

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة البليدة 1  
Université de Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie des Populations et des Organismes

**Mémoire**

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en biologie  
**Option : Génomique et Biotechnologie Végétale.**

**Thème**

**Contributions au développement en plants et acclimatation des  
hybrides somatiques chez trois cultivars de palmier dattier**

**Soutenu par :**

M<sup>lle</sup> CHAKLAL Khadidja

et

M<sup>lle</sup> KHESSANI Hanane

Le 07.10.2017

Devant le Jury :

- |                              |                      |              |               |
|------------------------------|----------------------|--------------|---------------|
| - M <sup>me</sup> GHANAI R.  | MAA                  | U.S.D. Blida | Présidente    |
| - M <sup>me</sup> AYADI R.   | MCB                  | U.S.D. Blida | Examinatrice  |
| - M <sup>me</sup> YATTA D.   | Chargée de recherche | INRAA        | Promotrice    |
| - M <sup>me</sup> CHEBATA N. | MAA                  | U.S.D. Blida | Co-promotrice |

Promotion 2016 /2017

## Remerciements

*Avant tous, nous tenons à remercier DIEU le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la volonté d'accomplir ce travail.*

*Nous tenons tous d'abord à exprimer nos très grandes gratitudee et nos reconnaissances les plus sincères à Madame YATTA, directrice et chef des projet palmier dattier au Laboratoire de Physiologie Végétal et Amélioration des Plantes de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA), qu'elle soit ici remerciée, pour ses encouragements et ses conseils, ainsi que pour sa simplicité, sa gentillesse, ses qualités humaines, sa sympathie et surtout d'avoir accepté de diriger ce travail.*

*Nous remercions également notre Co-promotrice Madame CHEBATA N. Professeur à la Faculté des sciences de la nature et de la vie de Blida, pour ses conseils et sa grande patience.*

*Nous remercions également les membres du jury qui ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail.*

*Nous tenons à remercier également :*

*Mme AYADI R, chef de la spécialité de la Génomique et Biotechnologie Végétale à la faculté de Blida, d'avoir accepté de présider le jury et d'examiner ce travail, ainsi que pour encouragement reçus tout au long de ce parcours universitaire.*

*Nous remercions toute l'équipe du plateau technique de la division Biotechnologies et amélioration des plantes qui nous ont accueillies chaleureusement surtout Mr BACHIRI A, pour ses informations et son soutien, Mr Amara B, Mr YAKHOUS. Ainsi que Mr Saad, Mlle Sana et Mme Lydia.*

*Nous remercions Mlle ZEMOUCHI Fouzia pour sa sympathie et surtout pour ses conseils.*

*Nous remercions enfin, tout ce qui ont contribué de près ou de loin et qui ont pris une part active à la réalisation de ce travail.*

*Hanane & Khadidja*

## *Liste des figures*

<b>Figure 1 :</b> Morphologie générale du palmier dattier.....	05
<b>Figure 2 :</b> Evolution de la superficie et des rendements du palmier dattier dans le monde principaux .....	08
<b>Figure 3 :</b> principaux pays explorateurs de dattes dans le monde (%).....	08
<b>Figure 4 :</b> l'évolution des exportations de dattes algérienne en quantité .....	10
<b>Figure 5 :</b> Matériel végétal utilisé pour l'étude caryologique .....	21
<b>Figure 6 :</b> Préparation des milieux de cultures. ....	23
<b>Figure 7 :</b> Plante à phase d'élongation .....	25
<b>Figure 8 :</b> La longueur des feuilles des vitroplants à acclimater .....	26
<b>Figure 9 :</b> Lavage des plantules, trempage des plantules dans une solution contenant un fongicide et rinçage avec de l'eau distillée .....	26
<b>Figure 10 :</b> Préparation de substrat .....	27
<b>Figure 11 :</b> Plantation des hybrides somatiques .....	27
<b>Figure 12 :</b> Les plantules installées dans la chambre de culture. ....	28
<b>Figure 13 :</b> L'arrosage des plantules .....	28
<b>Figure 14 :</b> Préparation de milieu d'irrigation.....	29
<b>Figure 15 :</b> Mesure de la teneur en chlorophylle .....	30
<b>Figure 16 :</b> Effet des régulateurs de croissance sur la longueur des feuilles .....	33
<b>Figure 17 :</b> Effet des régulateurs de croissance sur le nombre des feuilles .....	34
<b>Figure 18 :</b> Effet de régulateurs de croissance sur la longueur des racines .....	35
<b>Figure 19 :</b> Effet des régulateurs de croissance sur le nombre des racines néoformées.....	36
<b>Figure 20 :</b> Taux de survie des hybrides somatiques après huit semaines d'acclimatation ....	37
<b>Figure 21 :</b> Nombre des hybrides somatiques acclimatés .....	38
<b>Figure 22 :</b> Effet des régulateurs de croissance sur la concentration en chlorophylles des feuilles.....	39
<b>Figure 23 :</b> Plaques métaphasiques obtenues pour l'hybride 1F1, observées au microscope photonique Gx100.....	40
<b>Figure 24 :</b> Nombre des chromosomes observé dans différents plaques métaphasiques .....	41
<b>Figure 25 :</b> Cellules en métaphase obtenues suite au prétraitement par les deux agents mitoclasiques .....	42

*Liste des tableaux*

<b>Tableau 1</b> : La classification phylogénétique (la classification par <b>APGIII</b> en 2009) .....	04
<b>Tableau 2</b> : Le nombre et la production du palmier dattier, la répartition par Wilaya (2015).	09
<b>Tableau 3</b> : Le potentiel et la production par variété .....	09
<b>Tableau 4</b> : Les différentes combinaisons hormonales utilisées.....	24
<b>Tableau 5</b> : Différents nombres chromosomiques observés au niveau des cellules de l'hybride 1F1.....	40

## *Liste des abréviations*

**AIB** : Acide Beta-Indole Butyrique

**ANA** : Acide Naphtaléneacétique

**ANOA** : Acide Naphtoxyacétique

**APG** : Angiosperms Phylogeny Group.

**CCI** : Concentration Chlorophylle Index

**DN** : Deglet Nour.

**EDTA** : Ethylene Diamine Tetra Acetic acid

**FAO** : Food and Agriculture Organisatio

**F.o.a** : *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*.

**IPA** : Isopentényl-Adénine.

**KIN** : Kinétine

**M100** : Milieu solide avec 100 mg/l de 2,4-D.

**MS** : Murashig et Skoog (1962).

**PEG** : Polyéthylène glycol.

**Picloram** : Acide 4-amino-3,5,6 trichloropicolinique.

**TGZ** : Tegaza.

**TKB** : Takerboucht.

## SOMMAIRE

Résumé

Abstract

المخلص

Introduction .....01

### *Synthèse bibliographique*

1. Le palmier dattier, <i>Phœnix dactylifera</i> .....	04
1.1. Etymologie et Taxonomie .....	04
1.2. Etude morphologique .....	04
1.3 Répartition géographique .....	06
1.3.1. Dans le monde .....	06
1.3.2. En Algérie.....	06
1.4. Ecologie .....	07
1.5. Importance économique du marché phœnicicol .....	07
1.5.1. La production des dattes dans le monde .....	07
1.5.2. Production de datte en Algérie .....	08
1.6. Génétique .....	10
1.7. Les maladies.....	11
1.8. Les techniques de multiplication des palmiers dattiers .....	12
1.8.1. La multiplication par semis .....	12
1.8.2. La multiplication par rejets .....	12
1.8.3. La multiplication <i>in-vitro</i> .....	12
1.9. Acclimatation .....	15
1.9.1. Condition d'acclimatation .....	16
1.9.2. Prévention des maladies .....	17
1.9.3. Contrôle des paramètres physique .....	17
2. Notion de cultivar, variété et clone .....	17
2.1. Cultivar .....	17
2.2. Variété .....	18
2.3. Clone .....	18
3. Etude caryologique .....	18

### *Matériel et méthodes*

1. Matériel .....	20
1.1. Matériel biologique (matériel végétal) .....	20
1.1.1. Les hybrides somatiques.....	20
1.1.2. Les graines .....	20

1.2.3. Les extrémités racinaires des hybrides somatiques .....	20
1.2. Matériel non biologique .....	21
1.2.1. produits .....	21
1.2.2. les appareillages .....	21
1.2.3. Composition du milieu de culture .....	21
1.2.4. Milieux de culture solides GMN <sub>200</sub> et GMP .....	22
2. Méthodes .....	22
2.1. Développement en plants .....	22
2.1.1. Technique de stérilisation du matériel végétal .....	22
2.1.2. Stérilisation des graines .....	23
2.1.3. Préparation du milieu de culture (GMN <sub>200</sub> ; GMP) .....	23
2.1.4. Condition de culture .....	24
2.1.5. Effet des régulateurs de croissance sur la phase d'élongation.....	24
2.2. Acclimatation des plantules .....	25
2.2.1. Préparation des substrats pour acclimatation .....	27
2.2.2. Préparation de solution d'irrigation pour acclimatation .....	29
2.2.3. Prévention des maladies .....	29
2.2.4. Teneur en chlorophylle .....	29
2.3. Analyse statistique .....	30
2.4. Dénombrement caryologique.....	31
2.4.1. Scarification des graines .....	31
2.4.2. Mise en germination .....	31
2.4.3. Technique de coloration .....	31

*Résultat et discussion*

1. Effet des régulateurs de croissance sur la phase d'élongation.....	33
1.1. Longueur des feuilles .....	33
1.2. Nombre des feuilles.....	34
1.3. Longueur des racines.....	35
1.4. Nombre des racines.....	36
2. Phase d'acclimatation.....	37
2.1. Effet de l'acclimatation sur les plantules.....	37
2.2. Teneur en chlorophylles.....	38
3. Dénombrement chromosomique.....	40
Discussion .....	43
Conclusion .....	47

## **Résumé**

La maîtrise des techniques *in vitro* chez le palmier dattier présente un grand intérêt tant sur le plan agronomique, peut être intégrée dans le schéma d'amélioration des cultivars appréciés pour leur qualité et leur résistance au bayoud, que sur le plan fondamental pour une meilleure connaissance de l'espèce.

Notre étude a pour objectif primordial d'étudier l'effet de différentes combinaisons hormonales sur les hybrides somatiques en phase d'élongation et d'acclimatation du 1F1 et 1F2, dans le but d'assurer une vigueur optimale des plantules durant la phase d'élongation et de minimiser les problèmes de pertes et de flétrissements pendant l'acclimatation, et pour la production de plantes entières de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) résistants au bayoud.

Huit milieux de culture sont utilisés lors de développement en plants, avec différentes balances hormonale (ANA, AIB et KIN) dans le but d'assurer une vigueur optimale des hybrides somatiques et de minimiser les problèmes de pertes durant la phase d'acclimatation.

Cette étude a montré une élongation plus importante des feuilles en faveur l'AIB et le KIN. Des formations de feuilles et bonne élongation des racines ont été observées dans le milieu sans hormones de croissance. La meilleure émission racinaire a été obtenue dans les milieux contenant l'ANA et l'AIB. Ces hormones se sont révélées plus efficace pour l'obtention de plantes présentant une bonne teneur en chlorophylle.

Concernant l'effet d'acclimatation sur les hybrides somatique, les plantules vigoureuses obtenues après la culture *in vitro* ont été acclimatées avec succès à partir de la première semaine, marquant le meilleur service, jusqu'à la huitième semaine où nous avons observé une baisse de cette service, avec un taux de reprise moyen arrive à 68 %.

Le deuxième objectif de ce travail est l'évaluation des hybrides somatiques par une étude caryologique. Pour réaliser ce but nous avons établi une méthode pour obtention des plaques métaphasiques ont été remplies grâce à la 8Hydroxy Quinoléine, avec l'utilisation des enzymes qui donnent des observations plus claires chez le matériel génétique **1F1 (DN / TKB)** avec des nombre des chromosomes différents (18, 24, 27, 36 et 46).

Les hybrides somatiques seront transférés à l'acclimatation au champ pour obtenir probablement par la suite des plantes résistant à la maladie du bayoud.

**Mots clés :** acclimatation, caryologie, culture *in vitro*, hybrides somatiques, *Phoenix dactylifera* L.



## ملخص

إن العمل على اتقان تقنيات المختبر عند نخيل التمر له أهمية كبيرة في القطاع الزراعي، ويمكن دمجها في مخطط تحسين الأصناف المستتيرة ومقاومة مرض البيوض، فضلا عن ذلك فإن هذه التقنية أساسية لمعرفة أفضل الأنواع وأجودها. ومنه فإن الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو العمل على تحسين وتجديد و ضمان قدر عالي من قوة و صلابة الهجائن الجسدية خلال مرحلة الاستطالة و كذا التقليل من الخسائر في مرحلة التكيف مع الوسط الخارجي، وإنتاج كامل لنبات النخيل (*Phoenix dactylifera L*) المقاوم للبيوض.

قمنا باستخدام ثمانية أوساط زراعية لتنمية النباتات في مخبر الفيزيولوجيا وتحسين النباتات، مع إضافة هرمونات مختلفة للنمو ( AIB, ANA, و KIN ).

هذا العمل مكثنا من الحصول على طول معتبر للأوراق عند استعمال AIB و KIN. وكذا تم استنتاج أن اعلى عدد للأوراق وأحسن طول للجذور لوحظ وبمعدل جيد عند الوسط الخالي من هرمونات النمو. أما بخصوص أفضل وسط مكثنا من التحصل على جذور جديدة، فهو الوسط الذي يحوي ANA و AIB. ومنه فإن هذه الهرمونات تعتبر الهرمونات الأكثر ضمانا للحصول على نباتات ذات يخضور جيد وهذا بعد نتائج جيدة توصلنا إليها خلال فترة تأقلم الهجائن الجسمية للنخيل بعد استعمال تقنية الزراعة الاصطناعية. و ظهرت هذه النتائج من الأسبوع الأول الى غاية الأسبوع الثامن اين لوحظ انخفاض محسوس بنسبة 68%.

اما الهدف الثاني المسطر فهو العمل على تطوير الهجائن الجسمية من خلال دراسة وراثية. وهذا يتم عن طريق الحصول على صفائح الميتافاز التي تم الوصول لها بواسطة 8Hydroxy Quinoléine مع استعمال انزيمات معينة التي أعطت نتائج جيدة للسنف الجيني 1F1 مع ظهور اختلاف في العدد الكروموزومي الخاص به (8, 24, 27, 36, 46).

الهجائن الجسمية للنخيل سيتم تحويلها الى الميدان للتأقلم والتكيف مع الوسط الخارجي بعد فترة معينة وهذا من اجل امكانية الحصول على نباتات مقاومة للبيوض.

**الكلمات المفتاحية:** التأقلم، الزراعة الاصطناعية، الدراسة الوراثية، الهجائن الجسمية، *Phoenix*

*dactylifera L.*

### *Abstract*

The mastery of *in vitro* techniques in the date palm is more interest in terms of agronomy, and can be integrated in the cultivars improvement for their quality and resistance to bayoud disease, as well as at the fundamental level for a better knowledge of the species.

Our objective is to study the effect of different hormonal combinations on the phase of elongation and acclimatization of somatic hybrids 1F1 and 1F2 in order to ensure optimal vigor of the seedlings during the elongation phase and to minimize the problems of loss and wilting during acclimation and for the plants production of date palm (*Phoenix dactylifera* L) resistant to bayoud disease.

Eight culture media are used for plant development, with different hormonal solution (ANA, AIB and KIN) in order to ensure the optimal vigor the somatic hybrids and to minimize the loss problems during the acclimatization steaps.

This study showed a greater elongation of the leaves in favor of AIB and KIN. Leaf formations and good elongation of roots were observed in the medium without growth hormones. The best root was obtained in with ANA and AIB. These hormones have been found to be more effective in obtaining plants with good chlorophyll content.

Concerning the acclimatization effect on somatic hybrids, the vigorous plants obtained after *in vitro* culture, were acclimatized successfully from the first week, with marking the best service, until the eighth week when we observed a decrease in this service, with an average recovery rate of 68%.

The second objective of this work is the evaluation of somatic hybrids by a caryological study. To achieve this objective, we have established a method for obtaining the metaphase plates were obtained by 8hydroxyl-quinoline. With using the enzymes which provide clearer observation in genetic material **1F1** with different numbers of chromosome (18, 24, 27, 36 and 46).

The somatic hybrids will be transferred to the acclimation field to get plants resistant to bayoud disease.

**Keywords :** acclimatization, carpology, *in vitro* culture, somatic hybrid, *Phoenix dactylifera* L.

## ***Introduction***

---

La Phœniciculture est apparue il y a 10 mille ans en Mésopotamie et en Égypte puis a progressé vers les pays du Maghreb au 17<sup>ème</sup> siècle (**WRIGLEY, 1994 ; BRAC DE LA PERRIERE, 1995**).

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* L. par Linné en 1734. *Phoenix* dérive de « *Phoenix* », nom du dattier chez les Grecs de l'antiquité qui le considéraient comme l'arbre des Phéniciens (du grec phoen : rouge sang caractéristique de la couleur de la peau de cette ethnie, d'après les Grecs) et *dactylifera* vient du latin « *dactylus* » dérivant du grec « *daktulos* », signifiant doigt, en raison de la forme du fruit du dattier (**CHEIKH, 2014**).

Le palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. prend son origine de la haute antiquité, il est considéré comme le plus ancien arbre cultivé au monde.

Bien que largement cultivée, l'existence de la forme sauvage du palmier dattier n'est pas connue jusqu'à présent (**DJERBI, 1990 ; BARROW, 1998**). On pense que son ancêtre est *phœnix reclinata* Jacq de l'Afrique tropicale, ou *Phoenix sylvestris* L. Roxb, d'Inde, ou un hybride entre ces deux espèces. Ces derniers ont un fruit de taille plus petite et agréable au gout (**KHELAFI, 2012**).

Le palmier dattier appartient à la famille des Arecaceae, c'est une angiosperme, monocotylédone, tropicale à reproduction sexuée allogame, aboutissant à la formation de populations composées d'individus mâles (Dokkar) et femelles (Nakhla) difficiles à caractériser précocement (**BUELGUEDJ, 2007**). Elle est représentée par 200 genres et 2700 espèces réparties en six sous familles. La sous famille des Coryphoïdées est elle-même subdivisée en trois tribus (**RIEDACKER et al., 1990**). Cultivé depuis plus de 4000 ans, le palmier demeure une source vitale pour ses fruits : les dattes dans les zones arides et semi arides du globe (**MERANEH, 2010**).

Cette espèce joue à la fois un rôle économique grâce à la production de dattes qui constitue la base de l'alimentation humaine et animale et assure par sa frondaison un recouvrement qui crée un climat favorable à la culture sous-jacente (arbres fruitiers, légumes et autres cultures vivrières) (**BENHAMED, 2016**). Cultivée en Afrique du nord et le moyen orient (**SGHAIER et al., 2009**). Il est cultivé aussi dans les régions Arabes et les pays de la méditerranée (**MOGHAIEB et al., 2011**).

L'Algérie classée parmi les principaux pays producteurs de dattes, dispose d'un potentiel Phœnicicole important avec son millier de cultivars inventoriés, celui-ci offre par la dominance variétale des dattes communes (80% des cultivars sont rares ou très rares) à côté des cultivars connus et appréciés (20%) (**BEN ABBES, 2011**), elle se distingue par contre par sa faible présence sur le marché international. Selon les statistiques mondiales,

## ***Introduction***

---

l'Algérie est classé troisième pays producteur de dattes après l'Égypte et l'Iran, il a exporté six (06) fois moins que la Tunisie (1<sup>er</sup> exportateur mondial de dattes malgré sa faible production) (ONFAA, 2017).

Malheureusement le palmier dattier est confronté à diverses contraintes (biotiques et abiotiques) qui rendent la menace grandissante (SEDRA, 2013). La plus redoutable étant la fusariose vasculaire appelée localement Bayoud qui est une Trachéomyose c'est-à-dire une maladie due à un champignon faisant partie de la mycoflore de la rhizosphère dénommé *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. W.L (GORDON, 1965) (E.P.P.O, 1997).

Plusieurs méthodes chimiques et biologiques ont été employées pour lutter contre cette maladie qui ne cesse de se propager non seulement dans les jardins déjà infestés mais aussi dans les plantations indemnes (BOUGUEDOURA, 2007; YATTA et BOUGUEDOURA, 2013), cependant peu de cultivars présentant une résistance naturelle à la maladie sont connus actuellement et même lorsqu'ils existent, ils sont le plus souvent de qualité dattière médiocre (BOUGUEDOURA, 2007 ; EL HADRAMI et al., 2005 ; YATTA et BOUGUEDOURA, 2013).

La lutte contre le Bayoud repose sur des mesures prophylactiques car aucun moyen de lutte curatif n'a été trouvé (ZAID, 2002). Le seul moyen qui paraît être le plus apte à contre carrer cette maladie est de loin la lutte génétique (EL HADRAMI, 2005 ; SEDRA, 2005) qui consiste en la production de cultivars combinant la résistance et la qualité des dattes, soit par mutagenèse, par fusion de protoplastes ou la transgénèse (CHABANE et al., 2007 ; YATTA et al., 2014 ; YATTA et al., 2015 ; YATTA et al., 2016 ).

Cette approche ne peut être efficace qu'avec l'utilisation des techniques de culture *in vitro* qui permettent la multiplication de cultivars résistants (FERRY et al., 1998).

Une des voies actuelles permettant la prolifération rapide du Palmier est l'embryogenèse somatique (AMMAR et BENBADIS, 1977 ; TISSERAT, 1982). La multiplication *in vitro* du palmier dattier par embryogenèse somatique demeure la voie la plus intéressante ; elle permet la production d'embryons à partir de cellules somatiques avec d'énormes avantages dont le taux de multiplication très élevé et une période de régénération rapide (YATTA., 2007).

Par ailleurs, l'utilisation de l'outil biotechnologique fondé sur les techniques de culture *in vitro* constitue sans doute le moyen le plus prometteur pour la reconstitution des palmeraies dévastées via une multiplication massive du palmier dattier. La culture *in vitro* permet donc soit la multiplication conforme, soit la création de variétés nouvelles

## ***Introduction***

---

(BOUGUEDOURA, 1991). C'est pour cela que la fusion des protoplastes s'avère être un outil performant pour la recherche de plantes résistantes aux bayoud.

Nos travaux entrent dans le cadre d'un programme de recherche, lancé par l'équipe Palmier, pour l'amélioration et la conservation du palmier dattier par les techniques de culture *in vitro*.

Notre étude portera sur les hybrides somatiques de palmier dattier appartenant à trois cultivars Deglet Nour « sensible » et Takerboucht « résistante » et Tegaza « sensible».

L'objectif de notre travail est de tester l'effet des différentes balances hormonales sur ces hybrides afin d'optimiser la phase développement en plants et acclimatation.

L'évaluation des hybrides et les pieds mère se fait par étude caryologique qui consiste en l'observation et dénombrement des chromosomes. Ces derniers ne sont visibles que dans les cellules en division, au stade métaphasique.

Ce mémoire présente notre travail qui est divisé en quatre parties :

- ✓ Germination des graines de pieds mère.
- ✓ Germination et développement en plants *in vitro*.
- ✓ Acclimatation des hybrides somatiques.
- ✓ Etude caryologique.

# Synthèse Bibliographique

---

## 1. Le palmier dattier, *Phœnix dactylifera*

### 1.1. Etymologie et Taxonomie

Le palmier dattier a été dénommé *Phœnix dactylifera* par Linné en 1734. Le terme *Phœnix* dérive de « *Phoenix* », nom du dattier chez les grecs et *dactylifera* vient du latin « dactylus » dérivant du mot grec « dactylos », signifiant « doigt », à cause de la forme du fruit (MUNIER, 1973).

*Phœnix dactylifera*, est classé, selon APG III (2009) in ABADI et CHEKLAINÉ (2015), Comme suit:

**Tableau 1.** La classification phylogénétique (la classification par APGIII en 2009)

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<b>Embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Monocotylédones
<b>Ordre</b>	Arecales
<b>Famille</b>	Arecaceae
<b>Genre</b>	<i>Phoenix</i>
<b>Espèce</b>	<i>Phoenix dactylifera</i> L.

### 1.2. Etude morphologique

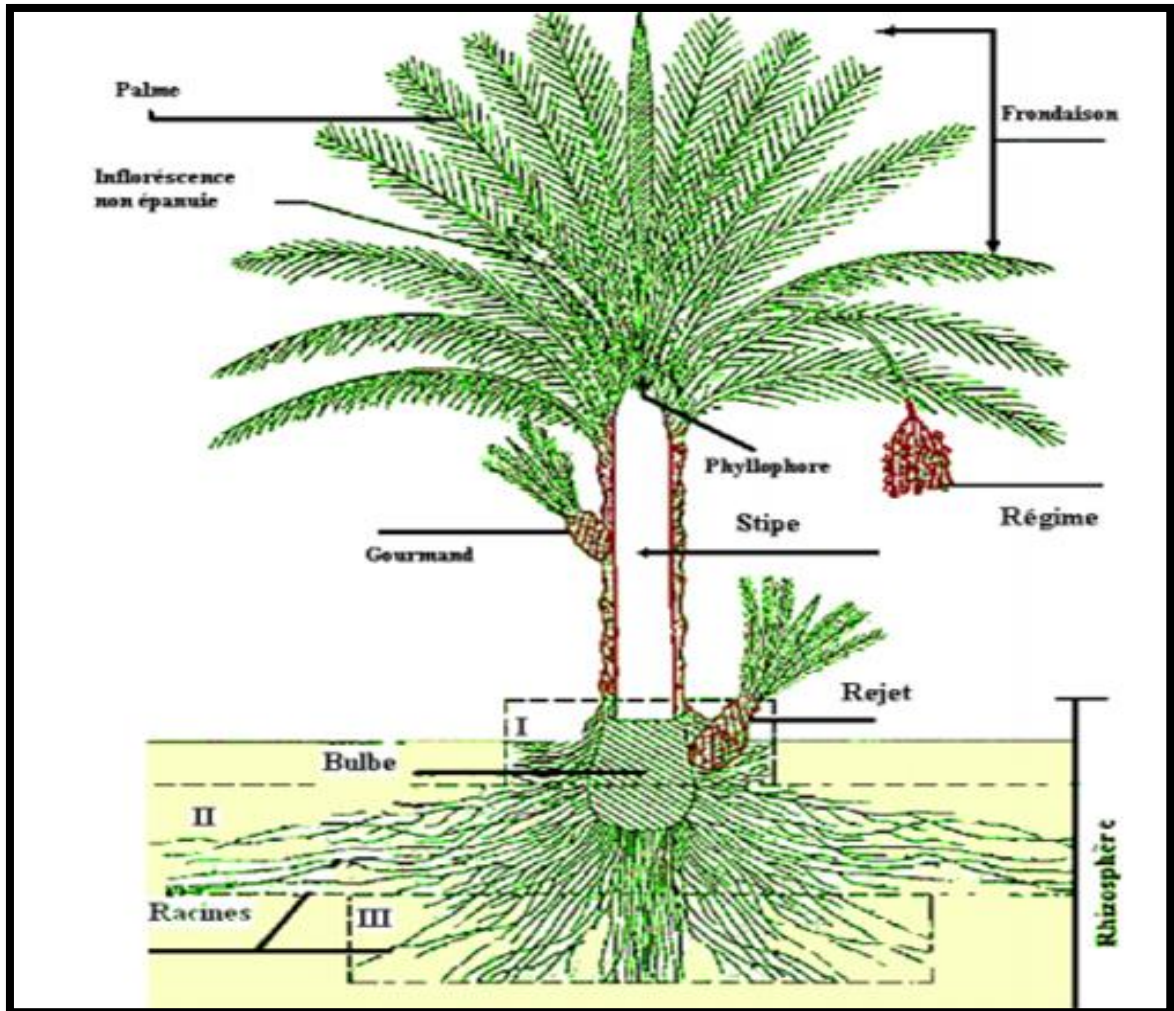
Le palmier dattier est une monocotylédone arborescente et dioïque, sa morphologie change pendant son développement du stade plantule à l'âge adulte.

Le système racinaire du palmier dattier est de type fasciculé. Il est formé de plusieurs types de racines :

- Les racines de premier ordre sont sensiblement cylindriques sur toute leur longueur, leur extrémité conique ne présente jamais de poils absorbants, elles prennent toute naissance à la base du stipe.
- Les racines du deuxième ordre sont portées par les racines de premier ordre, elles ont une longueur variant entre 20 et 25 cm et un diamètre moyen de 3.5 mm, ces racines présentent la même morphologie et structure des racines de premier ordre.
- Les racines du troisième ordre sont portées par les racines du deuxième ordre et ont un diamètre de 1 mm à 1.5 mm, ce sont des racines à croissance lente, courte et très abondante (BENHAMED, 2016).

## Synthèse Bibliographique

Sur le plan végétatif, le tronc ou autrement dit le stipe (figure 1), est de forme cylindrique, il peut atteindre 20 m de long ou plus et peut avoir durant sa vie des pseudo-ramifications due au développement des gourmands ou des rejets (MUNIER, 1973; ZAÏD, 2002).



**Figure 1.** Morphologie générale du palmier dattier (MUNIER, 1973).

Le pétiole issu de l'élargissement du rachis est l'élément de liaison avec le tronc ainsi que les palmes qui sont des feuilles composées, pennées. Ces dernières se disposent autour du tronc sous une forme d'hélice. Les segments inférieurs sont transformés en épines, plus ou moins nombreuses, plus ou moins longues (MUNIER, 1973). L'ensemble des palmes vertes constitue la couronne, qui peut contenir jusqu'à 200 palmes chez un palmier adulte (PEYRON, 2000).

Le palmier-dattier est une plante dioïque, c'est-à-dire chaque individu ne porte que des inflorescences d'un même sexe. Ces dernières en grappes d'épis, prennent naissance du

développement des bourgeons axillaires situés à l'aisselle des palmes dans la région coronaire du tronc. Les fleurs sont portées par des pédicelles, ou des épillets qui sont à leurs tours portés par un axe charnu, la hampe ou spadice. Elles sont entourées d'une gaine ou bractée membraneuse close appelée spathe (AMORCI, 1975 ; PEYRON, 2000 ; ZAID et al., 2002).

Les fruits appelés dattes, sont des baies, ovoïdes, de couleur jaune clair à brun plus ou moins foncé, leur poids varie de quelques grammes à plus de 50 g, contenant une pulpe sucrée et une seule graine, lisse, de consistance ligneuse, avec un sillon ventral et un embryon dorsal (PEYRON, 2000).

### **1.3 Répartition géographique**

#### **1.3.1. Dans le monde**

Le dattier est une espèce xérophile et ne peut fleurir et fructifier normalement que dans les déserts chauds (AMORSI, 1975). Le palmier dattier fait l'objet d'une plantation intensive en Afrique méditerranéenne et au Moyen-Orient. L'Espagne est l'unique pays européen producteur de dattes, principalement dans la célèbre palmeraie d'Elche (TOUTAIN, 1996). Aux Etats-Unis d'Amérique, le palmier dattier fut introduit au XVIII<sup>ème</sup> siècle. Sa culture n'a débuté réellement que vers les années 1900 avec l'importation de variété irakienne. Le palmier dattier est également cultivé à plus faible échelle au Mexique, en Argentine et en Australie (BOUGUEDOURA, 1991 ; MATALLAH, 2004).

Les limites extrêmes de la distribution géographique sont entre les altitudes 10° Nord (Somalie) et 39° Nord (Elche en Espagne ou Turkménistan). Les secteurs les plus favorables pour cette culture sont situés entre 24° et 34° Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Égypte, Irak, Iran, Arabie Saoudite, Soudan,....). Le palmier dattier se trouve aussi aux Etats-Unis entre 33° et 35° Nord, d'autres surfaces négligeables pour la culture du palmier dattier sont à l'hémisphère sud (Australie, Mexique, Argentine,...) (BEN ADBELLAH, 1990 ; ZAID, 2002).

#### **1.3.2. En Algérie :**

La culture de palmier dattier occupe toutes les régions situées sous l'Atlas saharien, soit 6000 ha depuis la frontière Marocaine à l'Ouest, jusqu'à la frontière Tuniso-libyenne à l'Est.



Du nord au sud du pays, la culture du palmier dattier, s'étend depuis la limite sud de l'Atlas saharien jusqu'à Regghane à l'Ouest, Tamanrasset au centre et Djanet à l'Est (MATALLAH, 2003).

### **1.4. Ecologie**

Le palmier dattier est cultivé dans les régions arides et semi-arides à des altitudes ne dépassant pas quelques centaines de mètre. Il peut s'adapter à de nombreuses conditions, grâce à sa grande variabilité. Différents facteurs climatiques et même édaphiques, sont très importants pour pouvoir déterminer la convenance d'un emplacement spécifique pour la culture d'un palmier dattier. En effet, le palmier dattier est une espèce thermophile qui nécessite pour sa croissance et la production dattière des températures supérieures à 30°C, héliophile, cultivée dans les régions à forte luminosité et exige un taux d'humidité inférieur à 40%. Il nécessite également une alimentation suffisante en eau (16.000 à 20.000 m<sup>3</sup>/ha/an) et un sol neutre, profond, légers et assez riche ou susceptible d'être fertilisé (ZAID, 2002).

### **1.5. Importance économique du marché phœnicol**

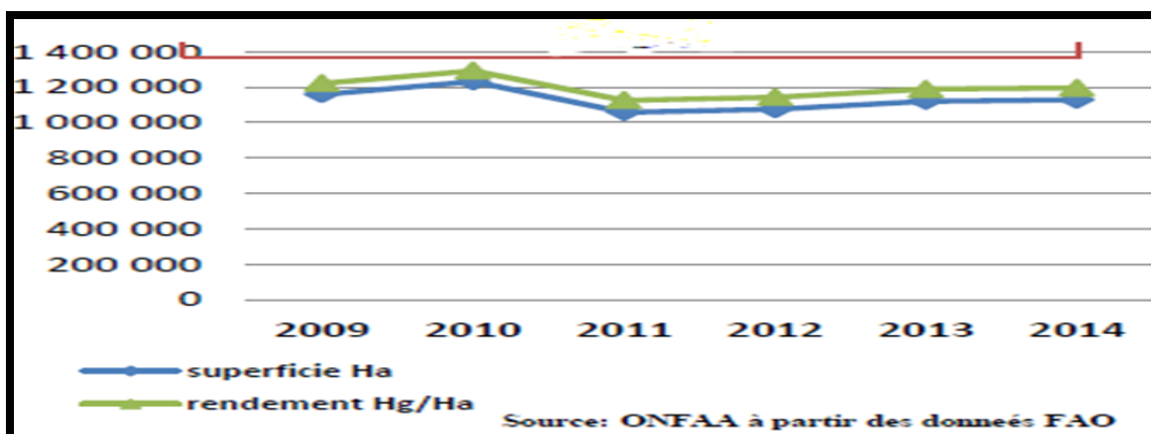
Les dattes, fruits de palmier dattier, sont de sources d'alimentation principal dans les régions arides de l'Afrique du nord et le Moyen-Orient et elles jouent un rôle central dans l'économie et la vie sociale dans ces régions (EL-DEEK *et al.*, 2010).

#### **1.5.1. La production des dattes dans le monde**

La production mondiale de dattes est presque de 8 millions de tonnes générant ainsi chaque année des millions de dollars US pour les pays producteurs (ZEHDI *et al.*, 2015).

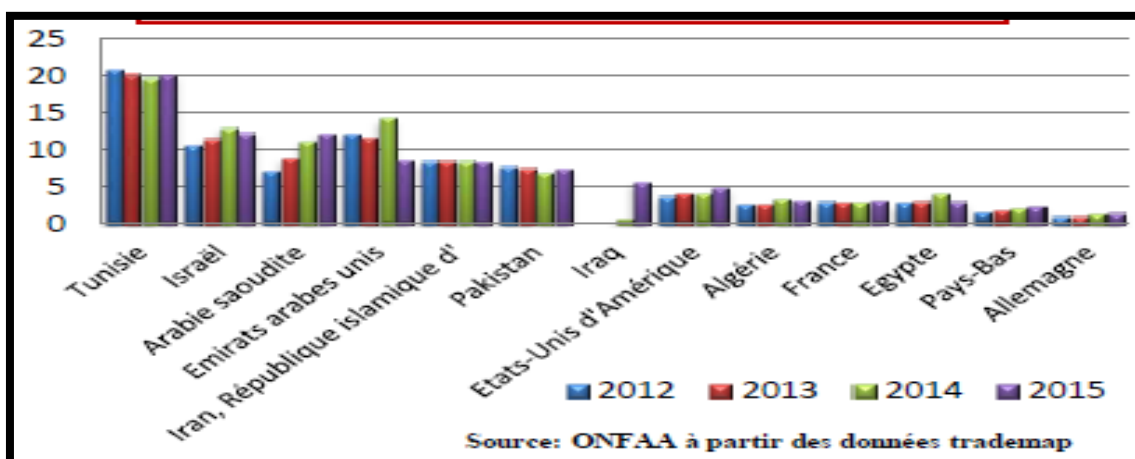
En termes d'exportation, les tonnages exportés sont en croissance continue, passant de près de 21.000 Tonnes en 2013 à plus de 28.000 Tonnes en 2015. La France reste le premier client de l'Algérie avec (en 2015) près de 13.400 Tonnes, suivie par la Fédération de Russie avec 3.300 Tonnes, les Emirats Arabes Unis avec 1.600 Tonnes, le Canada avec 1.200 Tonnes, l'Inde avec 1.100 Tonnes, les USA avec 1.000 Tonnes.

A l'exception de l'année 2011, la superficie récoltée mondiale et les rendements évoluent proportionnellement depuis 2009 jusqu'au 2014 (figure 2).



**Figure 2.** Evolution de la superficie et des rendements du palmier dattier dans le monde.  
Source : OFAA à partir des données FAO

Après une augmentation en 2013, les exportations mondiales de dattes en valeurs se sont presque stabilisées en 2014 pour baisser légèrement par la suite en 2015 (figure 3). Par contre, les quantités exportées ont connu une baisse depuis 2012 jusqu'à 2015.



**Figure 3.** Principaux pays explorateurs de dattes dans le monde (%)

Source OFAA à partir des données trademap

### 1.5.2. Production de datte en Algérie

Selon les statistiques les plus récentes (2015) du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, le palmier dattier occupe en Algérie une superficie évaluée à 167.000 hectares pour un nombre de palmiers estimé à plus de 18,6 millions d'unités et une production de dattes, toutes variétés confondues, de près de 990.000 tonnes (tableau 2). Les surfaces des palmeraies diffèrent d'une wilaya à une autre. La plus importante concerne les wilayas de Biskra et d'El-Oued atteignant toutes les deux 53.53ha. Les régions phoenicicoles se situent généralement au sud de l'atlas saharien et couvrent 17 wilayas (tableau 2).

## Synthèse Bibliographique

La wilaya de Biskra est la première région phoenicicole avec 27,4 % de la superficie totale, 23,1 % du nombre total de palmiers dattiers et 41,2 % de la production nationale de dattes.

**Tableau 2.** Nombre et la production du palmier dattier. La répartition par Wilaya (2015).

Wilaya	Production (quintaux)	Nombre de palmiers	Surface (hectares)
Biskra	2.077.900	4.315.100	42.910
El Oued	2.474.000	3.788.500	3.680
Ouargla	1.29.300	2.575.600	21.980
Adrar	910.300	3.977.000	28.330
Ghardaïa	565.000	1.246.500	10.850
Béchar	300.500	1.639.800	14.120
Tamanrasset	109.400	688.900	7.000
Khenchela	68.200	124.400	770
Tébessa	20.500	61.800	820
Laghouat	16.200	37.300	320
Illizi	15.600	129.100	1.250
Batna	14.000	28.700	190
El bayadh	10.300	63.900	640
Naama	10.200	50.600	510
Tindouf	8.400	45.200	430
Djelfa	6.800	10.100	100
M'Sila	0	0	0
<b>Total :</b>	<b>9.903.600</b>	<b>18.605.100</b>	<b>166.900</b>

(SIDAB, 2016)

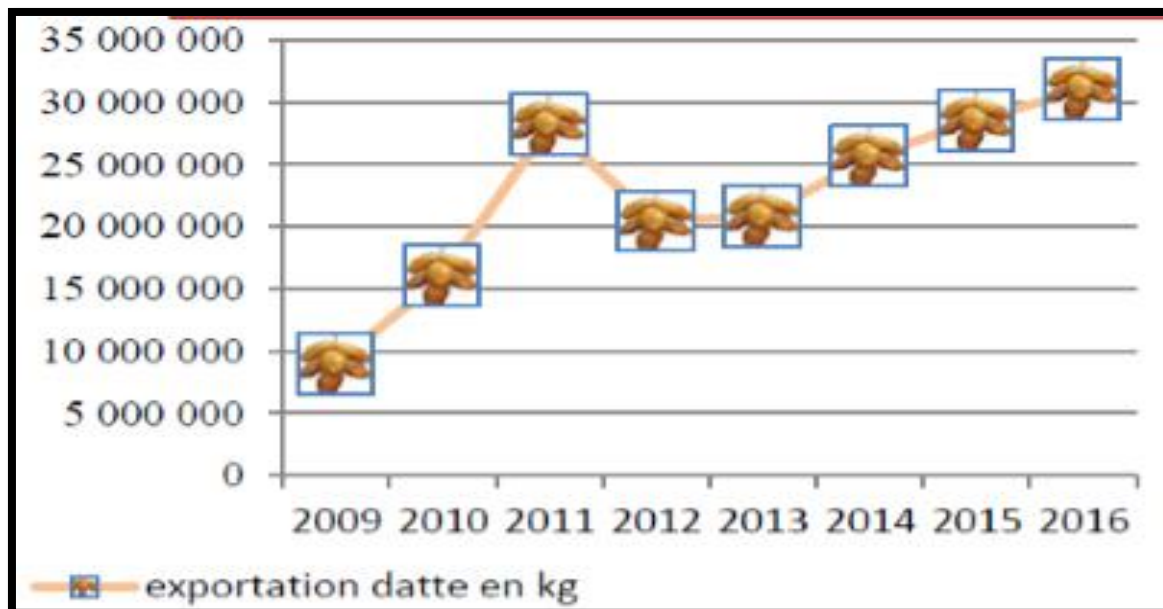
Les variétés de dattes sont nombreuses (plus de 9000) mais seules quelques-unes ont une importance commerciale tel que Deglet nour , Ghers et Degla beida (tableau 3).

**Tableau 3.** Le potentiel et la production par variété.

Variété	Nombre de Palmiers	Production(Quintaux)
Deglet nour	7.194.700	5.249.500
Ghers et analogues	4.192.000	1.928.500
Degle Beida et analogues	7.218.400	2.725.700

(SIDAB, 2016)

Malgré que la production totale de dattes en Algérie a constamment augmenté ces dernières années ; l'exportation par contre a connu une importante fluctuation. Après une hausse de 2009 à 2011, les exportations ont chuté pour connaître à nouveau une hausse à partir de 2013 afin d'atteindre les 31048,184 tonnes en 2016 (figure 4).



**Figure 4.** L'évolution des exportations de dattes algérienne en quantité

Source : ONFAA à partir des données du CNS (2016)

### 1.6. Génétique

Le genre *Phoenix* est constitué d'espèces dioïques, hétérozygotes à reproduction allogame. Ces espèces sont diploïdes, le nombre chromosomique est de  $2n=36$  ( $n=18$ ). Selon **Munier** en 1973 le *Phoenix dactylifera* L. est un hybride probable de plusieurs *phoenix*, qui provoquent une forte hétérogénéité de la descendance.

Ainsi, il existe de nombreux hybrides résultant de croisements naturels tels que *P.dactylifera* L. X *P. Sylvestris* Roxb. (Inde) ; *P. dactylifera* L. *reclinata* Jacq. (Sénégal) et *P. Dactylifera* L. x *P. canariensis* Chabaud. (Maroc et Algérie).

Chez *Phoenix dactylifera* L. des variations du nombre chromosomique entre variétés mais aussi au sein d'une même variété ont été rapportées (**ZAID et al., 2002**). Cette richesse a permis la sélection et la création de génotype de qualité résistants aux maladies (**MICHEL et al., 1998**). Le patrimoine génétique en cultivars et en hybrides de palmier dattier est considérable, mais la question de conformité et non-conformité des vitroplants de palmier dattier produits par divers laboratoires commerciaux selon la technique de l'embryogenèse somatique et leur évaluation par étude caryologique reste encore sans réponse précise. Pour

cela, les recherches sur son amélioration génétique sont restées très limitées et généralement sans grands résultats (SAAIDI, 1990).

### 1.7. Les maladies

Le palmier dattier peut être menacé par diverses pathologies dues à des ravageurs ou à des parasites. On peut citer comme exemple : La maladie du «Boufaroua», due à un acarien, *Oligonychus safrasiticus* ; La maladie du «Djereb», due à la cochenille blanche, *Parlatoria blanchardi*. La pourriture de l'inflorescence ou «Khamedj», causée par le champignon imparfait, *Mauginiellascaetae*. La plus redoutable est le Bayoud qui fut observée pour la première fois vers 1870 dans la vallée de Draa au Maroc. Elle a fait son apparition en Algérie vers 1898, et depuis, sa progression s'est effectuée du sud-ouest vers le centre-sud décimant plus de trois (03) million d'arbre sur son passage. L'agent causal est un champignon dénommé *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.W.L (GORDON, 1965) (E.P.P.O, 1997). Il se conserve pendant très longtemps sous forme de chlamydospores dans les tissus de palmiers malades particulièrement au niveau des racines mortes (BOUNAGA et al., 1990 ;ZAID et al.,2002). Les symptômes externe du Bayoud sont connus ; sur un arbre à l'origine sain, une palme de la couronne moyenne se dessèche et blanchit ; les folioles se dessèchent de base en haut et se replient vers le rachis. La palme prend l'aspect caractéristique d'une plume mouillée. Les palmes voisines sont atteintes à leur tour et la totalité du bourgeon terminal finit par se dessécher, entraînant la mort du palmier, dans des délais qui peuvent varier de quelque semaines à plusieurs mois (BOUNAGA et al., 1990). Cependant diverses mesures de lutttes ont été employées pour contrecarrer l'effet néfaste de l'infestation de ce champignon : La lutte chimique consiste en l'utilisation des fongicides à action systémique ou endothérapie (ROGER, 1990), la lutte culturale (TIRICHINE, 2007), consiste en l'amélioration des pratiques agricoles. Les mesures prophylactiques ont permis de ralentir la progression de la maladie sans l'arrêter définitivement, la lutte biologique qui consiste à l'utilisation des micro-organismes résistants au F.o.a, notamment le genre *Pseudomonas* ou *Bacillus* ou des champignons du genre *Aspergillus* ou *Penicillium* Cette stratégie de lutte est appuyée par l'existence de sols répressifs empêchant le développement de la maladie de Bayoud (MASLOUHY, 1989) (CHAKROUNE et al., 2008) (SEDRA et al., 1998 ; OIHABI et al., 1992). La lutte génétique par l'utilisation de variétés résistantes reste la seule méthode efficace pour contrecarrer la fusariose vasculaire et semble être la plus prometteuse (MAHDI, 2011).

### **1.8. Les techniques de multiplication des palmiers dattiers**

La multiplication du palmier dattier peut s'effectuer selon 03 différents modes (**NIXON et CARPENTER, 1978 ; ZAID et DE WET, 2002**)

#### **1.8.1. La multiplication par semis**

Cette technique de multiplication produit des descendants non conformes au pied mère d'où une graine donne 50% de chance d'avoir les deux sexes. Cette méthode de production est une technique consommatrice du temps, elle ne permet d'obtenir des pieds productifs qu'au bout d'une dizaine d'années (**ABADI et al., 2015**)

#### **1.8.2. La multiplication par rejets**

C'est la méthode classique de multiplication végétative. Les nouveaux arbres sont génétiquement identiques au pied mère qui leur donne naissance (**HADJI et al., 2015**). Les meilleurs rejets sont prélevés à la base du tronc ou voisinage du sol, leurs poids sera de 15 à 20 Kg (**MUNIER, 1973**).

Cette technique de multiplication est donc considérée comme la plus stable et la plus efficace par les phoeniciculteurs (**CIRAD et GRET, 2002**).

#### **1.8.3. La multiplication *in-vitro***

Depuis que les techniques conventionnelles de micropropagation sont limitées en termes de fournir un nombre insuffisant de plantes de palmier dattier, la biotechnologie a prodigué une alternative prometteuse pour répondre à la demande croissante de vitro- plants pour le palmier dattier depuis ces dernières décennies (**JAIN et al., 2011**).

##### **➤ L'embryogenèse somatique**

C'est un processus biologique issu de la reproduction asexuée. Cette technique est considérée comme la méthode de régénération la plus efficace pour la micropropagation du palmier dattier (**AL-KHAYRI, 2011 ; ABED et al., 2014**). Elle permet l'obtention de structure semblable à des embryons zygotiques à partir des cellules somatiques (à 2n chromosomes), connus sous l'appellation d'embryons somatiques (**MARGARA, 1989 ; JOHN et SMITH, 2004**). Les explants, provenant de la base de jeunes feuilles de cœurs de rejets ainsi que les inflorescences, sont cependant les plus utilisés (**EL HADRAMI et al., 1997**).

Il existe deux voies d'embryogenèse somatique :

- L'embryogenèse somatique directe : s'effectuant à partir de très jeunes cellules embryogenèse individualisées au sein de l'explant primaire sans le passage par le stade cal.
- L'embryogenèse somatique indirecte : des nombreuses divisions cellulaires prennent rapidement départ à partir des tissus cultivés grâce à l'apport d'une forte dose d'auxine, ceci menant à l'obtention d'un amas de cellules indifférencié appelé le cal.

### ➤ **L'organogénèse**

Elle s'adresse aux potentialités meristematiques préexistantes chez les explants mis en culture et qui permettent la néoformation directe des bourgeons, la régénération des plantules par cette technique comprend différentes étapes allant de l'initiation de bourgeon à l'obtention de plantules enracinées. Les plantules sont développées directement sans phase intermédiaire de cal, ce qui réduit au minimum la variation somaclonale. L'organogénèse permet de générer des plantes génétiquement conformes à la plante mère (AIT CHITT, 1989) et permet aussi la production de plantes indemnes de virus. De plus, l'organogénèse a été utilisée avec succès pour la modification génétique de nombreuses plantes (CHANDRA *et al.*, 2003).

### ➤ **Protoplastes**

#### • **Obtention des hybrides somatique de palmier dattier**

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.

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.

L'hybridation somatique permet de surmonter les barrières d'incompatibilité sexuelle, qui constituent une limite majeure dans l'amélioration des plantes et le croisement des variétés cultivées avec des espèces sauvages pour introduire de nouveaux caractères, tels que la résistance aux maladies et ravageurs ou tout simplement pour augmenter la variabilité génétique.

## ***Synthèse Bibliographique***

---

Le succès de l'hybridation somatique passe par la maîtrise de plusieurs facteurs (SIHACHAKR *et al.*, 1994) tel que: l'isolement des protoplastes en grande quantité et régénération de plantes, les techniques de fusion des protoplastes, la sélection de structures hybrides, la régénération à partir de cals hybrides et la confirmation de la nature hybride des structures régénérées. Cependant, la fusion de protoplastes nécessite la connaissance des gènes d'intérêts, particulièrement ceux liés aux mécanismes de résistances aux maladies.

Les protoplastes sont des cellules végétales dépourvues de paroi, obtenues expérimentalement par digestion de la paroi pecto-cellulosique et peuvent dans certains cas former des agrégations cellulaires (DEMARLY *et SIBI*, 1996).

- **Isolement de protoplastes**

- Plasmolyse

Pour un isolement réussi il a été jugé essentiel d'induire la contraction du protoplaste à une distance considérable de la paroi cellulaire qui est fermement accolé lorsque la cellule est turgescente. Ainsi la rupture de la paroi est réalisable par un procédé mécanique référant à la plasmolyse et par un procédé enzymatique par lequel une solution enzymatique mixte combinant plusieurs enzymes sera utilisée pour la digestion de la paroi.

- Dégradation de la paroi

Dans la cellule végétale, le plasmalemme est doublé par une paroi cellulaire constituée de fibres de cellulose et de pectine. La dégradation de la paroi est obtenue grâce à la digestion enzymatique. Pour obtenir des activités cellulases et pectinases, on fait appel à des champignons tels que *Trichoderma viride* et *Aspergillus niger* (ZRÿD, 1988; SIHACHAKR, 2002).

Divers facteurs influencent l'isolement des protoplastes notamment les facteurs génétiques des plantes, la composition et la concentration des solutions enzymatiques (ASSANI *et al.*, 2011 ; ZHU *et al.*, 2005) et les conditions d'isollements (SINHA *et al.*, 2003 ; AOYAGI, 2006)

- **Culture des protoplastes**

Les protoplastes isolés sont très fragiles, vulnérables et particulièrement confrontés à des dommages soit physiques ou chimiques. S'ils sont maintenus dans un milieu liquide, il ne doit pas être agité et le fort potentiel osmotique du milieu dans lequel l'isolement a été effectué doit être temporairement entretenu. La croissance des protoplastes dépend d'une aération adéquate. Des densités de placage assez fortes peuvent être nécessaires, pour que



## ***Synthèse Bibliographique***

---

les produits chimiques endogènes soient susceptibles d'imprégner ces cellules non protégées. Pour la culture et la conservation des protoplastes les milieux de cultures cellulaires végétales qui sont généralement utilisés comme support de base sont le milieu MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962), le milieu B (GAMBORG *et al.*, 1968) et le milieu KM (KAO et MICHAYLUK, 1975) et sont commercialement disponibles.

- **Fusion de protoplastes**

Afin d'obtenir un hybride somatique, les cellules végétales doivent d'abord être débarrassées de leur paroi pectocellulosique pour être induites à fusionner. De plus, l'avantage des cellules végétales est leur totipotence, qui leur procure ainsi la potentialité de régénérer une plante entière à partir d'une cellule isolée.

Les protoplastes se repoussent mutuellement en vue des charges électrostatiques négatives présentes à la surface de la membrane plasmique qui sont causées en majeure partie aux groupes phosphates, et pour une part plus faible, à des protéines. Afin d'induire une fusion cellulaire. Deux stratégies efficaces de fusion sont couramment utilisées, les méthodes chimiques et électriques (SIHACHAKR et HAÏCOUR, 1996).

### **1.9. Acclimatation**

La réussite de cette étape dépend, pour beaucoup, des techniques de C.I.V appliquées lors des étapes précédentes. L'acclimatation consiste à transférer les vitroplants dans des serres sous des conditions contrôlées d'humidité saturante, de température et de photopériode (YATTA, 2007 ; ABED, 2013 ; YATTA, 2017).

Ces conditions seront modifiées graduellement jusqu'à atteindre les conditions naturelles de plantation (ZAID *et al.*, 2002). Cette phase de durcissement est nécessaire afin de permettre aux vitroplants de s'accommoder progressivement aux conditions ambiantes et être prêts au terme de trois (03) ans d'élevage à être plantés en plein champ (SAKA, 1992). La réussite d'un procédé de multiplication végétative *in vitro* impose donc que les plantules transplantées en serre soient capables de s'adapter rapidement à une forte luminosité, une humidité relative assez faible, une fluctuation de la température et aux stress biotiques.

En vue d'une bonne maîtrise de cette acclimatation chez le palmier dattier, nous avons entrepris d'étudier plusieurs facteurs susceptibles d'influencer le comportement des vitroplants dont : leur état physiologique, la structure anatomique de leurs racines et feuilles ainsi que les conditions physico-chimiques de déroulement du sevrage (FREDERIQUE, 2008).

L'acclimatation est nécessaire car le matériel végétal dans le tube à essais est dans un environnement d'hygrométrie voisine de 100 % qui n'est pas adapté aux conditions naturelles.

Les vitroplants régénérés *in vitro* restent sensibles à une diminution trop brusque de l'humidité relative. C'est pourquoi, une méthode de sevrage adaptée aux vitroplants de palmier a été mise au point pour limiter les pertes de transfert.

On appelle acclimatation ou sevrage, la phase de croissance qui succède aux conditions *in vitro*. C'est une phase durant laquelle les vitroplants subissent un stress hydrique puisque vivant au préalable en atmosphère confiné.

La réussite de la culture *in vitro* pour une propagation massive dépend de la capacité de gestion à grande échelle des plantes en serre pendant leur période d'adaptation, avec un taux élevé de reprise, et à faible coût.

### **1.9.1. Condition d'acclimatation**

Les conditions de sevrage des vitroplants peuvent se résumer en 2 facteurs essentiels évoqués ci-dessous :

- **Préconditionnement au repiquage**

La sortie des récipients de culture contenant les vitroplants dans la serre est préconisée quelque jours avant le repiquage afin de pré-adapter les plantes aux conditions physique qui y prévalent. Il est toutefois nécessaire d'ôter les couvercles afin d'éviter un double effet de serre. Dans les pays tropicaux, le sevrage est souvent réalisé sous l'ombre du fait des fortes températures. Il est aussi nécessaire de maintenir un degré hydrométrique relativement élevé, proche de la saturation pour prévenir tout risque de dessiccation des feuilles. Les résidus du milieu de culture sont aussi éliminés par simple lavage à l'eau courante et sont éventuellement substitués par une solution nutritive diluée pour empêcher une contamination microbienne importante du système racinaire (YATTA, 2017).

- **Substrats d'acclimatation**

Le substrat choisi de l'espèce à acclimater. On utilise généralement des substrats équivalents au substrat conventionnel mais la qualité et la stérilisation de celui-ci sont des paramètres importants. La plupart des espèces ligneuses se développent bien sur un substrat qui assure un bon drainage et qui a une bonne porosité. Il doit aussi être bien aéré et avoir un pH pas trop élevé. Il est aussi possible d'employer des substrats artificiels du type polyuréthane, laine de roche, etc. L'arrosage des vitroplants avec une solution qui

contient les sels organiques du milieu de culture original est préconisé mais certaines espèces peuvent préférer des solutions nutritives spécifiques (BOUGUEDOURA, 2016).

### **1.9.2. Prévention des maladies**

Les plantes issues de culture *in vitro* sont très sensibles aux attaques des micro-organismes pathogènes puisque ayant été élevées dans un environnement aseptique. Par conséquent, la stérilisation du substrat quelques semaines avant la transplantation est une condition à la survie des vitroplants. On emploie aussi fréquemment des fongicides pour prévenir l'attaque de champignons pendant le processus d'adaptation. Les fongicides peuvent être pulvérisés directement sur les plantes, mélangés au substrat ou appliqués en alternance avec la solution d'arrosage (YATTA et BOUGUEDOURA, 2013)

### **1.9.3. Contrôle des paramètres physiques**

Trois paramètres physiques doivent être strictement maîtrisés ; il s'agit de l'humidité, de la température et de la lumière.

Le maintien d'une humidité relative supérieure à 90 % est obligatoire pendant les 15 à 21 jours qui succèdent au repiquage.

La majorité des espèces ligneuses tropicales se développe mieux à des températures comprises entre 25 °C et 28 °C ; les mêmes conditions thermiques sont requises durant la période de sevrage.

Il est aussi nécessaire de maintenir une faible intensité lumineuse car les feuilles des vitroplants ont des caractéristiques de feuilles d'ombre. Pour ce faire, les plantes sont souvent protégées par un filet à maille pour créer un ombrage. La photopériode doit aussi être identique à celle adoptée durant la phase en laboratoire et elle doit être maintenue pendant toute l'acclimatation. En définitive, pour réussir une phase d'acclimatation, il faut garder les vitroplants « pieds au chaud et têtes au froid ».

Après une phase d'acclimatation en serre qui peut durer 6 à 9 mois selon l'espèce, les plantes sont transférées au champ ou en conditions naturelles. Dans la mesure où les plantes sont prêtes à passer dans un écosystème naturel, elles peuvent servir au reboisement des zones éco-géographiques ciblées.

## **2. Notion de cultivar, variété et clone**

### **2.1. Cultivar**

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

Il existe un grand nombre de cultivars de dattiers. C'est ainsi qu'en Algérie plus de 1000 cultivars ont été recensés par **BENKHALIFA** en 2006.

### **2.2. Variété**

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

### **2.3. Clone**

Au cours des siècles, des sélections furent opérées sur des –francs- (plants issus de semis volontaires ou non). Celles-ci étaient basées sur les caractéristiques du fruit, la productivité et l'adaptation des plants aux conditions locales. Par la suite, les individus les plus intéressants sont fixés par voie végétative puis propagés (**MUNIER, 1973**). C'est ainsi qu'actuellement les cultivars connus ne sont que des clones issus d'une sélection millénaire.

Ces clones peuvent être représentés par une dizaine d'individus, pour les uns et jusqu'à une centaine de milliers voir de millions d'individus, pour d'autres (**HANNACHI et al., 1998**).

## **3. Etude caryologique**

La cytogénétique a trouvé un nouveau domaine d'application dans l'étude et l'utilisation des produits issus de culture in vitro (hybrides somatiques) (**OUKARA, 2008**). Selon **JAHIER**, rapporte que les méthodologies employées, en cytogénétique, sont nombreuses. Elles concernent avant tout l'étude des chromosomes lors de la mitose et la méiose.

Le caryotype consiste en l'étude des chromosomes. Ils ne sont visibles que dans les cellules en division, au stade métaphasique (**SHIZUYA et al., 1992**).

L'amélioration génétique et les recherches cytologiques à l'étude des mitoses somatiques sur (*Phoenix dactylifera* L.) sont restées très limitées et généralement sans grands résultats. Le but recherché par ce travail étant la recherche d'une méthode, permettant l'obtention de plaques métaphasiques et d'observation et dénombrement des chromosomes, ce qui nous a poussés à réaliser des combinaisons entre :

- La solution et la durée de prétraitement.
- La solution et la durée de l'hydrolyse.

## *Synthèse Bibliographique*

---

Le matériel d'étude est constitué de semences germées, des hybrides somatiques placés dans des conditions permettant une croissance active. Le prélèvement des tissus a lieu au moment où le pourcentage de cellules en division (index mitotique) est élevé.

L'expérimentation a été réalisée au niveau de la division Biotechnologies et Amélioration des plantes de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRAA) de Barraki, Algérie. Elle a duré 6 mois (Mars - Aout 2017).

### **1. Matériel**

#### **1.1 . Matériel biologique (Matériel végétal)**

##### **1.1.1. Les hybrides somatiques**

Notre travail a été effectué sur des hybrides somatiques issus de fusion de protoplastes au stade germination des embryons et leur développement en plants de trois cultivars de palmier dattier DN, TKB, TGZ, qui ont été choisis par rapport à leur comportement vis-à-vis de la maladie du bayoud.

- Le cultivar «Deglet Nour» : sensible au Bayoud et d'une excellente qualité de dattes.
- Le cultivar «Takerboucht» : résistant au Bayoud et d'une qualité dattière moyenne.
- Le cultivar «Tegaza» : sensible au Bayoud et d'une bonne qualité de dattes.

La technique de fusion de protoplastes a été réalisée au niveau de laboratoire d'INRAA en 2015.

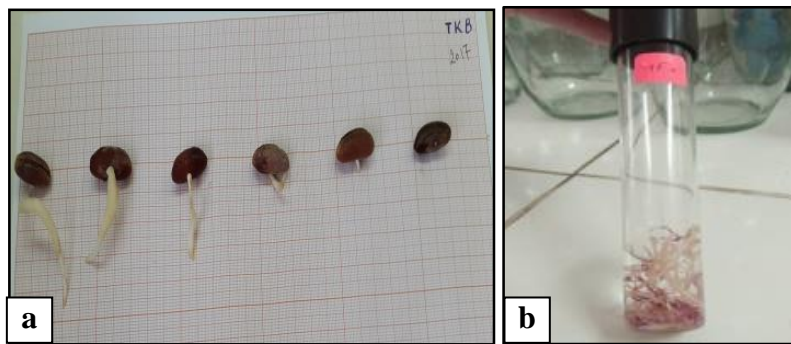
##### **1.1.2. Les graines**

En ce qui concerne l'étude caryologique, nous avons utilisé des graines des cultivars, Deglet nour, Takerboucht et Tagaza, à raison de 200 graines par cultivars, elles proviennent de la collection de l'INRAA (2015/2016), récoltées au niveau de deux stations de l'INRAA, à savoir : la station Sidi Madi à Touggourt, pour la variété TGZ et la station d'Adrar pour la variété TKB (figure 5).

##### **1.1.3. Les extrémités racinaires des hybrides somatiques**

Au cours de l'étude caryologique, nous avons utilisé aussi les coiffes des extrémités racinaires des hybrides somatiques **1F1** et **1F2** (figure 5).

- L'hybride somatique **1F1** issu de fusion de protoplastes entre DN et TKB
- L'hybride somatique **1F2** issu de fusion de protoplastes entre TGZ et TKB



**Figure 5.** Matériel végétal utilisé pour l'étude caryologique, **a**: racines issues de la germination des graines des cultivars, **b**: racines obtenues à partir des hybrides.

### 1.2. Matériel non biologique

#### 1.2.1. Produits

Les macroéléments ( $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), les microéléments ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KI}$ ), Fer MS ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), les vitamines MS,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , adenine, l-glutamine, charbon actif, sacharose agar/phytagel, thiamine, myoinositol,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , les régulateurs de croissance (hormones végétales ANA / AIB/ KIN, IPA, Piclorame),  $\alpha$ -bromonaphtalène, 8-Hydroxy-quinoléine, réactif de schiff, les enzymes. (Annexe 1.2 et 3)

#### 1.2.2. Les appareillages

Chambre de culture, l'autoclave, hotte à flux laminaire, matériel de repiquage et stérilisateur à billes, chambre froide, chlorophylle mètre SPAD, camera photo USB avec logiciel de traitement d'image pour microscope

#### 1.2.3. Composition du milieu de culture

Les milieux de cultures utilisés au cours de ce travail sont de base Murashige et Skoog (MS) (1962), modifié par l'équipe d'INRAA. Comportent (annexe 1):

- **Macroélément MS** contient l'azote (N), et phosphore (P) entrent dans la composition des protéines et des acides nucléique. Le potassium (K), le magnésium (Mg), et le calcium (Ca) interviennent dans le maintien de l'équilibre entre anions et cation. L'ion  $\text{K}^+$  règle la pression osmotique et l'équilibre acido-basique de la

plante. Le  $Mg^{2+}$  entre dans la composition de la chlorophylle. Le  $Ca^{2+}$  est un antagoniste des ions  $K^+$  et  $Fe^{2+}$  (annexe 1).

- **Microéléments MS** contient sulfate (S), Manganèse (Mn) fournie sous forme sulfatée, zinc (Zn), iode (I), molybdène (Mo), sodium (Na), cuivre (Cu), cobalt (Co), jouent un rôle important dans les mécanismes enzymatiques (annexe 2)
- **Fer MS** : Thiamine, Inositol
- **Hormones de croissance** : les auxines (picloram, 2,4-D) et cytokinine (IPA)
- **Elément organique** : Le charbon actif est ajouté à des doses allant de 0.2% à 0.3%. Il a la propriété d'absorber les composés phénoliques excrétés par l'explant et diffusés dans le milieu et provoque le brunissement et une inhibition de la croissance.
- **Agents gélifiants** : phytigel.

### **1.2.4. Milieux de cultures solides GMN<sub>200</sub> et GMP**

Les milieux de cultures GMN<sub>200</sub> et GMP utilisés pour ce travail ont été mis au point par l'équipe du laboratoire de physiologie végétale de l'INRAA. Ils de base Murashige et Skoog (MS) (1962) avec quelques modifications au niveau de composition de milieu culture GMP (YATTA., 2017).

## **2. Méthodes**

### **2.1. Développement en plants**

#### **2.1.1 Technique de stérilisation du matériel végétal**

Pour réussir la culture *in vitro* les conditions d'asepsie totale doivent être réunies à savoir :

- ✓ Nettoyer la hotte avec de l'alcool à 70°
- ✓ Allumer la hotte, au moins une demi-heure avant chaque manipulation.
- ✓ Les instruments de travail (scalpels et pinces) qui sont ainsi stérilisés par l'étuve, sont placés dans un stérilisateur à bille. (il faut toujours tripler les instruments de travail, pour permettre le refroidissement des uns tandis que les autres sont en usage ou en stérilisation dans le stérilisateur à billes).
- ✓ Tous les instruments de travail doivent être à la portée du manipulateur de façon à avoir le moins de geste à faire au cours de la manipulation (de grands mouvements entraînent des déplacements d'air donc des risques de contamination).
- ✓ Les mains doivent être lavées au savon et désinfectées à l'alcool 70°.



## ***Matériels et méthodes***

---

- ✓ Les instruments stérilisés doivent être disposés de façon à les avoir dans l'aire stérile.

La verrerie (Les bocaux, tubes à essai, erlenmeyers, éprouvettes) sont nettoyés à l'aide d'un détergent commercial (Isis) et rincés avec de l'eau ensuite à l'eau distillée. Ils sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 120° C pendant 20 minutes.

Les instruments utilisés dans le repiquage comme les scalpels, les bistouris, spatules, les pinces longues et courtes sont stérilisés dans des boites de stérilisation à l'étuve à 180° C pendant 24 heures puis dans le stérilisateur à billes pendant leur utilisation. Le papier sur lequel les cultures sont repiquées et le papier millimètre sont enveloppés dans du papier aluminium et stérilisés à l'étuve à 180° C pendant 3 heures.

### **2.1.2 Stérilisation des graines**

Les graines sont désinfectées par une solution d'Hypochlorite de Sodium diluée à 2%, pendant 3 à 5 min, suivi de 3 bains successifs d'eau distillée stérile.

### **2.1.3 Préparation de milieu de culture (GMN200/ GMP)**

Les milieux de culture contiennent les éléments indispensables au développement des tissus végétaux tels que les éléments minéraux, les substances organique, les régulateurs de croissances et charbon actif (annexe 2) (figure 6).



**Figure 6:** Préparation des milieux de cultures.

### 2.1.4 Conditions de culture

La germination des embryons somatique aussi que leur développement s'effectuent sur milieux nutritifs GMP<sub>200</sub> et GMN qui figure en annexe 2 de ce mémoire, de base MS (1962) modifié de substances de croissance. Le charbon actif est associé à des concentrations de 0.2mg/l<sup>-1</sup>. Le pH est ajusté à 5,8 et est distribué à l'aide d'un distributeur automatique dans des bocaux à 80 ml par bocal de 250ml. Les milieux sont ensuite stérilisés dans un autoclave à 120° C pendant 20min. Les cultures sont repiquées toutes les deux mois sur un milieu identique.

### 2.1.5 Effet des régulateurs de croissance sur la phase d'élongation.

Les régulateurs de croissance jouent un rôle important dans l'élongation et développement des plantules. Parmi ces hormones l'auxine et cytokinine sont les plus utilisées.

Pour évaluer les effets des différents régulateurs de croissance sur le développement des hybrides somatiques de palmier dattier en culture *in vitro*, Dans notre cas, trois hormones de croissances (ANA, AIB et KIN) ont été utilisées, avec une dose de 1mg/l, ces choix ont été réalisée selon les travaux de LAMIN (2015) au laboratoire national de culture des tissus du palmier dattier d'Errachidia à partir du coeur de rejets provenant d'Erfoud au Maroc.

Le milieu de base utilisé est le milieu Murashige et Skoog (MS). Huit combinaisons hormonales ont été testées afin d'étudier l'effet des régulateurs de croissance sur l'élongation des plantules (tableau 4).

**Tableau 4.** Les différentes combinaisons hormonales utilisées

	ANA (1mg/l)	AIB (1mg/l)	KIN (1mg/l)
M1	0	0	0
M2	1	0	0
M3	0	1	0
M4	0	0	1
M5	1	1	0
M6	0	1	1
M7	1	0	1
M8	1	1	1

- **Observations et critères d'évaluation**

Pour évaluer l'effet des différents milieux de cultures sur le comportement et l'élongation des plantules ainsi que leur vigueur avant leur transfert en serre pour l'acclimatation, des observations ont été faites pour chaque milieu et lors de chaque repiquage.

- ✓ **Nombre et longueur des feuilles néoformées**

Ce critère d'évaluation représente une estimation de la capacité des plantules, mises en culture sur les différents milieux, à s'allonger et à néoformé d'autres feuilles. Le nombre des feuilles néoformées et leurs longueurs ont été notés au moment de chaque observation (**figure 7.a**).

- ✓ **Nombre et longueur des racines néoformées**

Ce critère d'évaluation estime la capacité des plantules, mises en culture sur les différents milieux. La longueur des racines néoformées a été notée au moment de chaque observation (**figure 7.b**).



**Figure 7.** Plante à phase d'élongation ; **a.** La longueur des feuilles néoformées  
**b.** La longueur des racines néoformées

### **2.2. Acclimatation des plantules**

L'acclimatation est la dernière étape de tout procédé de micropropagation végétale. La sortie des plantules des bocal de culture doit être réalisée avec le plus grand soin, car elles sont très fragiles. L'opération d'isolement a consisté à détacher manuellement, une à

## ***Matériels et méthodes***

---

une, à l'aide d'un scalpel, les pousses feuillées caractérisés par des niveaux de développement morphologique différents. Seules les plus développées, avec une taille dépassant 5cm ont été utilisées. Certaines pousses feuillées pouvaient atteindre jusqu'à 20 à 30 cm, mais cela dépend de la durée de l'étape d'élongation (figure 8).

Les vitroplants bien enracinés sont enlevés avec délicatesse des bocaux au risque de casser les racines ; puis par l'élimination de la gélose par un lavage à l'eau distillée tiède. Ils sont ensuite trempés dans une solution contenant un fongicide (Zellomile à 3g/L) pour protéger leur système racinaire contre d'éventuelles infections fongiques (figure 9).

Après ce traitement, les vitroplants sont rincés à nouveau avec de l'eau distillée avant d'être transférés dans des sacs en plastiques contenant le substrat.



**Figure 8.** La longueur des feuilles des vitroplants à acclimater.



**Figure 9:** Lavage des plantules, trempage des plantules dans une solution contenant un fongicide et rinçage avec de l'eau distillée.

## ***Matériels et méthodes***

---

### **2.2.1 Préparation des substrats pour acclimatation**

Le substrat utilisé pour l'ensemble des vitroplants est constitué un mélange de sable, et tourbe à volume égal (1/2).

Le sable a été stérilisé à l'étuve à 200°C pendant deux heures trente minutes (2 h 30 mn), dont 30 mn pour le chauffage, 1 heure pour la stérilisation et 1 heure pour le refroidissement. Le substrat refroidi, mélangé avec la tourbe, puis on a ajouté la fongicides au ce mélange (15g/1kg). Le substrat a été mis dans des sachets plastiques de 15 cm de diamètre sur 25 cm de hauteur. Il a été arrosé au moment de plantation (figure 10). Il doit aussi être bien aéré et avoir un pH pas trop élevé (5-6).



**Figure 10.** Préparation de substrat

Les sacs rempotés sont déposés dans un panier d'acclimatation où les parties aériennes des vitroplants sont abritées par des bouteilles en plastique transparentes qui sont ouvert graduellement. Le bac d'acclimatation contenant les vitroplants et couvert d'un papier transparent (figure 11).



**Figure 11.** Plantation des hybrides somatiques

## ***Matériels et méthodes***

---

Pour l'essai d'acclimatation en chambre de culture, le matériel végétal était constitué des hybrides somatiques issus de la phase d'enracinement *in vitro* , Ils sont installés dans la chambre de culture à une photopériode de de 12h de lumière et 12h d'obscurité, la température a été maintenue à  $27 \pm 2$  °C et l' humidité au voisinage de 70% grâce au système d'humidification, et y ont séjourné deux semaines avant d'être transférés dans une tunnel en plastique (figure 12).



**Figure 12.** Les plantules installées dans la chambre de culture.

L'arrosage des hybrides somatiques était fait de façon légère tous les 3 jours au cours duquel 5 à 10 ml d'eau de robinet combinée avec une solution nutritive (volume 10%). Il a été versé dans le substrat une fois par semaine (figure 13).



**Figure 13.** L'arrosage des plantules.

### **2.2.2. Préparation de solutions d'irrigation pour l'acclimatation.**

L'irrigation des plantules nécessite la préparation de milieux d'irrigation (annexe 3) de base MS contenant l'auxine picloram à concentration 12.5mg/l associée à 1mg/l de IPA (cytokinine) respectivement. Les milieux sont distribués dans des bouteilles de 1L. Le pH des milieux est ajusté à 5,8 avant leur stérilisation par autoclavage (20min à 120°C). Donc pour l'irrigation, on utilise 10% de milieu MS et on ajoute 90% d'eau (figure 14).



**Figure 14.** Préparation de milieu d'irrigation.

### **2.2.3. Prévention des maladies**

Les plantes issues de culture *in vitro* sont très sensibles aux attaques des micro-organismes pathogènes puisqu'ayant été élevées dans un environnement aseptique. Par conséquent, la stérilisation du substrat avant la transplantation est une étape très importante pour la survie des vitroplants. On emploie aussi fréquemment des fongicides pour prévenir l'attaque de champignons pendant le processus d'adaptation. Les fongicides peuvent être pulvérisés directement sur les plantes, mélangés au substrat ou appliqués en alternance avec la solution d'arrosage. Chaque 2 à 3 jours les plantules ont été pulvérisées à l'aide d'une solution antifongique (Zellomile à une concentration 3g/l) afin d'éviter la pourriture des feuilles et du collet.

### **2.2.4. Teneur en chlorophylles**

Ce critère d'évaluation donne une idée sur la quantité de chlorophylles synthétisées au moment de chaque observation et aussi sur la capacité photosynthétique pour chaque plantule, donc c'est un paramètre qui confirme l'observation morphologique. Ceci a été mesuré à l'aide d'un chlorophylle-mètre (SPAD) chaque 15 jours pendant deux mois, et ceci pour l'ensemble des hybrides somatique qui ont été développées dans des milieux contenant différentes combinaisons (figure 15).



**Figure 15.** Mesure de la teneur en chlorophylle

Après une phase d'acclimatation en chambre de culture qui peut durer 15 jours, les plantes sont transférées au tunnel en plastique ou en conditions contrôlées.

Les plantes vigoureuses obtenues après 4 à 5 mois d'acclimatation au tunnel seront transférées en pots pour l'acclimatation au champ aux conditions ex-vitro, dans la mesure où les plantes sont prêtes à passer dans un écosystème naturel.

### 2.3. Analyse statistique

Les observations et les mesures des plants dans le substrat ont porté sur les paramètres suivants :

- La mensuration de la teneur en chlorophylle des plants chaque 15 jours ;
- Le comptage du nombre de plants ayant repris chaque semaine d'acclimatation ;

Les données quantitatives ont été soumises à une analyse de variance au seuil de 5%. Les liens entre les paramètres ont été également mis en évidence à l'aide du logiciel GenStat. La représentation graphique des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel Excel.

Le nombre de vitroplants vivants à la fin du sevrage a permis de calculer le taux de reprise au sevrage selon la formule suivante :

$$\% \text{plants sevrés} = \frac{\text{Nombre de plants vivants}}{\text{Nombre total de plants transférée ou sevrage}} \times 100$$



### **2. 4. Dénombrement chromosomique**

Le dénombrement chromosomique est réalisé sur la base des observations des divisions mitotiques au niveau des cellules méristématiques de racines, au stade métaphase. Nous avons adopté le protocole suivant:

#### **2.4.1. Scarification des graines**

Du fait que les téguments des graines sont très durs, nous avons procédé à une scarification des graines du côté opposé à l'embryon à l'aide d'un scalpel.

Les graines sont mises, par la suite, à tremper dans l'eau, pendant 24 heures à température ambiante, pour permettre leur imbibition.

#### **2.4.2. Mise en germination**

Les graines stériles sont déposées dans des boîtes de Pétri en verre, tapissées de coton imbibé d'eau distillée.

Les boîtes sont incubées à 4 °C pendant 2 à 3 jours pour accélérer la germination, puis transférées dans une étuve réglée à 32±1°C. Ce choc thermique permet de lever la dormance de l'embryon. Après 20 à 25 jours d'incubation, les graines ont germé.

#### **2.4.3. Technique de coloration**

##### **• Prétraitement**

Cette étape est réalisée sous une hotte à flux lumineuse horizontale. Nous avons testé l'effet de deux types d'agents mitoclasiques, l' $\alpha$ -bromonaphthalène et le 8-Hydroxy-quinoléine à 0.002%.

Des racines de 0.5 à 1.5cm de longueur issues de la germination des graines ainsi que les extrémités racinaires des hybrides sont réparties en deux lots. Chaque lot est trempé dans une solution aqueuse de l'un des deux agents mitoclasiques.

Le prétraitement a lieu à température ambiante, pendant 3h. Cette étape permet le blocage des divisions mitotiques au stade métaphasique, en inhibant la formation du fuseau achromatique.

##### **• Fixation et conservation**

Les racines sont rincées à l'eau distillée, puis fixées dans un mélange d'éthanol et d'acide acétique glacial (3:1; V/V), pendant 48 h à 4°C. Cette étape permet de détruire toute vie cellulaire et bloquer ainsi l'évolution des divisions cellulaires tout en conservant l'intégrité structurale des chromosomes.

La conservation est réalisée par le transfert des racines dans l'éthanol 70° à 4°C. Elle peut durer plusieurs mois.

### **•Hydrolyse**

Concernant cette étape deux méthodes d'hydrolyse ont été appliquées sur les racines. La première consiste en une hydrolyse acide et la deuxième consiste en un passage par une hydrolyse enzymatique, suite à l'hydrolyse acide. Les racines rincées à l'eau distillée sont réparties en deux lots:

#### **☞ Hydrolyse Acide**

Les racines du premier lot, sont mises dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 1N à 60°C, dans un bain-marie, pendant 30 min.

Cette hydrolyse permet de ramollir les tissus et de libérer les groupements aldéhydes de l'ADN, par la rupture des liaisons glucidiques des bases puriques.

#### **☞ Hydrolyse enzymatique**

Les racines du lot 2, ont subi une hydrolyse acide, comme précédemment cité, suivi par une macération dans une solution aqueuse constituée de 3types d'enzymes l'Hémicellulase, la cellulase et la pectinocellulase. Elle est réalisée à l'étuve à 37°C, pendant 15 à 20 min.

L'hydrolyse enzymatique permet d'assurer un meilleur étalement des cellules, suite à la destruction de la paroi, et d'obtenir les chromosomes sur le même plan.

### **•Coloration**

La coloration est réalisée selon la technique de Feulgen et Rossenbeck (1924). Les extrémités racinaires sont colorées au réactif de Schiff durant 2 à 3h, à l'obscurité et à température ambiante. Les groupements aldéhydes, libérés par hydrolyse, se lient au réactif de Schiff, donnant ainsi une coloration rouge violacée aux chromosomes.

Après cette durée, les racines sont rincées à l'eau distillée de 30min à 2h, pour augmenter le contraste entre le cytoplasme et les chromosomes.

### **•Montage et observation**

Les pointes racinaires colorées sont incisées et déposés entre lame et lamelle dans une goutte d'eau. L'écrasement est réalisé en tapotant la lamelle à l'aide d'un bâtonnet afin d'assurer une bonne dispersion des chromosomes, c'est *le squash*.

Les observations se font au grossissement Gx10, Gx40 et Gx100, à l'aide d'un microscope photonique de type ZEISS Axio scope 2, surmonté d'une caméra USB, couleur P/ et relié à un logiciel de traitement d'images pour microscope. Les meilleures plaques métaphasiques sont photographiées.

**Tableau 6:** Principaux travaux sur l'embryogenèse somatique du Palmier dattier (**Yatta, 2009**).

Auteurs	Explants	Résultats
<b>Reuveni et al., 1972</b>	Embryons zygotiques entiers.	Obtention de cals embryogènes
<b>Bouguedoura, 1979</b>	apex, bourgeons axillaires, stipe, et rachis.	Formation des plantules
<b>Reynolds et Murashige, 1979</b>	Embryons excisés de noyaux immatures.	Proembryons
<b>Tisserat, (1979)</b>	Embryons excisés de graines, apex, bourgeons axillaires, fragments de rachis ainsi que des inflorescences.	Formation des plantules
<b>Mater, 1986</b>	Embryons zygotiques immatures, fragments de cœurs de rejets.	Formation des plantules
<b>Sharma et al., 1984 et 1986</b>	apex, bourgeons axillaires, explants foliaires de vitroplants.	Formation des plantules
<b>Daikh et Demarly, 1987</b>	explants foliaires de vitroplants.	Formation des plantules
<b>Daguin et Letouze, 1987</b>	Tissus de cœur de rejets.	Formation des plantules
<b>Saka et Abed, 1989</b>	Tissus de cœur de rejets.	Formation des plantules
<b>Lachqer Sillou, 1989</b>	Tissus de cœur de rejets, Embryons zygotiques.	Formation des plantules
<b>Loutfi, 1989</b>	Jeunes Inflorescences mâles et Femelles.	Formation des plantules
<b>Scoarnec, 1991</b>	Tissus de cœur de rejets.	Formation des plantules
<b>Chabane, 1995</b>	apex, bourgeons axillaires, stipe, et rachis, feuilles de cœur de rejets.	Formation des plantules à partir d'apex, et de feuilles de cœur de rejets
<b>El Hadrami et Baaziz, 1995</b>	Tissus de cœur de rejets.	Formation des plantules
<b>Fergani, 1998</b>	apex, bourgeons axillaires, stipe, jeunes feuilles.	Formation des plantules
<b>Chukwuemeka et al, 2005.</b>	Tissus de cœur de rejets.	Formation des plantules
<b>Yatta, 2007</b>	Tissus de cœur de rejets.	Formation des plantules
<b>Moussouni, 2008</b>	Etude de l'embryogenèse zygotique	Formation des plantules
<b>Abed, 2013</b>	Etude de l'embryogenèse zygotique	Formation des plantules



## ***Discussion***

---

La germination des embryons somatique, leur développement en plants ainsi que l'acclimatation sont des étapes importantes qui demeurent le problème fondamental dans le programme d'amélioration du palmier dattier. Ce résultat concorde avec celui de nombreux auteurs **KOZAI (1991)** ; **AHEE et al.(1981)** ; **KONAN et al.(1989)** ; **KUMAR et RAO (2012)** qui ont rencontré une grande difficulté à maintenir les vitroplants en acclimatation. Afin de déterminer la meilleure composition hormonale utilisée pour les phases de développement en plants et d'acclimatation avec un taux élevé, nous nous sommes inspirés des travaux réalisés sur différentes espèces de monocotylédone tels que le bananier et le palmier à huile.

Nous avons constaté au cours de notre expérimentation que la balance hormonale en faveur les cytokinines (KIN) et les auxines (ANA, AIB) dans les milieux de culture a donné le meilleur allongement des feuilles. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **MAZRI (2012)**, sur les plantules de cv. Najda de palmier dattier.

Nos résultats, nous ont montré également que la combinaison hormonale qui a donné l'allongement le plus élevé est 1mg/l d'AIB combiné avec 1mg/l de KIN. Ces observations ne concordent pas avec les travaux de **MAZRI et MEZIANI (2013)**, qui ont mentionné que la longueur des feuilles augmente avec l'augmentation de la concentration en kinetine toute seule.

Nos résultats, révèlent que le nombre de feuilles reste toujours entre un, deux ou bien trois feuilles quel que soit le milieu de culture utilisé. Ces observations montrent bien que le rapport hormonal (auxine/ cytokinine) n'a pas influencé sur la néoformation des feuilles. Ces résultats valident les travaux de **LAMIN (2015)**.

Cependant l'emploi de milieu de culture sans hormones ou combinée à l'ANA, s'est révélé très efficace pour l'élongation des racines. Ce qui est validé par les travaux de **GYANA RANJAN ROUT (2004)**; **MOHAMMAD et al. (2003)**; **KAMBASKA et SANTILATA (2009)** ; **ANDREW et SIVA (2004)**, qui ont prouvé que l'ANA permet un meilleur enracinement des vitroplants chez bon nombre d'espèces végétales.

La balance hormonale en faveur des auxines 1mg/l d'ANA et 1mg/l d'AIB dans les milieux de culture a donné le meilleur allongement des racines. Ceci confirme les travaux de **GOPI et al.(2006)**; **BAKSHA et al.(2007)**; **KALIDASS et al.(2008)**; **KALIDASS et MOHAN (2009)** ; **GEORGES et al.(2008)**. Tandis que les cytokinines (KIN) ont donné un faible allongement des racines.

Dans notre étude, le nombre des racines augmente avec l'augmentation de la concentration en auxines toute seule. Ceci concorde avec les travaux de **LIU(2002)** ; **GOPI et al.(2006)** ;

## ***Discussion***

---

**YATTA (2017)**, qui ont affirmé que l'ANA favorise la formation d'un plus grand nombre de racines.

Concernant l'effet d'acclimatation sur les hybrides somatique, Le taux d'acclimatation est calculé à partir de la première semaine marquant la meilleure survie des hybrides somatiques jusqu'à la huitième semaine où nous avons observé une baisse de cette survie.

Nous avons également mentionné qu'aucune perte de vitroplants, pendant les premiers jours d'acclimatation, n'a été enregistrée sur les différents milieux. Ces observations concordent avec les travaux de **YOUMBI et al.(2005)**. Ceci valide nombreux travaux sur le bananier (**ABDOULAYE SIDIBE et al., 2013**).

Durant notre expérimentation, nous avons remarqué qu'au cours de premières quatre semaines d'acclimatation, on observe un bon développement des plantules. Elles présentent une bonne adaptation lorsque les conditions de nutrition et d'environnement sont optimales. Ces conditions optimales d'acclimatation ont abouti à un pourcentage de réussite égal à 96.5%. ces observations concordent avec les travaux de **KONAN et al.(2015)**.

Le taux de reprise moyen de 68 % de plants sursurvies dans nos conditions d'acclimatation confirment ceux d'autres équipes travaillant sur le sevrage des vitroplants de palmier à huile (**GINTING et FATMAWATI, 1995 ; TAN et al., 1999**).

Durant notre expérimentation nous avons remarqué que des pourcentages plus faibles ont souvent été observés, dans les quatre dernières semaines. Une partie de ces plantules n'ont pas repris leur croissance et l'autre partie des plantules ont subi un dessèchement. Ceci est dû probablement au transfert du tube vers le substrat.

Selon **BOXUS**, les vitroplants présentent plus ou moins de profondes modifications morphologique, anatomique et physiologique. Les feuilles des plantules obtenues « in vitro » ne sont que peu ou pas recouvertes de couche cireuse sous l'épiderme, la morphologie et la densité des stomates sont souvent modifiées, leur fonctionnement est altéré, les cellules palissadiques sont moins abondantes et contiennent moins de chloroplastes. Dans notre étude, les pertes des hybrides somatiques au cours d'acclimatation sont peut-être liées à ces modifications. Ce résultat est en accord avec ceux de **DUSTAN et TURNER (1984) ; PREECE et SUTTER (1991) ; ZIV (1991) ; DESJARDINS (1995) ; GHORBEL et al.(1998) ; LESCOT (2012)**.

Nous avons testé aussi l'effet de différentes balances hormonales sur la teneur en chlorophylle des hybrides somatiques.

## ***Discussion***

---

Les résultats que nous avons obtenu révèlent que les milieux contenant l'auxine favorisent la meilleure concentration en chlorophylle, tandis que les milieux avec autres compositions hormonales ont conduit à une faible concentration en chlorophylle. Ces résultats sont en accord avec **SIDKY et al.(2007)**. Qui ont déclaré que des plantules cultivées sur le milieu contenant d'ANA étaient plus vigoureuses que celles obtenues sur les milieux sans hormones.

Nos résultats montrent que le milieu contenant d'ANA et AIB s'est révélé plus efficace pour l'obtention de plantes présentant une bonne teneur en chlorophylle. Ces résultats ne concorde pas avec ceux de **MAZRI et MEZIANI (2013) ; LAMIN (2015)**. Qui ont montré que les plantules de la variété Najda cultivées sur des milieux sans hormones ont des feuilles plus larges et plus vertes que celles cultivées sur des milieux contenant des régulateurs de croissance.

Nos résultats, nous ont conduits à déduire que l'élévation de la teneur en chlorophylles indique leur tendance à l'autotrophie. Ce qui permet de produire des hybrides somatique mieux adaptés au transfert en conditions ex vitro. Ces observations sont conformes à ceux de **DE TOUCHET et DUCREUX (1991)**.

L'étude cytogénétique a porté sur les extrémités racinaires des hybrides somatiques 1F1 et 1F2 et sur les racines issues de la germination des graines de trois cultivars de Palmier Dattier, DN, TGZ et TKB.

Les résultats ont montré que le prétraitement au 8- Hydroxy-quinoléine et l'hydrolyse acide couplée à l'hydrolyse enzymatique ont permis d'avoir des plaques métaphasiques dénombrables.

Néanmoins, ces dernières n'ont pu être observées qu'au niveau des cellules de l'hybride 1F1, issu de la fusion des protoplastes. Ceci pourrait être dû à la difficulté d'obtenir des préparations de qualité pour lesquelles la lecture est précise (**EI HADRAMI ET EL HADRAMI, 2009**).

Cette étude a mis en évidence que le nombre chromosomique est variable d'une cellule à une autre chez cet hybride, il est à  $2n= 18, 24, 27, 32, 36$  et  $46$ . **EL HADRAMI ET EL HADRAMI (2009)**, mentionnent qu'il existe des différences dans les nombres chromosomiques du palmier dattier. En effet, certains auteurs indiquent que *Phoenix dactylefera* est à  $2n=18$  (**HUSSAIN et AL JARRAH, 1987**). Tandis que d'autres ramènent des nombres de  $2n= 32$  et  $2n=36$  (**BEAL, 1937 ; AL SALIH et AL RAWI, 1987; AL SALIH et al., 1987; IBRAHIM et al., 1998**).

## *Discussion*

---

Les recherches les plus récentes, mentionnent que le nombre de chromosomes chez le palmier dattier peut varier entre 18 et 46 ou entre 17 et 56 (**KHAMISS et ADEL BADEEA, 2013; RAJINDER et al., 2013; DOROTA, 2008; SALIH et AL JARRAH, 1987**).

Cependant, **SHARMA et SARKAR (1956); SAMI et al. (2015); SILJAK-YAKOVLEV et al. (1996); MOHAMED et AESHA (2010)**, notent que le nombre le plus rapporté est  $2n=36$ .

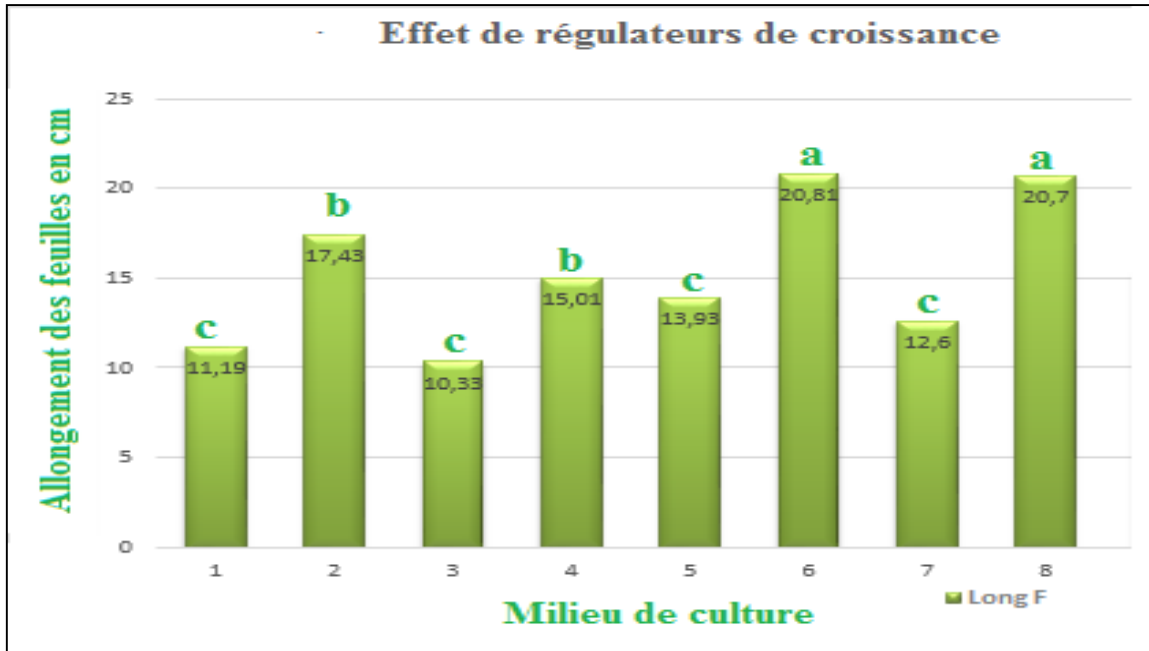


## Résultats

### 1. Effet des régulateurs de croissance sur la phase d'élongation

#### 1.1. Longueur des feuilles

Les résultats de l'effet des régulateurs de croissance sur l'élongation des feuilles sont représentés sur la figure (16).



**Figure 16.** Effet des régulateurs de croissance sur la longueur des feuilles.

Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le teste ANOVA.

D'après la figure (17), nous constatons que la balance hormonale en faveur des cytokinines et des auxines, dans les sept milieux, a donné le meilleur allongement des feuilles. En effet, les milieux M8 (1mg/l d'ANA, 1mg/l d'AIB et 1mg/l de KIN) et M6 (1mg/l d'AIB, 1mg/l de KIN), ont permis un meilleur résultat avec des valeurs qui varient entre 20.70 cm à 20.81 cm respectivement.

Les milieux: **M2** (1mg/l d'ANA) et **M4** (1mg/l de KIN) ont donné un allongement des feuilles assez important. Ces résultats montrent qu'une balance hormonale avec la KIN et l'ANA favorisent l'allongement des feuilles avec des valeurs de 15.01 cm à 17.43 cm.

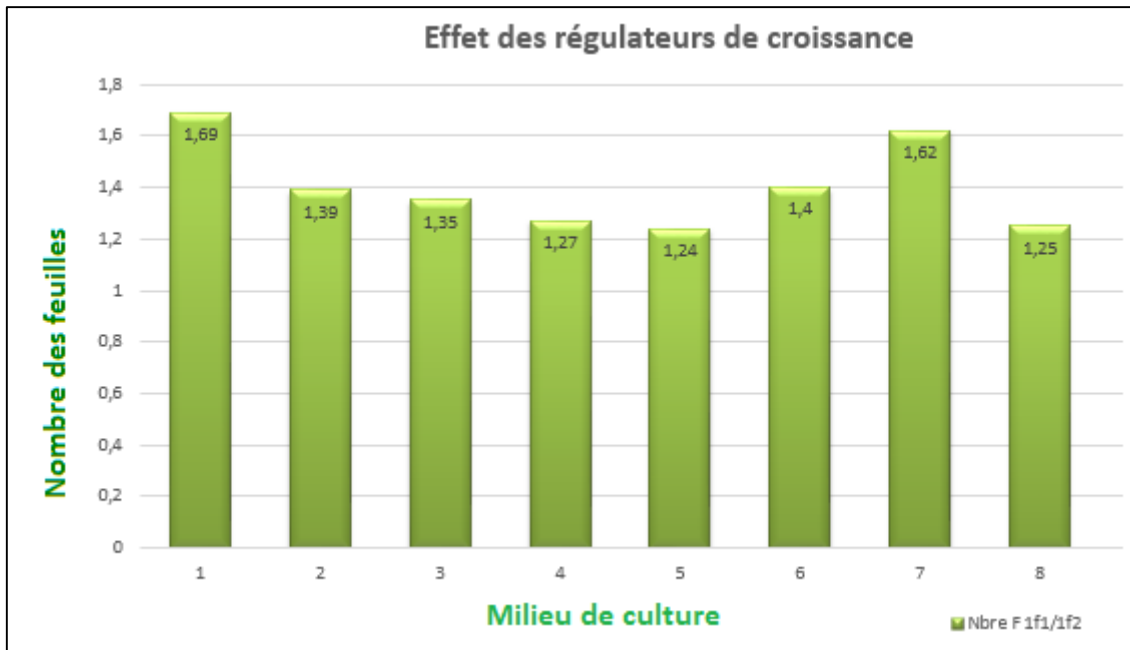
Les milieux **M1** (sans hormones), **M3** (1mg/l d'AIB), **M5** (1mg/l d'ANA et 1mg/l d'AIB) et **M7** (1mg/l d'ANA et 1mg/l de KIN) ont donné un allongement faible des feuilles. Ceci montre que les milieux avec une balance hormonale en faveur des auxines ou dépourvue d'hormones défavorisent l'allongement des feuilles.

D'après les analyses statistiques des résultats obtenus, au seuil de 5%, un effet hautement significatif ( $P < 0.001$ ) des régulateurs de croissance sur la longueur des feuilles a été relevé.

## Résultats

Nous constatons comme le montre très clairement la (**figure 17**), une distinction des milieux : **M6** (1mg/l d'AIB et 1mg/l de KIN), **M8** (1mg/l d'ANA, 1mg/l d'AIB et 1mg/l de KIN).

### 1.2. Nombre des feuilles



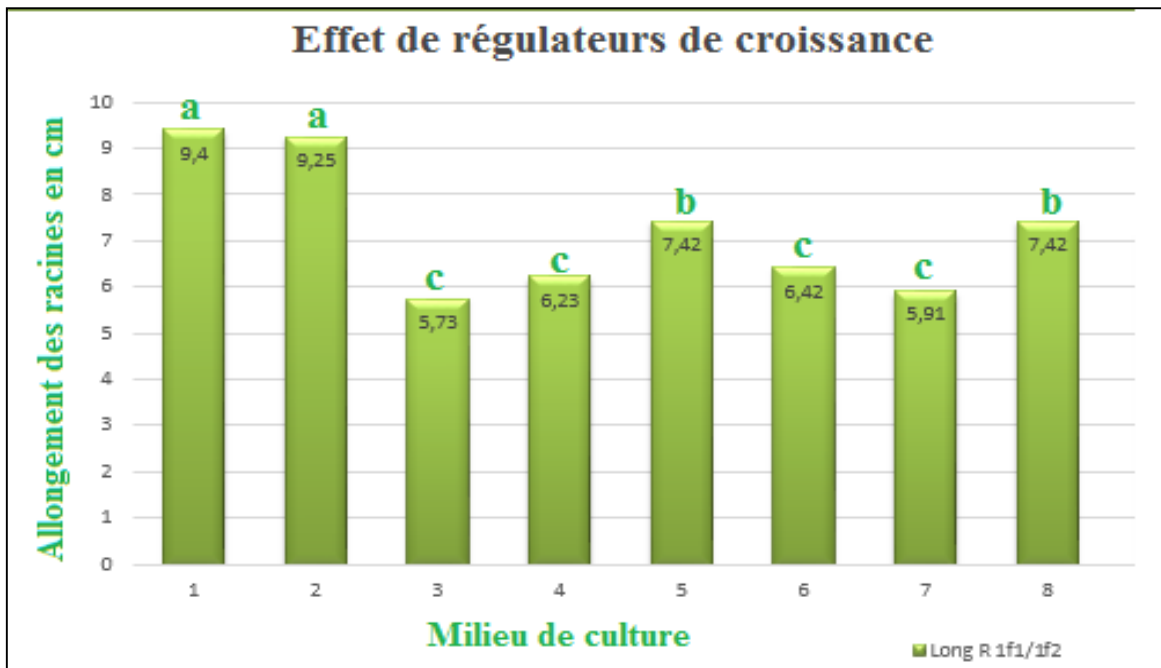
**Figure 17.** Effet des régulateurs de croissance sur le nombre des feuilles.

Les repiquages successifs des hybrides somatiques sur les huit milieux de culture frais contenant les différentes hormones de croissance ont entraîné une bonne élongation de feuilles avec l'obtention d'un nombre insuffisant de jeunes feuillies néoformés.

Dans notre essai, Après 8 semaines de culture nous avons remarqué que le nombre de feuilles reste toujours entre un, deux ou bien trois feuilles quel que soit le milieu de culture utilisé (figure 18). Concernant l'effet des régulateurs de croissance sur le nombre de feuilles, les observations réalisées et les analyses statistiques ont montré qu'il n'est pas d'effet significatif.

Le nombre des racines néoformées et leur longueur ont été notés au moment de chaque observation.

### 1.3. Longueur des racines



**Figure 18.** Effet de régulateurs de croissance sur la longueur des racines.

Durant notre expérimentation nous avons remarqué que les milieux sans hormones et les milieux contenant l'ANA seule favorisent l'élongation racinaire, tandis que les milieux avec l'KIN et AIB ont conduit à une diminution d'élongation de racines.

Nos résultats montrent que l'enracinement qui a été fait dans les huit milieux de culture, en enfonçant les pousses feuillées dans un milieu dépourvu d'hormone jusqu'à 9.4 cm (Figure 18) et cette étape a eu lieu en chambre de culture.

Il ressort clairement que la rhizogénèse est un phénomène qui est en fonction de la composition du milieu de culture. Ce qui indique que la composition du milieu de culture est le facteur principal qui influence le développement racinaire des espèces végétales cultivées in vitro.

L'analyse statistique, nous a montré que le traitement hormonal utilisé influe positivement par un effet hautement significatif ( $P < 0.001$ ) sur la croissance des racines de vitro-plants, ils nous permettent d'effectuer une meilleure élongation des racines.

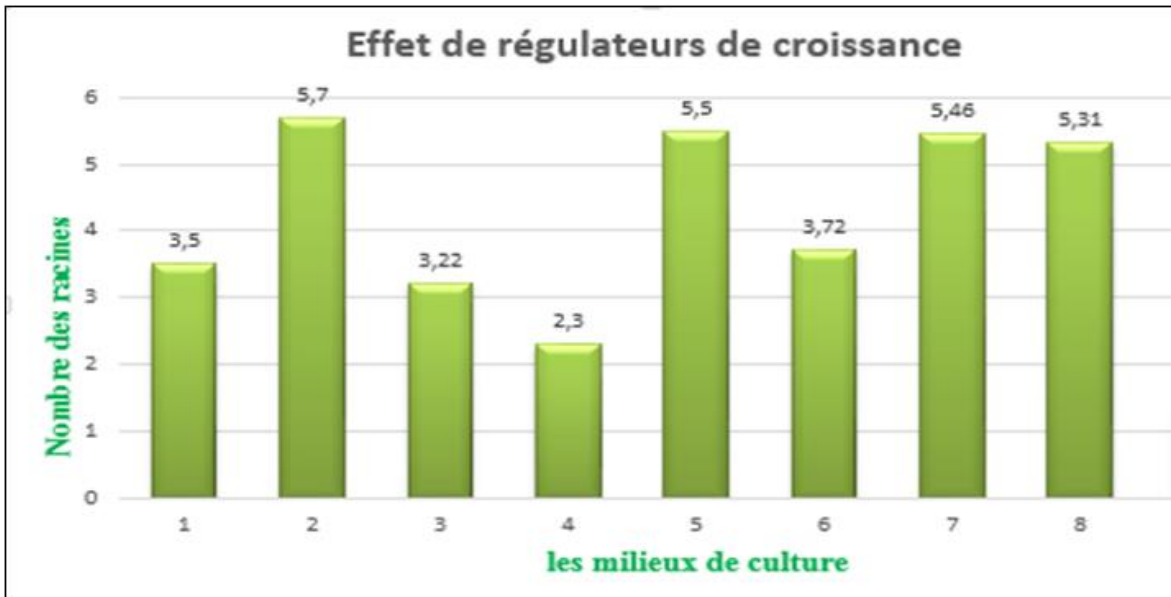
La figure 19 montre une bonne élongation racinaire chez les plantules mises dans les milieux : **M1** (sans hormones) avec une valeur élevée de 9.4 cm et **M2** (1mg/l d'ANA) avec une valeur de 9.25 cm. Au regard des résultats obtenu, nous pouvons dire que l'auxine dans ces milieux a donné le meilleur enracinement.

## Résultats

Pour ce qui concerne les milieux **M5** (1mg/l d'ANA et 1g/l d'AIB) et **M8** (1mg/l d'ANA ,1mg/l d'AIB et 1g/l de KIN), la **figure** révèle que chacun d'eux a une valeur d'enracinement de 7.42cm.

Par contre les milieux : **M3** (1mg/l d'AIB), **M4** (1mg/l de KIN), **M6** (1mg/l d'AIB et 1g/l de KIN) et **M7** (1mg/l d'ANA et 1mg/l de KIN) ont donné un nombre assez faible de racines.

### 1.4. Nombre des racines



**Figure 19.** Effet des régulateurs de croissance sur le nombre des racines néoformées

Nos résultats montrent que les milieux contenant l'ANA seule ou combiné avec l'AIB favorisent l'émission racinaire, tandis que les milieux avec l'AIB seule ou bien la KIN seule ont conduit à une diminution de nombre de racines.

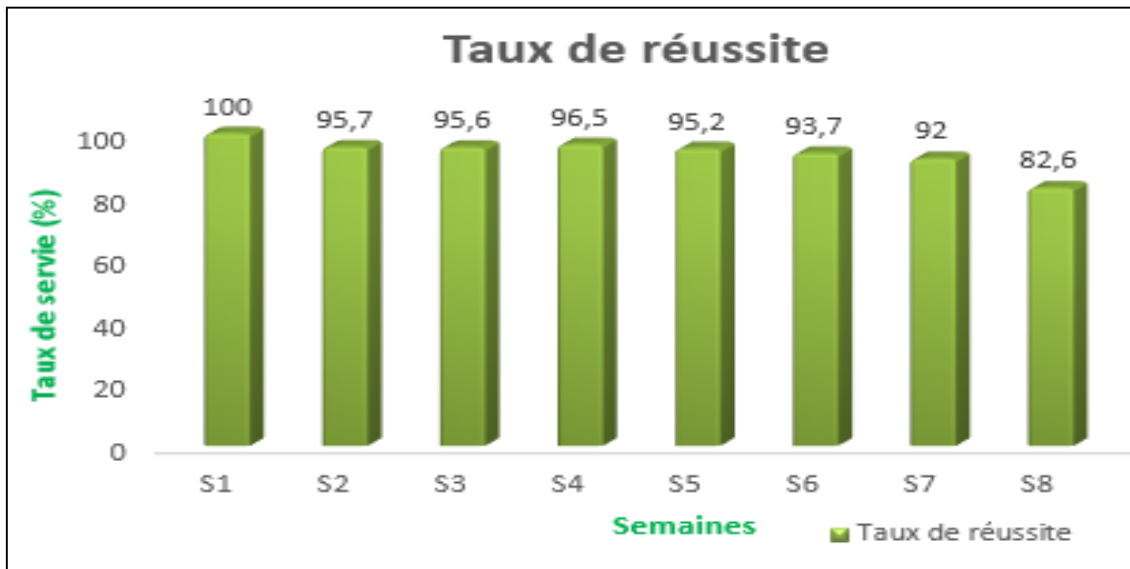
En ce qui concerne le nombre moyen le plus faible de racines (2.4) est obtenu sur le milieu **M4** (1mg/l de KIN) et **M3** (1mg/l d'AIB), tandis que celui le plus élevé (5.8) est produit par le milieu **M5** (1mg/l d'ANA et 1g/l d'AIB) et **M2** (1mg/l d'ANA).

L'évaluation de l'effet du milieu de culture sur l'apparition des racines a révélé une différence hautement significative ( $p < 0,001$ ) du nombre de racines entre les huit milieux de culture testés (figure 19).

Le nombre et la longueur des racines varient significativement par rapport aux concentrations d'auxine utilisées, pour cela l'enracinement constitue une étape importante de la micropropagation *in vitro* qui prépare les plantules au sevrage, car les plantules sans racines ou ayant peu de racines sont rapidement sujettes à la dessiccation.

### 2. Phase d'acclimatation

#### 2.1. Effet de l'acclimatation sur les plantules



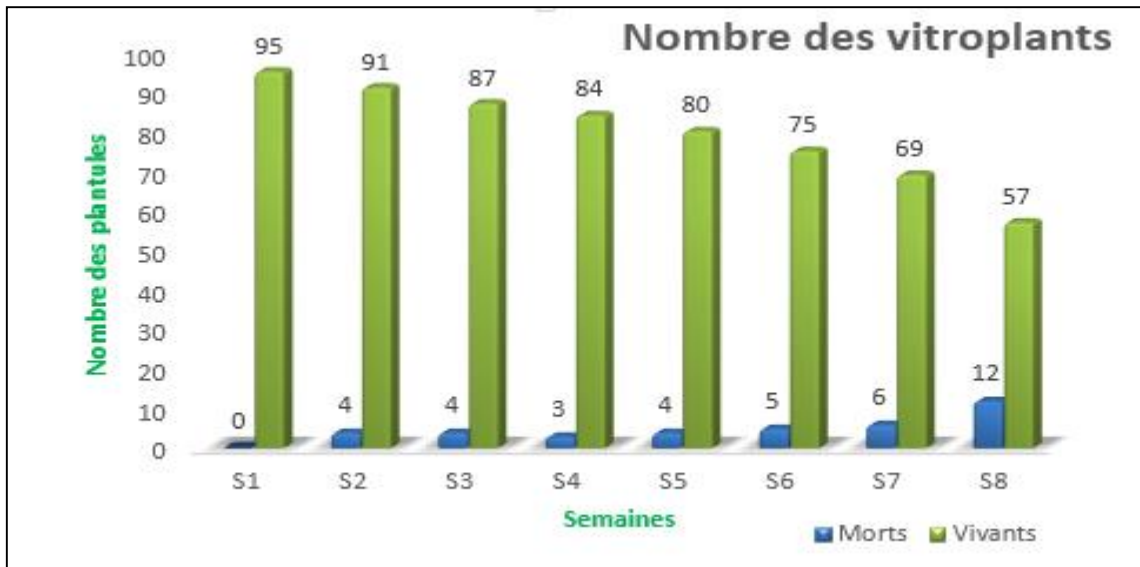
**Figure 20.** Taux de survie des hybrides somatiques après huit semaines d'acclimatation.

Nos résultats ont mis en évidence l'influence positive de la qualité morphologique des plants racinés obtenus à partir de multiplication et développement en plant avec l'utilisation de huit milieux de culture de composition hormonale différents sur le succès d'acclimatation.

Les plantes vigoureuses obtenues après 8 mois de culture *in vitro* sont transférées en pots pour l'acclimatation. Elles ont alors un système racinaire bien développé avec un nombre de racines supérieur à quatre et une longueur d'au moins 10 cm

Après une semaine de culture, nous avons dénombré et survié les plantules. Nos observations montrent que pendant la première semaine d'acclimatation passées dans la chambre de culture, tous les vitroplants au nombre de (95) par essai ont survécu (100% de survie), et ceci pour les huit milieux de culture ; sans et avec hormones de croissance ont eu les meilleurs taux de reprise de plantules sevrées (figure 20).

Les résultats du début d'acclimatation après deux semaines sur la figure (20), montrent que les plantules se sont bien développées en chambre de culture.



**Figure 21.** Nombre des hybrides somatiques acclimatés

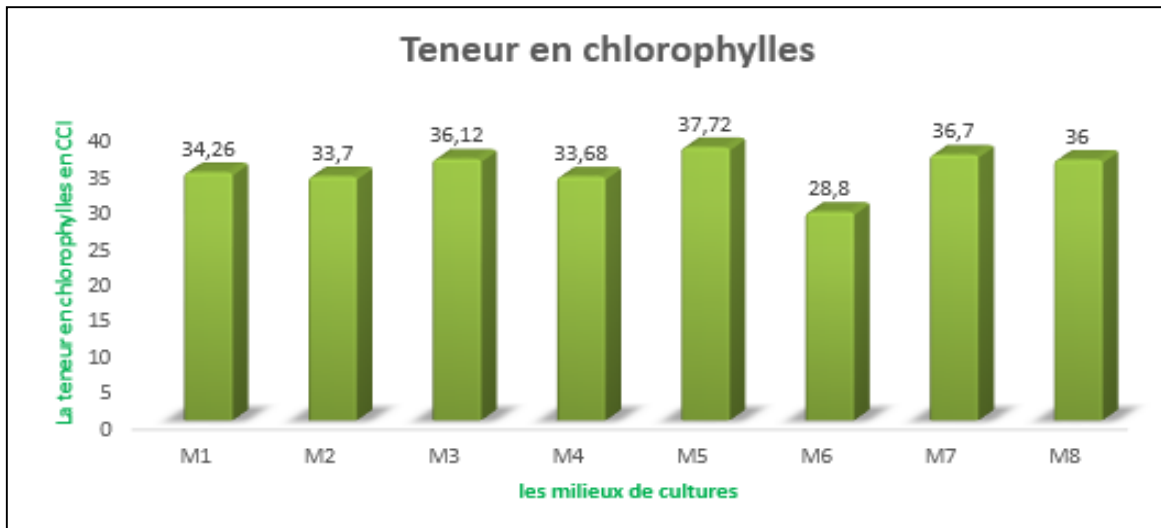
La figure (21) a révélé que durant les 21 jours de l'acclimatation, (8) plantules des (95) acclimatées, n'ont pas survécu au changement, et ceci quel que soit le milieu de culture dont le pourcentage est de (95.6%).

Après quatre semaines **S4** d'acclimatation, Les plantules obtenues sur les huit milieux de culture présentent une augmentation et une bonne du taux de survie (96,5%).

Ce taux a connu une baisse sur les quatre dernières semaines et se retrouve respectivement 95.2% avec (80) plantules à la cinquième semaine **S5**, 93.7% avec (75) plantules à la sixième semaine **S6**, 92% avec (69) plantules à la septième semaine et 82.6 % avec (57) plantules à la huitième semaine eu le plus faible taux de reprise.

### 2.2. Teneur en chlorophylles

L'étude comparative de l'induction des embryons somatiques des hybrides somatique, leur développement en plants, ainsi que leur acclimatation ont montré que l'élévation de la teneur en chlorophylles indique leur tendance à l'autotrophie. Cette évaluation physiologique permettre de produire des hybrides somatiques mieux adaptés au transfert en conditions naturelles.



**Figure 22.** Effet des régulateurs de croissance sur la concentration en chlorophylles des feuilles.

En effet l'utilisation de chlorophylle-mètre (SPAD), montre que les milieux contenant l'ANA et l'AIB favorisent la meilleure concentration en chlorophylle, tandis que les milieux avec autres composition hormonales ont conduit à une concentration moyenne en chlorophylle (figure 22).

La détermination de la teneur en chlorophylle des hybrides somatiques a été réalisée après 0, 15, 30, 45 et 60 jours d'acclimatation, elle est mesurée à l'aide d'un chlorophylle-mètre (SPAD). De façon générale, la teneur en chlorophylle variait selon les conditions et la période d'acclimatation, et surtout selon le traitement hormonal qui a été réalisé sur les hybrides somatique pendant la phase de multiplication et développement en plants.

D'après les observations visuelles on constat que le milieu **M1** (sans hormones) **M5** (1mg/l d'ANA et 1mg/l d'AIB), **M7** (1mg/l d'ANA et 1mg/l de KIN), **M8** (1mg/l d'ANA ,1mg/l d'AIB et 1g/l de KIN), ont donné des plantules avec un verdissement important par rapport aux autres milieux de culture.

Nos résultats montre et confirme qu'il n'y pas un effet significatif du différentes balances hormonales sur la concentration en chlorophylles des hybrides somatique de palmier dattier. La mesure de la teneur en chlorophylle a montré des légères variations entre 34.26CCI et 36CCI (figure 22).

L'analyse statistique nous a montré aussi que le milieu de culture **M5** (1 mg/l d'ANA et 1 mg/l d'AIB) a donné la meilleure teneur en chlorophylle des hybrides somatique à chaque mesure, avec des valeurs supérieures qui ont été jusqu'à 37 CCI (Figure22), tandis que les

## Résultats

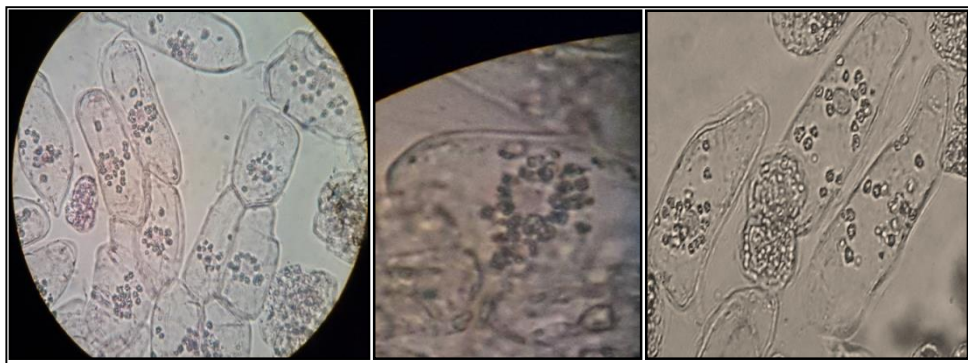
valeurs supérieures en en teneur de chlorophylle chez les autres milieux de culture varient entre 29.3CCI et 37.3CCI après deux mois d'acclimatation.

La teneur en chlorophylle était meilleure à chaque observation cela pendant toute la période d'acclimatation pour les hybrides somatiques qui ont été cultivé dans le milieu

En effet, les indices de la moyenne de concentration en chlorophylle ont été plus importants chez les hybrides somatiques ensemencée sur le milieu contenant l'ANA et AIB (**M5, M3, et M7**) suivis de ceux obtenues sur le milieu sans hormones (**M1**) ou bien un milieu avec l'ANA seul (**M2**), ou KIN seul (**M4**). Tandis que pour l'AIB combinée avec le KIN dans le milieu (**M6**) indice n'a pas dépassé (28.8 CCI) (figure 23) (Annexe 7).

### 3. Dénombrement chromosomique

Les meilleures plaques métaphasiques sont obtenues au niveau des racines de l'hybride 1F1 (figure 23). Cependant, aucune plaque n'a pu être dénombrée pour les racines des deux cultivars, DN, TGZ et TKB et celles de l'hybride 1F2.



**Figure 23.** Plaques métaphasiques obtenues pour l'hybride 1F1, observées au microscope photonique Gx100.

Toutefois, il nous a été difficile d'établir le caryotype pour cet hybride, du fait des différents nombres chromosomiques observés dans les différentes cellules (tableau 5).

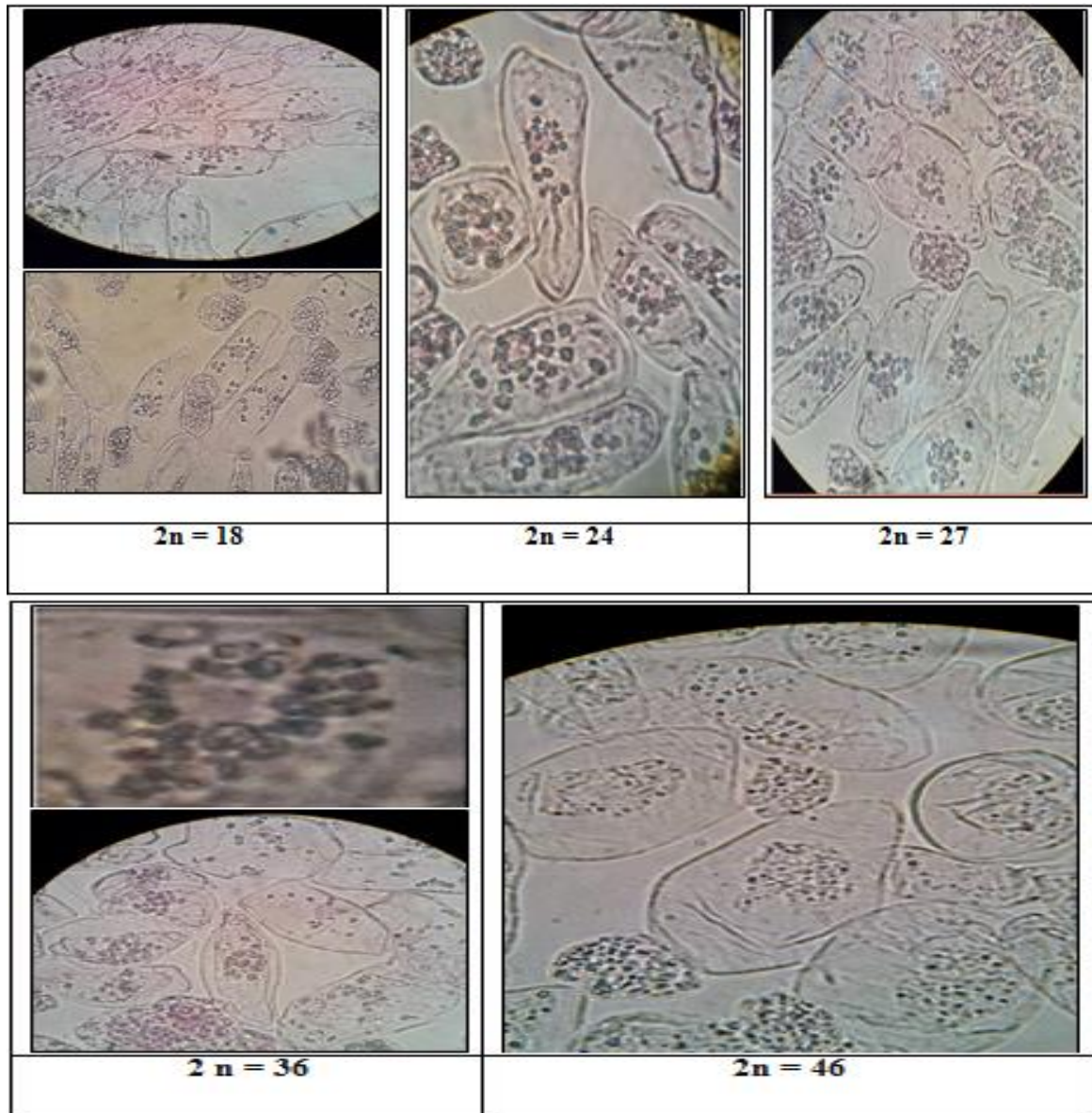
**Tableau 5.** Différents nombres chromosomiques observés au niveau des cellules de l'hybride 1F1.

Nombre de chromosomes	18	24	27	32	36	46
Nombre des cellules	21	6	3	1	5	4



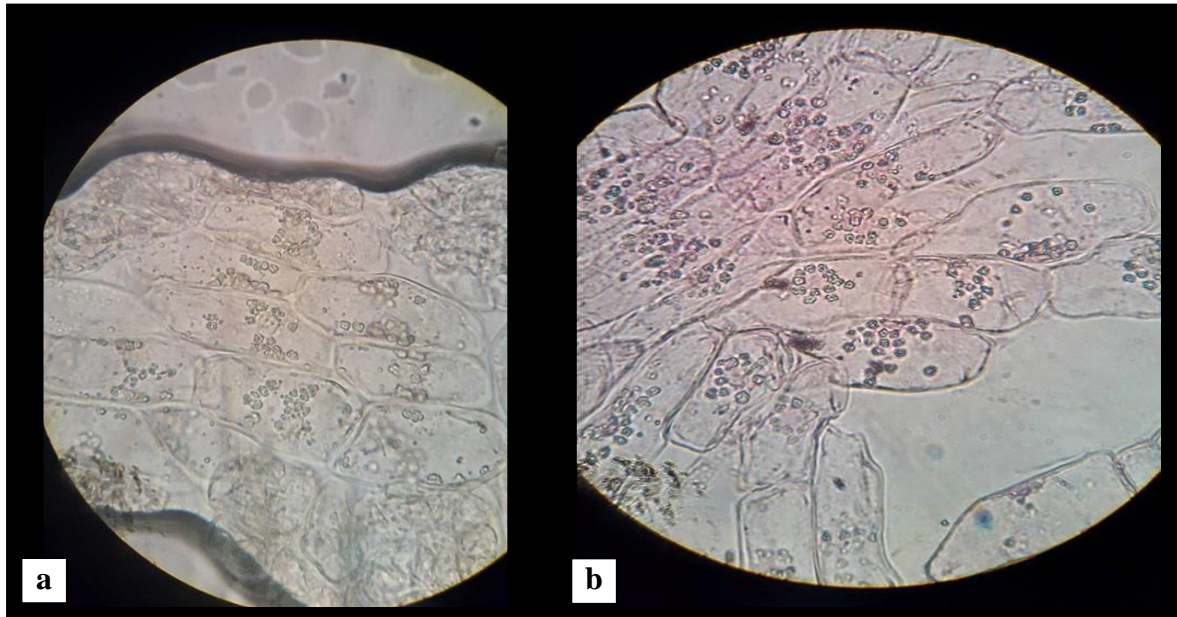
## Résultats

Le tableau 5, montre que le nombre le plus représenté est  $2n=18$ , observé au niveau de 21 cellules. Les nombres  $2n= 24$ ,  $2n= 36$  et  $2n= 46$  sont rencontrés dans respectivement, 6, 5 et 4 cellules (figure 24).



**Figure24.** Nombre des chromosomes observé dans différents plaques métaphasiques

Egalement, nous avons constaté que le prétraitement au 8-Hydroxy-quinoléine et l'hydrolyse acide suivi de l'hydrolyse enzymatique, ont donné les meilleurs résultats (figure 25). Il faut noter que, le trempage des racines dans l'eau distillée pendant 30min à 2h a permis d'augmenter le contraste entre le cytoplasme et les chromosomes.



**Figure 25.** Cellules en métaphase obtenues suite au prétraitement par les deux agents mitoclasiques Gx100, **a**: prétraitement à l' $\alpha$ - bromonaphtalène, **b**: prétraitement au 8-Hydroxy-quinoléine.

## *Conclusion*

---

La préservation de la perpétuité de la culture du palmier dattier relève du défi majeur de ce siècle, de part sa coriacité morphologique cette espèce est en constante vulnérabilité à des multiples dangers plus particulièrement à la maladie du bayoud pouvant causée son érosion génétique, de ce fait la biotechnologie apporte des compléments aux méthodes traditionnelles par les méthodes *in vitro* qui sont ainsi utilisées pour l'amélioration des plantes, pour la création de variétés résistantes.

Dans cette initiative nous avons appliqué une méthodologie permettant l'optimisation de la phase de l'embryogénèse somatique des hybrides somatiques issus de fusion de protoplastes chez les trois cultivars (DN, TGZ et TKB), leur développement en plants, leur acclimatation ainsi que leur évaluation par étude caryologique.

Nous avons testé trois hormones de croissance (ANA, AIB et KIN) utilisées dans les huit milieux de culture déférentes sur les hybrides somatiques, nous avons observé des effets importants sur la longueur et le nombre des feuilles et des racines dans la phase développement en plants et aussi sur la teneur en chlorophylle au cours d'acclimatation.

L'analyse statistique indique que les résultats obtenus ont montré qu'il y a une grande variabilité entre les réponses des hybrides somatiques sur les huit milieux de cultures. Elle nous a permis de révéler que la combinaison hormonale, qui a donné l'allongement le plus élevé avec d'AIB et de KIN. L'élongation racinaire et le nombre des feuilles ont été fortement stimulés par le milieu de culture dépourvu d'hormones, tandis que les milieux contenant l'ANA seule ou combiné avec l'AIB favorisent l'émission racinaire.

Nous avons établi, aussi la phase d'acclimatation. Le verdissement des plantules a été observé sur les milieux contenant d'ANA combiné avec l'AIB et milieu de culture sans hormones ont donné des taux de chlorophylle les plus élevé, avec un taux de survie 68% pendant l'acclimatation.

Nous avons réalisé une étude caryologique sur les cellules des racines, des hybrides somatique issuent de fusion de protoplastes et sur les graines des trois cultivars (DN, TGZ et TKB).

Notre présent travail nous a conduites à l'observation des plaques métaphasiques à l'aide de l'agent mitoclasique 8Hydroxy Quinoléine dans la phase de prétraitement. Pour optimiser le protocole, nous avons utilisé des enzymes après d'hydrolyse acide qui donne des plaques métaphasique plus claires.

## ***Conclusion***

---

Ainsi nous avons pu observer le même nombre de chromosome dans la plupart des cellules chez le matériel génétique **1F1** (18 chromosomes). Tandis que nous avons obtenu des nombres différents (27, 36 et 46) dans les autres cellules.

Cependant comme perspectives de recherches, l'étude soulève les points suivants

- ✓ Evaluation des hybrides somatique issus de la régénération des protoplastes par les marqueurs moléculaires fiables pour déterminer le succès de l'hybridation somatique.
- ✓ Etude cytofluométrique pour déterminer le niveau de ploïdie.
- ✓ Evaluation sur les terreries bayoude vis a vis du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

## *Références bibliographiques*

- **ABADIS et CHEKALAIN R, 2015.** L'effet de l'irradiation au Cobalt 60 à la dose 15 Gy sur la régénération des cals embryogènes de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*), Mémoire de Master 2 en Génomique et Biotechnologies Végétales, Uni SAAD DAHLEB BLIDA 1, Alger, p2.
- **ABED F, 2012.**embryogenèse somatique chez quelques cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) de trois régions du sud et évaluation de la conformité par les systèmes enzymatique (peroxydases). Mémoire de Magister en sciences agronomiques.
- **ABED F., YATTA D., AMARA B., YAKHOU M.S., ET BENHAFSI F., 2014.** Somatic embryogenesis from offshoot of different cultivars of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) of three region of southern Algerian, e-Book Biotechnology and conservation of species from arid regions.
- **AHEE J., ARTHUIS P., CAS G., DUVAL Y., GUENIN G., HANOWER J., HANOWER P., LIEVOUX D., LIORET C., MALAURIE B., PANNETIER C., RAILLOT D., VARECHON C., ZUCKERMANN L., 1981.** La multipli-cation végétative *in vitro* du palmier à huile par embryogenèse somatique. Oléagineux 36 (3) pp.113 - 118.
- **AIT CHITT M., 1989.** Problèmes rencontrés en culture *in vitro* du palmier dattier *phoenix dactylifera* L. Par la technique d'organogenèse. Compte rendu premier groupe de travail sur la multiplication rapide du palmier dattier par technique de culture *in vitro*. FAO Marrakech 9-12 oct 1989.
- **AL-KHAYRI JAMEEL M, 2011.** Basal salt differ according to culture stage and cultivar in date palm somatic embryogenesis. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 7(1): pp32-42.
- **AMORSI G, 1975.** Le palmier dattier en Algérie,Ed,Telemcen, 131p. In BANSSAADA ,2015. Etude du développement et architecture racinaire de plantules de palmier dattier sous stress salin. Thèse de master 2, Uni d'Oran Ahmed Ben Bella. Alger.
- **AMMAR S et BENBADIS A., 1977.** Multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par la culture de tissus de jeunes plantes issues de semis. C.R. Acad. Sci Paris. Serie D. 284: 1789-1792.
- **AOYAGI H, 2006.** Development of a quantitative method for determination of the optimal conditions for protoplast isolation from cultured plant cells. Biotechnol Lett. 28(20) :pp1687- 1694.
- **ASSANI A., CHABANE D., SHITTU H., BOUGUEDOURA N., 2011.** Date palm cell and protoplast culture. In : Jain SM, Al-Khayri JM, Johnson DV (eds) Date palm biotechnology. Springer, Dordrecht, pp 605–629.

- **BUELGUEDJ, 2007.** Evaluation du sous-secteur des dattes en Algérie, INRAA El-Harrach.
- **BEN ABDELLAH A, 1990.** La Phoeniciculture. Option Méditerranéennes. -Les systèmes agricoles oasiens- Série A/n°11.
- **BENKHALIFA A, 2006.** Un system d'information -au service des ressources génétiques du palmier dattier et de la lutte contre la fusariose. Journée internationales sur la désertification et le développement durable. Biskra 10 et 12 juin.
- **BENHAMED M –H, 2016.** Induction des composés phénoliques associés à la paroi cellulaire, des lignines et des enzymes de défense dans les racines de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) inoculées par *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis*, thèse de MASTER En Sciences Biologiques, UNI DE BLIDA -1-, Alger, p1.
- **BEN ABBES F, 2011.** Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes « *Phoenix dactylifera* L. ». thèse de Magister, Uni Ferhat Abbas-Setif, Alger, p1.
- **BOUGUEDOURA N.1991.** Connaissance de la morphogènes du palmier dattier. 201p. In BANSSAADA ,2015. Etude du développement et architecture racinaire de plantules de palmier dattier sous stress salin. Thèse de master 2.Uni d'Oran Ahmed Ben Bella. Alger. 201p.
- **BOUGUEDOURA N.1991.** in BOUFIS N,2008. régénération pr embryogenese somatique de vitroplants de palmier dattier (variété Degla Bayda) en vue de la résistance contre le bayoud.
- **BOUNAGA N et DJERBI, 1990.** Pathologie du palmier dattier. Options Méditerranéennes- Les systèmes agricoles oasiens- Sér. A/11. Uni Rech. Sur les Zones Arides (URZA). Inst. Nat. Rech. Agron (INRA). Algérie.
- **BOXUS et al., 1995.** Rôle de la culture in vitro dans la conservation du matériel génétique sur un espace réduit.BV 93, Ed Cned. Aupelf- Uref. 191p.
- **CIRAD et GRET,2002.** In Ghomari F-N,2009. Moyens de Luttés Chimique et Biologique Contre le *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* Agent Causal du Bayoud Chez Palmier Dattier *Phoenix dactylifera* L. Spécialité : Microbiologie Appliquée, Uni d'Oran ES-SEIA, Alger.
- **CHANDRA A et al., 2003.** in SIRATE SING S et TANSAOUT F., 2016. Contribution à la régénération des protoplastes et à la caractérisation moléculaire en vue de l'amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) à la résistance au bayoud. Uni Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, Algérie.
- **CHAROUN,2008.** In in BOUFIS N,2008.régénération pr embryogenese somatique de vitroplants de palmier dattier (variété Degla Bayda) en vue de la résistance contre le bayoud.
- **CHABANE D 2007,** Contribution à l'amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par fusion de protoplastes de deux cultivars Dglet nour sensible et Takerboucht résistant au bayoud, Uni de la Technologie Hoari Boumediene.
- **CHEIKH A, 2014.** Lutte Biologique contre la cochenille blanche (*Parlatoria blanchardi*) du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) en Adrar Mauritanien, Mémoire de licence professionnelle en production et protection végétales,Institut supérieur

d'Enseignement technologique, Département production et protection végétales, laboratoire patho-biotechnologie d'Ater, Mauritanie, p1.

- **CHEVALIER A. 1952.** Recherches sur les Phoenix africain. Rév. Int. De Bot. App. Et d'Agric. Trop.R. B.A., Masson, Paris. 146-159. in **Cheikh A, 2014.** Lutte Biologique contre la cochenille blanche (*Parlatoria blanchardi*) du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) en Adrar Mauritanien, Mémoire de licence professionnelle en production et protection végétales, Institut supérieur d'Enseignement technologique, laboratoire patho-biotechnologie d'Ater, Mauritanie.
- **DAIKH ET DEMARLY., 1987.** Résultats préliminaire sur l'obtention d'embryons somatique et la réalisation de semences artificielles de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). in Ghomari F-N, 2009. Moyens de Luttés Chimique et Biologique Contre le *Fusarium oxysporum* f.sp. albedinis Agent Causal du Bayoud Chez Palmier Dattier *Phoenix dactylifera* L. Uni d'Oran ES-SEIA, Alger, p 563-569.
- **DEMARLY et SIBI, 1996.** In SIRATE SING S et TANSOUD F., 2016. Contribution à la régénération des protoplastes et à la caractérisation moléculaire en vue de l'amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à la résistance au bayoud. Uni Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, Algérie.
- **DE TOUCHET BLANDIN., 1991.** Micropropagation du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) micropropagation in liquid medium, Thèse de doctorat, Discipline : Biologie et Physiologie végétales. UNI de paris 11, orsay, France
- **EHSANPOUR AA et JONES GK 2001.** Plant regeneration from mesophyll protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Delaware using Silver ThioSulfate (STS). J Sci IR Iran. 12(2):103-110.
- **DESJARDINS Y. 1995.** Factors affecting CO<sub>2</sub> fixation in string to optimize photoautotrophy in micropropagated plantlets. Plant Tiss. Cult. Biotechnol., 1 (1) : 13 - 25.
- **DUSTAN D I et K E TURNER., 1984.** The acclimatization of micropropagated plants. In : Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, 1 (15) : 123 -129. Academic Press, Inc, ISBN 0 -12 - 715001 - 3.
- **DJERBI M, 1990.** Méthodes de diagnostic du Bayoud. In : Compte rendu de l'atelier sur le diagnostic et l'éradication du Bayoud. Ghardaïa 3-7 Juin 1989.
- **ELHADRAMI I et ELHADRAMI A., 2009.** Breeding date. In Breeding plantation Tree Crops : Tropical Species. Eds S.M. Jain, P.M. Priyadarshan. P.196-216. In BANSSAADA ,2015. Etude du développement et architecture racinaire de plantules de palmier dattier sous stress salin. Thèse de master 2. Uni d'Oran Ahmed Ben Bella. Alger.
- **EL HADRAMI A., EL IDRISSEI-TOURANE A., EL HASSNI M., DAAYF F., et EL HADRAMI I., 2005.** Toxin-based in vitro selection and its potential application to date palm for resistance to the bayoud *Fusarium* wilt. Plant Biology and Pathology, C. R. Biologies, 328 : 732-744.
- **EL HADRAMI, 2005.** in BOUFIS N, 2008. régénération pr embryogenese somatique de vitroplants de palmier dattier (variété Degla Bayda) en vue de la résistance contre le bayoud.

- **EL-DEEK, A. A., ATTIA, A. A. ET AL-HARTHI M. A. 2010.** Whole inedible date in the grower– finisher broiler diets and the impact on productive performance, nutrient digestibility and meat quality. *Animal*, 4 (10): pp.1047-1052
- **EL HADRAMI I., AL DJAARARI 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, pp.23-27.
- **E.P.P.O (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 1997.** *Fusarium oxysporum* f.sp. albedinis. In : Quarantine Pest for Europe, 2<sup>nd</sup> ed.,, CABI international, Wallingford, La détermination du sexe chez le palmier dattier, pp. 758-763.
- **FERRY M. BOUGUEDOURA N et EL HADRAMI, I., 1998.** Patrimoine génétique et techniques de propagation in vitro pour le développement de la culture du palmier dattier, *Sècheresse* 9, p139-146.
- **FREDERIQUE ABERLENC-BERTOSSI, ABDOURAHMAN DAHER, NATHALIE CHABRILLANGE, 2008.** La détermination du sexe chez le palmier dattier, *Biotechnologies du palmier dattier*
- **HANNACHI S, KHITRI D, BEN KHALIFA A., 1998.** Brac de la Perrière AL. Inventaire varié tal de la palmeraie algérienne. Rouiba (Alge´rie) : Ed. Anep.
- **HADJI F et HAMADA F 2015.** Caractérisation morphologique des «Vitro-plants» du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*. L) dans la station INRAA de Touggourt. UNI KASDI MERBAH OUARGLA, Mémoire du diplôme de MASTER ACADEMIQUE, Science de la Nature et de la Vie, Uni Saad Dahleb Blida -1-, p 2.
- **JAIN, S., M.J.M. AL-KHAYRI AND D.V. JOHNSON., 2011.** Date palm biotechnology : Springer Science & Business Media.
- **JOHN E. ET SMITH., 2004.** *Biotechnology*, Cambridge Uni press , pp37-38
- **GAMBORG O I ; MILLER R A et OJIMA K, 1968.** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 148-51.
- **Ghordon, 1996.** In LOUVET, BULIT J, TOUTAIN G et RIEUF P,1970. Le Bayoud fusariose vasculaire du palmier dattier symptôme et nature de la maladie.
- **GORDON, 1965.** In LOUVET J, BULIT J, TOUTAIN G, ET RIEUF P., 1970. Le bayoud fusariose vasculaire du palmier dattier symptomes et nature de la maladie moyens de lutte.
- **KHELAFI H, 2012.** in 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 du 08 au 10 mars 2005 Erfoud, Maroc - B. Boulanouar & C. Kradi (Eds.)
- **KAO K. N et MICHAYLUK M. R, 1975.** Nutrient requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at very low population density in liquid media. *Planta* 126: 105-10.



- **KONAN K. E., DURAND-GASSELIN T., DUVAL Y., PANNETIER C., 1989.** Weaning oil palm ramets obtained by *in vitro* micropropagation (*Elaeis Guineensis* Jacq.). Communication In « Proc. 50 the Annivesany of Nifor « 22-25 Nov 1989, Benin City (Nigeria).
- **KOZAI T, 1991.** Micropropagation under photoautotrophic conditions. - In Debergh (P.C.), Zimmerman (R.H.) Micropropagation Technology and Application. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, p 447-469.
- **KUMAR, K. and RAO, I.U. 2012 :** Morphophysiologicals problems in acclimatization of micropropagated plants in - *ex vitro* con-ditions-a review. J. Ornament Hortic Plants 2(4) :271-283
- **LAMIN I., 2015.** Optimisation de l'organogenèse chez la variété Mejhoul : Phase d'elongation et d'acclimatation, Master en Sciences et Techniques, Gestion et Conservation de la biodiversité.
- **LINNE C., 1753.** Species Plantarum, tome 2. Stokholm, Impensis Laurentii Salvii, 776 p.
- **MATALLAH.M, 2003.** Contribution à l'étude de la coservation des dattes de la variété Deglet-Nour :Osotherme d'adsorption et de désorption. in Ghomari F-N, 2009. Moyens de Luttés Chimique et Biologique Contre le *Fusarium oxysporum* f.sp. albedinis Agent Causal du Bayoud Chez Palmier Dattier Phoenix dactylifera L. Spécialité : Microbiologie Appliquée, Option : Phytopathologie, Département de Biologie, faculté des sciences, Uni : d'Oran ES-SEIA.
- **MATALLAH M., 2004.** Contribution à l'étude de la conservation des dates variété Deglet-Nour : Isotherme d'adsorption et de désorption. Mémoire d'Ingéniera, INA. El-Harrach. Alger.
- **MAJEWSKA -SAWKA A et al., 1990.** in SIRATE SING S et TANSOOUT F., 2016. Contribution à la régénération des protoplastes et à la caractérisation moléculaire en vue de l'amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) à la résistance au bayoud. Uni Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, Algérie.
- **MERANEH A D, 2010.** Détermination du sexe chez le palmier dattier : approches histocytologiques et moléculaires. Thèse de doctorat de l'Uni Montpellier II. In Ezzouaoui S et Benkiar I-M,2015. Recherche d'une méthode fiable de culture de protoplastes et d'hybridation somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), Mémoire de fin d'étude du Master II en Science de la Nature et de la Vie, Option: Génomique et Biotechnologie Végétale, Uni Blida1, p1.
- **MARGARA, 1989.** In Anjarne M., Bougerfaoui M. et Abahmane L., 2005. Les techniques de micropropagation du palmier dattier : Expérience de l'INRA-Maroc.
- **MAHDI N, 2011.** Essai de lutte biologique contre la fusariose vasculaire du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Mémoire de Magister Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
- **MASLOUHI, 1989.** In LOUVET, BULIT J, TOUTAIN G et RIEUF P,1970. Le Bayoud fusariose vasculaire du palmier dattier symptôme et nature de la maladie.

- **MAZRI MOUAAD AMINE** .,2012. Effect of Liquid Media and In Vitro Pre acclimatization, Stage on Shoot Elongation and Acclimatization of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Najda, INRA, CRRA-Marrakesh, UR Agro-Biotechnologie, Avenue Mohammed VI, B.P. 533, Marrakesh, Morocco, 1p.
- **MAZRI MA, MEZIANI R** 2013 An improved method for micropropagation and regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). J Plant Biochem Biotechnol 22:176–184.
- **MICHEL** 1998. In LOUVET, BULIT J, TOUTAIN G et RIEUF P,1970. Le Bayoud fusariose vasculaire du palmier dattier symptôme et nature de la maladie.
- **MOHAMED SAALDL**,2013. Amélioration génétique du palmier dattier Critères de selection, techniques et résultats,Institut National de la Recherche Agronomique, Centre Régional du Haouz-Présahara, Marrakech (Maroc).
- **MONTEIRO A., PIJS J., BAX M., HAKKAART T. et BEAKEFIELD P.M** 2003. Mutants highlight the modular control of butterfly eyespot patterns. Evolution & Development, 5: 180-187.
- **MOGHAIEB REDA E.A., ABDEL-HADI A. ABDEL-HADI \* AND MOHAMED REDA A. AHMED.**, 2011. Genetic stability among date palm plantlets regenerated from petiole 2 1Department of Genetics and Genetic Engineering Research Center (GERC), Faculty of Agriculture, Cairo Uni, Giza, Egypt. in African Journal of Biotechnology Vol. 10(65), pp. 14311-14318 <http://www.academicjournals.org/AJB> Academic Journals Full Length Research Paper.
- **MUNIER, P., 1973.** Le palmier dattier. Edit. Maison neuve et Larose, Paris. ISBN 2706805633. 221 p. in ABADI S et CHEKALAIN R, 2015. L’effet de l’irradiation au Cobalt 60 à la dose 15 Gy sur la régénération des cals embryogènes de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*), Mémoire de Master2 en Génomique et Biotechnologies Végétales, Uni SAAD DAHLEB BLIDA 1.
- **MURASHIGE T., ET SKOOG F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15 : 473-497.in SIRATE SING S et TANSOOUT F., 2016. Contribution à la régénération des protoplastes et à la caractérisation moléculaire en vue de l’amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) à la résistance au bayoud, Uni M’Hamed Bougara de Boumerdes, Alger.
- **NIXON R.W AND CORPENTER J.B. 1978.** Growing dates in united states. U.S.Dep. Agric. Inf, bull, 207p.
- **OIHABO et al, 1992.** In LOUVET, BULIT J, TOUTAIN G et RIEUF P,1970. Le Bayoud fusariose vasculaire du palmier dattier symptôme et nature de la maladie.
- **ONFAA., 2017.** Rapport sur le commerce extérieur des dattes, Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires (ONFAA) Ministère de l’Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche (site : onfaa.inraa.dz)

- **PEYRON G 2000.** Cultiver le palmier dattier. Groupe de Recherche et d'Information pour le Développement de l'Agriculture d'Oasis (GRIDAO), 109 p. in Ezzouaoui S et Benkiar I-M, 2015. Recherche d'une méthode fiable de culture de protoplastes et d'hybridation somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), Mémoire de Master II en Science de la Nature et de la Vie, Uni Blida1.
- **ROGER, 1990.** In LOUVET, BULIT J, TOUTAIN G et RIEUF P,1970. Le Bayoud fusariose vasculaire du palmier dattier symptôme et nature de la maladie.
- **SAAIDI M. 1990.** Amélioration génétique du palmier dattier. Critères de sélection, techniques et résultats .in Dollé V. (ed.) , Toutain G. ( ed.) . Les systèmes agricoles oasiens Montpellier : CIHEAM, Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 11 p. 133- 154.
- **SAKA, 1992.** Recherche agronomique. Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA). In HADJI F et HAMADA F,2014. Caractérisation morphologique des «Vitro-plants» du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) dans la station INRAA de Touggourt, Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de MASTER ACADEMIQUE, Uni KASDI MERBAH OUARGLA, p2.
- **SEDRA, 1998.** In LOUVET, BULIT J, TOUTAIN G et RIEUF P,1970. Le Bayoud fusariose vasculaire du palmier dattier symptôme et nature de la maladie.
- **SEDRA, 2005.** in BOUFIS N,2008.régénération pr embryogenese somatique de vitroplants de palmier dattier (variété Degla Bayda) en vue de la résistance contre le bayoud.
- **SIDAB, 2016.** Salon national de la datte de Biskra. SIDAB 2016 1er Salon International de la Datte, CCI Paris Île-de-France\DGA\_AIE\DFCE\Carnets ATA. [www.caci.dz](http://www.caci.dz) .
- **SIHACHAKR D. 2002.** Protoplastes: isolement, culture, régénération et fusion au polyéthylène glycole. In: Biotechnologies végétales, techniques de laboratoire. Tec et Doc Ed., pp.177-199.
- **SHIZUYA, 1992.** In LOUVET, BULIT J, TOUTAIN G et RIEUF P,1970. Le Bayoud fusariose vasculaire du palmier dattier symptôme et nature de la maladie.
- **SIHACHAKR, 1996.** In LOUVET, BULIT J, TOUTAIN G et RIEUF P,1970. Le Bayoud fusariose vasculaire du palmier dattier symptôme et nature de la maladie.
- **SINHA A, WETTEN AC, CALIGARI PDS. 2003.** Effect of biotic factors on the isolation of *Lupinus albus* protoplasts. Aust J Bot. 51(1): pp103-109.
- **SIDKY RA, ZAID ZE, EL-BANA A (2007)** Optimized protocol for in vitro rooting of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Proceedings fourth international symposium on date palm, King Faisal University, Al Hassa, Saudi Arabia, pp 454–46
- **SUN Y, ZHANG X, HUANG C, NIE Y, GUO X. 2005.** Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of six explants in Coker (*Gossypium hirsutum*). Plant Cell Tiss Organ Cult. 201(82):pp309-315.

- **SGHAIER H, OHBA H, SATOH K, YANAGISAWA T, NARUMI I - Extremophiles, 2009.** Identification of PprM: a modulator of the PprI-dependent DNA damage response in *Deinococcus radiodurans*
- **TAKEBE I , LABIB G ET MELCHERS G, 1971.** Regeneration of whole plant from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften*, 58 : 318-320.
- **TIRICHINE, 2007.** in BOUFIS N,2008.régénération pr embryogenese somatique de vitroplants de palmier dattier (variété Degla Bayda) en vue de la résistance contre le bayoud.
- **TISSERAT B. (1982).** Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures. *Euphytica*, 31, p201-214.
- **TOUTAIN G. 1996.** Rapport de synthèse de l'atelier (Techniques culturelles du palmier dattier) pp201-205. In BANSSAADA ,2015. Etude du développement et architecture racinaire de plantules de palmier dattier sous stress salin. Thèse de master 2.Uni d'Oran Ahmed Ben Bella. Alger.
- **WRIGLEY G, 1994.** Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) J.Smartt, N. W Simmonds ed 2<sup>nd</sup> ed., The evolution of crop plants. Longman, Essex, UK, 399-403.
- **ZAÏD A, 2002.** Date Palm Cultivation. FAO. Plant Production and Protection Paper. 156 Rev.1. 110p. in ABADI S et CHEKALAIN R,2015. L'effet de l'irradiation au Cobalt 60 à la dose 15 Gy sur la régénération des cals embryogènes de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*), Mémoire de fin d'Etudes Pour l'obtention du Diplôme Master2 en Génomique et Biotechnologies Végétales, Uni SAAD DAHLEB BLIDA 1
- **ZAID A., ARIAS-JIMENEZ E.J., 2002.** Date palm cultivation. F.A.O 2002.
- **ZAID A et DE WET P-F., 2002.**Date Production Support Programme. CHAPTER V: DATE PALM PROPAGATION
- **ZIV M, 1991.** Vitrification : morphological and physiological disorders of in vitro plants. In : Micropropagation. Debergh P.C., Zimmermann R. H, eds. Kluwer academic publishers.
- **ZHU L.G., WANG B.C., ZHU J., CHEN L.X., DAI C.Y. ET DUAN C.R., 2005.** Prtoplast isolation of callus in *Echinacea august folia*. *Colloids Surfaces B-Bio interfaces*, 44: 4-5.
- **ZHU G et al 2007.** In SIRATE SING S et TANSOOUT F., 2016. Contribution à la régénération des protoplastes et à la caractérisation moléculaire en vue de l'amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à la résistance au bayoud. Uni Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, Algérie.
- **ZRÏD J.P, 1988.** Cultures de cellules, tissus et organes végétaux. Fondement théorique et utilisations pratiques. Ed Press. Polytechnique Romandes Suisse. Sharma D.R., Chowdhori J.B et Yadan N. 1998 – Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from shoot tipecalli of wild date *Phoenix sylvestris* Roxb. *Indian Journal of Experimental Biology*, 26: 854-857.
- **ZEHDI-AZOUZI, S., CHERIF, E., MOUSSOUNI, S., GROS-BALTHAZARD, M., ABBAS NAQVI, S., LUDEÑA, B., SI-DEHBI, F.,2015.** Genetic structure of

the date palm (*Phoenix dactylifera*) in the Old World reveals a strong differentiation between eastern and western populations. *Annals of botany*, 116(1), 101-112.

- **YATTA EL DJOUZI DJAMILA ,2007.** Étude de l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et caractérisation moléculaire du matériel végétale initial en vue de l'étude de la conformité des vitroplants. Thèse de Magister. USTHB, 96p.
- **YATTA D et BOUGUEDOURA N, 2013.** «The Date palm in Algeria», San Remo (Italy).

## Annexe 1

**Tableau 1.** Les composants de la solution mère des Macro MS.

Produits	Concentration du milieu	(n) fois concentration	Concentration de la solution mère
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1.9g/l	X25	45.5g
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1.65g/l	X25	41.25g
<b>CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O</b>	0.44g/l	X25	11g
<b>MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	0.37g/l	X25	9.25g
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.17g/l	X25	4.25g

**Tableau 2.** Les composants de la solution mère des Micro MS

Produits	Concentration du milieu	(n) fois concentration	Concentration de solution mère
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6.2mg/l	X100	620mg
<b>MnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	16.9mg/l	X100	1690mg
<b>ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	8.6mg/l	X100	90mg
<b>CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O</b>	0.025mg/l	X100	2.5mg
<b>CaCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O</b>	0.025mg/l	X100	2.5mg
<b>NaMoO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O</b>	0.25mg/l	X100	25mg
<b>KI</b>	0.83mg/l	X100	83mg

**Tableau3.** Les composants de la solution mère Fer MS

Produits	Concentration du milieu	(n) fois concentration	Concentration de la solution mère
Na <sub>2</sub> EDTA	<b>0.03735g/l</b>	<b>X100</b>	<b>3.73g</b>
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	<b>0.02785g/l</b>	<b>X100</b>	<b>2.78g</b>

## Annexe 2

**Tableau 1.** Milieu de germination et prolifération GMN et GMP.

ELEMENTS	MILIEU GMN 200	MILIEU GMP
MACRO MS	40ml (MACRO MS madéfié)	40ml
MICRO MS	10ml	10ml
FER MS	10ml	10ml
VITAMINES : MS : thiamine (32)/acide nicotinique(103)1/pyridoxine(128)		1ml/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100mg	100mg
NAH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170mg	170mg
ADENINE	40mg	/
L-GLUTAMINE	200mg	200mg
CHARBON ACTIF	200mg	200mg
SACHAROSE	60g	60g
AGAR/PHYTAGEL	7g/2g	7g/2g
THIAMINE	1ml	/
MYOINOSITOL	100mg	100mg
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	200mg	/

## Annexe 3

**Tableau.** Solutions d'irrigation pour l'acclimatation.

Eléments	Milieu
MCRO MS	40ML
MICRO MS	10ML
FER MS	10ML
VITAMINES MS : thiamine/acide nicotinique/pyridoxine	1ML/L
ADENINE	40mg
L-GLUTAMINE	100mg
SACHAROSE	45g
CHARBON ACTIF	200mg
MYOINOSITOL	100mg
PICLORAM	12.5mg
IPA	1mg

## Annexe 4

**Tableau 1.** Effet de régulateurs de croissance sur la longueur des feuilles

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr
Repiquage stratum	2	226.803	113.402	61.08	
Materiel_genetique	1	92.264	92.264	49.70	<.001
Milieu	7	688.763	98.395	53.00	<.001
Materiel_genetique/Milieu	7	553.423	79.060	42.58	<.001
Residual	30	55.697	79.060		
Total	47	1616.950			

Milieu	Longueur des feuilles
M1	11.19
M2	17.43
M3	10.33
M4	15.01
M5	13.93
M6	20.81
M7	12.60
M8	20.70
Moyenne	15.25

**Tableau 2.** Effet des régulateurs de croissance sur la longueur des racines

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
Repiquage stratum	2	101.801	50.900	28.26	
Matériel génétique	1	7.297	7.297	4.05	0.053
Milieu	7	87.250	12.464	6.92	<.001
Matériel génétique.Milieu	7	71.956	10.279	5.71	<.001
Residual	30	54.029	1.801		
Total	47	322.332			

Milieu	Longueur de racine
M1	9,40
M2	9,25
M3	5,73
M4	6,23
M5	7,42
M6	6,42
M7	5,91
M8	7,42
Moyenne	7,22



**Tableau 3.** Effet de régulateurs de croissance sur le nombre des feuilles

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
Repiquage stratum	2	2.98483	1.49242	34.42	
Materiel_genetique	1	0.69834	0.69834	16.11	<.001
Milieu	7	1.20179	0.17168	3.96	0.004
Materiel_genetique.Milieu	7	0.88099	0.12586	2.90	0.019
Residual	30	1.30085	0.04336		
Total	47	7.06681			

Milieu	Nombre des feuilles
M1	1,69
M2	1,39
M3	1,35
M4	1,27
M5	1,24
M6	1,40
M7	1,62
M8	1,25
<b>Moyenne</b>	<b>1,40</b>

**Tableau 4 :** effet de régulateurs de croissance sur le nombre de racines

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
Repiquage stratum	2	9.87592	6.49242	64.85	
Matériel génétique	1	5.69834	4.69834	18.91	<.001
Milieu	7	7.20179	6.17168	8.96	0.008
Matériel_génétique.Milieu	7	4.88099	3.12586	7.90	0.017
Residual	30	9.30085	8.05449		
Total	47	40.76681			

Milieu	Nombre de racines
M1	9,19
M2	21,54
M3	9,48
M4	14,6
M5	11,67
M6	12,41
M7	14,12
M8	17,91
<b>Moyenne</b>	<b>13,86</b>

## Annexe 6



**Figure 1.** Les produits utilisés



**Figure 2.** Chambre de culture.



**Figure 3.** L'autoclave



**Figure 4.** Balances.  
de précision



**Figure 5.** Matériel de repiquage  
et Stérilisateur à billes.



**Figure 6.** Verrerie.



**Figure 7.** Plaque  
chauffante.



**Figure 8.** Micropipettes.



Figure 9. chambre froid.



Figure 10. Fer MS, Micro MS et les Macro MS, Hcl, NaOH



Figure 11. IPA, Thiamine, Picloram, réactif de schiff



**Figure 12.** ANA, AIB, KIN.



**Figure 13.** Hemicellulase, cellulase

Péctinase



**Figure 14.** Etuve.



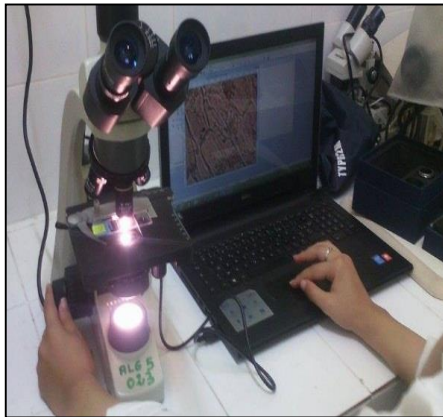
**Figure 15.** Hotte à flux laminaire.



**Figure 16.** chlorophylle mètre SPAD



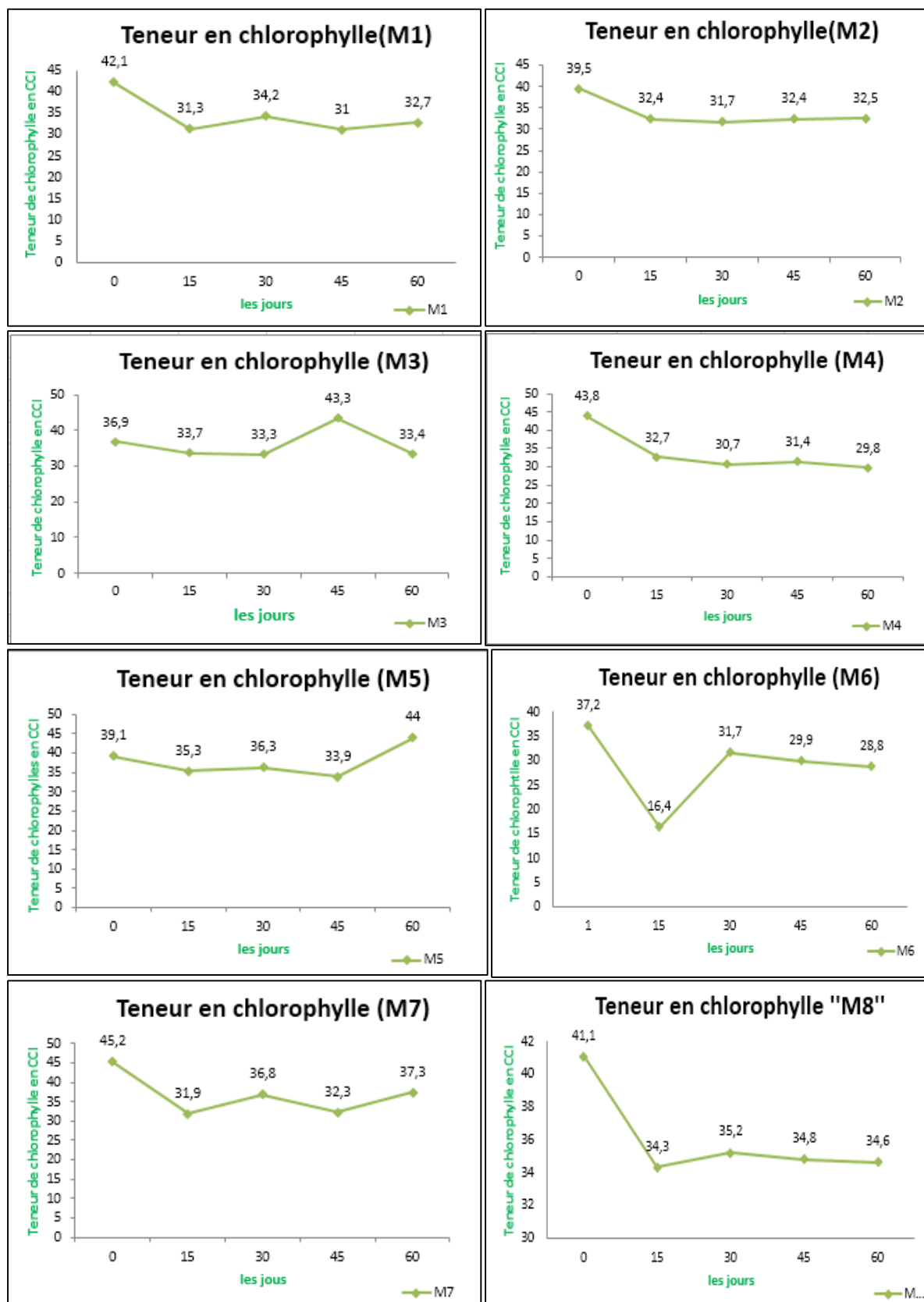
**Figure 17.** distributeur du milieu    **Figure 18.** pH mètre



**Figure 19.** Camera photo USB    **Figure 20.** microscope optique et inversé  
logiciel de traitement d'image pour microscope

## Annexe 7

### Teneur en chlorophylle dans les huit milieux de culture



## Annexe 05



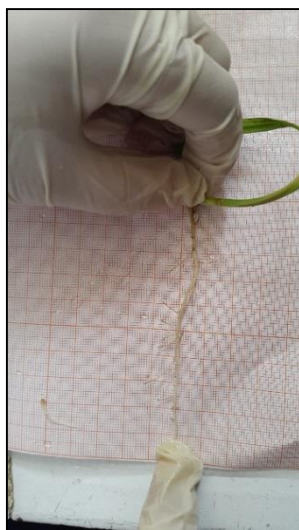
**Figure 1.** la repiquage des hybrides somatiques dans différents milieux de cultures



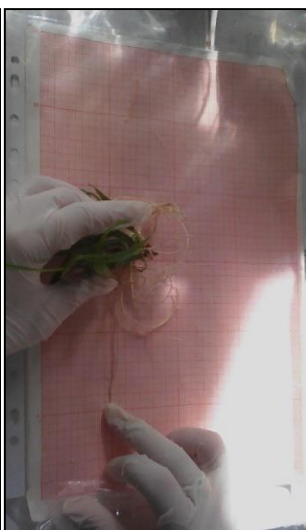
**Figure 2.** Le dénombrement des feuilles néoformé.



**Figure 3.** Longueur des feuilles néoformées.



**Figure 4.** La longueur des racines néoformées



**Figure 5.** Le nombre de racine néoformé



**Figure 6.** La longueur de feuille et de racine de plantule a acclimaté



**Figure 7.** L'acclimatation en chambre de culture après 2 semaines



**Figure 8 :** Détermination de la teneur en chlorophylle des hybrides somatique