1993) ; malheureusement son potentiel est jugé trop faible et son adaptation trop limitée pour repeupler les zones dévastées.

La mise en valeur du verger phœnicicole, son extension et sa reconstitution nécessitent la mise en œuvre de méthodes nouvelles, efficaces et rapides de multiplication végétative de cultivars intéressants tant du point de vu qualité dattière qu'en ce qui concerne la résistance au Bayoud.

La multiplication *in vitro* en association avec un programme de sélection, constituent la seule solution possible. À l'échelle internationale, l'organogenèse et l'embryogenèse somatique sont les principales techniques utilisées pour la micropropagation du palmier dattier (ANJARNE et *al.*, 2005). Des plants entiers sont déjà obtenus à partir de différents explants : cœur du rejet, méristème apicale, bourgeons axillaires, inflorescences, embryons zygotiques immatures, tissus différenciés de vitroplants (ZAID et *al.*, 2002).

En Algérie plusieurs travaux de recherche ont été entrepris depuis 1979 par une équipe du laboratoire de recherche sur les zones Arides de LRZA (Laboratoire de Recherche sur les Zones Arides) et qui portaient sur l'embryogenèse somatique, l'organogenèse, l'androgenèse, la gynogenèse et récemment sur les protoplastes (BOUGUEDOURA, 1979, 1991; CHABANE, 1995, 2007; MEGUELLATI, 2005; CHABANE et BOUGUEDOURA, 2006 ; CHABANE et *al.*, 2007). Ces dernières années, une deuxième structure de recherche l'INRA Algérie (Laboratoire de Physiologie Végétale et d'Amélioration), s'est essentiellement investie dans la régénération du Palmier dattier par voie de l'embryogenèse somatique (SAKA et ABED, 1989). Des milieux de culture avec diverses substances de croissance ont été définis pour assurer une callogenèse maximale chez plusieurs cultivars (SAKA et *al.*, 1997). L'optimisation de la régénération a été testée sur milieu solide et liquide à partir des travaux de SAKA (2001). Des plants ont été régénérés et plantés en champs. Ainsi, 59 vitroplants de différents cultivars (Tazerait, Taquerbucht, Teggaza, Tinacer) et 28 vitroplants du cultivar Deglet Nour ont été transplantés en 1999 dans leur lieu d'origine : Adrar et Touggourt (ABED et *al.*, 2004).

Ces résultats bien que prometteurs restent insuffisants, le succès des biotechnologies reste lié à la maîtrise complète des méthodes de régénération du dattier et à la définition de protocoles fiables, simples et de reproductibilité élevée.

La problématique de ce sujet, porte sur la régénération du palmier dattier par la voie de l'embryogenèse somatique. Cette voie de multiplication conduira à la production en masse de plants de dattiers de différents cultivars, afin de pallier à l'insuffisance de rejets sur le marché. Par ailleurs, elle ouvrira sans doute des voies d'amélioration génétique permettant en particulier l'application de la fusion de protoplastes, afin d'obtenir des hybrides somatiques surtout résistants au Bayoud.

Effectivement le présent travail, vise la recherche d'un protocole expérimental qui concerne la régénération et la germination d'embryons somatiques formés à partir de cals embryogènes, ceux-ci seront initiés à partir d'explants de cœur de rejets de deux cultivars Deglet nour et Akerbouch. Dans cette recherche, on utilisera la culture en milieux liquides par la mise en place de suspensions cellulaires embryogènes.

---

# SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

## I - Caractéristiques du palmier dattier

Le palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. est une plante pérenne, monocotylédone de la famille des arecacées, avec un nombre chromosomique  $2n = 36$  (MUNIER, 1973).

C'est un arbre productif très bien adapté aux zones arides et semis arides, qui se caractérisent par une faible pluviométrie et de fortes températures. Le dattier peut tolérer la sécheresse et des températures allant de -5 jusqu'à 50 °C (EI HADRAMI, 2006).

Le palmier dattier est caractérisé par un système caulinaire constitué d'un stipe monopodique surmonté de palmes (figure 1).

Au sommet du stipe se situe un seul bourgeon terminal qui assure la croissance apicale. A l'aisselle des palmes se situent des bourgeons axillaires qui, peuvent évoluer en inflorescences à la région coronaire ou en rejets à la région basale (BOUGUEDOURA, 1991).

Le système racinaire est fasciculé et constitué de nombreuses racines grêles et longues qui explorent une grande surface verticale et horizontale du sol pour l'alimentation de la plante.

Le palmier dattier est une plante dioïque, présentant un pied male et un pied femelle. Sur ce dernier sont récoltés les fruits sous forme de régimes de dattes formés à la suite d'une pollinisation croisée (allogame) assistée par l'homme dans le cas de plantations commerciales de dattiers.

## II - Répartition géographique

Dans le monde, le dattier, se trouve représenté par environ 100 millions de plants. Sa culture fut introduite dans différentes régions telles que les États-unis d'Amérique, le Mexique, l'Argentine, l'Australie et l'Espagne (MEGUELLATI, 2005).

Les palmeraies les plus importantes sont localisées en Afrique du Nord et au Moyen-Orient et constituent une source de vie pour plus de dix millions d'habitants (EL HADRAMI et *al.*, 1997).

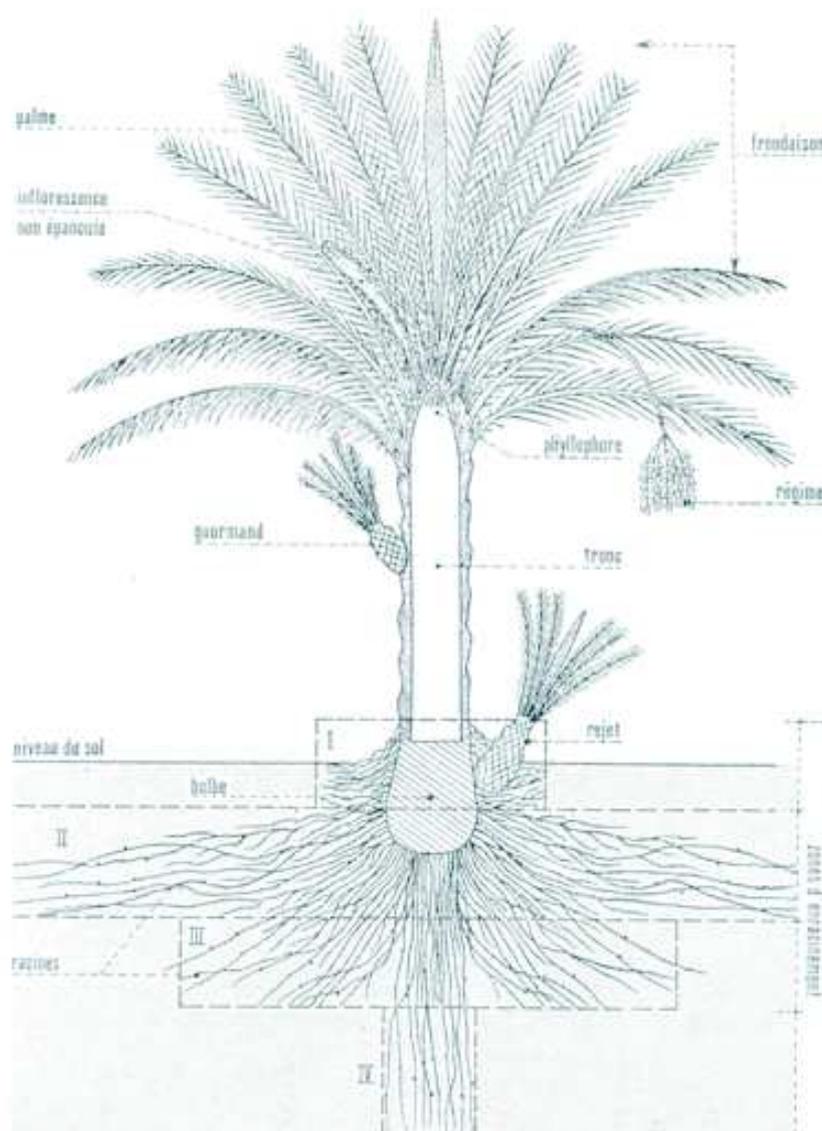


Figure 1 : Figuration schématique du dattier (MUNIER, 1973)

I : Racines respiratoires.

II : Racines nutritionnelles.

III et IV: Racines d'absorption plus ou moins profondes.

L'aire phœnicicole algérienne couvre deux millions de kilomètres carrés (LE BERRE et RAMOUSSE, 2003). Plus de 940 cultivars de dattiers sont inventoriés (TIRICHINE et *al.*, 2005) pour 16,5 millions de palmiers dattier (Ministère de l'Agriculture, 2006).

Le patrimoine phœnicicole local, est composé d'une part importante de cultivars femelles, à un degré moindre de francs, individus issus de multiplication sexuée et de cultivars mâles appelés dokkars (TIRICHINE, 1997)

La composante variétale de l'ensemble des oasis se caractérise par :

- Une prédominance totale de la Deglet Nour dans la zone Est (figure 2) englobant les Zibans, Oued Righ, Oued Souf, et à un degré moindre dans le M'Zab. Il faut noter en

outre la présence dans ces palmeraies des cultivars Ghars, Mech Degla, Degla beïda et Akerbouch (HANNACHI et *al.*, 1998).

- Une dominance exclusive des variétés dites communes à faible valeur marchande dans la zone Ouest et la zone sub-saharienne (figure 2). Les principales sont : Takerboucht, Cherka, Feggous, Hartane, et Timliha (HANNACHI et *al.*, 1998).

### **III - Stature de la culture du palmier dattier**

#### **1 - Intérêt de la culture du dattier**

---

Le palmier dattier joue plusieurs rôles dans l'économie et dans la vie des habitants du Sahara (TIRICHINE, 1997) :

- Rôle primordial sur le plan économique, grâce à la production de la datte, fruit et sous produits (pâte, farine, sirop, vinaigre, levure,...), qui sont la base de l'alimentation humaine et animale de ces régions ;
- Rôle écologique en freinant l'avancée des déserts, tout en créant sous son couvert un microclimat favorable au développement de nombreuses cultures sous-jacentes (arbres fruitiers, céréales, légumes) ;
- Rôle social en assurant une stabilité des populations qui vivent dans les oasis.

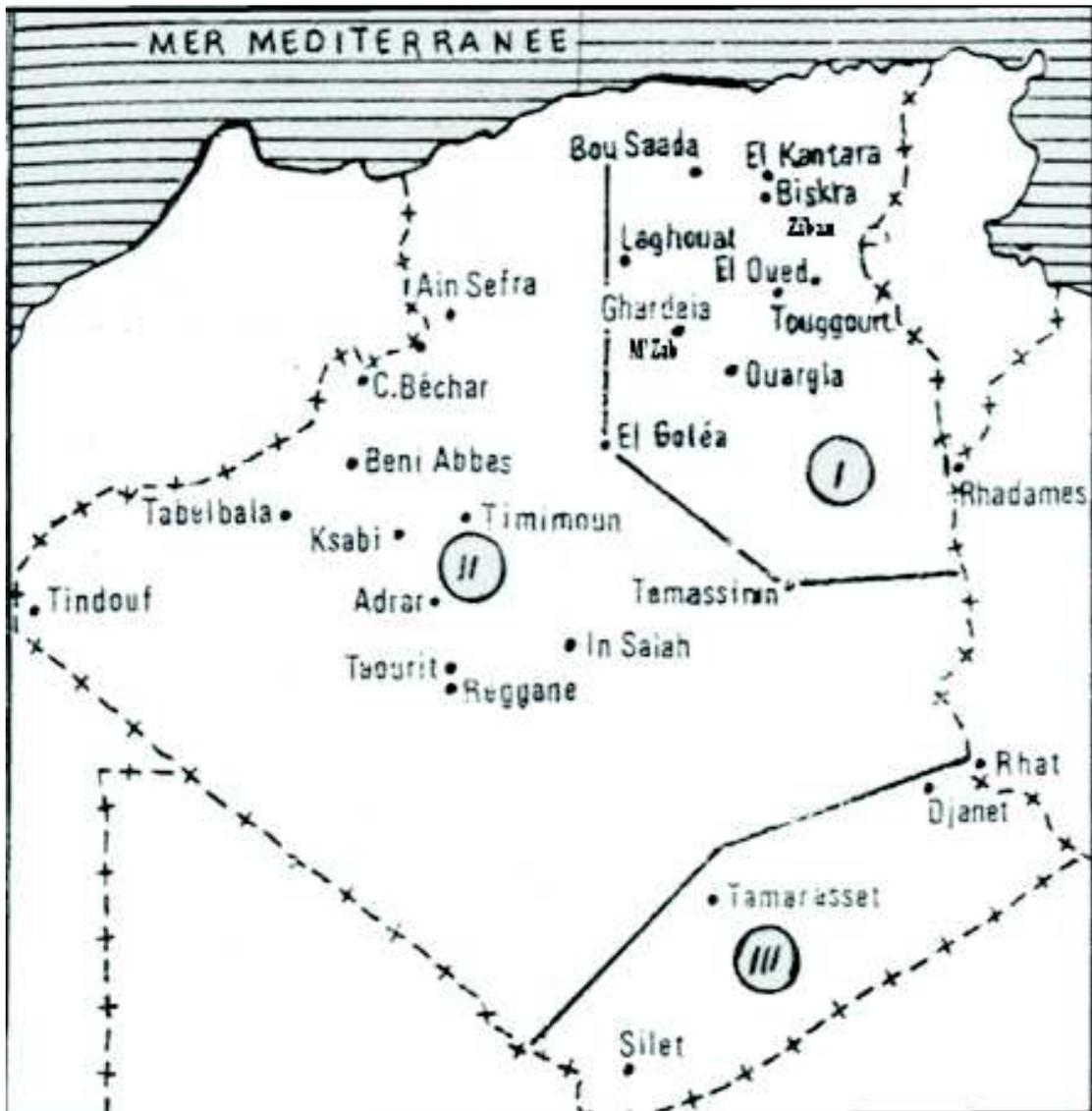


Figure 2 : Régions phéniciques d'Algérie (MUNIER, 1981).

I : Palmeraie orientale ou zone Est.

II : Palmeraie occidentale ou zone Ouest.

III : Palmeraie méridionale ou zone subsaharienne

## 2 - Production mondiale et nationale

### 2.1. Production mondiale:

La production mondiale de dattes en 2004 était estimée à 5.353.090 tonnes provenant de 34 pays (FAO stat., 2004). Les pays producteurs les plus importants sont mentionnés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Principaux pays producteurs de dattes (FAO stat., 2005)

Classement	Pays	Production en 2005 (Tonnes)
1	Égypte	1.170.000
2	l'Arabie Saoudite	900.000
3	Iran	880.000
4	Émirats Arabes Unies	760.000
5	Pakistan	625.000
6	Algérie	470.000

Bien qu'une partie de la production mondiale de la datté soit autoconsommée, il existe un grand marché d'exportation estimé à 512.829 tonnes (FAO stat., 2004). La France et l'Inde, sont les plus grands importateurs de dattes (FAO stat., 2004).

## 2.2. Production nationale :

La production annuelle de dattes en Algérie est de 516.293 tonnes dont 230.000 tonnes sont exportées, il s'agit de la variété Deglet Nour, elle représente à elle seule 2,43 millions de pieds, soit 47% de l'effectif total (Ministère de l'Agriculture, 2006).

Les principales régions productrices de dattes sont (Figure 3) :

- Biskra, El Oued, et Ouargla essentiellement pour la production de dattes fines (Deglet Nour) et de dattes molles (Ghars et analogues);
- Adrar, Bechar et Ghardaïa pour la production de dattes sèches (Degla Beida et analogues).

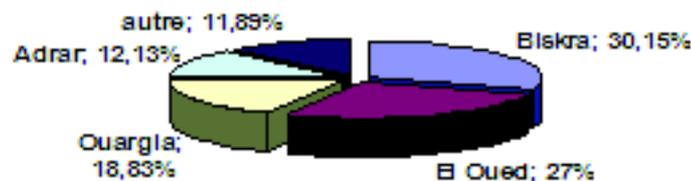


Figure 3 : Les principales régions productrices de dattes en Algérie (Ministère de l'Agriculture, 2006)

## 3 - Situation de la culture du dattier en Algérie et contraintes de développement :

Un effort important de plantation a été fait récemment en dehors des oasis traditionnelles. Dans le cadre du PNRDA, la superficie plantée est passée de 100.000 ha en 1999 avant le lancement du programme à 148.000 ha en 2005 (Ministère de l'Agriculture, 2006).

Cependant, il reste certaines contraintes qui entravent le développement et l'extension de la culture du dattier en Algérie tels que :

- L'essentiel de la palmeraie se concentre dans le Sud-Est.
- Le tiers de la palmeraie est constitué d'arbres trop âgés.

- Les plantations nouvelles se font quasi exclusivement en variété 'Deglet Nour'.
- L'ensablement particulièrement important dans les régions d'In Salah et de l'Oued Souf.
- Nombre limité de rejets disponibles.
- Des géotypes rares sont menacés de disparition.
- Les contraintes phytosanitaires dont le Bayoud.

Les pathologies du dattier sont nombreuses, les principales en Algérie sont le « Djerb » causé par une cochenille *Parlatoria blanchardii* Targ. et le « Bouguessa » causé par *Apate monachus* qui parasitent les palmes, le « Boufaroua » sur les fruits causé par un acarien *Oligonychus afrasiaticus* Mc., et le vers de la datte *Myelois ceratoniae* Zell (BELGUEDJ et SALHI, 2006).

Cependant le Bayoud reste la plus grave maladie, il est causé par un champignon du sol le *Fusarium oxysporum f. sp. Albidinis*. En Algérie le Bayoud aurait décimé trois millions d'arbres, et touche 34 communes de plantations de dattier dans le Sud Ouest et le M'Zab (BENKHALIFA, 2006). Ainsi, il menace sérieusement les plantations de Deglet nour, très sensible à cette maladie vasculaire dans les zones de l'Oued Rhir, des Zibans et du Souf qui produisent près de 76 % de dattes algériennes (Ministère de l'Agriculture, 2006).

Le seul moyen de lutte est celui par voie génétique, elle se fait par la recherche de cultivars résistants provenant soit des prospections soit de croisements dirigés (figure 4), ou bien des populations naturelles issues de graines : les « khalts », testés dans les zones infestées (SEDRA, 2005).

## **IV - Multiplication traditionnelle du dattier :**

Le dattier est traditionnellement multiplié par graines ou par la plantation de rejets.

Les rejets se développent lentement à la base des palmiers, et sont produits en nombre limité, ainsi un palmier produit durant toute sa vie une douzaine de rejets aptes à une bonne reprise (BOUGUEDOURA, 1991).

Le semis, bien qu'il offre l'intérêt du maintien d'un certain brassage génétique qui peut être à l'origine de géotypes de qualité et/ou adapté à des contextes écologiques particuliers (FERRY et *al.*, 1991), entraîne le développement de plantations désordonnées, hétérogènes et en sur densité. De plus, la proportion de pieds males est souvent élevée du fait de la dioecie de l'espèce (MUNIER, 1973), et l'entrée en production nécessite dix ans après semis (LOUTFI et EL HADRAMI, 2004).

Toutes les conséquences très négatives de cette situation en terme de développement, conduisent à chercher de nouvelles méthodes de multiplication. L'application des biotechnologies au palmier dattier par la culture *in vitro* apparaît comme l'unique issue favorable pour multiplier cette espèce.

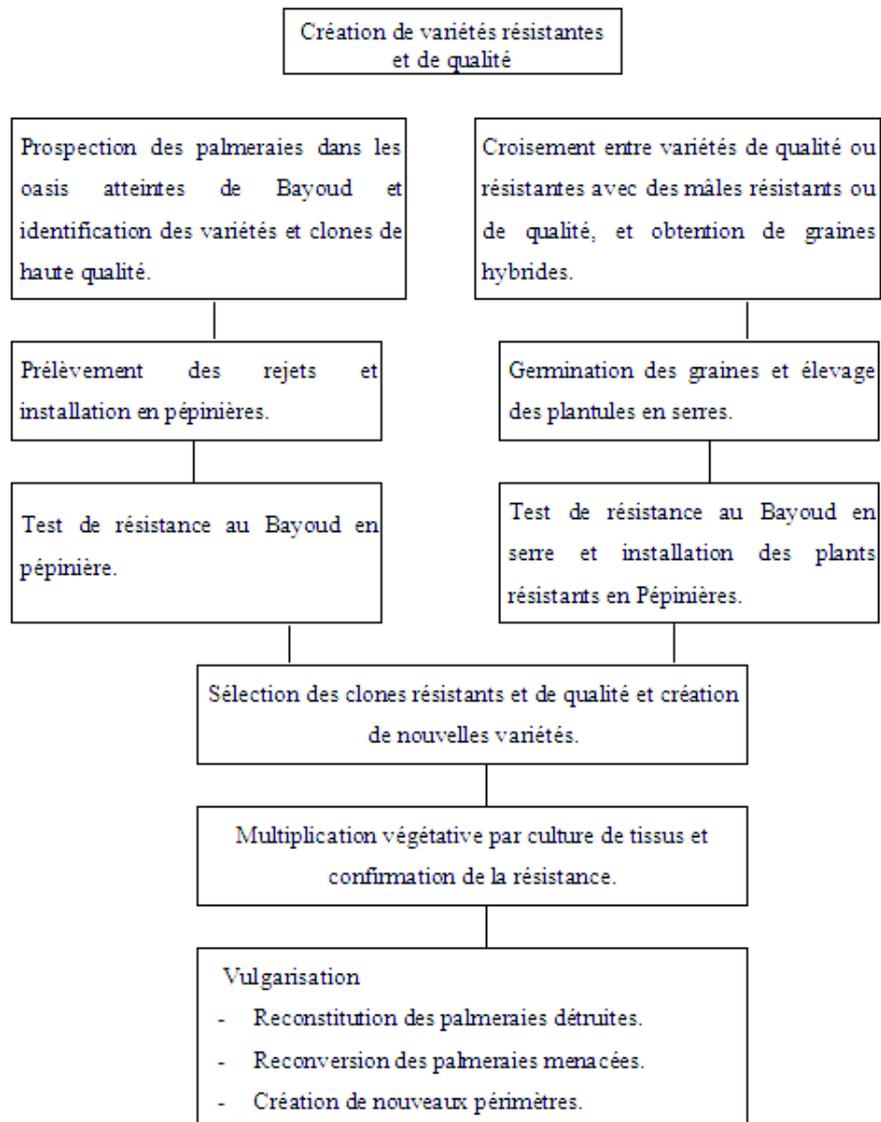


Figure 4 : Programme de lutte contre le Bayoud par l'utilisation de la résistance variétale (DJERBI, 1991).

## V - Applications des biotechnologies sur le palmier dattier :

Pour le palmier dattier, deux voies de morphogénèse existent : l'organogénèse et l'embryogénèse somatique, et elles peuvent être directes ou indirectes.

**La voie directe** : implique que l'explant soit cultivé sur un milieu nutritif qui permet la morphogénèse sans passer au préalable par la formation d'un cal (amas de cellules indifférenciées).

**La voie indirecte** : consiste à cultiver l'explant sur un milieu nutritif qui conduit à la formation de cal. Par la suite, celui-ci est placé sur un milieu permettant le développement

de plants suivant une des deux voies de régénération. L'organogenèse permet d'obtenir des bourgeons et des pousses végétatives, l'embryogenèse somatique, quant à elle, désigne la formation en condition *in vitro* d'embryons à partir d'une ou de plusieurs cellules sans fusion gamétique (EL HADRAMI et *al.*, 1997).

Plusieurs recherches sont actuellement consacrées à des travaux de régénération par ces deux voies, sur des tissus de plusieurs types d'explants de palmier dattier, et nous distinguons quatre principales techniques :

## **1 - Organogenèse de bourgeons à partir de rejets :**

---

Les recherches ont démarré avec la première publication en 1979 de POULAIN et *al.* in FERRY et *al.* (1991), qui annonçait l'obtention des premiers plants acclimatés par bourgeonnement.

RHISS (1980) indique la nature des explants de départ qu'il précise de type ébauches foliaires, bourgeons ou méristèmes.

Selon FERRY et *al.* (1991), l'analyse des résultats publiés par plusieurs chercheurs conduit à la mise en évidence de conceptions différentes concernant le bourgeonnement :

- Celle de DRIRA (1983), pour qui le bourgeonnement est de type adventif et superficiel à la base des feuilles du bourgeon axillaire.
- Celle de BEAUCHESNE (1988) qui interprète le bourgeonnement comme la levée d'une dominance apicale exercée par le bourgeon axillaire, sur des méristèmes préexistants.

En 1991, et selon les coupes cytologiques réalisées par Ferry et son équipe sur des touffes très proliférantes, plusieurs interprétations étaient possibles, en effet le bourgeonnement de certaines souches était à la fois axillaire et adventif.

La régénération de plantules par organogenèse comprend plusieurs étapes, allant de l'initiation de bourgeons à l'obtention de plantules enracinées (BOUGERFAOUI et *al.*, 1996).

## **2 - Réversion végétative d'ébauches florales :**

---

La mise au point d'une technique permettant la multiplication *in vitro* du palmier dattier à partir du matériel floral présente des intérêts pratiques très importants (LOUTFI, 1989) :

- D'une part, c'est un matériel abondant 20.000 à 50.000 fleurs par palmier et par an.
- D'autre part, les inflorescences sont faciles à prélever et ne nécessitent pas le sacrifice du pied d'origine.

Cette voie de propagation bien qu'intéressante, n'a donné lieu qu'à très peu de publications. Celles-ci ont été précédées par quelques travaux sur le développement floral du palmier dattier, en particulier ceux de BOUGUEDOURA (1979) qui a étudié avec précision l'évolution des bourgeons axillaires en inflorescences.

En 1985, DRIRA et BENBADIS ont travaillé sur les inflorescences de palmier dattier, et ils sont parvenus à obtenir des plants par réversion des méristèmes floraux vers un fonctionnement végétatif (RHOUMA et *al.*, 2004).

---

Un des aspects de la réversion correspond à la formation de bourgeons sur des milieux de culture riches en cytokinines, un autre aspect correspond à la formation de cals (LOUTFI, 1989) et donc à une néoformation indirecte.

Ainsi, une plus récente publication, celle de FKI et *al.* (2003), rapporte la régénération de plants par embryogenèse somatique à partir de cals initiés d'explants inflorescenciels et des feuilles primordiales.

Par ailleurs des résultats encourageants ont été obtenus par ABAHMANE (2005) au laboratoire de l'INRA Maroc qui a réussi la multiplication de cinq clones présumés résistants au Bayoud, de bonne qualité dattière et ne pouvant plus rejeter à leur base. Des centaines de vitroplants ont été acclimatés.

En Algérie, la technique de culture *in vitro* des explants floraux chez le palmier dattier a été initié par ARBAN et DJABALI (2004). Ces derniers ont établi un protocole expérimental permettant l'obtention des cals à partir des explants floraux chez deux cultivars, Deglet Nour et Dagla Beidha. Ce travail mérite d'être approfondie pour obtenir des cals embryogènes puis la régénération de vitro plants.

### 3 - Embryogenèse somatique et suspensions cellulaires :

---

#### 3.1. Embryogenèse somatique :

C'est la voie qui a été la plus explorée si on considère le nombre de recherches qui lui ont été consacrées.

Les premiers résultats satisfaisants, ont été obtenus à partir d'apex et de bourgeons axillaires de cœur de rejet par TISSERAT (1979).

Des cals embryogènes ont été obtenus en utilisant différentes auxines : Picloram, ANA, ANOA, mais les résultats ont été optimaux en présence du 2,4-D (LOUTFI et *al.*, 2004) celui-ci utilisé à des doses variables mais souvent élevées : 100 mg/l.

Pour initier la formation d'embryons somatiques, les cals doivent être placées sur un milieu contenant peu ou pas d'auxines, causant alors la conversion irréversible de plusieurs cellules embryogènes.

Les embryons somatiques sont morphologiquement et anatomiquement similaires aux embryons zygotiques; ils se développent à partir d'une seule ou d'un amas de cellules et présentent une bipolarité dès les premières divisions (MARQUIS, 1998).

En 1982, TISSERAT a obtenu des vitroplants par la voie de l'embryogenèse somatique, dont il a réussi l'acclimatation *in vivo*.

Cette méthode a conduit à la formation de vitroplants prêts à l'acclimatation, dans des délais de 20 à 26 mois (TALAL, 2001) avec des taux de multiplication élevés. Mais l'inconvénient majeur de cette méthode est le passage par une phase de callogenèse, source de variation somaclonale noté chez plusieurs espèces végétales.

Néanmoins, LOUTFI et EL HADRAMI (2004) ont rapporté qu'une centaine de dattiers dérivants d'embryons somatiques *in vitro* produits à l'échelle commerciale, ont été plantés *ex situ*, la majorité a fleuri et a donné des fruits conformes aux cultivars.

Par ailleurs, la conformité des vitroplants a été vérifiée par des outils plus puissants tels que par les marqueurs moléculaires RAPD et microsatellites ainsi que par des méthodes de cytométrie en flux par FKI et *al.*(2006). ESHRAGHI et *al.*(2006) ont obtenu, grâce aux

marqueurs RAPD, un coefficient de similarité estimé à 90,2% entre le plant mère et les vitroplants dérivants de cals embryogènes chez le cultivar Sukary.

### **3.2. Suspensions cellulaires :**

Des progrès considérables ont récemment été réalisés dans le domaine de la production de plants par embryogenèse somatique, grâce au développement de systèmes basés sur la culture des cellules en suspension.

L'établissement de suspensions cellulaires est réussi par transfert des cals friables sur un milieu nutritif liquide approprié tout en assurant une agitation orbitale servant à la fois pour l'aération et la dispersion des cellules (EL HAMDOUNI et *al.*, 1999). Il est ensuite nécessaire d'entretenir la suspension par des repiquages réguliers (AUGÉ et *al.*, 1989). À partir d'agrégats cellulaires se développent des embryons somatiques individualisés (MARGARA, 1989) qui présentent un développement relativement synchrone (RIVAL et *al.*, 1997).

Chez le dattier, des protocoles d'établissement de suspensions embryogènes à partir de cals ont été mis au point et décrits par plusieurs auteurs (DAGUIN et LETOUZÉ, 1989 ; VERAMENDI et NAVARRO, 1997 ; SAKA, 2001 ; FKI et *al.*, 2003 ; SANÉ et *al.*, 2006), et ceci dans le but de développer des systèmes de micropropagation à grande échelle qui soient potentiellement automatisables par l'utilisation de bioréacteurs (FKI et *al.*, 2003).

Aussi, les suspensions embryogènes sont à l'origine des transformations génétiques et ont permis de faciliter d'avantage l'utilisation des techniques de mutagenèse induites (FKI et *al.*, 2006). La résistance peut être induite par l'irradiation au Cobalt 60, pour l'obtention de mutants de Deglet Nour résistants au Bayoud et conservant le caractère qualité de la datte (ABED et *al.*, 2006).

Par ailleurs, la suspension cellulaire constitue le matériel idéal pour isoler les protoplastes du fait qu'elle contient une grande quantité de cellules en culture, facilement accessibles à la digestion enzymatique et capables de régénérer des plantes entières (MEGUELLATI, 2005).

## **4 - Culture de protoplastes :**

---

Les protoplastes sont des cellules végétales dénudées de leurs parois cellulaires.

La technologie d'isolement des protoplastes dans l'amélioration du dattier peut constituer le point de départ pour l'obtention d'hybrides somatiques alliant qualité dattière et résistance au bayoud (ABED et *al.*, 2006).

Cependant, le développement d'un protocole efficace de fusion de protoplastes nécessite la réalisation d'un certain nombre d'étapes pouvant chacune constituer une barrière (EL HAMDOUNI et *al.*, 1999) :

- Choix de la source des explants et du tissu.
- Développement d'un système enzymatique efficace pour se débarrasser de la paroi pectocellulosique.
- Développement d'un milieu approprié pour la survie des protoplastes.
- Exécution du protocole de fusion pour la production d'hybrides somatiques.
- Sélection du produit de fusion.
- Développement d'un milieu permettant la régénération de la paroi des cellules sélectionnées et éventuellement de plantes complètes.

Chez le dattier, aucune transformation par fusion de protoplastes n'a été rapportée jusqu'à ce jour. Par contre deux groupes de recherche algériens ont travaillé sur la mise au point de protocoles permettant l'isolement et la culture des protoplastes.

L'équipe de l'INRA d'Alger, qui est arrivée à mettre en place un protocole d'obtention de protoplastes à partir de suspensions cellulaires de cals embryogènes chez deux cultivars : Deglet Nour et Takerboucht (ABED et *al.*, 2006). Cependant, il était primordial dans un premier temps d'identifier des marqueurs permettant une discrimination des deux cultivars au stade cal embryogène. Une caractérisation moléculaire a été réalisée par PCR/RAPD en utilisant 60 amorces décimères arbitraires. Cette technique a permis de sélectionner 12 amorces révélant un polymorphisme. Des fragments polymorphes ont pu être amplifiés. Ces marqueurs RAPD de type présence ou absence, permettront de distinguer les hétérofusions des autofusions lors des fusions somatiques des deux cultivars (SAKA, 1997).

L'équipe de LRZA, pour sa part est arrivé à produire des protoplastes de dattier en quantité significative (CHABANE et BOUGUEDOURA, 2006), ainsi que la formation de cals à partir des protoplastes aussi bien en milieu liquide que sur couche nourrice (CHABANE et *al.*, 2007). Des essais d'hétérofusions de protoplastes des cultivars Deglet Nour sensible et Takerboucht résistant au Bayoud, ont été entrepris par CHABANE (2007). Le repiquage des cals (initiés des hétérofusions) sur le milieu de régénération a permis l'obtention de plantules par voie de l'embryogenèse somatique, avec cependant un taux assez faible de 5%.

RIZKALLA et *al.*(2007), une équipe égyptienne, ont décrit un protocole efficace d'isolement de protoplastes à partir de deux cultivars Zaghloul et Barhee. Ces auteurs ont par ailleurs, induit une tolérance au stress salin par l'application de différentes concentrations de KCl et de NaCl aux protoplastes cultivés en milieu liquide. Ceci a conduit à la formation de microcals, puis de cals sur milieu avec 0,5% d'agarose.

# MATERIEL ET METHODES

## I - Objectifs du travail

Ce travail consiste en l'étude des possibilités d'obtention et de régénération d'embryons somatiques à partir de deux cultivars de palmier dattier : Deglet Nour et Akerbouch. Ainsi cette étude comporte trois parties. La première partie porte sur l'évaluation des pourcentages d'induction et de croissance des cals lors de la phase d'initiation (selon le traitement hormonal utilisé et la composition minérale du milieu de culture), et ce, pour chaque cultivar. La seconde partie permettra de caractériser les meilleures modalités de conduites des suspensions cellulaires pour une induction rapide et efficace de l'embryogenèse. La troisième et dernière partie vise à évaluer les pourcentages de régénération des embryons somatiques, et étudiera l'effet de la concentration minérale du milieu de germination.

## II - Matériel Végétal

Les rejets de deux cultivars de Palmier dattier : Deglat Nour et Akerbouch sont récoltés dans des palmeraies différentes de Ghardaïa et de Biskra. Leur poids a varié entre 4 et 6 kg. Nous avons utilisé les cœurs blanchâtres des rejets dont les tissus sont encore tendres.

## III - Techniques expérimentales

### 1. Initiation des cals

---

#### 1. 1. Stérilisation du matériel végétal

Les mêmes traitements ont été appliqués aux deux cultivars, tout d'abord le rejet est débarrassé des palmes externes jusqu'à l'apparition de la partie blanche et tendre (cœur) du rejet.

L'opération qui s'est effectuée sous une hotte à flux d'air laminaire stérile.

Le cœur prélevé sur le rejet est désinfecté à l'aide d'une solution de chlorure mercurique à 150 mg/l pendant 60 min. Après nettoyage à l'aide d'un scalpel, le cœur du rejet est de nouveau incubé pendant 60 min dans une nouvelle solution de chlorure mercurique à 150 mg/l puis rincés 3 fois à l'eau distillée stérile (planche 1).



*Planche 1 : Rejet et cœur de rejet de palmier dattier*

- A : Rejet de palmier dattier (cultivar Deglet Nour);
- B : Cœur du rejet placé dans la solution de désinfection;
- C : Partie blanche et tendre du cœur du rejet;
- D et E : Apex du rejet.

## **1. 2. Composition des milieux de culture**

Nous avons utilisé 6 balances hormonales et un témoin (tableau 2) dans deux types de milieux de culture (Annexe1) : un milieu de base (= T) constitué par la solution MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962) préconisé depuis 1979 par TISSERAT pour son utilisation dans la multiplication du palmier dattier par la voie de l'embryogenèse somatique, et un milieu modifié (= M) constitué du milieu MS additionné (en mg/l) de 350  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 170  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et 100  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  selon OURDANI (2002). Aussi nous avons fait varier la

## Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmier dattier (cultivars Deglet Nour et Akerbouch) en vue de la résistance contre le Bayoud.

concentration du charbon actif en fonction des concentrations de 2,4-D utilisées et ceci de façon à établir un rapport Charbon actif / 2,4-D égale à 3% (CHEIKH *et al.*, 1989) (tableau 2).

Soit au final 14 milieux différant les uns des autres par :

1. La balance hormonale : 2,4-D/BAP ;
2. Le milieu MS employé : simple (T) ou modifié (M).

**Tableau 2 : Les balances hormonales utilisées et les quantités de charbon actif associées**

	M0 T0	M1 T1	M2 T2	M3 T3	M4 T4	M5 T5	M6 T6
Concentration du 2,4-D en mg/l	0	1	5	10	50	100	5
Concentration de BAP en mg/l	0	1	1	1	1	1	5
Balance 2,4-D/BAP	0	1	5	10	50	100	1
Charbon actif	0	30 mg/l	150mg/l	300mg/l	1.5g/l	3g/l	150mg/l

T : utilisant le milieu de base MS simple, M : utilisant un milieu MS modifié.

A tous les milieux on a ajouté de la glutamine (100 mg/1), de l'adénine (40 mg/1), du saccharose (45 g/1), de l'agar (7 g/1) et des quantités différentes de charbon actif associées à chaque balance hormonale (voir tableau 2). Le pH est ajusté à 5.7, et la stérilisation des milieux est effectuée par autoclavage à 120°C pendant 20 mn.

### 1. 3. Ensemencement et conditions de culture

Sous une hotte à flux d'air laminaire, et à l'aide d'un sécateur stérile, des explants de 0.5 cm sont mis en culture dans des tubes à essai avec au minimum 4 répétitions par milieu. (Annexes 2 et 3).

Après ensemencement, les tubes sont placés à l'obscurité dans une chambre de culture dont la température est de 24 ± 1°C. Des repiquages sur des milieux frais sont effectués tous les 02 mois.

## 2. Prolifération des cals

Dans des conditions d'asepsie, le cal est posé sur du papier absorbant préalablement stérilisé (20 mn dans une étuve à 200°C) puis, rapidement nettoyé à l'aide d'une pince et d'un scalpel des parties nécrosées et de la gélose accrochée. Les gros cals sont alors fragmentés par une légère pression du scalpel en évitant de couper franchement.

### 2. 1. Prolifération sur milieux solides

Les petits fragments de cal ainsi obtenus, sont ensemencés dans plusieurs tubes de composition identique aux milieux d'initiation. L'origine par rapport à l'explant initial est précisément marquée sur les nouveaux tubes. Cette opération permet, d'entretenir les cals et de garder la souche de départ.

Les tubes sont maintenus à l'obscurité dans la chambre de culture.

### 2. 2. Amplification en milieux liquides

Les milieux d'amplification utilisés sont ceux de MS simple/2 où les concentrations des macroéléments et des microéléments ont été divisées par deux (FKI, 1998) pour les cals des milieux T, et de MS modifié/2 où la concentration des macroéléments, microéléments et aussi des additifs ont été divisé par deux pour les cals des milieux M (tableau 3).

Les milieux sont additionnés de 0.3 g/l de charbon actif et de 30 g/l de saccharose ainsi que de l'un des équilibres hormonaux suivants ;

- Concentration de 2,4-D d'initiation ;
- La moitié de la concentration de 2,4-D d'initiation ;
- 1 mg/l de 2,4-D.

Des fragments de cal (environ 1 à 2 g) issus des traitements M4, T4, M5 et T5 du cultivar DN, sont transférés dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu liquide. De petits Erlenmeyers peuvent être utilisés, mais il faut veiller à ce que le rapport entre le volume du récipient et celui du milieu de culture soit de 20 % afin d'assurer une bonne aération (MONNIER, 1990).

Les cultures sont incubées à 27° C sur un agitateur va et vient à 100 trs / mn, et sous une photopériode de 16h de lumière.

Les milieux de culture sont soit renouvelés chaque semaine afin de poursuivre l'évolution du poids des cals, ou non renouvelé pour que la biomasse soit récoltée au bout d'un mois de culture.

**Tableau 3 : Composition des milieux de culture durant les phases d'initiation des cals, d'amplification et d'établissement des suspensions.**

	<b>Milieu d'initiation des cals</b>	<b>Milieu liquide d'amplification</b>	<b>Milieu des cultures en suspension</b>
<b>Macro éléments</b>	MS	½ MS	½ MS
<b>Micro éléments</b>	MS	½ MS	½ MS
<b>Vitamines</b>	MS	MS	MS
<b>* Additifs ( mg/l)</b>			
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	85	0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100	50	0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	350	175	0
<b>Glutamine( mg/l)</b>	100	100	100
<b>Adenine ( mg/l)</b>	40	40	40
<b>Saccharose ( g/l)</b>	45	30	30
<b>Agar (g/l)</b>	7	0	0
<b>2,4-D/ BAP (mg/l)</b>	variable	variable	1
<b>Charbon actif (g/l)</b>	0,03 à 3	0,3	0,3

\* Additifs juste pour les cals cultivés sur les milieux MS modifiés (M0 à M6)

Après un mois d'incubation, les cals sont fragmentés puis transférés dans un milieu liquide d'embryogénèse.

### **3. Induction de l'embryogénèse somatique et suspensions cellulaires**

## Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmier dattier (cultivars Deglet Nour et Akerbouch) en vue de la résistance contre le Bayoud.

Les cals embryogènes ainsi obtenus sont placés dans des boîtes de pétri stériles puis coupés finement à l'aide d'un scalpel. Les fragments de cals sont mis en suspension dans 50 ml de milieu liquide puis filtrés à travers un filtre de 500 µm (passoire à thé) dans un Erlen de 250 ml.

Le milieu est identique au milieu liquide d'amplification mais avec 1 mg/l de 2,4-D et sans additifs, quelque soit le milieu d'initiation du cal (voir tableau 3).

Tous les milieux d'initiation n'ont pas été utilisés car d'une part, le nombre de cals dans certains traitements est faible et d'autre part, l'espace sur l'agitateur est réduit. Ces cals sont sélectionnés pour leur friabilité et leur texture nodulaire, granuleuse ou mixte pour le cultivar Deglet Nour et pour leur texture granuleuse pour le cultivar Akerbouch (tableau 4).

**Tableau 4 : Les cals utilisés pour les suspensions cellulaires (trois systèmes de culture) et pour les milieux de régénération MS et ½ MS.**

Le cultivar	Milieu d'initiation	Propriétés du cal		
		Texture (1)	Structure	Prolifération (2)
Deglet Nour (DN)	T5	Nodulaire avec nodules petits et moyens	friable	grande
	T4	Granuleux	friable avec agrégats	moyenne
	T3	Nodulaire avec nodules moyens	friable	Grande
	M5	Nodulaire avec nodules petits et moyens	friable	faible
	M4	Nodulaire avec nodules gros de 3 à 4 mm	friable	Faible
	M3	Mixte à nodules petits	friable avec agrégats	Faible
Akerbouch (AK)	M2	Granuleux	Gros agrégats	Faible
	M1	Granuleux	Gros agrégats	faible

1. nodules petits = 1mm, 1mm □ nodules moyens □ 3mm, gros nodules □ 3 mm.
2. grande prolifération : au-delà de 30 cals ; prolifération moyenne entre 10 et 30 cals ; faible prolifération : moins de 10 cals.

La conduite et l'entretien des suspensions cellulaires étaient en fonction du système de culture choisi. Ainsi, on a testé trois systèmes de culture :

### - Système de culture continu ouvert

Son principe consiste à renouveler le milieu à intervalles de temps réguliers, et à faire une dilution en prélevant la moitié de la masse cellulaire (DJELMAMI, 2000).

Le premier repiquage s'effectue par dilution (2X) après 30 jours de culture, les suivants sont effectués chaque dix jours par renouvellement du milieu après décantation.

Pour cela on laisse la suspension décanter pendant environ 2 heures, puis sous hotte, la presque totalité du surnageant est éliminée en évitant de brouiller le fond du récipient (on peut utiliser une micropipette, MONNIER, 1990). À l'aide d'une spatule stérile, la moitié du dépôt de cellules est transférée vers un nouvel Erlen contenant environ 40 ml de milieu liquide.

Ainsi, chaque suspension cellulaire établis à partir d'un fragment de cal conduit à deux nouvelles suspensions cellulaires ou subcultures (AL KHAYRI, 2005).

#### **- Système de culture continu fermé**

Ce système de culture consiste à changer le milieu de culture régulièrement sans changer la masse cellulaire (DJELMAMI, 2000).

Le milieu est renouvelé après un mois de culture puis chaque dix jours. Les embryons somatiques visibles sont retirés au fur et à mesure etensemencés sur des milieux de culture de régénération.

#### **- Système de culture en batch**

Il consiste à introduire un volume de masse cellulaire dans un milieu de culture bien défini, la biomasse est récoltée à un stade bien déterminé : quand la production atteint son maximum (DJELMAMI, 2000).

Il s'agit de maintenir les cultures en suspension pendant une durée de 4 à 5 semaines puis toute la masse cellulaire est retirée et étalée sur un milieu solide de régénération.

Ainsi, et pour les trois systèmes de culture, les filtrats contenant environ 1 g de matériel végétal (voir tableau 4) sont incubés sur un agitateur va et vient (100 trs/mn) en condition photopériodique de 16h de lumière, dans une chambre de culture où la température est à  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  en moyenne.

## **4. Régénération des embryons somatiques**

Afin de déterminer la concentration optimale en éléments minéraux nécessaire à une bonne régénération des embryons somatiques, quatre milieux de culture ont été testés : KNOP modifié, MS, 1/2MS et 1/4MS. Pour les deux derniers, les concentrations des macroéléments et des microéléments ont été divisées par deux et par quatre. Le milieu KNOP quant à lui est composé des éléments suivants : 1g/l  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.25g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.25g/l  $\text{KNO}_3$ , 0.25g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (AUGÉ et al., 1989) additionné de 0.1g/l de Fe EDTA et des vitamines MS.

Pour les quatre milieux ont été additionnés : 100 mg/l de glutamine, 40 mg/l d'adénine ainsi que 30 g/l de saccharose pour les milieux MS et 15 g/l pour le milieu KNOP. Les milieux sont semi solides avec 3 g/l d'agar et dépourvus d'hormones de croissance. Le pH est ajusté à 5,7. Les milieux sont distribués dans des tubes, ou dans des Erlen et des weaks pour favoriser les développements ultérieurs.

### **4.1. Repiquage sans passage par le milieu liquide**

Dans la mesure du possible, les mêmes souches de cals cultivées en milieu liquide ont également été ensemencées sur milieu gélosé d'embryogenèse MS et 1/2 MS sans hormones de croissance. Cette expérimentation a pour objectif de suivre l'évolution des cals sélectionnés et notamment leur aptitude à néoformer des embryons somatiques directement en milieu gélosé.

#### **4.2. Repiquage après passage par le milieu liquide**

Les suspensions cellulaires cultivées en système batch, sont récoltées après quatre semaines de culture puis étalées sur le milieu de régénération MS et 1/2 MS.

Par ailleurs les embryons qui apparaissaient dans les milieux liquides conduits en système de culture continu, sont ensemencés sur les milieux de germination MS, 1/2MS, 1/4MS et KNOP.

À partir de la suspension T1 du cultivar AK conduite en système continu ouvert, 45 répétitions sont réalisées par milieu. Au départ, cinq embryons étaient ensemencés par tube à essai, puis séparés et repiqués individuellement après un mois.

Les repiquages sont précédés par une opération de dessiccation des embryons somatiques. Ces derniers sont placés dans des Erlenmeyer stériles avec du papier absorbant. Les embryons sont maintenus en dessiccation pendant trois jours (communication personnelle) avant d'être transférés en milieu de régénération.

Les cultures sont incubées à 27° C sous une photopériode de 16h de lumière.

#### **4.3. Repiquage sur milieu de régénération enrichi en hormones de croissance**

Après trois mois de culture dans les différents milieux de germination, les embryons blancs opaques, vitrifiés et ceux ayant seulement développés la partie aérienne, ont été transférés sur un milieu 1/2 MS mais enrichi avec 0,1 mg/l d'ANA et 0,05 mg/l de BAP. Les hormones sont additionnées au milieu afin de favoriser l'enracinement des pousses vertes et la réactivité des embryons n'ayant pas évolués.

## **IV - Observations et mesures**

Le suivi de l'expérimentation a consisté en l'observation des explants et de leur évolution durant toutes les phases de l'embryogenèse somatique. Les observations sont faites à 03 échelles, à l'œil nue, sous loupe binoculaire et au microscope inversé pour les suspensions cellulaires, afin de rapporter :

- Les taux de contamination ;
- La réactivité des explants (en %) en fonction des milieux : c'est le rapport entre le nombre d'explants initiant une callogenèse et le nombre d'explants introduits ;
- Les pourcentages de cals granuleux, nodulaires et mixtes (%) en fonctions des milieux : c'est le rapport entre le nombre de cals granuleux, nodulaires ou mixtes et le nombre de cals produits par milieu après une période de douze mois ;
- Mesure du poids de la biomasse en milieux liquides d'amplification ;
- Les stades de développement des embryons dans les suspensions cellulaires ;
- Les pourcentages de régénération des embryons somatiques ainsi que les embryons brunis, vitrifiés ou ayant seulement émis une pousse ou une racine.

## **V - Analyse statistique**

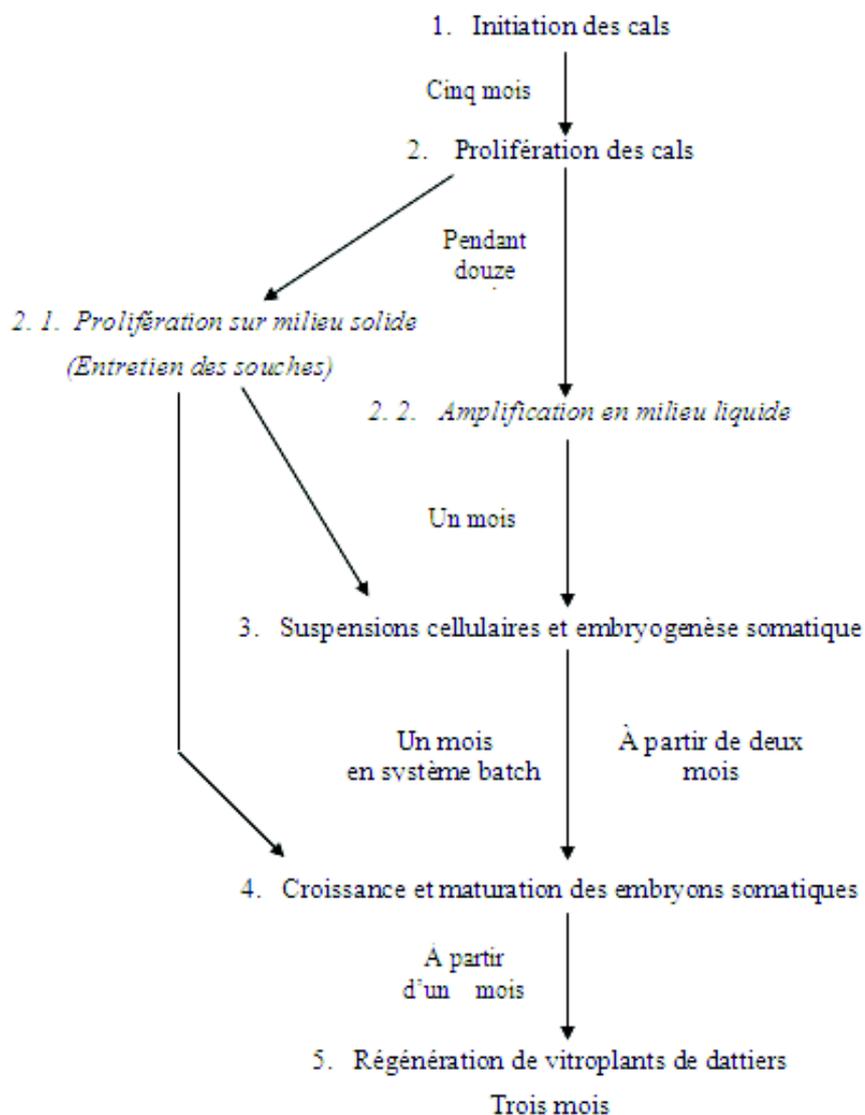
---

L'analyse statistique a été effectuée en utilisant le logiciel STATGRAPHICS (5.1), sur les pourcentages d'induction et de croissance des cals, ainsi que sur les pourcentages de régénération des embryons somatiques.

Le but de cette analyse est de déterminer l'effet des traitements hormonaux et de la composition minérale du milieu de culture dans le processus de l'embryogenèse somatique chez les deux cultivars de palmier dattier. Une comparaison multiple des moyennes LSD est effectuée lorsque le tableau de l'analyse de la variance au seuil de 5% révèle des différences significatives. Ceci permet de dégager les groupes homogènes.

## VI - Protocole expérimental

La figure 5 résume le protocole que nous avons adopté pour notre expérimentation, ainsi que le temps nécessaire pour chaque étape.



*Figure 5 : Protocole expérimental pour l'embryogenèse somatique chez les deux cultivars Deglet Nour et Akerbouch.*

---

# RESULTATS ET INTERPRETATIONS

## I - Initiation et croissance des cals

### 1 - Méthode de désinfection

---

L'utilisation du  $\text{HgCl}_2$  à la dose de 150 mg/l pour la désinfection des cœurs des rejets, a révélé des taux de contamination très faibles chez les deux cultivars (annexes 4 et 5), le maximum enregistré est de 15,87% après deux mois de culture chez les explants du cultivar Akerbouch (figure 6).

### 2 - Initiation et prolifération des cals chez les deux cultivars Deglet Nour et Akerbouch

---

#### A - Cultivar Deglet Nour(DN)

##### A.1. Initiation de la callogenèse

##### 1.1 - Effet des régulateurs de croissance

##### 1.1.1 - En l'absence d'additifs

Tous les milieux MS simples hormis le témoin, ont permis une initiation de cals sur les explants du cultivar DN. Les cals sont apparus à partir du premier mois de culture sur les milieux T1 et T6 dont les rapports 2,4-D/BAP respectifs sont de 1/1 et 5/5. Les pourcentages de callogenèse se sont stabilisés au cinquième mois de culture, et ont varié entre 60 et 100%. Les meilleurs pourcentages ont été obtenus sur les milieux T3 (10/1) et T4 (50/1) (figure 7).

En effet l'analyse de la variance au seuil de 5% (annexe 6:1) effectuée à partir des résultats obtenus au cinquième mois de culture, a révélé une différence significative entre le témoin et les traitements hormonaux. Le test LSD nous a permis de classer les traitements en deux groupes homogènes :

- Groupe a : comporte seulement le témoin ;
- Groupe b : comporte tous les traitements hormonaux : T1, T2, T3, T4, T5 et T6 avec des pourcentages respectifs (en %) de 60, 60, 100, 100, 80 et 60.

##### 1.1.2 - En présence d'additifs

Les premiers cals sont apparus un mois après la mise en culture sur les milieux M1 (1/1), M4 (50/1) et M6 (5/5). La callogenèse s'est stabilisée au cinquième mois de culture où les pourcentages ont varié de 25% (M3 et M4) à 60% (M5). Sur le milieu témoin il n'y a eu aucune callogenèse (figure 8).

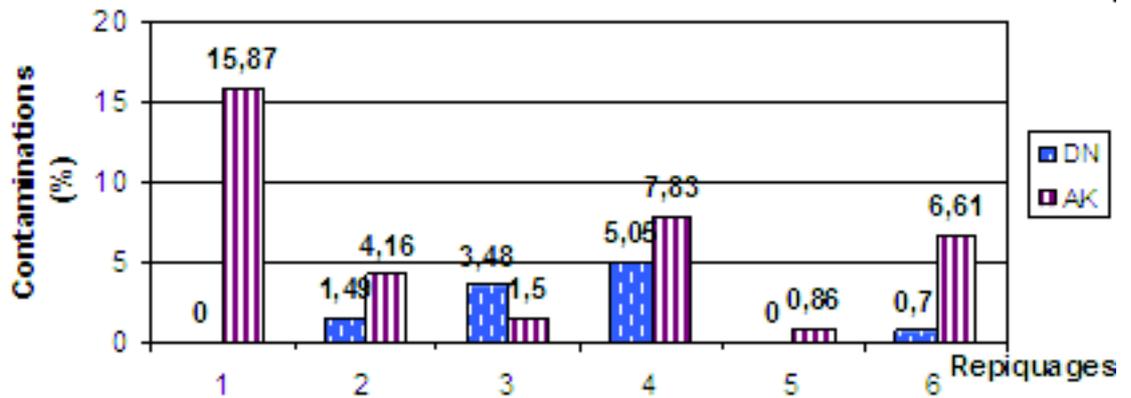


Figure 6 : Pourcentages des contaminations chez les deux cultivars DN et AK, en fonction des repiquages (12 mois de culture).

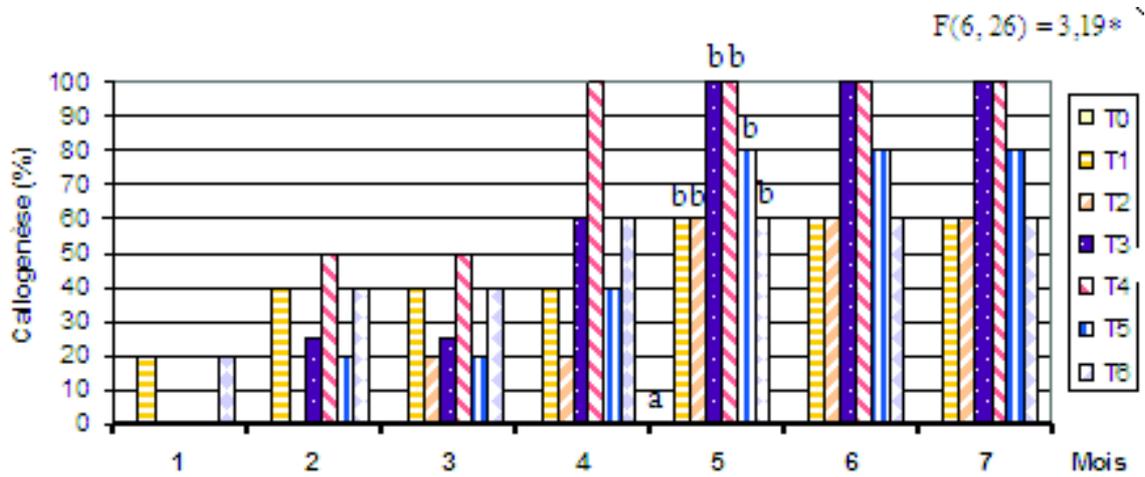


Figure 7 : Pourcentages de callogénèse en fonction du temps de culture sur les milieux T chez le cultivar DN (analyse de la variance au cinquième mois de culture)

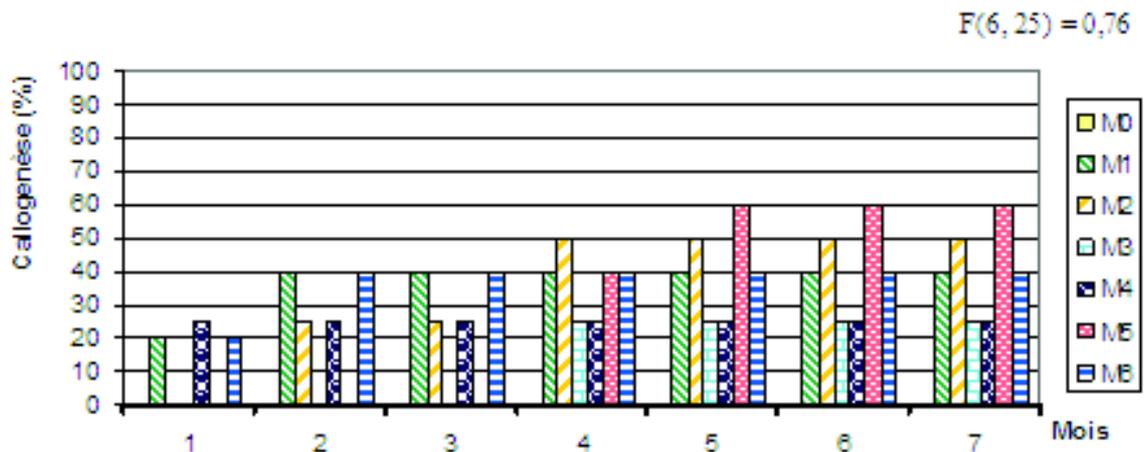


Figure 8 : Pourcentages de callogénèse en fonction du temps de culture, sur les milieux M chez le cultivar DN (analyse de la variance au cinquième mois de culture)

L'analyse statistique de la variance se rapportant aux pourcentages de callogenèse chez le cultivar DN et dans le milieu MS modifié (annexe 6:2), n'a révélé aucun effet significatif des traitements.

## 1.2 - Effet de la composition minérale du milieu

Le milieu MS sans additifs a permis d'obtenir un pourcentage de callogenèse moyen supérieur à celui du milieu MS modifié avec des pourcentages respectifs de 63,63% et 34,37% (figure 9). Effectivement, l'analyse de la variance à deux niveaux a montré l'existence d'une différence significative entre les deux milieux de culture (annexe 6:3).

## A.2. Développement des cals

### 2.1 - En milieux d'initiation

Trois types de cals ont été obtenus : des cals granuleux, des cals nodulaires et des cals mixtes, ces derniers se présentent sous forme de cals granuleux recouverts en partie par des nodules (planche 2).

Les cals initiés ont été au départ granuleux beiges et ont pris place sur les explants gonflés. Les granules ont proliféré et ont formé des masses compactes. Au fur et à mesure des repiquages ces cals évoluaient vers une structure plus ou moins friable composée de petits agrégats.

#### 2.1.1 - En l'absence d'additifs

Deux à trois mois après l'initiation, des nodules sont apparus au niveau des premiers cals formés, il s'agit de formations à surface lisse qui mesurent entre 1 et 3mm, de couleur blanche ou beige. Dans certain cas, des nodules bien individualisés se sont développés entre les tissus de l'explant initial pour former des cals nodulaires fibreux. Ce type de formations, a été observé sur les milieux T1(1/1), T2(5/1), T3(10/1), T4(50/1) et T5(100/1), mais à des fréquences faibles.

Les cals du cultivar DN cultivés sur les milieux MS simples, ont révélé un potentiel callogène important. Pendant douze mois de culture, on a remarqué une notable prolifération de cals en bon état sur les milieux T3(10/1) et T5(100/1) suivi par le T4(50/1) (figure 10). La prolifération a été faible sur les milieux T1(1/1), T2(5/1) et T6 (5/5).

Quant à la texture des cals, ce sont ceux à texture mixte qui ont donné les meilleurs pourcentages : 56,25% sur le T5 ; 46,15% sur le T4 et 45% sur le T3 (figure 11).

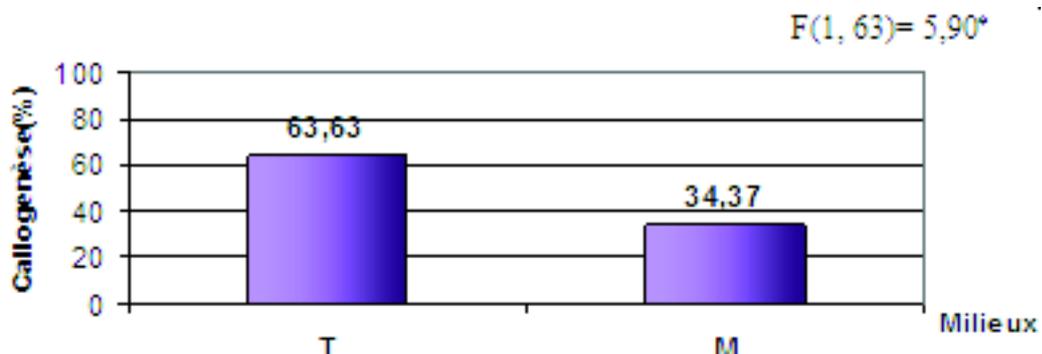
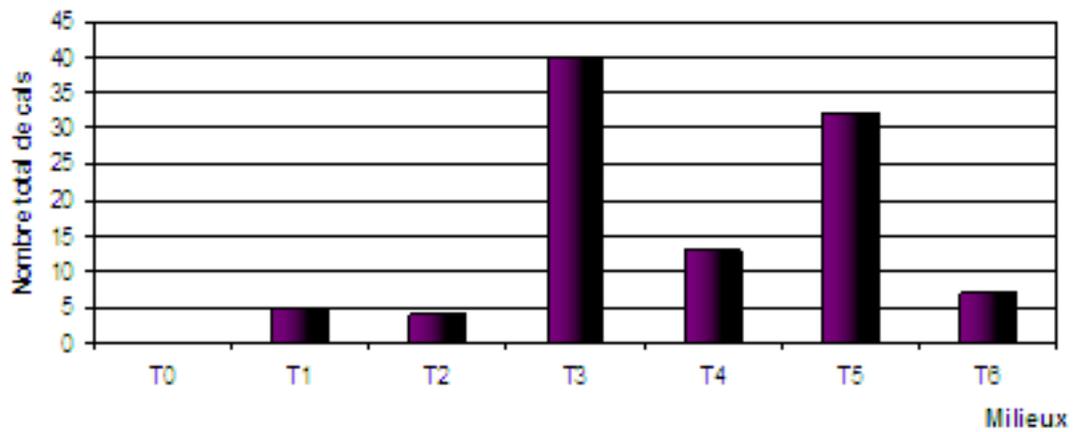
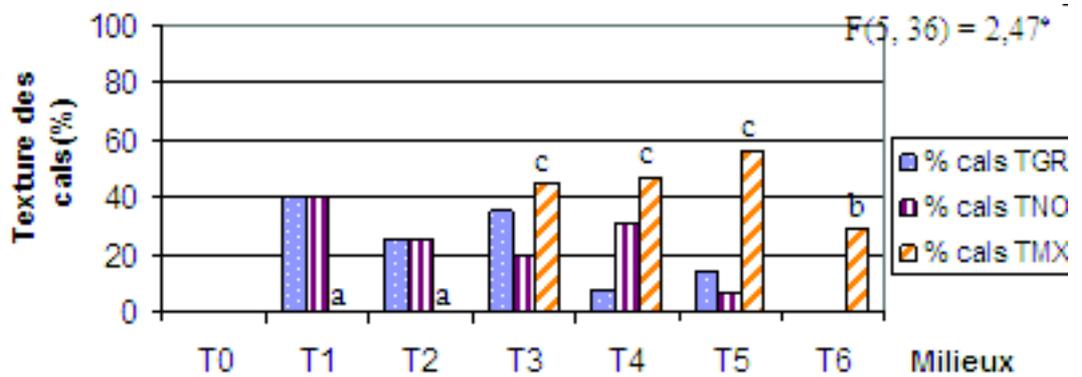


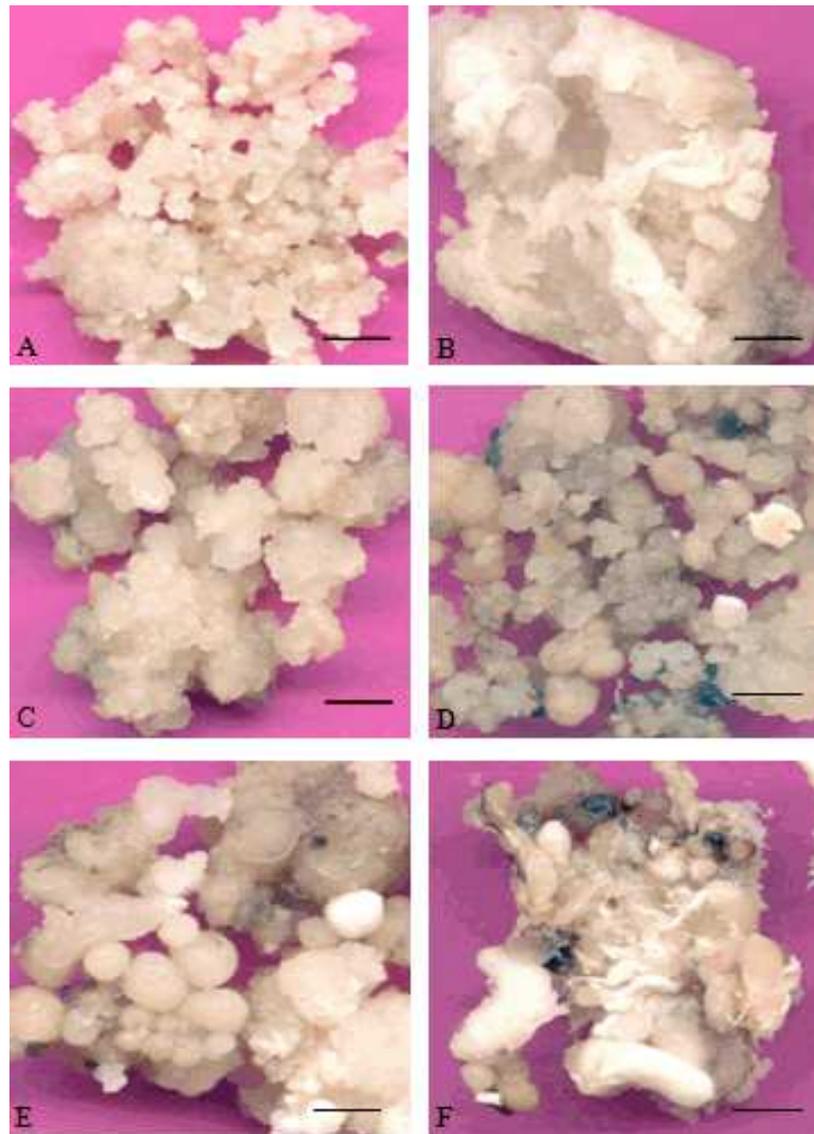
Figure 9: Pourcentages de callogenèse sur les milieux MS simples(T) et MS modifiés (M) chez le cultivar DN (tous traitements confondus, après cinq mois de culture).



**Figure 10 :** Nombre de cals obtenus chez le cultivar DN sur les milieux T après 12 mois de culture.



**Figure 11 :** Pourcentages de cals avec texture granuleuse (TGR), nodulaire (TNO) et mixte (TMX), en fonction des équilibres hormonaux en l'absence d'additifs chez le cultivar DN (analyse de la variance pour les cals TMX après 12 mois de culture).



*Planche 2 : Types de cals obtenus à partir des explants du cœur du rejet.*

- A : Cal granuleux friable (barre = 5mm)**
- B : Cal granuleux compact (barre = 5mm)**
- C : Cal granuleux friable avec agrégats (barre = 5mm)**
- D : Cal mixte friable (barre = 4mm)**
- E : Cal nodulaire friable (barre = 4mm)**
- F : Cal nodulaire fibreux (barre = 5mm)**

Les cals des milieux T1 et T2 ont présenté des textures granuleuses ou nodulaires à part égale dans chaque traitement.

Le milieu T6(5/5) où les cals étaient particulièrement touchés par le phénomène de brunissement, n'a conduit qu'à la prolifération de cals mixtes avec un taux de l'ordre de 28,57%.

L'analyse de la variance n'a montré d'effet significatif des traitements que sur l'induction de cals à texture mixte (annexe 7), et la comparaison des moyennes a fait ressortir trois groupes homogènes:

- Groupe a : composé de T1 et T2 qui n'ont aucun effet sur l'induction de cals mixtes ;
- Groupe b : composé uniquement du T6 ;
- Groupe c : composé de T3, T4 et T5.

### 2.1.2 - En présence d'additifs

Les milieux M ont conduit à une faible prolifération des cals du cultivar DN dont l'amplification n'a pas dépassé dix cals par traitement (figure 12). Les cals ont été essentiellement à texture mixte notamment sur les milieux M4(50/1) et M5(100/1) avec des pourcentages respectifs de 100% et 57,14% (figure 13). Des cals à texture exclusivement granuleuse ou nodulaire ont été obtenus mais à des fréquences moindres.

En effet, les analyses de la variance réalisée après douze mois de culture (annexe 8) n'ont montré aucun effet significatif entre les traitements M en ce qui concerne l'induction de cals granuleux ou nodulaires et un effet hautement significatif pour les cals à texture mixte. Le test LSD a dégagé quatre groupes homogènes :

- Groupe a : composé de M1 et M2 où aucun cal mixte n'a été obtenu ;
- Groupe b : composé de M3 et M6 avec des pourcentages respectifs de 42,85% et 33,33% ;
- Groupe c : comprend le traitement M5 ;
- Groupe d : comprend le traitement M4.

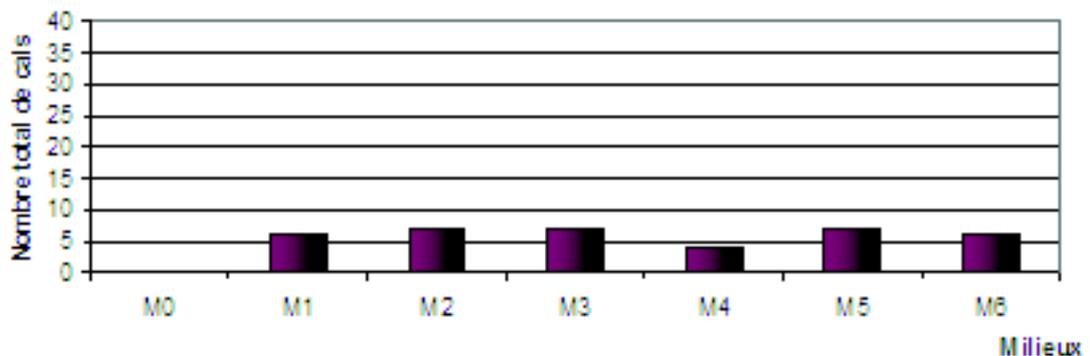
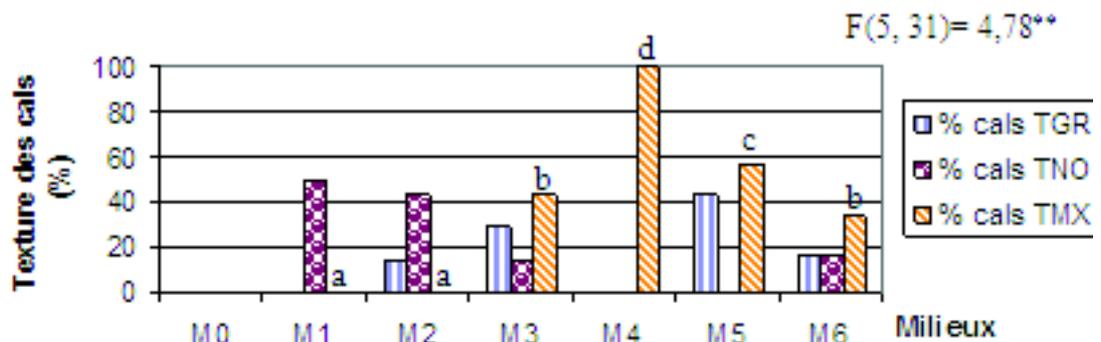


Figure 12 : Nombre de cals obtenus chez le cultivar DN sur les milieux M, après 12 mois de culture.



**Figure 13 :** Pourcentages de cals avec texture granuleuse (TGR), nodulaire (TNO) et mixte (TMX), en fonction des équilibres hormonaux en présence d'additifs chez le cultivar DN (analyse de la variance pour les cals TMX après 12 mois de culture).

## 2.2 - Amplification en milieux liquides

L'essai de l'amplification en milieu liquide a été conduit en vue de déterminer la concentration de 2,4-D avec laquelle les cals prolifèrent efficacement.

Dans un premier temps, deux milieux ont été testés : milieu A1= ½ MS+ la concentration de 2,4-D d'initiation des cals (50 et 100 mg/l), et le milieu A2 = ½ MS+1mg/l de 2,4-D. Pour chaque traitement, quatre répétitions ont été réalisées par l'ensemencement de cals de poids initial variant entre 1 et 1,5 g. Après un mois, le matériel végétal a été pesé et les résultats sont mentionnés dans le tableau 5.

Milieu liquide d'amplification	Nombre de répétitions	Poids moyen initial des cals (g)	Poids moyen final des cals (g)
A1 = ½ MS + [2,4-D] d'initiation	4	1,31	1,41
A2 = ½ MS + 1 mg/l de 2,4-D	4	1,435	2,55

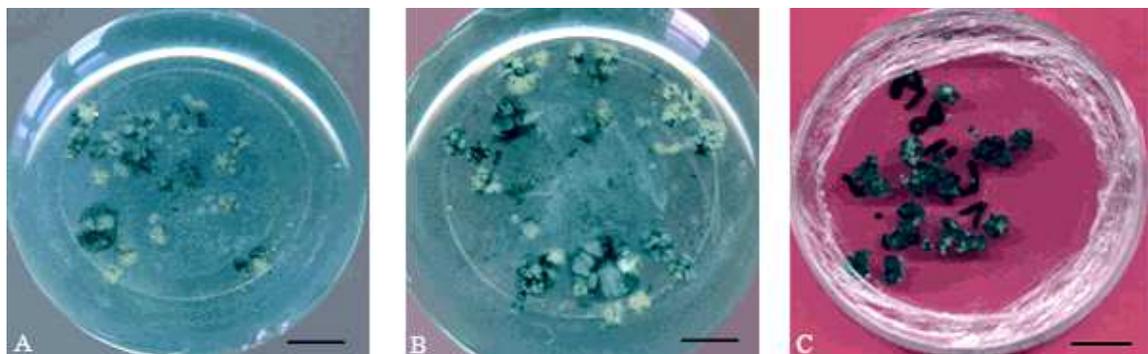
**Tableau 5:** Évolution du poids des cals du cultivar DN après un mois de culture en milieu liquide d'amplification.

On a remarqué que les cals cultivés dans le milieu A1, ont présenté une croissance faible comparée à celle des cals dans le milieu A2 dont le poids moyen est passé de 1,435g à 2,55g (planche 3: A, B).

De ce fait, les cals cultivés en présence de 1mg/l de 2,4-D ont présenté une croissance rapide. En effet, ils ont doublé de poids pour certaines souches en l'espace d'un mois.

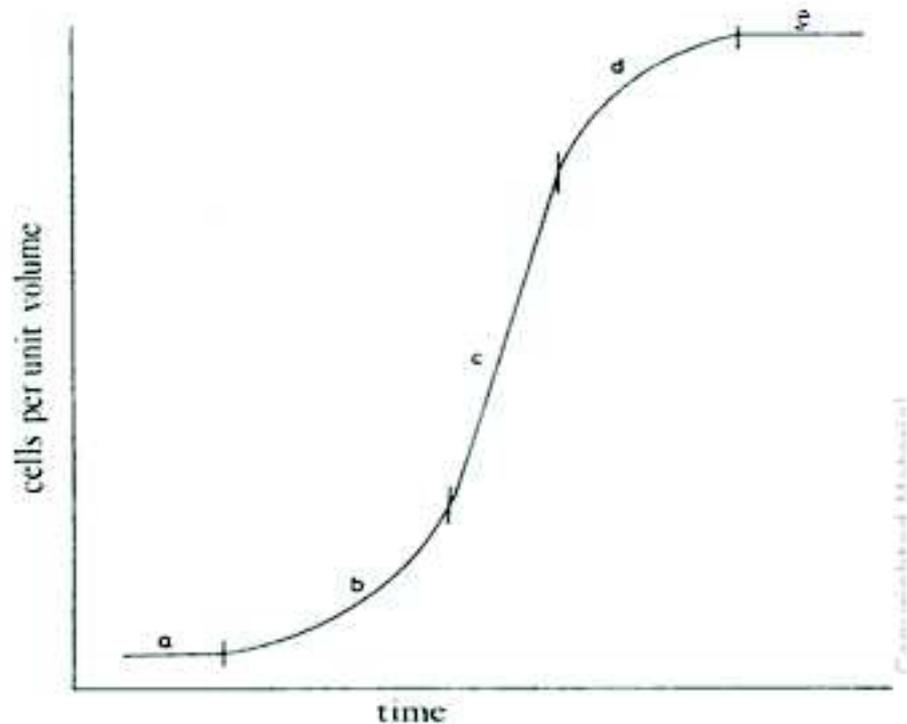
Selon GAGIK et GREY (1990), lorsque le matériel végétal est placé en milieu liquide, il se passe une phase de latence antérieure à la division cellulaire. Celle-ci est suivie par une phase exponentielle de multiplication intense des cellules. Enfin, les cellules entrent en phase stationnaire (Figure14) après une certaine période estimée à 2 ou 3 semaines.

Ainsi, nous avons entrepris de redessiner cette courbe de croissance en faisant chaque semaine des mesures de poids frais des cals et cela pendant une durée d'un mois.



**Planche 3 :** Amplification des cals en milieu liquide (après un mois).

- A : Amplification des cals dans le milieu A1 (barre = 1,16 cm)  
 B : Amplification des cals dans le milieu A2 (barre = 0,93 cm)  
 C : Cals spongieux et brunis (barre = 1,55 cm)



**Figure 14:** Courbe modèle relative à la croissance des cultures en fonction du temps dans le milieu liquide.

Les différents stades de croissance sont : (a) phase de latence, (b) phase exponentielle, (c) phase linéaire, (d) phase à décélération progressive, (e) phase stationnaire (GAGIK et GREY, 1990).

Une troisième concentration de 2,4-D a été testée dans le milieu d'amplification qui est de la moitié ( $=\frac{1}{2}$ ) de la concentration de 2,4-D d'initiation (milieu A3) (tableau 6).

Milieu liquide d'amplification	symbole	répétitions	Évolution du poids des cals (g)				
			*S0	S1	S2	S3	S4
$\frac{1}{2}$ MS + [2,4-D] d'initiation	A1	4	0,625	0,615	0,614	0,64	0,67
$\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/l de 2,4-D	A2	8	2,897	2,81	2,68	2,69	2,78
$\frac{1}{2}$ MS + $\frac{1}{2}$ [2,4-D] d'initiation	A3	4	1,122	0,962	0,972	1,01	1,13

**Tableau 6:** Évolution par semaine du poids des cals cultivés en milieux liquides d'amplification chez le cultivar DN.

S : semaine

Après la première semaine, les cals entretenus sur les milieux A1, A2 et A3 ont eu une croissance nulle, la chute du poids est sans doute due à la libération de quelques cellules dans le milieu liquide. A la deuxième semaine, le poids des cultures a stagné pour A1, a diminué d'avantage pour le A2 et a repris par une légère croissance dans le A3. La croissance pondérale a repris faiblement dans les trois milieux au cours de la troisième et quatrième semaine mais les cals ont présenté un brunissement intense et ont été recouverts de charbon actif. Aux repiquages, ils semblaient spongieux et profondément nécrosés (voir planche 3: C).

La courbe modèle n'a pu être reproduite dans nos conditions de culture, cependant on peut conclure de cet essai que les repiquages fréquents sont défavorables pour les cals durant les premiers stades de croissance. Par ailleurs, des échantillons d'un certain volume pourraient être pris afin d'éviter de perturber la croissance des cultures.

## **B - Cultivar Akerbouch (AK)**

### **B.1. Initiation de la callogenèse**

#### **1.1. Effet des régulateurs de croissance**

##### **1.1.1 - En l'absence d'additifs**

Une callogenèse de 100% a été enregistrée dans les traitements T1(1/1) et T5(100/ 1). Dans le milieu T1, 50% des explants ont initiés des cals dès le premier mois de culture puis la callogenèse a atteint 100% au deuxième mois. En revanche sur le milieu T5, l'initiation des cals n'a débuté qu'à partir du quatrième mois de culture puis a atteint son taux maximal au cinquième mois de culture.

Les milieux T2(5/1) et T6(5/5) ont conduit respectivement à 40 et 80% de callogenèse. Alors que les traitements T0, T3(10/1) et T4(50/1) n'ont donné aucune callogenèse (figure 15), cela suite à un brunissement des explants survenu essentiellement au quatrième mois de culture.

Les résultats de l'analyse de la variance au cinquième mois de culture (annexe 9:1) ont révélé une différence significative entre les traitements quant à l'induction de la callogenèse chez le cultivar AK. Le test LSD nous a permis de classer les traitements en trois groupes homogènes :

- Groupe a : comporte les traitements T0, T3 et T4 sans callogenèse ;
- Groupe b : comporte uniquement le traitement T2 ;
- Groupe c : comporte les traitements T1, T5 et T6.

##### **1.1.2 - En présence d'additifs**

Les pourcentages de cals initiés après quatre mois de culture ont été très variables d'un milieu à l'autre. Ainsi le pourcentage le plus faible 7,14% a été noté sur le milieu M2 et le pourcentage le plus élevé 72,72% sur le milieu M6 (figure 16). Par ailleurs, on a remarqué un brunissement total des explants du témoin et du traitement M4.

L'analyse de la variance (annexe 9:2) a révélé une différence très hautement significative entre les traitements hormonaux appliqués au cultivar AK. Ainsi le test LSD a fait ressortir trois groupes homogènes :

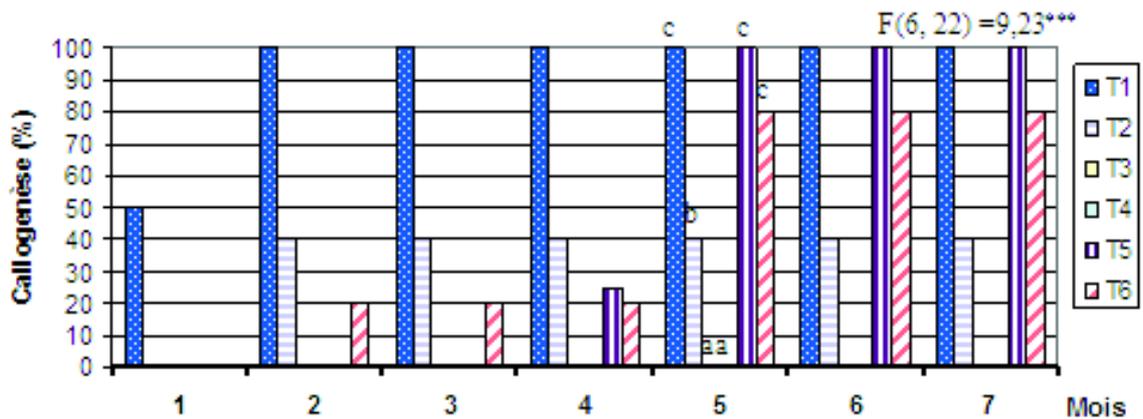


Figure 15 : Pourcentages de callogenèse en fonction du temps de culture sur les milieux T chez le cultivar AK (analyse de la variance au cinquième mois de culture)

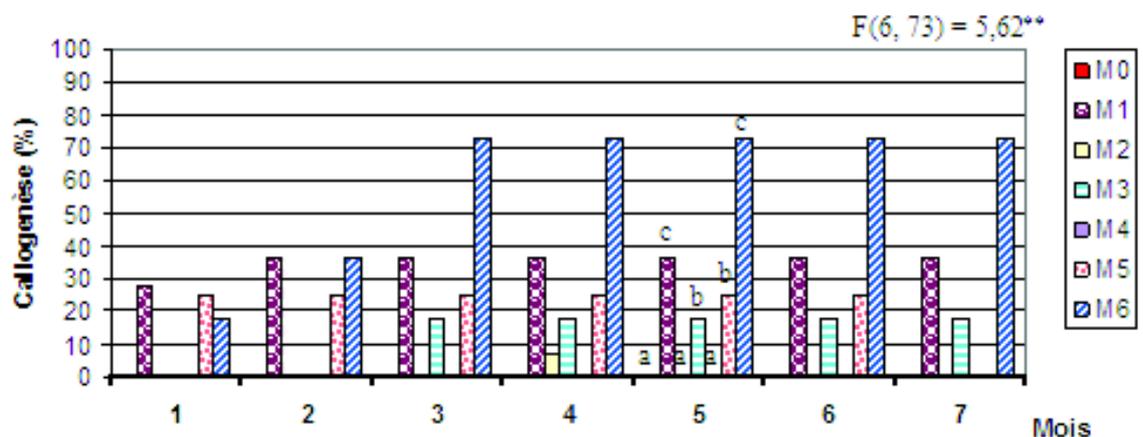


Figure 16 : Pourcentages de callogenèse en fonction du temps de culture sur les milieux M chez le cultivar AK (analyse de la variance au cinquième mois de culture)

- Groupe a : composé des milieux M0 et M4 avec aucune callogenèse et M2 avec 7,14% ;
- Groupe b : composé des milieux M3 et M5 avec des pourcentages respectifs de 18,18% et 25% ;
- Groupe c : composé des milieux M1 et M6 avec des pourcentages respectifs de 36,36% et 72,72%.

## 1.2. Effet de la composition minérale du milieu

Bien que les pourcentages moyens de callogenèse paraissent être en faveur du milieu MS simple avec une valeur de 45,71% contre 22,77% pour le milieu MS avec additifs (figure 17), l'analyse de la variance n'a fait apparaître aucune différence significative entre les deux milieux pour le cultivar Ak (annexe 9:3).

## B.2. Amplification sur milieux d'initiation :

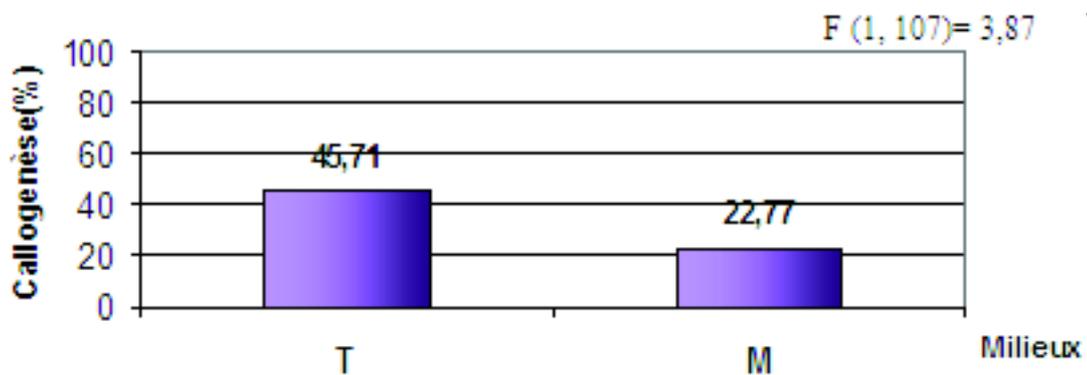
### 2.1. En l'absence d'additifs

Le cultivar AK a répondu aux milieux T par une prolifération moyenne des cals sur le milieu T5 avec un nombre de 12 cal après une année de culture (figure 18). L'amplification a été moins importante sur le reste des milieux.

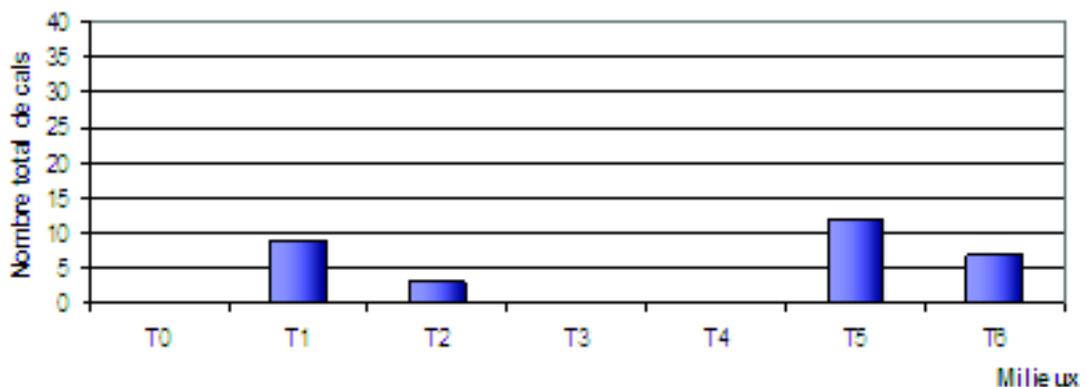
Les cals ont été essentiellement à texture granuleuse, cas du traitement T5(100/1). Le milieu T2(5/1) a conduit à la production de cals hyperhydriques qui ont bruni très rapidement. Des cals à texture mixte ont été également obtenus sur les milieux T1(1/1), T5(100/1) et T6(5/5) avec des pourcentages respectifs de 30%, 28,57% et 11,11%. Alors que des cals nodulaires ont été observés avec une très faible fréquence sur le milieu T5 (figure 19).

Les tableaux de l'analyse de la variance (annexe 10) n'ont montré d'effet significatif des traitements T que sur l'induction de cals granuleux. Le test LSD a fait ressortir deux groupes homogènes :

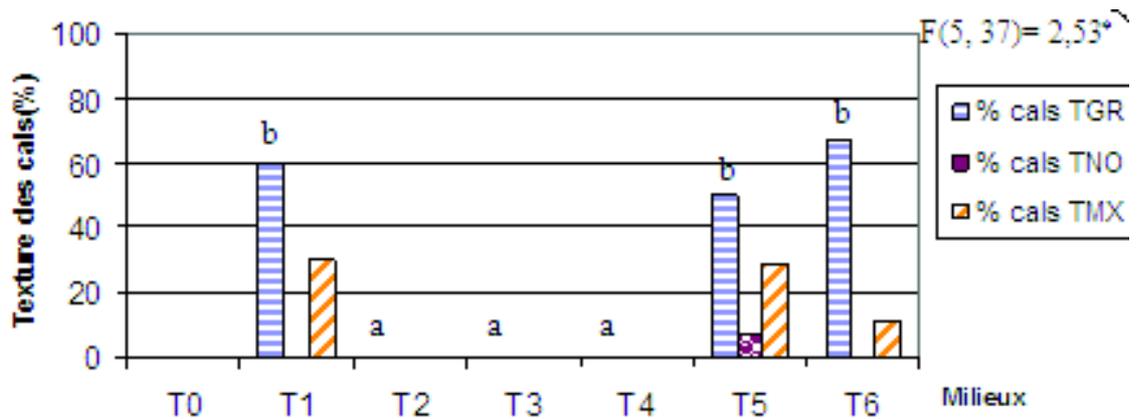
- Groupe a : comporte les traitements T2, T3 et T4 ;
- Groupe b : comporte les traitements T1, T5 et T6 avec des pourcentages respectifs de 60%, 50% et 66,66%.



**Figure 17 :** Pourcentages de callogénèse sur les milieux T et M chez le cultivar AK (tous traitements confondus, après cinq mois de culture).



**Figure 18 :** Nombre de cals obtenus chez le cultivar AK sur les milieux T, après 12 mois.



**Figure 19 :** Pourcentages de cals à texture granuleuse (TGR), nodulaire (TNO) et mixte (TMX), en fonction des équilibres hormonaux en l'absence d'additifs chez le cultivar AK (analyse de la variance pour les cals TGR après 12 mois de culture).

## 2.2. En présence d'additifs

De tous les milieux M testés, seuls M1(1/1), M3(10/1) et M6(5/5) ont répondu par une faible prolifération des cals (figure 20). Tous les cals ont été de texture homogène, essentiellement granuleux sur le M1 et nodulaires sur le M6. Cependant, les résultats des deux analyses de la variance (annexe 11) ont indiqué que les différences entre les traitements M sont non significatives sur l'induction de cals à texture nodulaire, mais très hautement significatives pour une callogenèse à texture granuleuse. La comparaison des moyennes par le test LSD a fait ressortir deux groupes homogènes (figure 21):

- Groupe a : comporte les traitements M2, M3, M4, M5 et M6 avec des pourcentages respectifs de 0, 11, 0, 0 et 23,07% ;
- Groupe b : comporte uniquement le traitement M1 avec un pourcentage de 80%.

## 3 - Évolutions organogènes des cals chez les deux cultivars :

Deux types d'organogenèse ont été observées au cours de la phase de callogenèse chez les deux cultivars AK et DN : le bourgeonnement et la rhizogenèse.

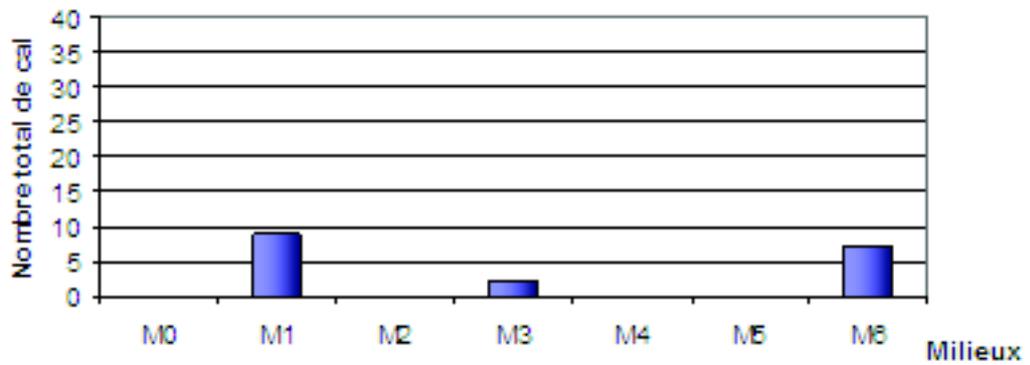
### 3.1. Bourgeonnement

Une néoformation de bourgeons est apparue sur les cals en milieu d'initiation T1-M1(1/1) et T6(5/5) chez le cultivar AK, et sur le milieu T1(1/1) chez le cultivar DN. Ces bourgeons ont été reconnaissables par les jeunes petites ébauches foliaires qui ont pris naissance directement à partir du cal (planche 4 : A, B, C).

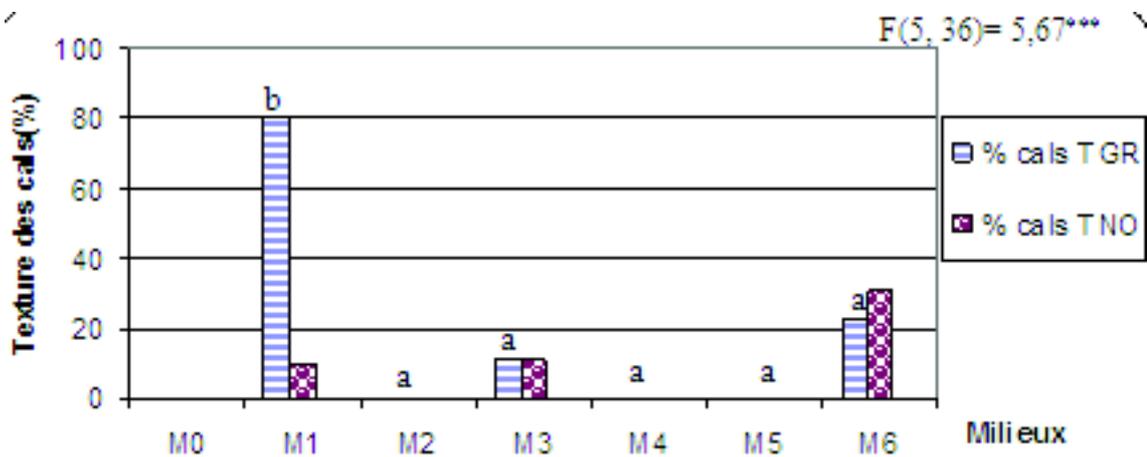
Ce phénomène a commencé à partir du seizième mois de culture sur les cals placés à l'obscurité et devenait très important par la suite notamment chez le cultivar AK dans les traitements T1 et M1. Les cals portant les bourgeons ont été transférés en lumière (photopériode de 16h), ce qui a permis une meilleure distinction des bourgeons qui ont verdi suite à la synthèse de chlorophylle.

Au fur et à mesure de leur apparition dans les milieux d'initiation, les bourgeons ont été repiqués avec une partie du cal sur des milieux MS sans hormones de croissance. Ceci

a conduit à des touffes de pousses feuillées, qui ont développé par la suite des racines (planche 4 : D).



**Figure 20 :** Nombre de cals obtenus chez le cultivar AK sur les milieux M, après 12 mois.



**Figure 21:** Pourcentages de cals à texture granuleuse (TGR), nodulaire (TNO) et mixte (TMX), en fonction des équilibres hormonaux en présence d'additifs chez le cultivar AK (analyse de la variance pour les cals TGR après 12 mois de culture)

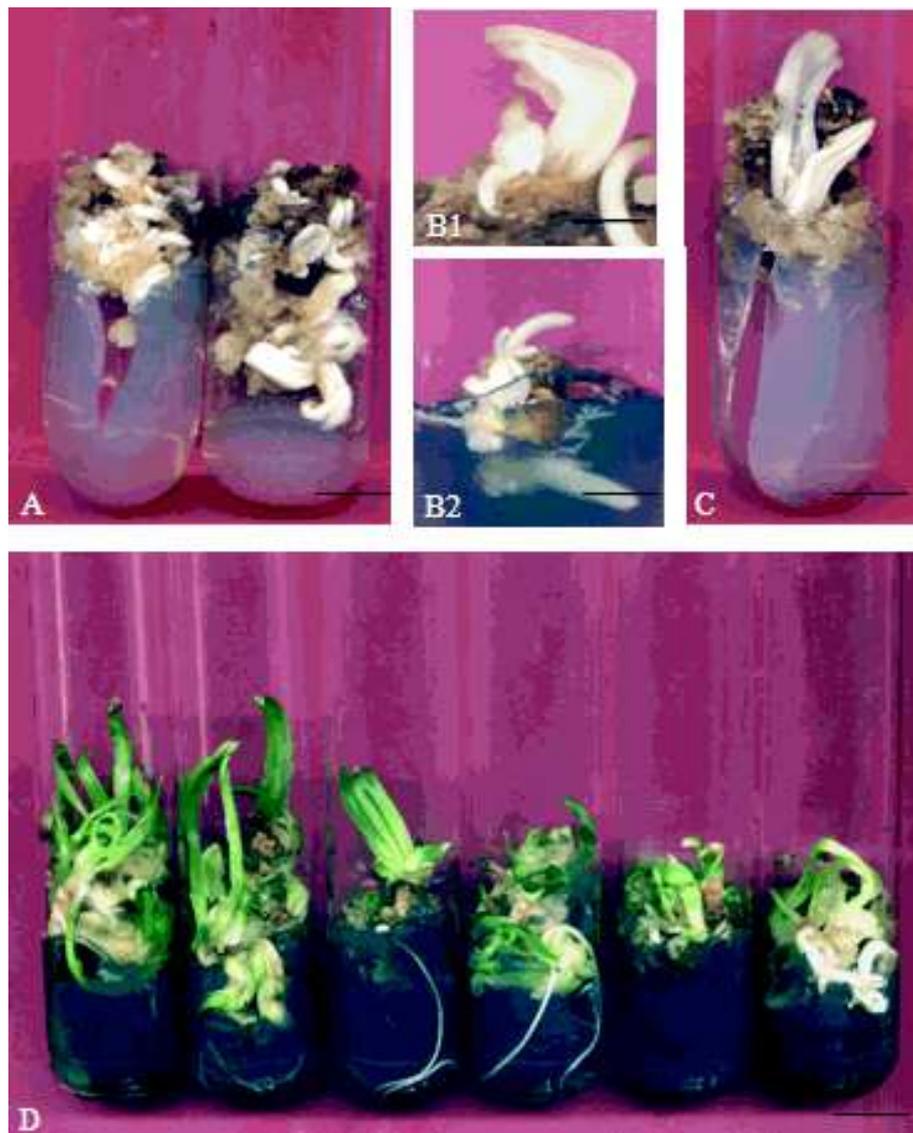


Planche 4 : Organogenèse par bourgeonnement chez le cultivar AK.

**A** : Néοformation de plusieurs bourgeons sur les cals T1 (barre = 0,96cm)

**B1-B2** : Ébauches foliaires néοformées (barre B1= 0,5 cm, barre B2=0,55cm)

**C** : Allongement du bourgeon (barre = 0,85 cm)

**D** : Formation de touffes feuillées vertes et enracinées sur les milieux MS sans hormones de croissance (barre = 1,2 cm)

Ainsi on a obtenu chez le cultivar AK et après cinq mois sur le milieu MS, 65 pousses feuillées dont 24 enracinées à partir des cals initiés sur le M1 et 49 pousses dont 14 enracinés à partir des cals des milieux T1.

### 3.2. Rhizogenèse

La formation de racines a été observée sur plusieurs cals chez les cultivars Ak et DN.

Différent types de racines ont été mis en évidence (planche 5):

- Des racines courtes, non ramifiées et avec un géotropisme négatif. Ces racines ont été obtenues à partir des cals du cultivar AK cultivés sur les milieux T2(5/1) et T6(5/5) après huit mois de culture.

- Des racines longues avec ramification et un géotropisme positif, produites sur les cals AK cultivés sur les milieux M3 (10/1) et M4-T4(20/1).

- Des racines grosses et longues sans ramification à partir des nodules des cals fibreux, après leur transfert sur un milieu dépourvu d'hormones de croissance, et leur exposition à une photopériode de 16h de lumière. Ce phénomène n'a été observé que chez le cultivar DN sur les milieux T1(1/1), T2(5/1), T3(10/1), T4(50/1) et T5(100/1).

## **II - Induction de l'embryogenèse somatique en milieux liquides**

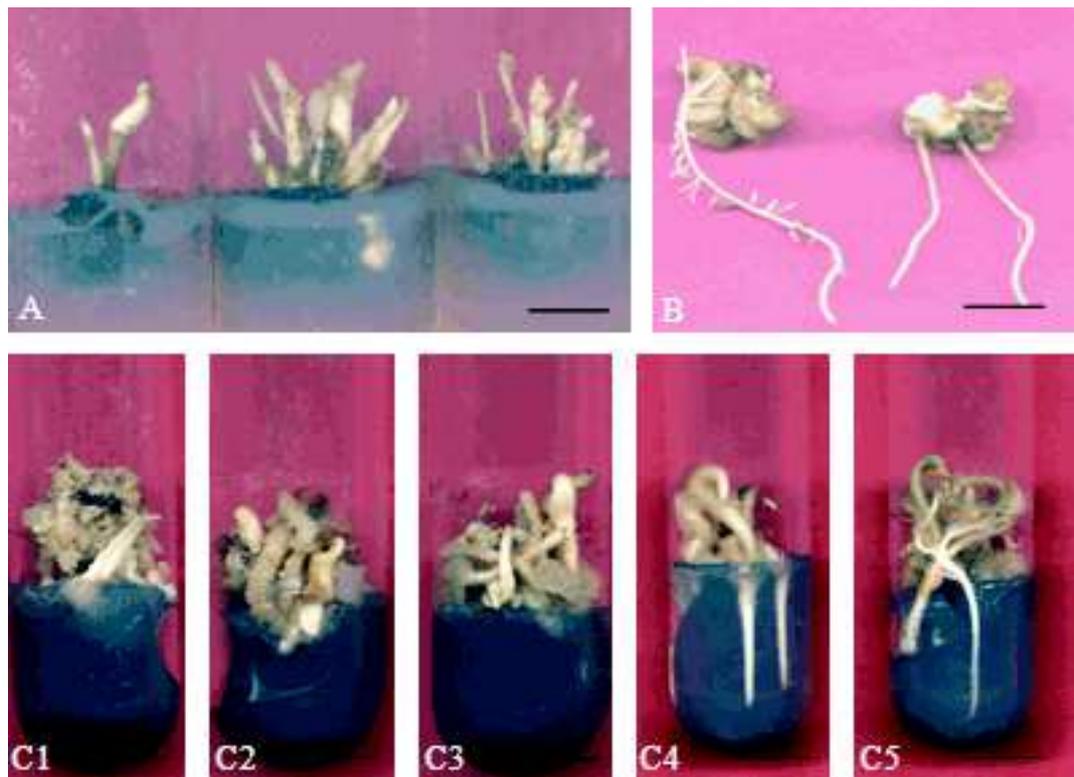
Pour les deux cultivars, la mise en culture des cals en milieu liquide d'embryogenèse a été effectuée environ vingt mois après l'introduction primaire des explants dans les milieux d'initiation.

Durant le premier mois, toutes les suspensions appartenant aux trois systèmes ont été conduites dans les mêmes conditions de culture. Par la suite, les suspensions en batch ont été filtrées et étalées sur les milieux de régénération. Les autres suspensions ont été maintenues en système continu et entretenues par des repiquages réguliers espacés de dix jours.

### **1 - Les cultures conduites en système continu ouvert**

---

La croissance des suspensions a été différente, et plusieurs réponses morphologiques ont été notées après trois mois de culture (tableau 7).



*Planche 5 : Rhizogenèse à partir des cals.*

**A : Racines courtes non ramifiées à géotropisme négatif (barre = 0,8 cm)**

**B : Racines longues avec ou sans ramification et à géotropisme positif (barre = 1,1 cm)**

**C1à C5 : Évolution des nodules des cals fibreux en racines (barre = 1 cm)**

Cultivars	Souches	Système continu ouvert	Système continu fermé	Système batch
AK	T1	Embryons globuleux et bipolaires dans les quatre suspensions.	Embryons globuleux et bipolaires	Présence de globules
	M1	Embryons globuleux et bipolaires dans les deux suspensions.	Embryons globuleux et bipolaires	Présence de globules
DN	T5	Embryons globuleux dans les deux suspensions.	Densité élevée de nodules	Suspension simple
	T4	Susp.1 : globules et embryons bipolaires, Susp.2 : racines courtes.	Globules et structures bipolaires	Suspension simple
	T3	Suspensions simples plus ou moins brunes.	Globules, quelques structures allongées et nodules évolués en racines qui remontent en surface.	Suspension simple
	M5	Densité élevée de globules.	Globules, structures bipolaires et racines enchevêtrées.	Suspension simple
	M4	Susp.1 : contaminée Susp.2 : simple plus ou moins brune	Contamination	Présence de globules
	M3	Susp.1 : globules et embryons bipolaires Susp.2 : globules et embryons bipolaires, racines simples et enchevêtrées.	Contamination	Suspension simple

*Tableau 7 : Évolutions des suspensions conduites selon les trois systèmes de culture (après trois mois pour les systèmes continus et un mois pour le système batch).*

l'apparition de globules pour les souches AK (T1 et M1) et DN (T5, T4 et M5) a débuté à partir de la troisième semaine. Pour les autres suspensions, elles sont restées à l'état de suspensions simples (planche 6 : A, B, C).

Après la quatrième semaine, des subcultures ont été réalisées en divisant le contenu cellulaire de chaque suspension sur deux nouveaux Erlenmeyer, puis dilués pour constituer deux nouvelles suspensions de 50 ml.

Les subcultures ont eu un effet favorable sur la croissance des suspensions. En effet, on a noté suite à la dilution un développement de globules dans la nouvelle suspension M3 (DN) et une forte augmentation du nombre de globules dans les suspensions AK (T1 et M1) et DN (T5 et M5).

À partir de la sixième semaine, certains globules se sont allongés et se sont transformés en structures bipolaires avec une très forte densité dans les T1 et M1 (AK) et en quantité moyenne dans les quatre suspensions T4 et M3 (DN) (planche 6 :D).

Pour le M4 (DN), la dilution a été contaminée après le renouvellement du milieu. Les suspensions du deuxième Erlen M4 et celles des deux Erlen T3 sont restées à l'état stationnaire, de suspensions brunâtres.

Après deux mois, une seconde subculture a été réalisée pour les suspensions T1 (AK) ce qui a conduit à la production de quatre suspensions, puis huit suspensions suite à une troisième subculture réalisée un mois plus tard. Les embryons ont été de tailles variables, de couleur beige opaque (planche 6 : E, F) qui est devenue jaune après dessiccation. Ils ont été individualisés pour la plus part, mais certains ont été accolés (planche 7 : A, B). Chaque suspension contenait en moyenne 360 embryons bipolaires.

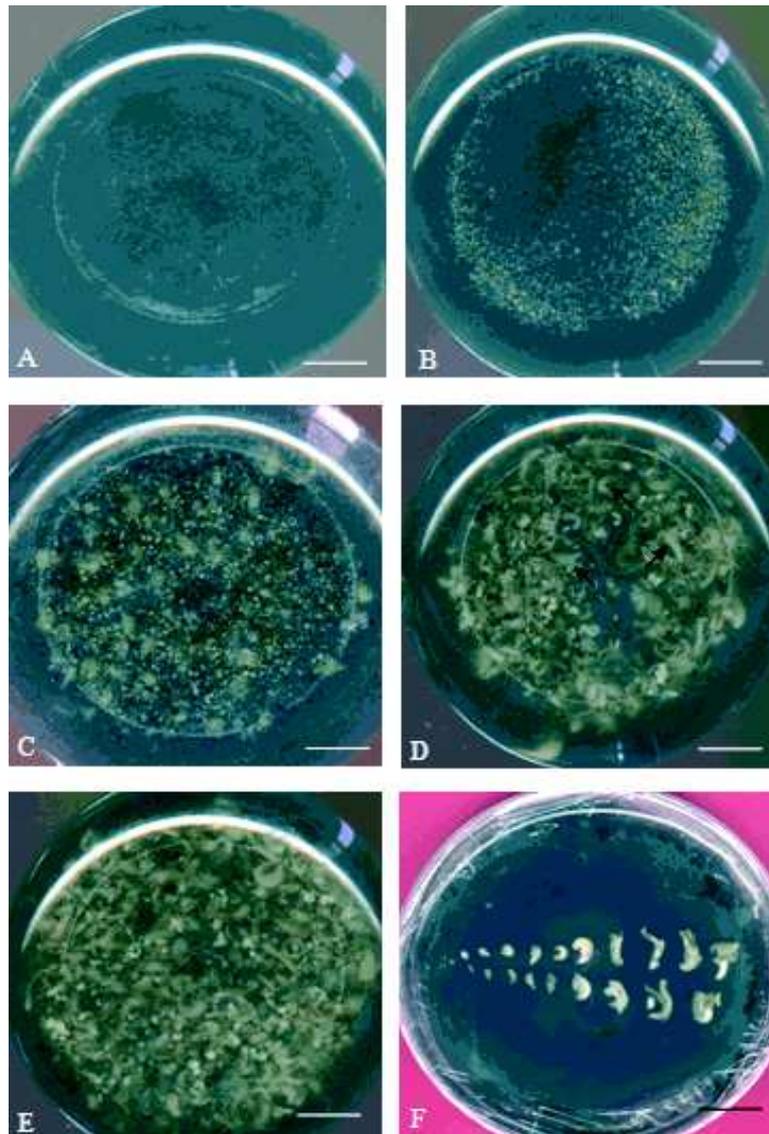
Par ailleurs, vers le troisième mois de culture, dans les suspensions T4 et M3 (DN), on a noté respectivement l'évolution de certains nodules en racines courtes et individuelles, et la formation d'un réseau de racines grêles et enchevêtrées (planche 7 : C).

## **2 - Les cultures conduites en système continu fermé**

---

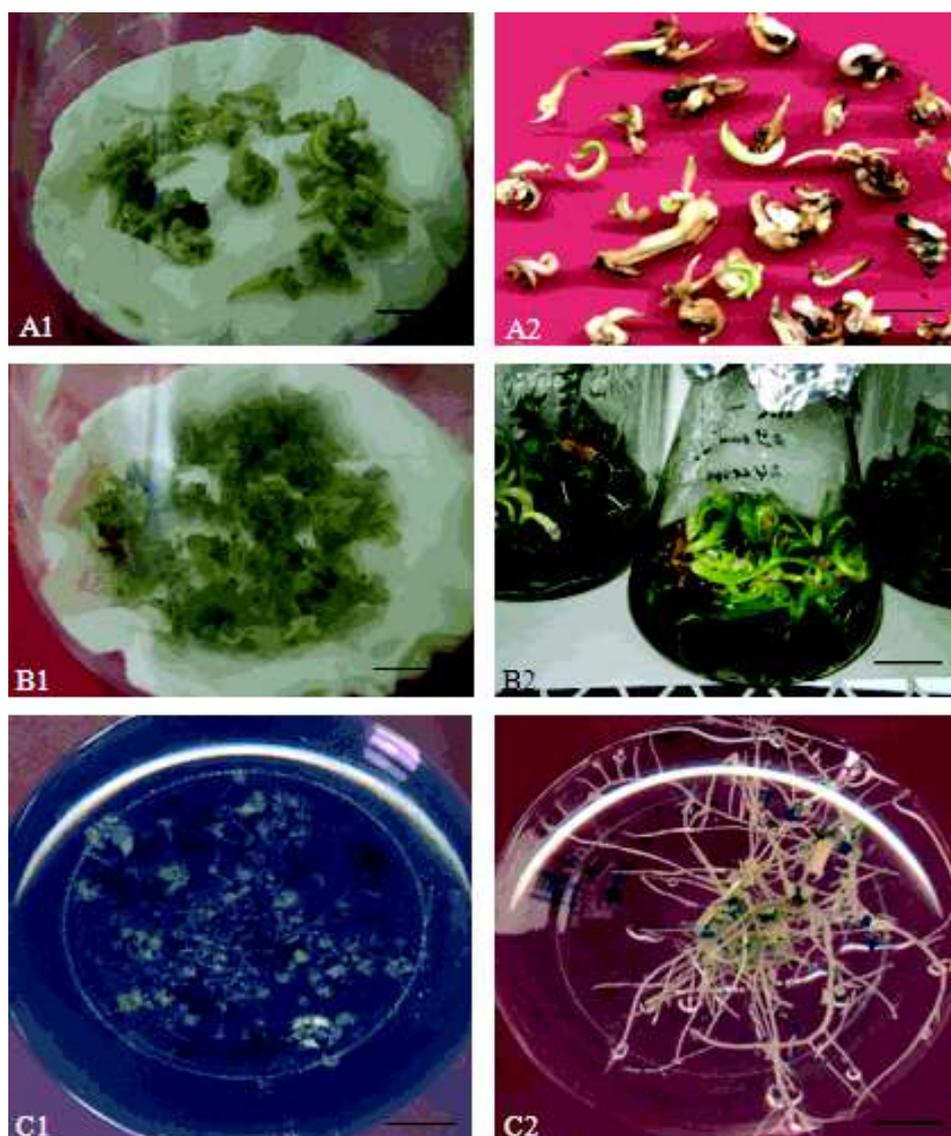
Les suspensions obtenues après trois mois de culture dans le système fermé, ont été pour certaines semblables à celles conduites dans le système continu ouvert (voir tableau 7).

En effet, les premiers globules ont été observés dans les suspensions T1 et M1 (AK) après environ vingt jours, puis dans les milieux T5, T4 et T3 (DN).



*Planche 6 : Induction de l'embryogenèse somatique en milieu liquide conduit en système continu ouvert, chez le cultivar AK de souche T1.*

- A : Initiation de la suspension (barre = 0,87 cm)**
- B : Nodules en prolifération (barre = 0,93 cm)**
- C : Apparition de globules après 3 semaines (barre = 0,77 cm)**
- D : Dilution et différenciation de quelques structures bipolaires (barre = 0,93cm)**
- E : Grand nombre d'embryons au stade structuré, à 2 mois (barre = 0,90 cm)**
- F : Étapes de différenciation des embryons somatiques depuis le stade globulaire au stade bipolaire (barre = 1,14 cm)**



*Planche 7 : Évolutions morphogénétiques des suspensions conduites en système continu ouvert.*

**A : Embryons somatiques de grande taille, simples et accolés (A1) en dessiccation (A2) germés (barre = 0,93 cm)**

**B : Embryons somatiques individualisés de petite taille (B1) en dessiccation (B2) régénérés (barre B1= 0,93 cm), (barre B2 = 1,75 cm)**

**C : Développement de racines (C1) racines courtes et individuelles dans le T4 (DN), (C2) réseau de racines enchevêtrées dans le M3 (DN) (barre C1= 0,77cm), (barre C2 = 0,83 cm)**

Le changement du milieu a été réalisé dans ce système après un mois sans que la densité cellulaire de départ ne soit modifiée.

Au cours du deuxième mois de culture, les suspensions M3 et M4 n'ayant présenté aucune évolution se sont contaminées. Par ailleurs, le maximum de globules des cultures T1 et M1 (AK) a évolué en structures bipolaires.

Les nodules de la souche T5 se sont fortement amplifiés et aucun embryon structuré n'a été observé.

Les suspensions T3, T4 et M5 (DN), quant à elles ont été très hétérogènes (planche 8-I : A). Elles ont été composées de globules et de quelques embryons bipolaires ainsi que de certains petits nodules évolués en racines qui ont remonté en surface dans la suspension T3 (planche 8-I : B).

Des racines enchevêtrées se sont développées plus tard dans la suspension M5.

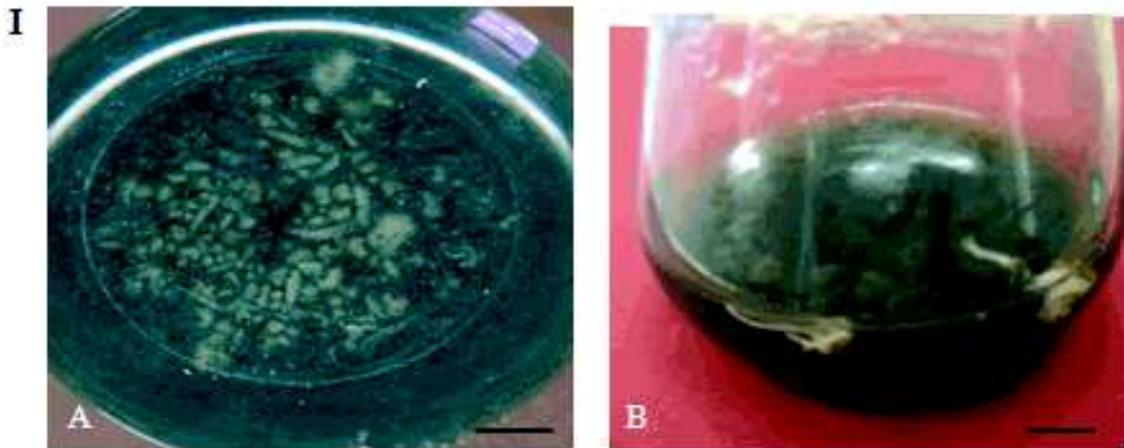
Au début du troisième mois de culture, le milieu T1(AK) qui contenait des embryons bipolaires et le milieu T5 (DN) qui ne portait que des nodules, ont été filtrés puis rincés par du milieu liquide neuf, ainsi de nouvelles suspensions limpides ont été obtenues.

Dans la nouvelle suspension T1 (AK), il y a eu après deux semaines la néoformation d'un nombre indéfini de nouveaux globules au fond de l'Erlen qui ont évolué par la suite en embryons somatiques bien structurés.

L'observation de la suspension embryogène T1 (AK) au microscope inversé, a permis de distinguer deux types de cellules : des cellules rondes de petite taille (normalement embryogènes) et des cellules allongées de grande taille. Ces cellules ont été soit isolées, ou groupées (planche 8-II).

Les nodules du T5 passés en dessiccation puis transférés sur des milieux de régénération n'ont donné que des racines (planche 9 : A). Par contre les embryons du T1 ont évolué en vitroplants complets.

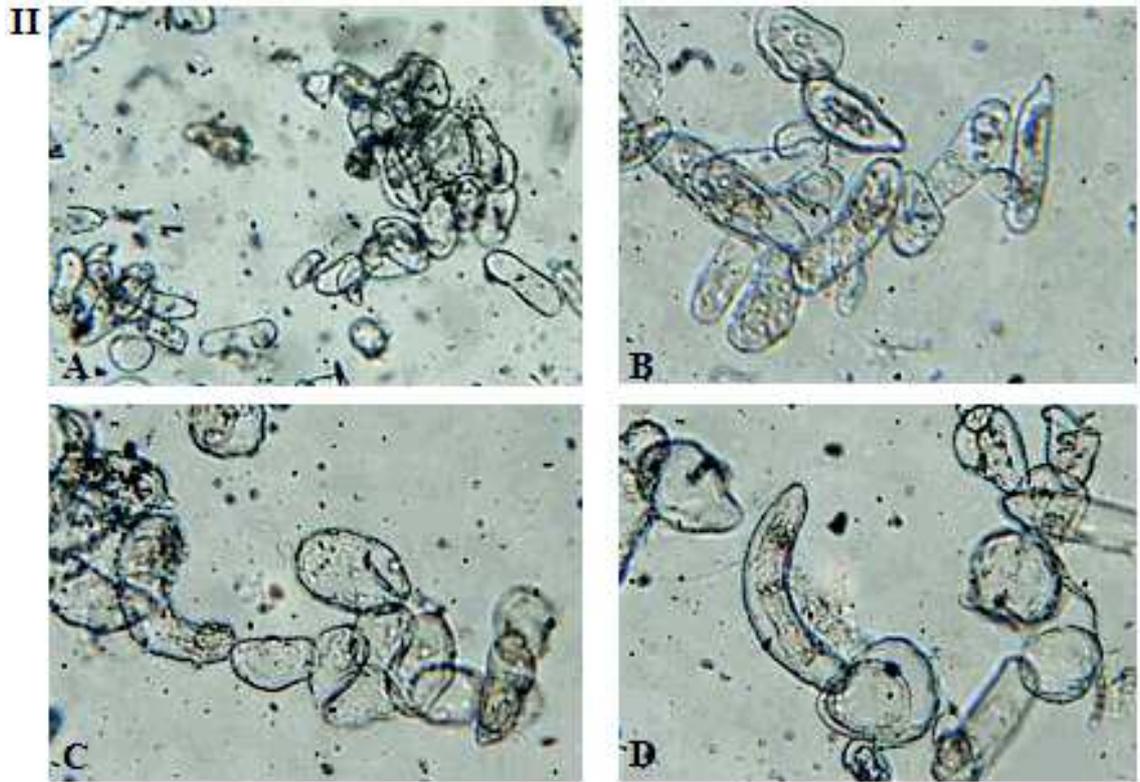
En outre, les structures allongées retirées du T3 et repiquées sur les milieux de régénérations, ont présenté soit un blocage de croissance soit un enracinement (planche 9 : B).



*Planche 8, I : Suspensions conduites en système de culture continu fermé.*

**A : Suspension hétérogène formée de nodules et de quelques structures bipolaires (barre = 0,9 cm)**

**B : Nodules évolués en racines qui flottent sur le milieu (T3 DN) (barre = 1,2 cm)**



*Planche 8, II : Observation des suspensions embryogènes T1 (AK) sous microscope inversé (G x 400)*

- A : Amas compact de cellules;**
- B : Amas de cellules allongées;**
- C : Amas de cellules petites et rondes;**
- D : Cellules individuelles rondes et allongées;**



Planche 9 : Évolution des suspensions conduites en système de culture continu fermé.

**A** : Nodules de la suspension T5 de plus de 2 mois (A1) en dessiccation, (A2) évolués en racines sur les milieux de régénération (barre A1 = 0,87 cm), (barre A2 = 2,4 cm)

**B** : Structures allongées retirées de la suspension T3 (DN), (B1) en dessiccation, (B2) croissance bloquée ou évolution en racines (barre B1= 1,1 cm), (barre B2= 3,3 cm)

### 3 - Les cultures conduites en système « batch »

Sur l'ensemble des essais placés en système batch, seulement T1, M1 (AK) et M4 (DN) ont développé des masses globulaires vers la fin de la troisième semaine de culture (voir tableau 7).

Après un mois, toutes les suspensions ont été filtrées au travers d'un tissu de maille très fine (voile préalablement autoclavé). Les masses cellulaires retenues, ont été placées en dessiccation puis étalées sur les milieux de régénération MS et ½ MS (planche 10 : A).

Durant les trois mois qui ont suivi le transfert, aucune évolution n'a été constatée pour les produits des suspensions T5, T4, M5 et M3 (DN).

Par contre, plusieurs globules se sont différenciés simultanément pour les cultures T1, M1 (AK) et M4 (DN) (planche 10 : B).

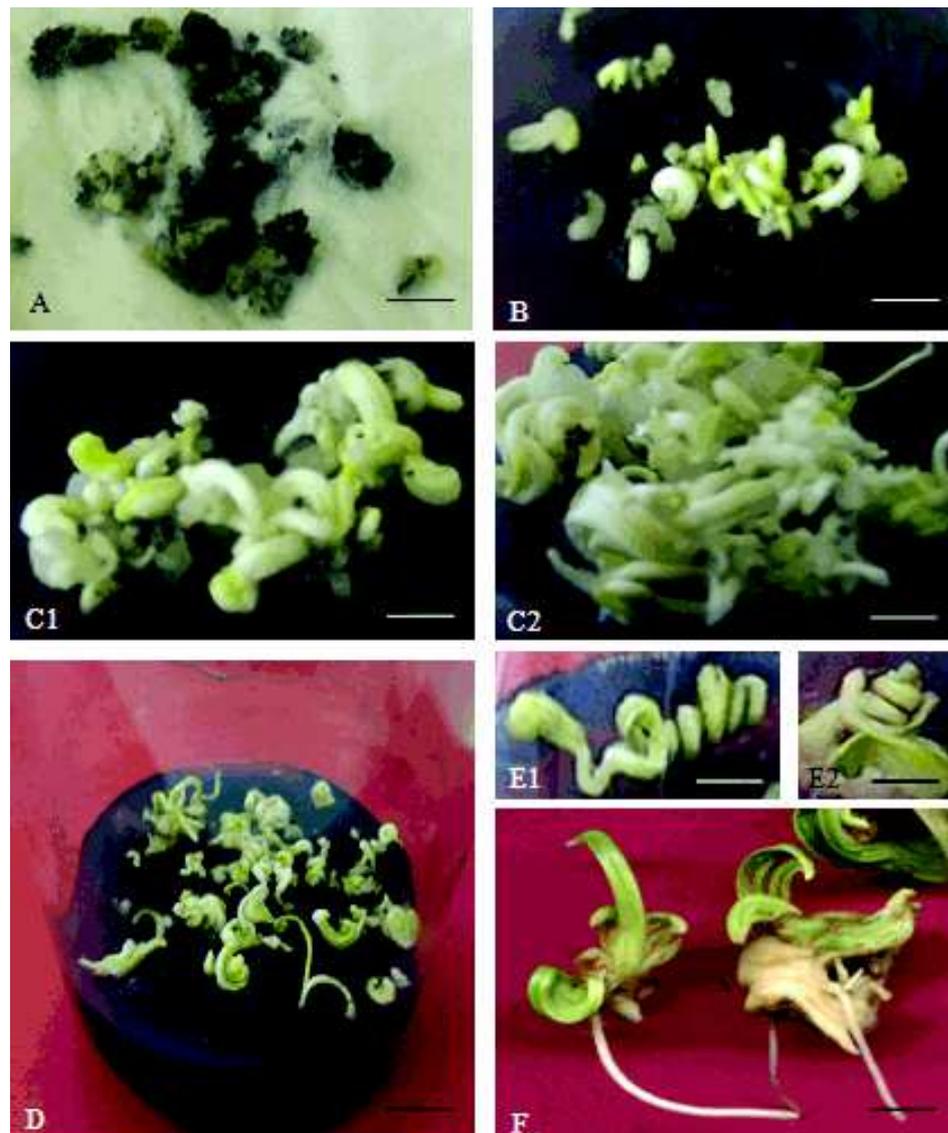
En effet, au bout de dix jours, les globules sont devenus blancs opaques et ont commencé à s'allonger vers la troisième semaine après l'étalement (planche 10 : C). Ces structures allongées ont été des embryons bipolaires, qui après un mois ont germé en émettant une pousse verte et une racine (planche 10 : D, F).

La radicule des embryons en germination sur le milieu MS solide, au lieu de pénétrer dans le milieu, est restée en surface et s'est enroulée sur elle-même ou sur l'embryon (planche 10 : G). Ainsi pour un meilleur développement, les embryons ont été repiqués le mois suivant sur le même milieu MS mais de consistance semi solide (par l'utilisation de 3 g/l d'agar au lieu de 7g/l).

Certain embryons sont devenus hyperhydriques et n'ont plus évolué, d'autres ont donné naissance à de nouveaux nodules par embryogenèse secondaire (planche 11 : A, B). Cela a conduit à la formation de plusieurs pousses (3 à 4) à partir d'un seul embryon primaire. Les pousses ont été reliées entre elles au niveau du pôle radiculaire, et elles ont

été séparées par la suite par des pinces lors du repiquage (planche 11 : C).

Le phénomène de l'embryogenèse secondaire s'est poursuivi même après la régénération. En effet, on a observé le développement de nouveaux embryons secondaires globuleux et translucides après la différenciation des premiers embryons secondaires. Ces derniers, se sont allongés et sont devenus blancs opaques.



*Planche 10 : Évolution de la masse cellulaire de la suspension M4 (DN) conduite en système batch, puis étalée sur milieux de régénération.*

**A** : Masse cellulaire retirée de la suspension et placée en dessiccation (barre = 0,6 cm)

**B** : Différenciation des globules en structures allongées blanches et opaques, dix jours après étalement (barre = 0,6 cm)

**C** : Évolution du matériel végétal (C1) après trois semaines de l'étalement, (C2) après cinq semaines de l'étalement (barre = 0,4 cm)

**D** : Germination des embryons somatiques (barre = 1,5 cm)

**E1-E2** : Détails d'embryons enroulés, germés sur milieux de régénération solide (barre = 0,3 cm)

**F** : Embryons somatiques avec une pousse verte et une racine développée sur milieu semi-solide (barre = 0,9 cm)



*Planche 11 : Embryons somatiques primaires et secondaires régénérés à partir des suspensions cultivées en batch puis étalés sur milieux de régénération chez le cultivar Ak.*

**A : Embryons somatiques hyprhydriques et blancs opaques avec embryons secondaires (barre = 0,87 cm)**

**B : Détail de l'embryogenèse secondaire (B1) embryons secondaires blancs opaques à partir d'un embryon primaire (B2 et B3) nombre indéterminé d'embryons secondaires globulaires et translucides formés sur les deux faces d'un embryon primaire en germination (barre = 0,4 cm)**

**C : Pousses enracinées (C1) reliées ente elles par le pôle radriculaire, (C2) séparées (barre = 1,5 cm).**

Ainsi les embryons nouveaux ont présenté un développement asynchrone, dont certains se sont différenciés. Aussi bien les embryons primaires que les embryons secondaires, ont évolué en plantules accolées (planche 12).

---

### III - Régénération des embryons somatiques

#### 1 - Régénération après passage par le milieu liquide.

---

Cette partie de l'expérimentation, a consisté en la régénération d'embryons somatiques sur quatre milieux de germination sans hormones de croissance : MS,  $\frac{1}{2}$  MS,  $\frac{1}{4}$  MS et KNOP, en vue de définir l'effet de la composition minérale du milieu sur la croissance et le développement des embryons somatiques.

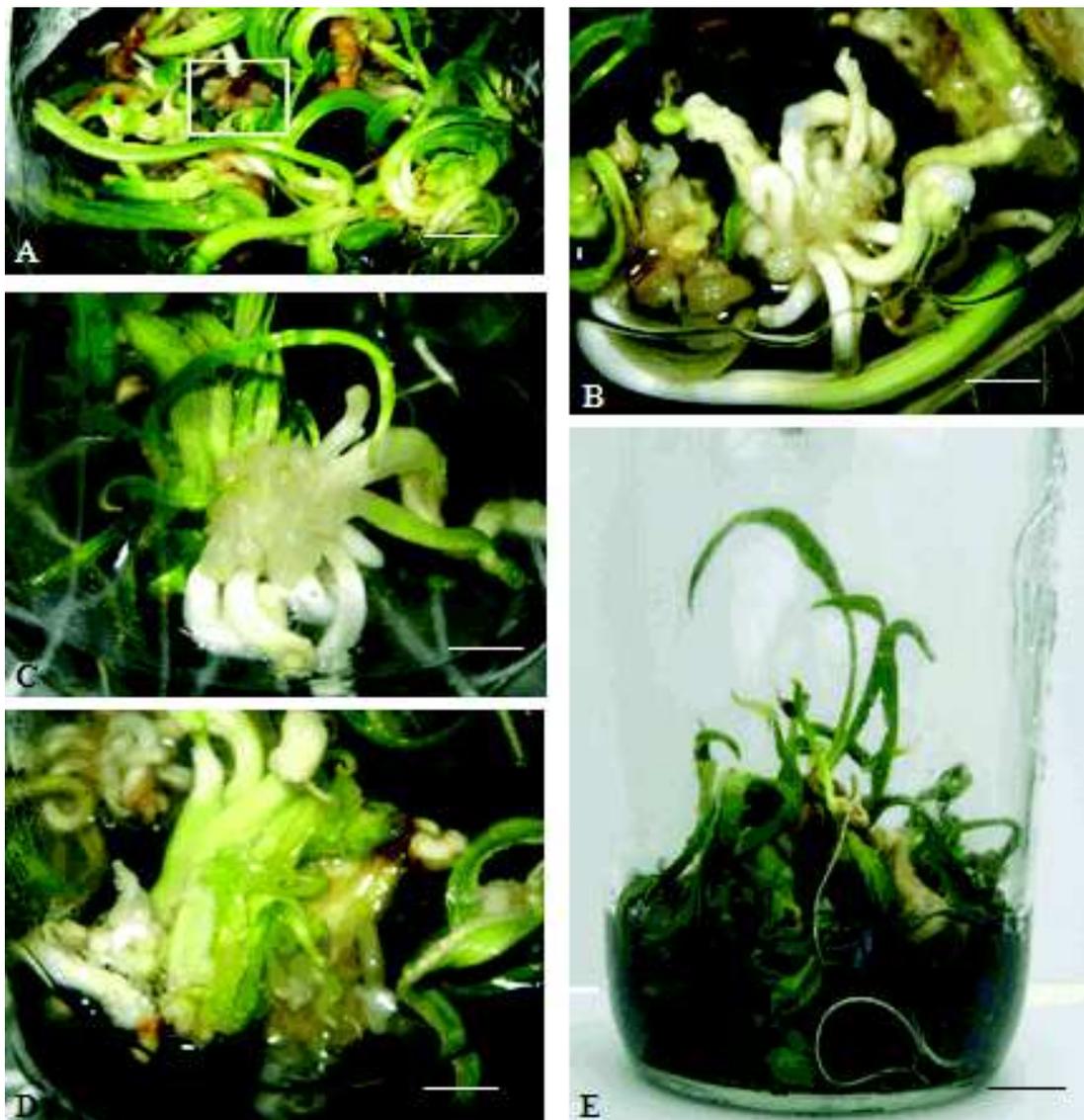
Pour cela, 180 embryons somatiques de structure bipolaire appartenant au cultivar Akerbouch, et provenant tous d'une même suspension T1 conduite en système continu ouvert durant huit semaines, ont été placés pendant 3 jours en dessiccation puis repiqués dans les quatre milieux de régénération.

La dessiccation a consisté au placement des embryons dans des Erlen contenant suffisamment de papier absorbant (l'ensemble préalablement passé à l'autoclave). Cinq mesures de poids frais réalisées avant et après dessiccation d'échantillons d'un poids variant entre 4 et 7g, ont indiqué une réduction moyenne du poids frais initial de 25,33% après trois jours de dessiccation.

En général, le pôle caulinaire s'est développé en premier, entre la troisième et la sixième semaine du repiquage sur les milieux de régénération. Une fente au niveau de l'embryon laissait apparaître la gemmule, plus tard lorsque l'embryon a développé ses premières ébauches foliaires, s'est formée l'ébauche racinaire. Les embryons somatiques par la suite, ont évolué normalement en plantules enracinées (planche 13).

Le suivi de la conversion des embryons somatiques en vitroplants sur les quatre milieux étudiés a été achevé après trois mois de culture.

Les résultats de l'analyse de la variance effectuée avec les paramètres de régénération (vitroplants complets et uniquement la pousse feuillée) ont montré qu'il y a des différences très hautement significatives entre les milieux au seuil de 5% (Annexe 12).



*Planche 12 : Embryogenèse secondaire après régénération des embryons primaires en vitroplants.*

**A :** Embryons secondaires globulaires et translucides à la base de la pousse feuillée (barre = 0,7 cm)

**B :** Maturation des embryons somatiques qui deviennent blancs opaques et leur différenciation en structures allongées (barre = 0,6 cm)

**C :** Formation de nouveaux embryons secondaires globulaires et translucides, après différenciation des premiers embryons formés (barre = 0,6 cm)

**D et E :** Développement asynchrone de vitroplants accolés à travers une embryogenèse primaire mêlée à une embryogenèse secondaire (barre D= 0,6 cm) (barre E= 1,7 cm)



*Planche 13 : Croissance et développement des embryons somatiques en vitroplants complets.*

**A : Embryons somatiques de structure bipolaire (barre = 0,2 cm)**

**B1 et B2 : Apparition de la gemmule sur les embryons somatiques (barre = 0,25 cm)**

**C : Croissance et développement de l'ébauche foliaire et de l'ébauche racinaire (barre = 2cm)**

**D : Vitroplant complet (barre = 2,4 cm)**

La comparaison des milieux composés par les minéraux MS à différentes concentrations, a montré qu'il n'y a pas de différences entre eux au seuil de 5% pour leurs effets sur la régénération.

Les pourcentages de vitroplants complets obtenus sur ces milieux ont varié entre 40% et 33.33%, aussi les pourcentages d'embryons ayant seulement émis une pousse feuillée ont été compris entre 20% et 24.44% (figure 22).

A partir de ces résultats on peut déduire qu'il n'existe pas de différence dans les effets des milieux MS,  $\frac{1}{2}$  MS et  $\frac{1}{4}$  MS sur la régénération. Cependant, une observation plus minutieuse des vitroplants, nous a permis de constater qu'une meilleure vigueur des vitroplants a été obtenue sur le milieu  $\frac{1}{2}$  MS (planche 14).

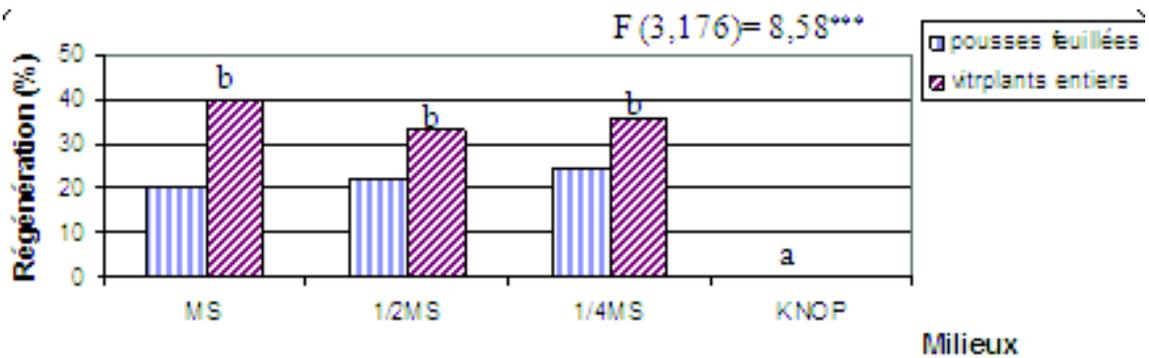
**Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmier dattier (cultivars Deglet Nour et Akerbouch) en vue de la résistance contre le Bayoud.**

Par ailleurs, les trois milieux ont conduit à 11,11% d'enracinement des embryons sans développement des parties aériennes (figure 23).

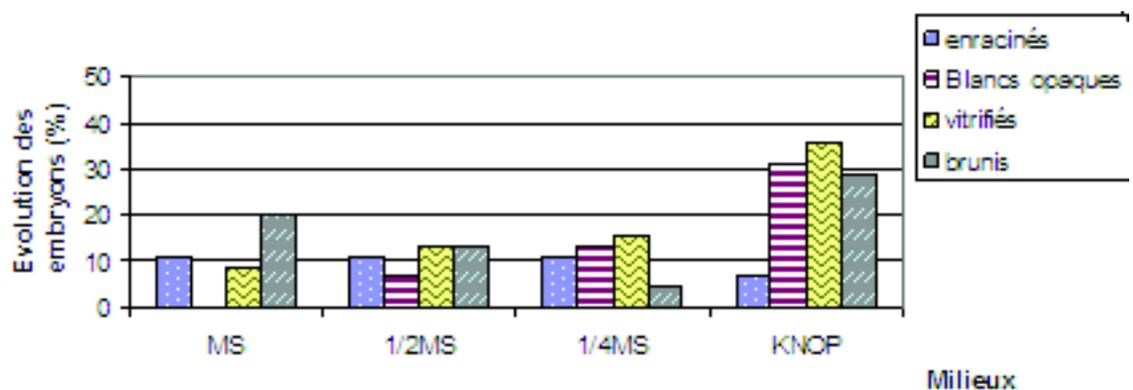
En ce qui concerne les embryons brunis, les pourcentages obtenus après trois mois de culture ont été respectivement de 20%, 13.33% et 4.4% sur les milieux MS, 1/2 MS et 1/4 MS. On a remarqué que plus la concentration minérale du milieu est élevée, plus le brunissement des embryons devient plus important. Par ailleurs, les résultats ont révélé que sur le milieu MS complet, les embryons qui n'ont pas germé ont brunis aussitôt, contrairement aux milieux 1/2 MS et 1/4 MS où les embryons blancs opaques se sont bien maintenus, même après trois mois de culture.

Pour ce qui est de la vitrification des embryons somatiques, ce phénomène a été observé dans tous les milieux de régénération étudiés, très accentué dans le milieu KNOP et sensiblement variable sur les différents milieux MS. Aussi, on a constaté que plus le milieu est dilué, plus le taux de vitrification est élevé.

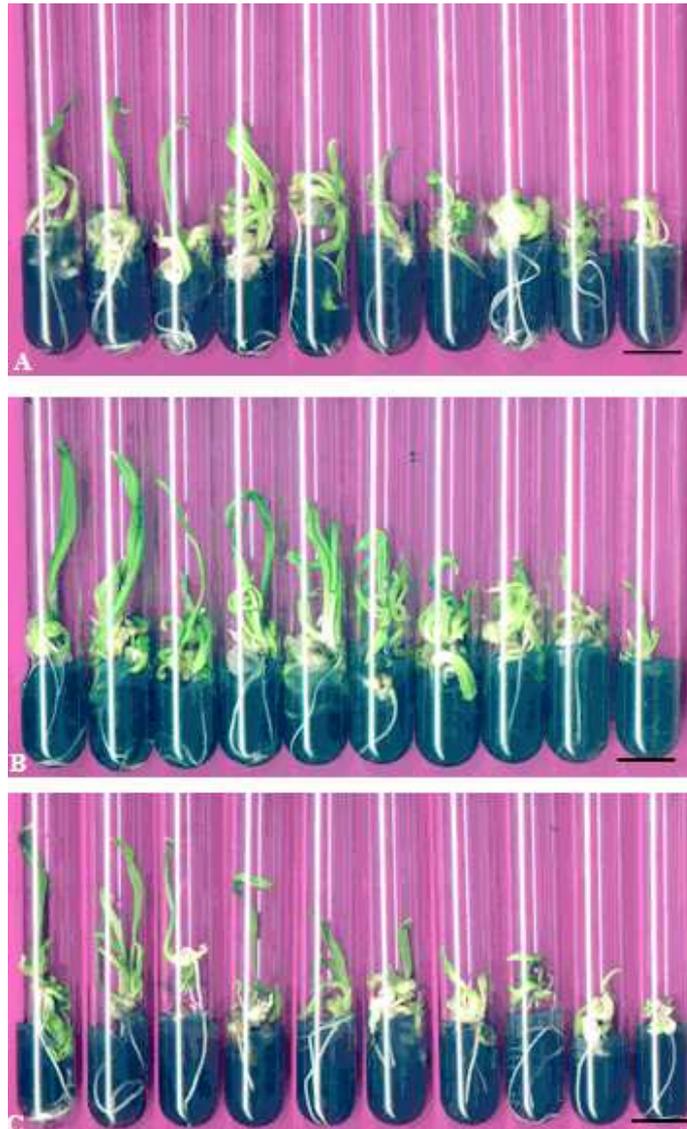
Après les trois mois de culture dans les différents milieux de régénération MS, les pousses feuillées, les embryons restés blancs opaques, vitrifiés et ceux ayant seulement développé la partie radriculaire, ont été transférés sur un milieu 1/2 MS de même composition que le milieu de régénération, mais avec 0.1 mg/l d'ANA et 0.05 mg/l de BAP. Les hormones ont été additionnées au milieu, afin de favoriser l'enracinement des pousses feuillées et la réactivité des embryons n'ayant pas germés.



**Figure 22 :** Effet de la composition minérale du milieu de culture sur la régénération des embryons somatiques (vitroplants complets et pousses feuillées) après trois mois.



**Figure 23 :** Effet de la composition minérale du milieu de culture sur l'évolution des embryons (enracinés, vitrifiés, blancs opaques et brunis) après trois mois.



*Planche 14 : Comparaison de la vigueur des vitroplants obtenus sur les trois milieux de régénération MS, ½ MS et ¼ MS (barre = 2 cm)*

**A : Vitroplants obtenus sur les milieux MS;**

**B : Vitroplants obtenus sur les milieux ½ MS;**

**C : Vitroplants obtenus sur les milieux ¼ MS**

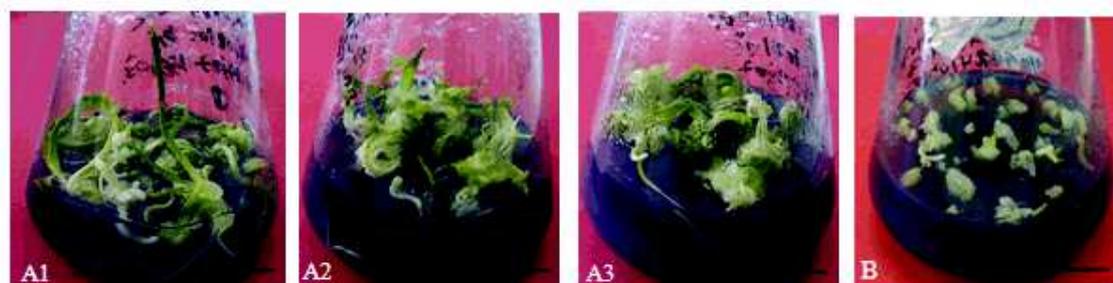
Dès la fin de la première semaine de repiquage on a noté un développement très important des pousses, l'apparition des pointes de racines, ainsi qu'une embryogenèse secondaire intense qui s'est installée parfaitement à la troisième semaine de culture. Par contre aucune reprise des embryons vitrifiés n'a été enregistrée (tableau 8 et planche 15).

Ainsi, l'addition de 0.1 mg/l d'ANA et 0.05 mg/l de BAP au milieu de régénération ½ MS a conduit à l'enracinement de 17 vitroplants sur un totale de 30 pousses feuillées, soit un pourcentage d'enracinement de 56%.

**Tableau 8 : Évolution des pousses feuillées, des embryons somatiques blancs, vitrifiés et enracinés après un mois de leurs transfert sur milieu ½ MS avec hormones de croissance.**

**Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmier dattier (cultivars Deglet Nour et Akerbouch) en vue de la résistance contre le Bayoud.**

Milieu initial de régénération	Nombre et type de matériel végétal	Évolution
MS	9 pousses feuillées	Formation de 5 vitroplants et une très forte embryogenèse secondaire formant des touffes feuillées.
	5 embryons enracinés 4 embryons vitrifiés	Brunissement des embryons vitrifiés et enracinés.
½ MS	10 pousses feuillées	Formation de 3 vitroplants complets.
	5 embryons enracinés 3 embryons blancs opaques 6 embryons vitrifiés	Pas d'évolutions des embryons enracinés. Le reste des embryons s'est vitrifié ou a bruni.
¼ MS	11 pousses feuillées	Formation de 9 vitroplants.
	5 embryons enracinés 6 embryons blancs opaques. 7 embryons vitrifiés	Germination d'un embryon accompagnée d'une embryogenèse secondaire. Brunissement et vitrification du reste des embryons.



*Planche 15 : Pousses feuillées et embryons vitrifiés du cultivar AK, transférés sur les milieux de régénération enrichis en régulateurs de croissance (résultats après un mois) (barre = 1,6 cm)*

**A1, A2 et A3 : Enracinement des pousses feuillées;**

**B : Embryons somatiques vitrifiés sans évolution.**

## **2 - Régénération sans passage par le milieu liquide :**

Deux souches de cals T1 et M1 du cultivar AK, ainsi que six souches T5, T4, T3, M5, M4 et M3 du cultivar DN, ont été repiqués à partir des milieux d'initiation directement vers les milieux MS et ½ MS semi solides dépourvus de régulateurs de croissance.

Le transfert de tous les types de cals, sur les milieux de régénération et sous une photopériode de 16h, a permis leur amplification.

Sur les cals fibreux T3 (DN) sont apparues des racines blanches (planche 16 :A). Sur les cals M1 (AK) des deux milieux MS et ½ MS ainsi que sur les cals T1 (AK) du milieu ½ MS, après environ dix semaines, il y a eu le développement de pousses vertes qui ont évolué par la suite en touffes feuillées enracinées. Par ailleurs, il était difficile de distinguer la voie de régénération qui semblait être une organogenèse plutôt qu'une embryogenèse somatique. En effet les pousses ont pris directement naissance à partir des cals, et sont apparus au départ sous forme de folioles, en outre, aucune structure embryogène n'a été observée. Les autres cals n'ont exprimé aucune régénération, mais ils se sont amplifiés fortement (planche 16).



*Planche 16 : Régénération sans le passage par le milieu liquide.*

**A : Enracinement des nodules des cals fibreux T3 (DN) sur le MS (barre= 1,8 cm)**

**B : Néof ormation de bourgeons à partir des cals granuleux légèrement bruni T1(AK) sur le MS (barre = 1,7 cm)**

**C : Développement d'ébauches foliaires à partir des cals granuleux M1 (AK) cultivés sur le ½ MS (barre = 1,5 cm)**

**D, E, et F : Croissance de touffes feuillées qui s'enracinent (barre D et E = 1,8 cm), (barre F= 1,5 cm).**

# DISCUSSIONS

## I - Initiation et prolifération des cals chez les deux cultivars DN et AK

L'étude menée durant la première partie concernant l'initiation et l'amplification des cals, nous a révélé que l'effet de la composition hormonale et minérale du milieu de callogenèse chez le palmier dattier est fortement lié au génotype. En effet, les deux cultivars DN et AK se sont comportés différemment vis-à-vis des deux facteurs étudiés.

L'induction de la callogenèse pour la régénération de plants par la voie de l'embryogenèse somatique chez plusieurs cultivars de palmier dattier, à partir d'explants de cœur de rejet, a été étudiée par plusieurs chercheurs : SAKA *et al.* (1989 et 1997), YADAV *et al.* (2001), SAID *et al.* (2001) et ESHRAGHI *et al.* (2005). Ils ont ainsi démontré de grandes différences dans les capacités d'initiation des cals entre les cultivars.

### 1 - Induction de la callogenèse

---

#### 1.1 - Effet de la composition hormonale des milieux de culture

Le temps de réponse à la callogenèse a varié entre un et cinq mois selon les traitements et indépendamment des cultivars. Les explants ayant réagi dès le premier mois de culture ont été ceux cultivés sur les milieux dont le rapport 2,4-D/BAP est égal à un dans le T1, T6, M1 et M6 chez DN, et dans le T1, M1 et M6 chez AK. Par contre, avec le traitement 100 mg/l de 2,4-D, la callogenèse s'est révélée plus tardivement avec une augmentation nette et rapide du nombre d'explants réactifs vers le cinquième mois de culture.

Chez le palmier dattier, le temps de réponse à la callogenèse est long et peut nécessiter jusqu'à huit mois de culture (MATTER, 1986). En outre, SAKA (1996) et SAKA *et al.* (1997) ont indiqué que cette durée a été variable d'un cultivar à l'autre, elle a été surtout dépendante du génotype et du type d'explant, ainsi que de la concentration de 2,4-D utilisée (EL HADRAMI, 1995).

En effet, certains auteurs ont signalé l'initiation des cals dès le premier mois de culture (YADAV, 2001), d'autres au deuxième (SHARON et SHANKAR, 1998; MOHAMED *et al.*, 2001) ou au troisième mois de culture (AL KHAYRI, 2001).

Dans nos conditions de culture, les différents équilibres hormonaux 2,4-D/BAP utilisés (1/1, 5/1, 10/1, 50/1, 100/1, 5/5) ont conduit chez le cultivar DN à des taux de réactivité rapprochés et ceci dans les milieux MS simples (T) ou MS modifiés (M). Les pourcentages de callogenèse ont varié entre 60% et 100% dans les milieux MS simples, et entre 25% et 60% dans les milieux contenant les additifs.

Ces résultats concordent avec ceux de SAKA *et al.* (1997) qui ont rapporté que l'utilisation du 2,4-D aux doses de 12,5 mg/l; 25 mg/l; 37,5 mg/l associés à 1 mg/l de 2ip et 100 mg/l de 2,4-D avec 3 mg/l de 2ip a conduit chez le cultivar Tinasseur, à des taux de callogenèse similaires, quelque soit la concentration de 2,4-D utilisée. Aussi, MOHAMED

---

et *al.* (2001), en comparant 10 et 50 mg/l de 2,4-D lorsque associés à 3 mg/l de 2iP ont obtenu des pourcentages de callogenèse équivalents, avec des valeurs respectives de 50 et 58% chez le cultivar Sewi.

Chez AK par contre, la composition hormonale a influencé de façon significative l'initiation de la callogenèse que ce soit en présence ou en l'absence d'additif dans les milieux. L'utilisation des équilibres 2,4-D/BAP égaux à 5/5 (dans T6 et M6) et 1/1 (dans T1 et M1) ont permis les plus hauts pourcentages (moyennes entre T et M) qui ont été respectivement de 76,36% et 68,18%.

EL HADRAMI et *al.* (1995) ont rapporté que, lorsque le rapport auxine/cytokinine est égal à un, et particulièrement quand la 2iP est remplacé par du BAP, l'induction de la callogenèse est augmentée.

Ces mêmes auteurs ont publié trois recherches sur l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier, dans lesquelles ils ont utilisé 5mg/l de 2,4-D associé à 5 mg/l de BAP pour l'initiation des cals (EL HADRAMI et *al.*, 1995; 2000 et 2007). Les résultats obtenus dans la première publication, ont été de 89% de réactivité chez le cultivar Iklane et de 92% chez le cultivar Jihel.

Les premières études sur l'obtention de cals embryogènes chez le palmier dattier, ont démontré la nécessité de l'utilisation de fortes concentrations de 2,4-D allant jusqu'à 100 mg/l (ZAID et TISSERAT, 1983). Effectivement, le protocole préconisé par TISSERAT en 1979, qui a consisté en l'utilisation de 100 mg/l de 2,4-D associé à 3 mg/l de 2iP, a été repris par plusieurs laboratoires commerciaux de multiplication du palmier dattier (in LOUTFI et EL HADRAMI, 2004) ainsi que par plusieurs chercheurs dont VERRAMENDI et NAVARRO (1997), AL KHAYRI (2001, 2002, 2003), AL KHAYRI et EL BAHRY (2004), EKE et *al.* (2005) et ESHRAGHI et *al.* (2005).

L'utilisation de 100 mg/l de 2,4-D, a conduit à 80% de callogenèse sur le milieu T5 chez DN, ainsi qu'à un pourcentage moyen de 62,5% chez le cultivar AK. Cependant, selon nos résultats, il est également possible d'obtenir 100% de callogenèse en réduisant la concentration du 2,4-D à 50 mg/l, cela chez le cultivar DN dans le T4.

CHEIKH et *al.* (1989) ont rapporté la possibilité d'obtenir une meilleure callogenèse en réduisant la concentration d'auxine à 50%. Ils ont, en effet, comparé chez le cultivar Iklane trois milieux contenant 100, 50 et 10 mg/l de 2,4-D associés à 3 mg/l de 2iP. Les résultats étaient de 80,95% de callogenèse avec 50 mg/l de 2,4-D, contre 54,54% et 41,17% respectivement sur les milieux contenant 100 et 10 mg/l de 2,4-D.

Concernant la concentration de 10 mg/l de 2,4-D associé à 1 mg/l de BAP dans les milieux T3 et M3, le pourcentage obtenu a été de 100 % chez DN sur le T3 alors qu'il a été de 9,09% chez AK. L'effet génotypique ressort parfaitement dans ce cas, mais il ne faut pas oublier un autre facteur qui est celui du type d'explant (dans notre expérimentation le paramètre type d'explant n'a pas été pris en considération à cause du matériel végétal).

Selon SAKA et ABED (1989) la nature de l'explant influe sur la callogenèse. Les apex, la base des feuilles et les bourgeons végétatifs avec ébauches foliaires produisent plus de cals que les folioles et le stipe. Ceci a aussi été démontré par CHABANE (1995) et par FERGANI (1998).

Les milieux contenant les rapports 2,4-D/BAP égaux à 5/1 et 1/1, ont aussi conduit à une initiation de cals. Les pourcentages ont été supérieurs à 40% chez DN, et ont été de 23,57% dans T2 et M2 et de 68,18 % dans T1 et M1 chez AK.

MEGUELLATI (2005), a mentionné que l'emploi du 2,4-D aux doses de 1, 2, 4, 6 mg/l en combinaison avec 3 mg/l de 2ip s'est révélé très efficace pour l'induction de la callogenèse, vis-à-vis des différents explants du cœur de rejet du cultivar Deglet Nour. Selon le même auteur, la substitution des 3 mg de 2ip par 0,5 mg/l de BAP, a conduit à une initiation de cals mais dont l'effet a été dépendant du type d'explant utilisé.

Par ailleurs, FKI et *al.* (2003), ont démontré la possibilité d'induire des cals embryogènes à partir d'explants foliaires de rejets Deglet Nour, par l'utilisation de 0,5 mg/l de 2,4-D.

Les explants n'ayant pas réagi ont brunis. Le phénomène de brunissement a été observé chez les deux cultivars mais essentiellement chez Ak sur les milieux T4, T3, M2, M3 et M4 ainsi que sur les milieux témoins T0 et M0.

Afin de cerner l'effet des différents équilibres hormonaux, le charbon actif a été utilisé en rapport avec le 2,4-D à raison de 3g pour 100mg de 2,4-D (CHEIKH et *al.*, 1989). En effet le charbon actif, en plus de l'adsorption des polyphénols, serait capable selon HOCHER et *al.* (1997) d'adsorber certains composés du milieu de culture dont les hormones exogènes (2,4-D, BAP). Selon ces auteurs, une équipe de l'ORSTOM/CIRAD-CP ont développé en 1993, une méthode de dosage des hormones de croissance de types auxines et cytokinines par HPLC dans les milieux de cultures. Les résultats ont révélé des taux d'adsorption importants selon les types de charbon actif utilisé.

Cependant, malgré l'utilisation du charbon actif dans tous les milieux, les brunissements se sont manifestés. Cet obstacle pourrait être surmonté par le prétraitement des explants avec une solution antioxydante après désinfection du matériel végétal (AITCHITT, 1989). TISSERAT (1979) a proposé une immersion des explants dans une solution composée de 150mg/l d'acide ascorbique et de 100 mg/l d'acide citrique.

## **1.2 - Effet des additifs aux milieux de culture**

Peu de chercheurs ont étudié l'effet de la composition minéral sur l'induction de la callogenèse chez le palmier dattier. Le milieu MS a été utilisé avec parfois certains additifs qui ont fait l'objet d'une application directe sans étude comparative tel que TISSERAT et DEMASON (1980) par l'addition de 170 mg/l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Cet additif a été repris par AL KHAYRI (2001 et 2002) ainsi que par SAKA et ABED (1989) mais additionné de 100mg/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Ce dernier élément, a aussi été utilisé par FKI et *al.* (2003) à la dose de 120 mg/l.

En outre, le nitrate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) est un sel particulièrement efficace dans la stimulation des phénomènes d'organogenèse et d'embryogenèse (NORREEL, 1975 in CHABANE, 1995). Par ailleurs, les composés phosphorés en forme de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sont des composés structuraux fondamentaux de la matière vivante, en particulier sous forme de nucléoprotéines (CHABANE, 1995). En effet, FERGANI (1998), a révélé que l'adjonction du  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à 170 mg/l a permis une rapidité dans la formation des cals (2 à 5 mois) et une amélioration des pourcentages et de la nature callogène de certains explants peu réactifs. Tandis que CHABANE (1995), a rapporté que l'utilisation d'un milieu contenant 100 mg/l de glutamine est plus favorable à la callogenèse qu'un milieu contenant du  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

Dans notre cas l'utilisation des milieux M contenant les additifs  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  n'a amélioré ni les pourcentages de callogenèse ni la durée de réactivité des explants.

---

Effectivement, les meilleurs pourcentages de callogenèse chez DN ont été obtenus sur les milieux T avec un pourcentage moyen de 63,63%. Par ailleurs, la composition minérale n'a conduit à aucune différence significative dans les pourcentages de réactivité des explants du cultivar AK.

## 2 - Développement des cals en milieux d'initiation

---

Bien que les cals aient présenté des caractères communs entre les deux cultivars (couleur beige et structure friable ou avec petits agrégats), on a remarqué des différences notables.

En effet, le cultivar DN a permis une prolifération de cals essentiellement à texture mixte (cals granuleux recouverts en partie par des nodules) par contre le cultivar AK a principalement conduit au développement de cals granuleux.

Les types de cals obtenus dans les recherches publiées, ont varié de compacts à friables, de granuleux à nodulaires, certains même ont rapporté la présence de globules (premier stade de développement des embryons) sur les cals en milieux d'initiation. Selon TISSERAT (1979), MATER (1986) et VERAMENDI (1997), les types de cals permettant la meilleure régénération de plants seraient les types nodulaires, blancs et à structure friable. Par contre ZOUINE et EL HADRAMI (2007) ont affirmé que les cals granuleux portants des globules sont les cals embryogènes.

Par ailleurs, la prolifération des cals a été plus importante chez DN notamment sur les milieux T3(10/1) et T5(100/1) que chez AK où elle a été nettement inférieure.

Dans les travaux sur l'embryogenèse somatique chez le palmier à huile, les cals à croissance rapide sont recherchés et dénommés CCR (HANOWER et *al.*, 1983; MALAURI, 1987; RIVAL, 2000). AHÉE et *al.* (1981) les ont défini comme étant des cals de structure aérée et quelque peu granuleuse, dont le temps de dédoublement varierait entre 10 et 20 jours, mais qui pourrait atteindre un ou deux mois.

## 3 - Amplification des cals en milieux liquides

---

Pour les cals amplifiés avec 1mg/l de 2,4-D, nous avons constaté une action favorable du milieu liquide par une augmentation du poids des cals (de 1,11g) notée seulement après un mois de culture. Cette approche a été similaire à celle de FKI et *al.* (2003), qui l'ont utilisé comme une procédure de routine pour la prolifération des cals, ce qui leur a permis de quadrupler le poids frais des cals en l'espace d'un mois.

Les suspensions A1 (contenant la concentration de 2,4-D d'initiation : 50 et 100 mg/l), ont conduit après un mois à une faible augmentation du poids des cals. Ceci pourrait être attribué aux fortes concentrations hormonales incompatibles avec la composition minérale du milieu liquide qui a été de la moitié (1/2) des minéraux MS. Aussi, SANÉ et *al.* (2006) ont rapporté qu'en présence de charbon actif dans le milieu liquide, toute augmentation de la dose d'auxine au-delà de 50 mg/l diminuerait significativement les capacités de multiplication des cellules embryogènes.

Par ailleurs, le renouvellement du milieu liquide réalisé chaque semaine, a eu un effet défavorable sur la croissance des cals dans les trois milieux A1, A2 et A3. En effet d'après nos résultats, le poids de la masse cellulaire après un mois, a été inférieur ou presque égale à la masse cellulaire initiale. Ainsi, il serait souhaitable de ne pas perturber la croissance des cellules par des repiquages fréquents notamment durant la phase de latence.

## II - Induction de l'embryogenèse somatique dans les trois systèmes de culture des suspensions cellulaires

### 1 - Stades de développement des embryons somatiques

---

Dans les trois systèmes de conduite des cultures en milieu liquide, nous avons obtenu des suspensions qui avaient une grande capacité de régénération en produisant de grandes quantités d'embryons somatiques telles que T1 et M1(AK) dans les trois systèmes, ainsi que M4(DN) en système batch. Certaines suspensions ont eu des capacités de régénération moyennes telles que T4-M3 (DN) du système continu ouvert et T3-M5(DN) du système continu fermé. Enfin, d'autres suspensions n'ont pas été du tout embryogènes telles que T5-T4-T3-M5-M3(DN) du système batch, et M4-T3(DN) du système continu ouvert.

Pour obtenir une bonne suspension embryogène, il serait en premier lieu important de sélectionner et d'utiliser le bon type de cal (STROSSE et *al.*, 2006). Dans notre cas, la majorité des cals utilisés ont été nodulaires ou mixtes pour le cultivar DN, et de type granuleux pour AK.

Après environ trois semaines de culture en milieu liquide, on a noté l'apparition de globules dans les suspensions embryogènes, qui ont évolué par la suite en embryons bipolaires dans les systèmes continus. Selon FERGANI (1998), les globules acquièrent une bipolarité par l'installation de deux extrémités opposées qui sont les précurseurs du méristème caulinaire et radicaire.

Le développement des embryons a été asynchrone, puisque les différents stades de différenciation ont été retrouvés dans une même suspension.

Certains chercheurs ayant utilisé le milieu liquide dans l'embryogenèse somatique, ont rapporté les mêmes observations concernant l'hétérogénéité des suspensions cellulaires chez le palmier dattier (FKI et *al.*, 2003; ZOUINE et EL HADRAMI, 2007) ainsi que chez d'autres espèces tels que le bananier (BUI TRANG et THANH, 1999; STROSSE et *al.*, 2006) et l'avocatier (QUESSADA et *al.*, 2004).

La morphologie des cellules en suspension, observée dans nos conditions de culture a été conforme aux descriptions de DJELMANI (2000). En effet, il a rapporté que les suspensions ont été composées de cellules individualisées rondes et petites, de cellules allongées, ainsi que d'amas de cellules. Les cellules rondes d'environ 15  $\mu\text{m}$ , et les amas compacts de cellules rondes (1 à 30 cellules), avec un rapport nucléocytoplasmique élevé, ont été cytologiquement les plus compétents à l'embryogenèse (FKI, 1998).

Toutefois selon ZAID (1989), il a été difficile d'affirmer l'origine unicellulaire ou pluricellulaire des embryons somatiques. D'une part, les études réalisées par TISSERAT et DEMASSON (1980) sur l'embryogenèse somatique en milieu gélosé, ont indiqué l'origine unicellulaire des embryons somatiques. Les cals ont décrit une séquence d'embryogenèse en partant de cellules isolées qui se sont divisées pour former des amas cellulaires de : 2, 4, 8 ou 16 cellules. Les agrégats ont alors donné naissance à des proembryons non polarisés qui ont proliféré pour produire de nouveaux centres méristématiques ou des structures bipolaires de plusieurs centaines de cellules.

D'autre part, si l'on se réfère aux travaux de FKI et *al.* (2003), sur l'embryogenèse somatique en milieu liquide, les embryons auraient une origine pluricellulaire.

---

En outre, selon SANÉ et *al.*(2006), les embryons somatiques ont marqué deux parcours de développement : un parcours typique d'une origine unicellulaire, et une seconde voie où l'embryon a montré une origine pluricellulaire.

Les amas de cellules non embryogènes, ont manifesté différentes évolutions morphologiques donnant en suspension des nodules et des racines. Les racines ont conduit dans les suspensions M3(DN) du système ouvert, et M5(DN) du système fermé, à la formation d'un réseau de racines enchevêtrées. Cette évolution a été similaire à celle décrite par MALAURIE (1987), dans les suspensions cellulaires de palmier à huile. Par ailleurs, les nodules formés dans certaines suspensions ont marqué soit un blocage de croissance (T5 DN du système fermé), soit une évolution en petites racines dans T4-M3 (DN) du système ouvert, et T3(DN) du système fermé. Ces évolutions ont également été mentionnées par MALAURIE (1987).

Par ailleurs, il est important de noter que des coupes histologiques, peuvent guider le choix des cals à mettre en suspension en révélant leurs potentiels embryogènes. En effet ZAID (1989), a signalé que l'accumulation de réserves protéiques et amylacées pourrait être considérée comme étant un marqueur précoce de l'embryogenèse somatique. Ces observations ont été confirmés par d'autres auteurs (FERGANI, 1998; SANÉ et *al.*, 2006), qui ont indiqué que les cellules constituant les cals embryogènes avaient un gros noyau, de petites vacuoles et un cytoplasme riche en substances de réserve.

La distinction des cals embryogènes des cals non embryogènes pourrait également être réalisée grâce à l'activité de l'AIA oxydase (EL BELLAJ et EL HADRAMI, 2000) ou par la présence d'isoenzymes peroxydases (FKI et *al.*, 2006). Selon ces auteurs, ces enzymes seraient impliqués dans le processus d'embryogenèse somatique chez le palmier dattier, et pourraient être révélés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les tissus embryogènes.

## **2 - Comparaison entre les trois systèmes de conduite des suspensions**

---

Par rapport au système fermé, le système continu ouvert a permis le développement d'un plus grand nombre d'embryons bipolaires essentiellement dans les suspensions T1 et M1 (AK). Ceci a donc montré l'action favorable des dilutions réalisées chaque mois.

AL KHAYRY (2005), a trouvé que la dilution des cultures a affecté positivement la différenciation des embryons somatiques chez le palmier dattier. En effet selon MONNIER (1990), après une certaine période estimée à 2 ou 3 semaines, les cellules en suspension se sont multipliées de façon très efficace, et la densité cellulaire dans l'Erlen contenant 50 ml de milieu était devenue très élevée. Selon le même auteur une densité minimale à chaque repiquage devrait être respectée pour maintenir le potentiel embryogène des cellules.

En effet, une surdensité suite à une forte amplification de la masse cellulaire sans dilution dans le système continu fermé, a entraîné un blocage de croissance dans la suspension T5 (DN). Ainsi un grand nombre de nodules s'est formé, mais dont la croissance s'est arrêtée à ce stade. Le transfert en milieu de régénération n'a pas permis le développement d'embryons somatiques.

Par ailleurs, AL KHAYRI (2005) a rapporté également que les sous cultures grâce aux dilutions, devenaient purifiées et débarrassées des débris cellulaires et des cellules non embryogènes.

Quant au système batch, la polarisation et la maturité des embryons somatiques se sont déroulées sur le milieu de régénération. L'avantage par rapport au système continu, c'est que les embryons somatiques dès qu'ils acquièrent leur maturité entrent en germination contrairement au système continu où la régénération n'est pas possible en milieu liquide.

Le système batch a été performant et a présenté d'autres avantages :

- La formation de suspensions homogènes (tous les embryons sont au stade globulaire);
- Ne nécessite aucun entretien;
- Rapide et permet de libérer l'espace sur l'agitateur après un mois;
- Un haut potentiel de régénération après étalement sur milieu semi solide notamment par l'installation d'un processus d'embryogenèse secondaire.

En effet, les embryons somatiques formés, sont capables d'entamer de nouveaux cycles de multiplication, et ceci en donnant naissance à des embryons secondaires. Ce phénomène a été mentionné chez le palmier dattier par plusieurs auteurs (FERGANI, 1998 ; FKI, 1998 ; ZOUINE et EL HADRAMI, 2007). Selon FKI (1998), ces embryons paraissent provenir de la réactivation des cellules de l'épiderme de l'embryon primaire. Ils ont proliféré et ont été à l'origine de massifs polyembryoniques (DE TOUCHET, 1991).

Le système batch a été utilisé par YADAV et *al.* (2001) à partir de cals cultivés en milieu liquide contenant 0.1 mg/l d'ANA. Après 3 à 4 semaines, les suspensions ont été étalées, sous faible densité, sur des milieux de régénération MS sans hormones de croissance mais additionnés de 170 mg/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O et de 3 g/l de charbon actif.

Aussi, SANÉ et *al.* (2006) ont adapté au palmier dattier la procédure décrite par DE TOUCHET (1991) sur le palmier à huile. Les suspensions ont été cultivées pendant un mois puis filtrés à travers un filtre à double maille (1 et 2mm). Cinquante milligrammes de matériel végétal ont été étalés sur un papier filtre de 9 cm de diamètre dans une boîte de Pétri contenant 20 ml de milieu de régénération solide et enrichi par 0.5 mg/l de BAP. Le papier filtre portant la culture, a été transféré chaque semaine sur un milieu frais de même composition mais sans BAP, et cela pendant 5 semaines. Les embryons somatiques développés ont été par la suite repiqués individuellement.

Lorsque la masse cellulaire est étalée sur les milieux de régénération à partir des suspensions conduites en système batch, les différentes phases de développement observées ont été également rapportés par DE TOUCHET (1991). Une phase de latence a été d'abord observée, dans notre cas elle a duré dix jours. Puis les globules translucides sont devenus blancs opaques. Selon DE TOUCHET (1991), l'apparence blanche opaque est le paramètre indicateur de la maturation des embryons somatiques qui évoluent par la suite vers une structure bipolaire plus ou moins chlorophylliennes. Par ailleurs, les délais d'apparition des pousses chez le palmier à huile (DE TOUCHET, 1991) ont été pareils à ceux observés chez nos deux cultivars, ils ont varié entre cinq semaines et douze semaines après l'étalement. Cependant, en dépit des avantages de chaque système de culture, ils n'ont présenté aucun effet sur l'embryogenèse si la souche de cal n'est pas à caractère embryogène.

### III - Effet de la dessiccation et de la composition minérale des milieux de culture sur la régénération des embryons somatiques

Le repiquage des embryons somatiques dans les différents milieux de régénération, a été précédé par une phase de dessiccation qui a conduit à une réduction moyenne du poids frais initial de 25,33%. Selon FKI et *al.* (2003), la dessiccation partielle des embryons somatiques conduisant à une diminution de la teneur en eau de 90% à 75%, a amélioré de façon significative les taux de germination qui sont passés de 25% à 90% chez le cultivar Deglet Nour.

*In vivo*, la dessiccation des graines jouerait un rôle important dans le développement des embryons et particulièrement durant la phase de maturation (QUESSADA et *al.*, 2004). En outre, selon ABERLENC-BERTOSSI et *al.* (2006), le stress hydrique accélérerait la maturation des embryons zygotiques. Il induirait chez le palmier dattier ainsi que chez le palmier à huile l'expression des gènes responsables de la synthèse et de l'accumulation des protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant).

Dans les conditions *in vitro*, le stress hydrique responsable de l'accumulation des protéines pourrait être induit par l'application de pressions osmotiques telles que l'utilisation de fortes concentrations de sucre ou l'utilisation du PEG (RAUBICHAUD et *al.*, 2004). En effet, ALKHATEEB (2006) a démontré que le PEG à 5% associé à 60 g/l de sucre, sont capables d'augmenter le nombre d'embryons somatiques chez le cultivar Sukary ainsi que leur maturation et germination.

Par ailleurs, selon SGHAIER et *al.* (2005) l'addition de l'ABA à la dose de 20  $\mu$ m, et de l'arginine à la dose de 3 mM augmenterait les quantités de protéines totales, et favoriserait la maturation et le bon développement des embryons somatiques chez le cultivar Deglet Nour.

Après trois mois de culture sur milieux de régénération, le milieu KNOP n'a conduit à aucune germination par contre les milieux MS,  $\frac{1}{2}$  MS et  $\frac{1}{4}$  MS ont permis des pourcentages respectifs de 40%, 33.33% et 35.55% sans différences significatives entre eux au seuil de 5%. Selon AL KHAYRI (2003), lorsque le milieu a été dépourvu d'hormones de croissance, la composition minérale du milieu MS n'a eu aucun effet significatif sur la régénération. Ainsi, il a obtenu sur les milieux MS et  $\frac{1}{2}$  MS, respectivement 48% et 43% de régénération.

Chez le palmier dattier, la culture d'embryons somatiques sur milieu sans hormones de croissance, conduit souvent au développement de la partie aérienne seulement (AL KHAYRI, 2003). En effet des embryons avec pousses feuillées ont été obtenus avec des pourcentages variant entre 20% et 24% sur les trois milieux MS.

Le transfert des pousses feuillées vers un milieu  $\frac{1}{2}$  MS additionné de 0.1 mg/l d'ANA et 0.05 mg/l de BAP, a conduit à 56% d'enracinement. Selon ALKHATEEB (2006), les pousses sans systèmes racinaires pourraient être systématiquement enracinées par leur transfert sur un milieu  $\frac{1}{2}$  MS enrichi par 0.1 mg/l d'ANA. Par ailleurs, ZOUINE et EL HADRAMI (2007) ont signalé que le milieu  $\frac{1}{2}$  MS additionné de 0.1 mg/l d'ANA, 0.05 mg/l de BAP et de 0.1 mg/l d'IBA a augmenté le pourcentage de régénération.

Le reste des embryons ne pouvant ni former des plants complets ni des pousses feuillées, ont développé des racines seulement. Les pourcentages ont été de 11.11% dans les trois milieux MS. FKI (1998), a rapporté que le développement précoce du pôle racinaire, a conduit en générale à un blocage du méristème caulinaire. Afin de limiter

l'enracinement précoce qui bloquerait la germination, AL KHAYRI (2003) a recommandé l'utilisation de l'IBA dans le milieu de régénération.

Les embryons somatiques qui n'ont pas germé sont restés soit blancs opaques ou sont devenus bruns ou hyperhydriques. Ainsi, nous avons constaté que plus le milieu de culture a été dilué (graduellement : KNOP, ¼ MS, ½ MS et MS), plus la vitrification a augmenté et le brunissement a diminué.

Selon FKI et *al.* (2003), la culture des embryons en milieu liquide pendant plus d'un mois conduirait au phénomène d'hyperhydratation. L'addition de composés organiques non métabolisables tel que le mannitol, en agissant sur la pression osmotique du milieu, pourrait réduire l'état d'hydratation des embryons somatiques (FKI, 1998).

## **IV - L'embryogenèse sans passage par le milieu liquide**

Le transfert des cals directement en conditions embryogènes sur milieux solides MS et ½ MS, n'a conduit à aucune production d'embryons au cours des six mois de culture qui ont suivi le transfert. Ainsi, bien que les cals utilisés soient de même origine que ceux placés en milieux liquides, ces cals se sont amplifiés ou ont produit des bourgeons ou des racines uniquement.

Selon DE TOUCHET (1991), le procédé de l'embryogenèse en milieu solide présenterait des limites de plusieurs ordres dont le manque de synchronisation des cultures. Les cals pourraient devenir embryogènes entre 2 et 36 mois après passage en milieu sans hormones de croissance.

D'après les résultats de FKI et *al.* (2003), le passage par le milieu liquide augmenterait radicalement la production d'embryons somatiques. Ainsi, le nombre d'embryons est passé de 10 ± 2 par 100 mg de cal à 200 ± 10 embryons par la même quantité de cal, au bout d'un mois de culture en milieu liquide.

Les cals en milieu solide ont manifesté une organogenèse, les bourgeons se sont développés à partir des cals du cultivar AK initiés sur les milieux T1(1/1) et M1(1/1). Selon CHABANE (1995), des bourgeons pourraient être obtenus à partir d'explants de bourgeons végétatifs et de fragments d'apex cultivés sur le milieu contenant 2mg/l de 2,4-D et 3mg/l de 2ip. Cependant ESHRAGHI et *al.* (2005), ont signalé que la distinction entre les pousses dérivant de l'organogenèse et de l'embryogenèse somatique était parfois difficile. Pour cette raison, il serait nécessaire de disposer d'informations histologiques révélant ainsi l'origine des vitroplants.

---

# CONCLUSION

La multiplication du dattier par embryogenèse somatique revêt une importance pratique de plus en plus ressentie pour l'extension et le repeuplement des palmerais, la conservation des ressources génétiques et pour l'amélioration de l'espèce surtout pour la résistance au Bayoud. Cependant, la complète maîtrise de la régénération par cette voie de multiplication, dans notre pays est loin d'être atteinte dans la généralité des cas. En effet, le développement d'un protocole efficace de l'embryogenèse somatique, nécessite dans un premier temps la réalisation et la réussite d'un certain nombre d'étapes qu'il faudra par la suite optimiser pour chaque cultivar.

Ainsi, le procédé suivi dans notre travail de recherche a concerné deux cultivars de dattier : Deglet Nour et Akerbouch, et a comporté trois phases :

- Une phase d'initiation de la callogenèse et d'amplification des cals ;
- Une phase d'induction de l'embryogenèse en milieu liquide ;
- Une phase de régénération des embryons somatiques.

Le but de ce travail a été d'optimiser les pourcentages de callogenèse, d'embryogenèse et de germination des embryons somatiques. À cet effet, plusieurs facteurs ont été étudiés durant chaque phase. Ceci a permis l'identification des facteurs essentiels pour chacune des étapes du protocole de régénération, chez les deux cultivars.

L'utilisation de plusieurs équilibres hormonaux 2,4-D/BAP en association avec des doses de charbon actif, est importante pour avoir une idée plus précise de l'action des hormones sur l'induction des cals. Aussi, la composition hormonale et minérale des milieux de culture sont deux facteurs étroitement liés pour leurs actions sur les explants.

Le dilemme rencontré, est qu'une gamme d'équilibres hormonaux allant des faibles concentrations au plus élevées, est capable d'induire une bonne callogenèse. Par ailleurs, un milieu trop enrichi en éléments minéraux n'est pas forcément en faveur d'une callogenèse importante. La comparaison entre les deux cultivars DN et AK nous a conduit à déduire que ces actions sont fortement liées au génotype.

Ainsi nous avons optimisé le milieu d'initiation de la callogenèse, en retenant celui de MS sans additifs, avec différentes concentrations hormonales allant de 1 mg/l à 100 mg/l de 2,4-D associés au charbon actif pour le cultivar DN, et les équilibres de 1/1 et 5/5 de 2,4-D/BAP, en présence ou en l'absence d'additifs pour le cultivar AK. En outre, l'utilisation des faibles concentrations de 2,4-D est donc souhaitable.

L'induction de l'embryogenèse a été réalisée par le passage des cals embryogènes en milieu liquide avec 1 mg/l de 2,4-D. Le choix du système de conduite des suspensions cellulaires est un facteur déterminant pour une induction rapide et efficace des embryons somatiques.

Ainsi, nous avons défini deux modes de conduite des suspensions cellulaires. Le système batch qui ne demande aucun entretien de la suspension et qui a conduit au développement d'embryons en plantules chez les deux cultivars en un temps très court. En effet, la germination des embryons a été notée un mois après l'étalement sur les milieux de régénération. Le système continu ouvert quant à lui, a permis le développement d'un nombre

plus important d'embryons somatiques structurés et bien individualisés. Ces embryons ont été retirés du milieu liquide à partir du deuxième mois, puis repiqués sur les milieux de régénérations où ils ont germé à partir de la troisième semaine. Par ailleurs, ce système présente l'avantage d'une production continue d'embryons, et aussi un maintien et une amplification de la suspension à travers des dilutions mensuelles.

Enfin, les facteurs essentiels à la régénération sont la suppression du 2,4-D dans les milieux MS, et la réduction à 3 g/l de la quantité d'agar afin d'avoir une consistance semi solide du milieu de germination. Le repiquage des embryons au stade globulaire ou bipolaire placés préalablement en dessiccation, a permis le développement de vitroplants entiers.

Les milieux de régénération composés des minéraux MS,  $\frac{1}{2}$  MS et  $\frac{1}{4}$  MS ont conduit à des pourcentages de régénération de vitroplants complets, compris entre 33,33% et 40%, sans différences significatifs entre eux au seuil de 5%. Cependant les vitroplants ont présenté une meilleure vigueur dans les milieux  $\frac{1}{2}$  MS.

L'addition de 0,1 mg/l d'ANA et de 0,05 mg/l de BAP a amélioré l'enracinement des pousses feuillées (56% d'enracinement après un mois) et a favorisé la mise en place d'une embryogenèse secondaire.

Ainsi, pour les deux cultivars, il a été possible d'obtenir des cals embryogènes, d'établir et d'entretenir des suspensions, et de réussir la régénération de grandes quantités de plants. De ce fait, les difficultés initiales relatives au nombre limité d'explants, aux problèmes de brunissement et à la faible callogenèse notamment chez le cultivar AK, ont été surmontées par la puissance particulière, du système d'induction de l'embryogenèse en milieu liquide. Ainsi, on a obtenu à partir des suspensions du cultivar AK, conduites en système continu ouvert, une moyenne de 360 embryons somatiques par dilution de 50 ml de la suspension initiale contenant 1 à 2 g de cal initié sur le milieu T1(1/1).

Toutefois, des recherches sont encore nécessaires pour améliorer les pourcentages d'embryons somatiques convertis en plantules notamment en définissant les facteurs permettant une dessiccation optimale des embryons. Ceci permettra une meilleure maturation et accumulation des substances de réserves, et contribuera à réduire le nombre d'embryons hyperhydriques.

Par ailleurs, pour les travaux ultérieurs il serait intéressant aussi de :

- Reproduire le même processus expérimental à partir d'explants inflorescenciels;
- Étudier la réactivité des différents types d'explants du cœur de rejet.
- Réaliser une étude histologique ou d'utiliser les marqueurs moléculaires pour la détection des cals à caractère embryogène;
- Rechercher des liens existants entre la texture des cals et leurs potentiels embryogènes;
- Réaliser l'acclimatation des vitroplants.
- Appliquer les techniques de cryoconservation des cals, des suspensions et des embryons somatiques.

En ce qui concerne la résistance au Bayoud, des travaux sont en cours de réalisation notamment en Algérie par certains centres de recherche (INRAA et LRZA) et dans notre cas on peut d'ors et déjà envisager de :

- Optimiser le protocole pour le cultivar Taquerboucht, reconnu résistant à la maladie en Algérie. D'une part pour augmenter son effectif, et d'autre part pour l'introduire dans les programmes d'amélioration de l'espèce.

- Développer la technique de culture de protoplastes issus de cals ou de suspensions embryogènes, puis d'envisager la création d'hybrides somatiques particulièrement avec le cultivar Taquerboucht (travaux en cours).
- Induire des mutations sur le matériel végétal durant les phases de l'embryogenèse somatique (cals, suspensions embryogènes, embryons somatiques et vitroplants) en vue de la création de variétés résistantes.
- Étudier les interactions hôte/pathogène et les mécanismes de défenses de la plante.
- Rechercher des marqueurs moléculaires de résistance à la maladie

## Références bibliographiques

- ABAHMANE L., 2005.** Les tissus inflorescentiels: une nouvelle source de matériel végétal pour la micropropagation des clones sélectionnés de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). in BOUCHAIB B. et KADRI E., Actes du Symposium International sur le Développement Durable des Systèmes Oasiens, Erfoud, Maroc, résumé.
- ABAHMANE L., 2006.** Utilisation des inflorescences pour la micropropagation des clones de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) résistants à la maladie du Bayoud. In ABED F., Conférence régionale : Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier Contre le Bayoud, Alger, p. 39-41.
- ABED F., BOUGUEDOURA N., MAATALLAH S., KHELIFI L., MORSLI A. et BENKHALIFA A., 2004.** Évaluation de la capacité national de multiplication ex situ du palmier dattier en Algérie. In NASR N., RHOUMA A., BENKHALIFA. A. et ZIRARI A. Situation et perspectives de la multiplication *Ex situ* du palmier dattier en Tunisie, Algérie et Maroc. Atelier régional sur le renforcement des capacités nationales en matière de multiplication *Ex situ* du palmier dattier dans le Maghreb, Maroc, p. 26-40.
- ABED F., KHELAFI H., DJELLAL L., YAKHOU M.S., YATTA D., AMARA B. et SEDRA M.H., 2006.** Mutagenèse induite chez le palmier dattier : détermination des doses de toxine FOA. In ABED F., Conférence régionale : Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier Contre le Bayoud, Alger, p. 19-20.
- ABED F., YATTA D., KHELAFI H., YAKHOU M.S., AMARA B. et DJELLAL L., 2006.** Optimisation de la technique d'obtention des suspensions cellulaires et de protoplastes en vue d'une hybridation somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). In ABED F., Conférence régionale : Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier Contre le Bayoud, Alger, p. 43-44.
- ABERLENC-BERTOSSI F., SANÉ D., DAHER A., BORGEL A. et DUVAL Y., 2006.** Aptitude à la déshydratation des embryons zygotiques de palmier à huile et de palmier dattier : étude de l'expression de gènes LEA. Les actes du BRG, 6, p. 401-413.
- AHEE J., ARTHUIS P., CAS G., DUVAL Y., GUENIN G., HANOWER J., HANOWER P., LIEVOUX D., LIORETC., MALAURI B., PANNETIER C., RAILLOT D., VARECHON C. et ZUCHERMAN L., 1981.** La multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile par embryogenèse somatique. Oléagineux, 36 (3), p. 113-118.
- ALKHATEEB A. A., 2001.** Influence of different carbon sources on *in vitro* root formation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khanazi. Second International Conference on Date Palm. Al Ain, United Arab Emirates, p. 559-566.
- ALKHATEEB A. A., 2001.** Promotion of *in vitro* bud/shoot promotion of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) with date syrup "DIBBS" as a carbon source. Second International Conference on Date Palm. Al Ain, United Arab Emirates, p. 567.

- ALKHATEEB A. A., 2006.** Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Sukary in response to sucrose and polyethylene glycol. *Biotechnology*, 5 (4), p. 466-470.
- ALKHATEEB A., 2008.** Comparison effects of sucrose and date palm syrup on somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *American Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 4 (1), p. 19-23.
- AL KHAYRI J. M., 2001.** Optimization of biotin and thiamin requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 37, p. 453-456.
- AL KHAYRI J. M., 2002.** Growth, proline accumulation, and ion content in sodium chloride-stressed callus of date palm. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 38, p. 79-82.
- AL KHAYRI J. M., 2003.** *In vitro* germination of somatic embryos in date palm: effect of auxin concentration and strength of MS salt. *Current Science*, 84 (5), p. 680-683.
- AL KHAYRI M. J. et AL BAHRANY M. A., 2004.** Genotype dependent *in vitro* response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to silver nitrate. *Scientia Horticulturae*, 99, p. 153-162.
- AL KHAYRI J. M., 2005.** Date palm *Phoenix dactylifera* L. In MOHAN S.J. et PRAMOD K.G. *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Springer, p. 309-320.
- ANJARNE M. et ZAID A., 1993.** Effet de certains équilibres hormonaux sur l'enracinement précoce des tissus de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *Al Awamia*, 82, p. 197-210.
- ANJARNE M., BOUGERFAOUI M., ABAHAMANE L. et ZIRARI A., 2004.** Évaluation de la capacité nationale de multiplication *ex situ* du palmier dattier au Maroc. In NASR N., RHOUMA A., BENKHALIFA. A. et ZIRARI A. *Situation et perspectives de la multiplication Ex situ du palmier dattier en Tunisie, Algérie et Maroc. Atelier régional sur le renforcement des capacités nationales en matière de multiplication Ex situ du palmier dattier dans le Maghreb, Maroc*, p. 41-55.
- ANJARNE M., BOUGUERFAOUI M. et ABAHMANE L., 2005.** La culture de tissus: Un outild'améliorationgénétique du palmier dattier. Actes du Symposium International sur le Développement Durable des Systèmes Oasiens, Mars 8-10, ERFOUD, Maroc, résumé.
- ANJARNE M., BOUGERFAOUI M. et ABAHMANE L., 2005.** Les techniques de micropropagation du palmier dattier: Expérience de l'INRA Maroc. Actes du Symposium International sur le Développement Durable des Systèmes Oasiens, Mars 8-10, ERFOUD, Maroc, résumé.
- ARBANE A. et DJABALI M.C., 2004.** Études morphologiques et histologiques de la callogenèse d'explants floraux du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L., en culture *in vitro*. Mémoire DES en sciences biologiques, U.ST.H.B., Alger, 28 p.
- ASEMOTA O., EKE C. R. et ODEWAL O. J., 2007.** Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. *African Journal of Biotechnology*, 6 (20), p. 2353-2357.
- AUGÉ R., BEAUCHESNE G.J., BOCCON-GIBOD L., DECOURTY L., GET B, JALOUZOUT R., MINIER R., MORAN J., REYNORD J,P., STRULLY D.G. et**

- VIDALIE H., 1989.** La culture *in vitro* et ses applications horticoles. 3<sup>ème</sup> Ed., TEC. et DOC., Lavoisier, 207 p.
- BAAZIZ M., BENDIAB K., BRAKEZ Z. et AIT CHITT M., 1993.** Le polymorphisme enzymatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) utilisé comme marqueur de la conformité génétique des vitroplants. In CHALYAN H. et DEMARLY Y. Actualités Scientifiques : Le progrès passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes? Ed. AUPLEF-UREF, Jhon Libbey Eurotext, Paris, p. 155-158.
- BEN ABDELLAH A., 1990.** La phoeniciculture. Options Méditerranéennes, Série A, 11, les systèmes agricoles oasiens, p. 105-120.
- 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 les techniques de culture *in vitro*. FAO/ PNUD/ RAB/ 88/ 024, p. 37-41.
- BENBADIS A.K., 1993.** Coconut and Date palm. In HAMMERSHLAG F.A. et LITZ R.E., Biotechnology of perennial fruit crops, Biotechnology in agriculture, 8, p. 383-400.
- BENKHAL IFA A., 2006.** Situation de la lutte contre le Bayoud en Algérie. In ABED F., Conférence régionale : Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier Contre le Bayoud, Alger, p. 9-10.
- BEKHEET S.A. et SAKER M., 1998.** *In vitro* propagation of Egyptian date palm: II- Direct and direct shoot proliferation from shoot-tip explants of *Phoenix dactylifera* L. cv. Zaghoul. First International Conference on Date Palm. Al Ain, United Arab Emirates, p. 150-157.
- BELGUEDJ M. et SALHI A., 2006.** Perspectives de lutte biologique contre les ravageurs de palmier dattier dans la région de Biskra. In ABED F., Conférence régionale : Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier Contre le Bayoud, Alger, p. 85-86.
- BHANSALI R. et SINGH M., 2003.** Micropropagation of arid zone fruit trees of India. In MOHAN D. Micropropagation of woody trees and fruits. Springer, USA, p. 387-392.
- BOSSILA H.A., EL SHARABASY S.F., MOHAMMED S.M., IBRAHIM I.A. et REFAY K.A., 2001.** Production of some secondary products from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues cultures (Sewi cultivar) using some precursors. 1- Callus stage. Second International Conférence on Date Palm cultivars, Al Ain, UAE, p. 531-539.
- BOSSILA H.A., EL SHARABASY S.F., MOHAMMED S.M., IBRAHIM I.A. et REFAY K.A., 2001.** Production of some secondary products from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues cultures (Sewi cultivar) using some precursors. 2- Embryogenesis stage. Second International Conférence on Date palm cultivars, Al Ain, UAE, p. 540-546.
- BOUGERFAOUI M. et ZAID A., 1993.** Effet de la teneur du milieu de culture en nitrate d'ammonium sur la vitrification des tissus du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) cultivés *in vitro*. Al Awamia, 82, p. 177-196.
- BOUGERFAOUI M. , ANJARNE M., CHEIKH M. et AITCHITT M., 1996.** Multiplication *in vitro* du palmier dattier par la technique de l'organogenèse. In EL HADRAMI,

- Rapport de synthèse de l'atelier « Culture *in vitro* du palmier dattier », CIHEM, Options méditerranéennes, résumé, p. 172.
- BOUGUEDOURA N., 1979.** Contribution à la connaissance du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.): étude des productions axillaires. Thèse de doctorat, U.S.T.H.B., Alger, 201 p.
- BOUGUEDOURA N., 1991.** Connaissance de la morphogenèse du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) : Étude *in situ* et *in vitro* du développement morphogénétique des appareils végétatifs et reproducteurs. Thèse de doctorat, U.S.T.H.B, Alger, 201 p.
- BOUGUEDOURA N., 1993.** Rapport de synthèse de l'atelier « fusariose du palmier dattier/maladie de la feuille cassante». Option Méditerranéenne, série A, 28, p. 217-228.
- BOUNAGA N. et DJERBI M., 1990.** Pathologies du palmier dattier. Options Méditerranéennes, série A, 11, les systèmes agricoles oasiens, p.127-132.
- BRANTON R.L. et BLAKE J., 1989.** Date palm (*Phoenix dactylifera* L.). In BAJAJ Y.P.S. Biotechnology in Agriculture and Forestry 5, trees II, Springer Verlag, Berlin, p. 161-175.
- BUFFARD-MOREL J., VERDEIL J. L. et PANNETIER C., 1992.** Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires : Étude histologique. Can. J. Bot., 70, p.735-741.
- BUI TRANG V. et THANH T.H., 1999.** Croissance de suspensions cellulaires de bananier cultivar «Cau Man». *Infomusa*, 13 (1), p. 2-4.
- CHABANE D., 1995.** Étude des aptitudes morphogénétiques de divers explants de 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, 103 p.
- CHABANE D. et BOUGUEDOURA N, 2006.** Contribution à la lutte contre le Bayoud par les biotechnologies : Production de protoplastes de la variété Deglet Nour (sensible) et de la variété Takerbucht (résistante) en vue de leur fusion et la production d'hybrides somatiques. In ABED F., Conférence régionale : Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier Contre le Bayoud, Alger, p. 45-48.
- CHABANE D., ASSANI A, BOUGUEDOURA N, HAICOUR R et DUCREU G., 2007.** Induction of callus formation from difficile date palm protoplasts by means of nurse culture. C. R. Biologies, 330, p. 382-401.
- 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, 109 p.
- CHARLES G. et BRANCHARD M., 1995.** Néof ormation de plants d'épinard à partir de suspensions cellulaires, quel avenir pour l'amélioration des plantes? Ed. AUPLF-UREF, Jhon Libbey Eurotext, Paris, p.177-183.
- CHAWLA H.S., 2002.** Introduction to plant biotechnology (Cell suspension and secondary metabolites). 2<sup>nd</sup> Ed., Science Publishers, USA, p. 57-73.

- CHEIKH R. , ZAID A. et AIT CHITT M. ,1989.** Travaux de recherche conduits sur l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier. 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, p. 59-69.
- DAOOL A., AAOUINE M. et SAKA K., 1991.** Les biotechnologies dans les systèmes de recherches agronomiques au Maghreb: Stratégies mises en oeuvre : Cas de l'Algérie, du Maroc et de la Tunisie. Options Méditerranéennes, Série Séminaires, 14, p.105-112.
- DAGUIN F. et LETOUZÉ R., 1989.** L'embryogenèse somatique : Des possibilités nouvelles pour la micropropagation du palmier dattier. 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, p. 51-58.
- DE TOUCHET B., 1991.** Micropropagation du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) en milieu liquide. Thèse de doctorat es science, Université de Paris Sud, centre d'Orsay, 154 p.
- DE TOUCHET B., DUVAL Y. et PANNETIER C., 1991.** Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Plant Cell Reports, 10, p. 529-532.
- DJELMAMI I. , 2000.** Initiation à la culture en suspension cellulaire du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour et Takerboucht el kala. Mémoire d'ingénieur en génie biologique, U.S.T.H.B., Alger, 57 p.
- 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, Série séminaires, 14, p. 31-38.
- DURZAN D.J., et BONAGA J.m., 1983.** Tissus culture in forestry. Technology and Industrial Arts, Springer, USA, p.192-193.
- DUSSERT S., VERDEIL J. L. et BUFFARD-MOREL J., 1995.** Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. Plant Science, 111, p. 229-236.
- EKE C. R., AKOMEAH P. et ASEMOTA O., 2005.** Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from "Zebida" and "Loko" landraces. African Journal of Biotechnology, 4 (3), p. 244-246.
- EL BELLAJ M. et EL HADRAMI I., 2000.** L'AIA oxydase: Régulateur et marqueur potentiel de l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Cahiers d'études et de recherches francophones/ Agriculture, 9(3), Notes de recherche 193-5, 4p.
- EL HADRAMI I., CHEIKH R. et BAAZIZ M., 1995.** Somatic embryogenesis and plant regeneration from shoot-tip explants in *Phoenix dactylifera* L. Biologia Plantarum, 37 (2), p. 205-211.
- EL HADRAMI I., AL DJAAFARI S. et DAAYF F., 1997.** Les biotechnologies végétales : Intégration chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) pivot de l'agriculture oasienne, cas du Maroc. Sixième journée scientifique du réseau biotechnologies végétales. AUEPLF, UREF, Orsay, p. 23-27.

- EL HADRAMI I., 2006.** Le palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. Jardins du Maroc, 5, in <http://www.jardinsdumaroc.com>
- EL HAMDOUNI E., LAMARTI A. et BADOUC A., 1999.** La régénération *in vitro* du fraisier (*Fragaria X Ananassa duch*) : Les possibilités offertes par la culture *in vitro*. Bull. Soc. Pharm., Bordeaux, 138, p. 49-74.
- EL SHARABASY S.F., BOSSILA H.A., MOHAMMED S.M., REFAY K.A. et IBRAHIM I.A., 2001.** Micropropagation on Zaghloul and Sewi cultivars of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). 2- Shoot and root formation. Second International Conference on Date palm cultivars. Al Ain, UAE, p. 513-522.
- EL SHARABASY S.F., BOSSILA H.A., IBRAHIM I.A., REFAY K.A., et MOHAMMED S.M., 2001.** Micropropagation on Zaghloul and Sewi cultivars of date palm (*Phoenix dactylifera* L.): 3- Plantlet and acclimatization. Second International Conference on Date palm cultivars. Al Ain, UAE, p. 523-530.
- ESHARGHI P, ZARGHAMI R. et OFOGHI H., 2005.** Genetic stability of micropropagated plantlets in date palm. Journal of Science, 16 (4), p. 311-315.
- ESHARGHI P., ZARGHAMI R. et MIRABDULBAGHI M., 2005.** Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. African Journal of Biotechnology, 4 (11), p. 1309-1312.
- ESHARGHI P. , ZARGHAMI R. et OFOGHI H., 2006.** RAPD analysis of micropropagated plantlets in date palm. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9 (1), p. 111-114.
- FAO, 2004.** Key statistics of food and agriculture trad. In <http://www.fao.org/es/ess/toptrad>
- FAO, 2005.** Key statistics of food and agriculture trad. In <http://www.fao.org>
- FERGANI K., 1998.** Embryogénèse somatique du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L., cultivar Deglet Nour. Thèse de Magistère en Biologie, U.S.T.H.B., Alger, 131 p.
- FERRY M., TOUTAIN G. et MONFORT S., 1991.** La multiplication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides, Groupe d'étude de l'arbre, Paris, France, p. 353-363.
- FKI L., 1998.** Embryogénèse somatique et régénération de plants de palmier dattier *Phoenix dactylifera* L., à partir de cultures en suspensions. Mémoire DEA en génie biologique, Université de Sfax pour le Sud, ENI, Tunisie, 74 p.
- FKI L., MASMOUDI R., DRIRA N. et RIVAL A., 2003.** An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Deglet Nour. Plant cell Rep., 21, p. 517-524.
- FKI L., MASMOUDI R., MAHDJOUN A., MZID R. SEDRA M.H. et DRIRA N., 2006.** Biotechnologies for date palm propagation, improvement and perspectives. In ABED F., Conférence régionale : Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier Contre le Bayoud, Alger, p. 28-30.
- FINER J.J., 1995.** Plant regeneration via embryogenic suspension cultures. In DIXON R.A. Plant cell culture. Oxford University Press, USA, p. 99-125.
- GAGIK S.S. et GREY D., 1990.** Growth determination and medium analysis. In POLLAND J. Methods of Molecular Biology. Humana Press, USA, p.13-21.

- HAGGAG H.N., IBRAHIM A.M.F., EL SABROUT M.B. et AL ASSAR A.M., 2001.** Effects of cultivars and explants on growth of *in vitro* cultured tissues of two date palm cultivars. Second International Conference on Date palm cultivars. Al Ain, UAE, p. 448-458.
- HANNACHI S., BENKHALIFA A., KHITRI D. et BRAC DE LA PERRRIÈRE R.A., 1998.** Inventaire variétal de la palmeraie Algérienne. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, CDARS et URZA, 225p.
- HANOWER J., HANOWER P. et GAUTHERET R., 1983.** Inhibition et stimulation, en culture *in vitro* de l'embryogenèse des souches issues d'explants foliaires de palmier à huile. C. R. Acad. Sc. Paris, 298, série III (2), p. 45-48.
- HILAE A. et TE CHATO S., 2005.** Effects of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). S. j. Sci. Technol., 27 (3), p. 639-635.
- HOCHER V., VERDEIL J.L., GROSSEDEMANGE F., HUET C., BOURDEIX R., N'CHOT Y.P., SANGAR A. et HAMON S., 1997.** Collaboration internationale pour la maîtrise de la multiplication végétative *in vitro* du cocotier (*Cococ nucifera* L.). Sixième Journée Scientifique du Réseau Biotechnologies Végétales. AUEPLF, UREF, Orsay, p. 79-87.
- HUSSAIN I. , RASHID H., MOHAMMED A. et QURASHI, A., 2001.** *In vitro* multiplication of date palm. Second International Conference on Date palm cultivars. Al Ain, UAE, p. 432-438.
- IBRAHIM A.M.F., HAGGAG H.N., EL SABROUT M.B. et AL ASSAR A.M., 2001.** Effects of explants and incubation conditions on growth of *in vitro* cultured tissues of two date palm cultivars. Second International Conference on Date palm cultivars. Al Ain, UAE, p. 440-447.
- KHELAFI H., ABED F, YAKOU M.S. et SEDRA H.M., 2005.** Évaluation de la résistance de quelques mutants de la variété Deglet Nour du palmier dattier au *Fusarium oxysporum*. Actes du Symposium International sur le Développement Durable des Systèmes Oasiens, ERFOUD, Maroc, résumé.
- LE BERRE M. et RAMOUSSE R., 2003.** Les enjeux de la conservation de la biodiversité en milieu saharien. Socioécologie et conservation, France, 13 p.
- LETOUZÉ R. et BEAUCHESNE G., 1989.** La technologie de la culture *in vitro* : Principe et applications agricoles. 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, p. 9-19.
- LETOUZÉ R. , DAGUIN F., HAMAMA L. et MARIONET F., 1998.** Somatic embryogenesis and mass micropropagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) characterization and genetic stability of regenerated plantlets by RAPD markers. First International Conference on Date Palm, Al Ain, UAE, p. 158-167.
- LITZ R.E. et GRAY D.J., 1993.** Organogenesis and somatic embryogenesis. In HAMMERSHLAG F.A. et LITZ R.E., Biotechnology of perennial fruit crops, Biotechnology in agriculture, C.A.B. International, 8, p. 3-34.

- LOUTFI K., 1989.** Recherche d'une multiplication du palmier dattier à partir des inflorescences. 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, p. 97-103.
- LOUTFI K., CHLYAH H., 1998.** Vegetative multiplication of date palms from *in vitro* cultured inflorescences: Effect of some growth regulator combinations and organogenetic potential of various cultivars, *Agronomie*, 18, p. 573-580.
- LOUTFI K. et EL HADRAMI I., 2004.** *Phoenix dactylifera* L., Date Palm. In LITZ R.E. Biotechnology of fruits and nut crops. CABI Publishing, UK, p.144-156.
- MALAURI B., 1987.** L'embryogenèse somatique en milieu liquide du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) et *E. guineensis* x *E. melanococca*. Premiers résultats. *Oléagineux*, 42 (6), p. 217-222.
- MARGARA J. , 1989.** La multiplication végétative, le méristème et l'organogenèse. Ed. INRA, Paris, 230 p.
- MARQUIS P., 1998.** Optimisation des conditions de culture de cellules et de régénération de plants chez le Paturin du kentucky. Mémoire du grade maître ès science. Faculté des études supérieures de l'université de Laval, Canada, 70 p.
- MATER A. A., 1986.** *In vitro* propagation of *Phoenix dactylifera* L. *Date Palm Journal*, 4(2), p. 137-152.
- MEGUELLATI H., 2005.** Optimisation de la callogenèse chez le palmier dattier *Phoenix dactylifera* L., en vue de l'obtention de suspensions cellulaires et de protoplastes. Thèse de magistère en Biologie, Ecobiologie et Amélioration végétale, U.S.T.H.B., Alger, 74 p.
- MESSAR M., 1993.** Le secteur phoenicicol Algérien : Situation et perspectives à l'horizon 2010. *Option Méditerranéenne*, A, 28, p. 23-44.
- Ministère de l'Agriculture, 2006.** Statistiques Agricoles. Ministère de l'agriculture, série A, 2006.
- MOHAMED M. S., EL SHARABAZY F. S., BOSILA H. A., IBRAHIM A. I. et REFAY A. K., 2001.** Micropropagation studies on Zaghlool and Sewi cultivars of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) : 1- Callus initiation and formation. Second International Conference on Date Palm, Al Ain, UAE, p. 500-512.
- MONNIER M., 1990.** Induction of embryogenesis in suspension culture. In POLLAND J. *Methods of Molecular Biology*. Humana Press, USA, p. 149-156.
- MUNIER P., 1973.** Le palmier dattier. Coll. Techniques agricoles et productions tropicales, Ed. MAISONNEUVE et LAROSE, XXIV, France, 221p.
- MUNIER P., 1981.** Origine de la culture du palmier dattier et sa propagation en Afrique. *Fruit*, 36 (9), p. 536-550.
- OTHMAN I., BAYOUDH C., HEDFI J., DRIRA N., TRIFI M. et MARRAKCHI M., 2006.** Le clonage *in vitro* de la meilleure variété tunisienne du palmier dattier (Deglet Nour) : Amélioration de la technique par passage en milieu liquide agité et en bioréacteurs. In ABED F., Conférence régionale : Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier Contre le Bayoud, Alger, p. 31-33.

- QUINTIN, 2001.** Biodiversité du palmier dattier. In [www.agromzab.multimania.com](http://www.agromzab.multimania.com).
- OURDANI L. , 2002.** Étude de quelques équilibres hormonaux influençant l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. cv Deglet Nour. Mémoire d'Ingénieur en Sciences Agronomiques, phytotechnie. INA, El Harrach, Alger, 76 p.
- PANNETIER C. et BUFFARD-MOREL J., 1982.** Premiers résultats concernant la production d'embryons somatiques à partir de tissus foliaires de cocotiers *Cocos nucifera* L. Oléagineux, 37 (7), p. 349-354.
- PANNETIER C. et BUFFARD-MOREL J., 1982.** Production of somatic embryos from leaf tissues of coconut (*Cocos nucifera* L.). Proc. 5<sup>th</sup> int. 1 Cong. Plant Tissue and Cell Culture, p. 755-756.
- QUESADA R.P., ROMERO C.S., MUNOZ A.B. et PLIEGO-ALFARO F., 2004.** Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. Scientia Horticulturae, 102, p.61-73.
- RAZDAN M.K., 2003.** Introduction to plant tissue culture. 2<sup>nd</sup> Ed, Science Publisher, USA, 375 p.
- RHISS A., 1980.** Palmier dattier, multiplication végétative en culture *in vitro*. Thèse de doctorat. Université de Paris Sud, Centre d'Orsay, 160 p.
- RHOUMA N., DRIRA N. et FKI L., 2004.** État de la multiplication du palmier dattier par culture de tissus en Tunisie. In NASR N., RHOUMA A., BENKHALIFA. A. et ZIRARI A. Situation et perspectives de la multiplication *Ex situ* du palmier dattier en Tunisie, Algérie et Maroc. Atelier régional sur le renforcement des capacités nationales en matière de multiplication *Ex situ* du palmier dattier dans le Maghreb, Maroc, p.11-25.
- RIVAL A., ABERLENC-BERTOSSI F., MORCILLO F., TREGERT J., VERDEIL J.L., DUVAL Y., DURAND CASSELIN T., KONAN E.K. et KOUAM B., 1997.** Micropropagation du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.), programme de recherche lié au transfert d'échelle. Sixième Journée Scientifique du Réseau Biotechnologies Végétales. AUEPLF, UREF, Orsay, p. 69-78.
- RIVAL A., 2000.** Somatic embryogenesis in oil palm. In MOHAN J., GUPTA P.K. et NEWTON R.J., Somatic embryogenesis in woody plant, 6, kluwer Academic Publisher, p. 249-290.
- RIZKALLA A. , BADR-ELDEN A., et NOWER A., 2007.** Protoplast isolation, salt stress and callus formation of two date palm genotypes. Journal of Applied Sciences Research, 3 (10), p. 1186-1194.
- RAUBICHAUD R., LESSARD V. et MERKLE S.A., 2004.** Treatments affecting maturation and germination of American Chesnut somatic embryos. Journal of Plant Physiology, 161, p. 957-969.
- SAAIDI, 1990.** Amélioration génétique du palmier dattier, critères de sélection, techniques et résultats. Options méditerranéennes, série A, les systèmes agricoles oasiens, p. 133-154.
- SAKA H. et ABED F., 1989.** La multiplication végétative *in vitro* du palmier dattier par embryogenèse somatique. 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, P. 71-73.

- SAKA H., 1996.** La régénération *in vitro* de différents cultivars de palmier dattier par embryogenèse somatique à partir d'organes de rejets. URBFA, 4<sup>ème</sup> Journée Scientifique de l'URBFA, 18-20 Mars, p. 22.
- SAKA H., ABED F., AMARA B., KERMICHE A., 1997.** Embryogenèse somatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*). I- Induction de la callogenèse à partir d'organes de rejets de quelques cultivars. Recherche Agronomique, 0, p. 1-8.
- SAKA H., 1997.** Caractérisation moléculaire des cals embryogènes de deux cultivars de palmier dattier : Deglet nour et Takerboucht. Sixième Journée Scientifique du Réseau Biotechnologies Végétales. AUEPLF, UREF, Orsay, p. 463.
- SAKA H., 2001.** Somatic embryogenesis and suspension cultures from mature zygotic embryos of date palm (*Phoenix dactylifera L.*). Recherche Agronomique, 8, p. 13-18.
- SANÉ D., ABERLENC-BERTOSSI F., GASSAMA-DIA Y.K., SAGNA M., TROUSLOT M. F., DUVAL Y. et BORGEL A., 2006.** Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspension of date palm (*Phoenix dactylifera L.*). Annals of Botany, 98, p. 301-308.
- SANÉ D., ABERLENC- BERTOSSI F., GASSAMA-DIA Y.K., SAGANA M., DUVAL Y. et BORGEL A., 2006.** Obtention de clones acclimatés par embryogenèse somatique à partir de suspensions cellulaires de palmier dattier. In ABED F., Conférence régionale : Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier Contre le Bayoud, Alger, p. 34-35.
- SCHOOF H., PANIS B., STROSS H., MAYOMOSQUEDA A., TORRES L.J., ROUX N., DOLEZEL J. et SWENNEN R., 1999.** Difficultés rencontrées pour établir et maintenir des suspensions cellulaires morphogènes de bananiers et pour régénérer des plants par embryogenèse somatique. *Infomusa*, 8 (2), p. 2-7.
- SEDRA M.H., 2005.** La maladie du bayoud du palmier dattier en Afrique du Nord: Diagnostique et caractérisation. Actes du Symposium International sur le Développement durable des Systèmes Oasiens, ERFOUD, Maroc, résumé.
- SGHAIR B., BAHLOUL M., MEJDOUB H. et DRIRA N., 2005.** Contribution au contrôle de la phase de maturation des embryons somatiques chez le palmier dattier : étude protéomique. Actes du Séminaire International sur l'Amélioration des Productions Végétales, APV 2005, Ed. KHELIFI L., p. 89-92.
- SHABANA H.R., EL SHIRAKI R.M.K., MANSOOR M.L. et AL SAFADI W.M., 1998.** Comparision between date palm fruits produced from tissue culture and offshoot plants (Hilali cultivar). First International Conference on Date palm cultivars. Al Ain, UAE, p. 169-172.
- SHARMA D. R., CHOWDHURY J. B. et YADAN N., 1998.** – Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from shoot tpe calli of wild date *Phoenix sylvestris Roxb.* Indian Journal of Experimental Biology, 26, p. 854-857.
- SHARON M. et SHANKAR P.C., 1998.** Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf primordia of *Phoenix dactylifera* cv. Yakubi. Indian Journal of Experimental Biology, 36, p. 526-529.

- STROSSE H., DOMERGUE R., PANIS B., ESCALANT J.V. et CÔTE F., 2003.** Suspensions cellulaires embryogènes de bananiers et bananiers plantain. Vezina et Picq Edi. Guide technique INIBAP8. Réseau international pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain, Montpellier, France, 31p.
- STROSSE H., SCHOOF H., PANIS B., ANDRE E., REYNIERS K. et SWENNENS R., 2006.** Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp). Plant Science, 170, p. 104-112.
- SUDERSAN C. et ABO EL NIL M., 2004.** Axillary shoot production in micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Current Science, 86 (6), p.771-773.
- TALAL A. , 2001.** *In vitro* propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by adventive buds. Second International Conference on Date Palm, Al Ain, UAE, p. 568-587.
- TIRICHINE A., 1997.** Étude des ressources génétiques du palmier dattier. In <http://www.agromzab.multimania.com>
- TIRICHINE A., 1998.** Études des contraintes d'acclimatation et de transfert en sol des plants de palmier dattier issus de la culture *in vitro*. Rapport de stage réalisé au Centre Régional du Houz, Pré-sahara, INRA du maroc, 8 p.
- TIRICHINE A., BELGUEDJ M., BENKHALIFA A. et GUERADI M., 2005.** Dynamique des ressources génétiques du palmier dattier dans les oasis du M'Zab en Algérie. Actes du Symposium International sur le Développement durable des Systèmes Oasiens, Mars 8-10, ERFOUD, Maroc, résumé.
- TISSERAT B., 1979.** Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. Journal of Experimental Botany, 30 (119), p. 1275-1283.
- TISSERAT B. et DEMASSON D.A., 1980.** A histological study of adventive embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. Ann. Bot., 46, p. 465-472.
- TISSERAT B., 1981.** Production of free living date palms through tissue culture. Date Palm Journal, 1(1), p. 43-54.
- TISSERAT B., 1982.** Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures. Euphytica, 31, p. 201-214.
- TOKYJI Y. et KURIJAMA K., 2003.** Involvement of gibberillin and cytokinin in the formation of embryogenic cell clumps in carrot (*Daucus carota*). J.Plant Physiol., 160, p.133-141.
- VERAMENDI J. et NAVARRO L., 1997.** Influence of explant sources of adult date palm (*Phoenix dactylifera* L.) on embryogenic callus formation. Journal of Horticultural Science, 72 (5), p. 665-671.
- VERDEIL J. L., BUFFARD-MOREL J. et PANNETIER C., 1989.** Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir de tissus foliaires et inflorescentiels : Bilan des recherches et perspectives. Oléagineux, 44 (8-9), p. 403-411.
- VERDEIL J. L., HUET C., GROSDÉMANGES F., RIVAL A. et BUFFARD-MOREL J., 1992.** Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) : Obtention de plusieurs clones de vitroplants. Oléagineux, 47 (7), p. 465-469.

- YADAV N. R., YADAV R. C., CHOWTHURY V. K. et CHOWTHURY J. B., 2001.** Explant and cultivar response to *in vitro* clonal propagation of female date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Second International Conference on Date Palm, Al Ain, UAE, p. 491-499.
- YATTA D., ABED F., SAKA H., AMARA B., DJELLAL L., YAKHOU M.S., BOUGUEDOURA N. et BENNACEUR M., 2006.** Régénération de quelques variétés de palmier dattier *Phoenix dactylifera* L., par embryogenèse somatique : évaluation de la conformité des vitroplants par les marqueurs RAPD et AFLP. In ABED F., Conférence régionale : Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier Contre le Bayoud, Alger, p. 26-27.
- ZAID A. et TISSERAT B., 1983.** *In vitro* shoot tip differentiation in *Phoenix dactylifera* L. Date Palm Journal, 2(2), p. 163-182.
- ZAID A., 1984.** *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures a review. Date Palm J, 3(1), p. 269-275.
- ZAID A., 1989.** Étude histologique de l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). 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, p. 81 -95.
- 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 Phoeniculture et la Protection du Palmier Dattier, 1(4), p. 21-28.
- ZAID A. et ARIAS JIMENEZ E.J., 2002.** Date palm cultivation. FAO, Plant Production and Protection Paper, 156 (1), 110 p.
- ZOUINE J. et EL HADRAMI I., 2004.** Somatic embryogenesis in *Phoenix dactylifera* L.: Effect of exogenous supply of sucrose on proteins, sugars, phenolics and peroxydases activities during the embryogenic cell suspension culture. Biotechnology, 3 (2), p. 114-118.
- ZOUINE J. et AL HADRAMI I., 2007.** Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Scientia Horticulturae, 112, p. 221-226.
- ZRYD J. P., 1988.** Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Ed. Press, Polytechniques Romande, Suisse, 398 p.

## ANNEXES

	Eléments	Concentrations en mg/l
<b>Macroéléments MS</b>	KNO <sub>3</sub>	1 900
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650
	CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	440
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	370
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Micro-éléments MS</b>	MnSO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	22,3
	ZnSO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	8,6
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	6,2
	KI	0,83
	Na <sub>2</sub> MnO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,25
	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,025
	CaCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,025
	Na <sub>2</sub> EDTA	37,25
	FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	27,85
<b>Vitamines MS</b>	Glycine	2
	Pyridoxine	0,5
	A. nicotinique	0,5
	Thiamine HCl	0,1
	Myo-inositol	100
<b>Additifs</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	350
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100

**Annexe 1** : Composition de la solution de MURASHIGE et SKOOG simple (= milieu T), et modifiée par l'addition des additifs (milieu M = MS simple+additifs).

Milieux MS simples	Nombre d'explants à l'introduction primaire	
	cv. DN	cv. AK
T0	5	6
T1	5	7
T2	5	7
T3	4	6
T4	4	4
T5	5	6
T6	5	6

*Annexe 2 : Nombre total d'explants introduits dans les milieux T, chez les deux cultivars.*

Milieux MS modifiés	Nombre d'explants à l'introduction primaire	
	cv. DN	cv. AK
M0	5	12
M1	5	12
M2	4	12
M3	4	12
M4	4	12
M5	5	12
M6	5	12

*Annexe 3 : Nombre total d'explants introduits dans les milieux M, chez les deux cultivars.*

Repiquage R	Nombre d'explants total	Nombre d'explants contaminés	Pourcentages des contaminations
Introduction primaire	65	0	0
R1	67	1	1,49 %
R2	86	3	3,48 %
R3	99	5	5,05 %
R4	102	0	0
R5	143	1	0,70 %

**Annexe 4: pourcentages des contaminations (%) en fonction des repiquages chez DN :**

Repiquage R	Nombre d'explant total	Nombre d'explants contaminés	Pourcentages des contaminations
Introduction primaire	126	20	15,87 %
R1	120	5	4,16 %
R2	133	2	1,5 %
R3	126	10	7,83 %
R4	116	1	0,86 %
R5	136	9	6,61 %

**Annexe 5: pourcentages des contaminations (%) en fonction des repiquages chez AK :**

1 - tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements T sur l'induction de la callogenèse chez le cultivar DN.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3,23636	6	0,539394	3,19	*0,0176
Within groups	4,4	26	0,169231		
Total (Corr.)	7,63636	32			

LSD test

Method: 95,0 percent

Level Count Mean Homogeneous Groups

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
0	5	0,0	X
2	5	0,6	X
1	5	0,6	X
6	5	0,6	X
5	5	0,8	X
4	4	1,0	X
3	4	1,0	X

2- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements M sur l'induction de la callogenèse chez le cultivar DN.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1,11875	6	0,186458	0,76	0,6049
Within groups	6,1	25	0,244		
Total (Corr.)	7,21875	31			

3- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les milieux M et T sur l'induction de la callogenèse chez le cultivar DN.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1,39104	1	1,39104	5,90	*0,0180
Within groups	14,8551	63	0,235795		
Total (Corr.)	16,2462	64			

**Annexe 6 :**

1- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements T sur l'induction de calcs à structure granuleuse chez DN.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1,23634	5	0,247269	1,57	0,1816
Within groups	9,92308	63	0,157509		
Total (Corr.)	11,1594	68			

2- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements T sur l'induction de calcs à structure nodulaire chez DN.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,943994	5	0,188799	1,24	0,3020
Within groups	9,60673	63	0,152488		
Total (Corr.)	10,5507	68			

3- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements T sur l'induction de calcs à structure mixte chez DN.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2,65606	5	0,531212	2,47	*0,0416
Within groups	13,5468	63	0,215029		
Total (Corr.)	16,2029	68			

LSD test

Method: 95,0 percent

milieux T DN	Count	Mean	Homogeneous Groups
T1	5	0,0	X
T2	8	0,0	X
T6	7	0,285714	X
T3	20	0,45	X
T4	13	0,461538	X
T5	16	0,5625	X

Annexe 7:

**Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmier dattier (cultivars Deglet Nour et Akerbouch) en vue de la résistance contre le Bayoud.**

1- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements M sur l'induction de cals à structure granuleuse chez DN.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,842342	5	0,168468	1,08	0,3904
Within groups	4,83333	31	0,155914		
Total (Corr.)	5,67568	36			

2- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements M sur l'induction de cals à structure nodulaire chez DN.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1,36551	5	0,273102	1,73	0,1580
Within groups	4,90476	31	0,158218		
Total (Corr.)	6,27027	36			

3- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements M sur l'induction de cals à structure mixte chez DN.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3,67053	5	0,734106	4,78	0,0024
Within groups	4,7619	31	0,15361		
Total (Corr.)	8,43243	36			

LSD test  
Method: 95,0 percent

milieux M DN	Count	Mean	Homogeneous Groups
M2	7	0,0	X
M1	6	0,0	X
M6	6	0,333333	X
M3	7	0,428571	X
M5	7	0,571429	X
M4	4	1,0	X

*Annexe 8 :*

1- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements T sur l'induction de la callogenèse chez le cultivar AK.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	5,03448	6	0,83908	9,23	***0,0000
Within groups	2,0	22	0,0909091		
Total (Corr.)	7,03448	28			

## Test LSD

Method: 95,0 percent

Level Count Mean Homogeneous Groups

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
0	4	0,0	X
4	4	0,0	X
3	5	0,0	X
2	5	0,4	X
6	5	0,8	X
5	4	1,0	X
1	2	1,0	X

2- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements M sur l'induction de la callogenèse chez le cultivar AK.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4,40779	6	0,734632	5,62	***0,0001
Within groups	9,54221	73	0,130715		
Total (Corr.)	13,95	79			

## Test LSD

Method: 95,0 percent

Level Count Mean Homogeneous Groups

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
4	11	0,0	X
0	10	0,0	X
2	14	0,0714286	X
3	11	0,181818	X
5	12	0,25	X
1	11	0,363636	X
6	11	0,727273	X

3- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les milieux M et T sur l'induction de la callogenèse chez le cultivar AK.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,758637	1	0,758637	3,87	0,0518
Within groups	20,9845	107	0,196117		
Total (Corr.)	21,7431	108			

## Annexe 9 :

**Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmier dattier (cultivars Deglet Nour et Akerbouch) en vue de la résistance contre le Bayoud.**

1- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements T sur l'induction de cals à structure granuleuse chez AK.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2,70465	5	0,54093	2,53	*0,0454
Within groups	7,9	37	0,213514		
Total (Corr.)	10,6047	42			

LSD test  
Method: 95,0 percent

milieux T AK	Count	Mean	Homogeneous Groups
T2	3	0,0	X
T3	1	0,0	X
T4	6	0,0	X
T5	14	0,5	X
T1	10	0,6	X
T6	9	0,666667	X

2- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements T sur l'induction de cals à structure nodulaire chez AK.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0481728	5	0,00963455	0,38	0,8566
Within groups	0,928571	37	0,0250965		
Total (Corr.)	0,976744	42			

3- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements T sur l'induction de cals à structure mixte chez AK.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,665596	5	0,133119	0,84	0,5284
Within groups	5,84603	37	0,158001		
Total (Corr.)	6,51163	42			

*Annexe 10 :*

1- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements M sur l'induction de cals à structure granuleuse chez AK.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3,77485	5	0,754969	5,67	***0,0006
Within groups	4,79658	36	0,133238		
Total (Corr.)	8,57143	41			

LSD test

Method: 95,0 percent

milieux M AK	Count	Mean	Homogeneous Groups
M2	2	0,0	X
M5	6	0,0	X
M4	2	0,0	X
M3	9	0,111111	X
M6	13	0,230769	X
M1	10	0,8	X

2- tableau de l'analyse de la variance : comparaison entre les traitements M sur l'induction de cals à structure nodulaire chez AK.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,584737	5	0,116947	0,92	0,4770
Within groups	4,55812	36	0,126614		
Total (Corr.)	5,14286	41			

Annexe 11 :