



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma



Année Universitaire : 2013-2014

Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**MYCORHIZATION ET CROISSANCE DES VITROPLANTS
DU PALMIER DATTIER DANS LES NOUVELLES
PLANTATIONS (Région d'Er-Rachidia)**

Présenté par :

Fatima Es-bai

Encadré par :

Pr. Fatima Jaiti

Pr. KawtarFikriBenbrahim

Soutenu le : 18 Juin 2014

Avis favorable
Signé : Pr Fatima JAITI

Devant le jury composé de :

- Pr. Fatima Jaiti
- Pr. KawtarFikriBenbrahim
- Pr. Naima Elghachtouli
- Pr. Khalid Amrani

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES

☎ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – Fax : 212 (35) 60 82 14



Résumé

Ce travail a porté sur l'étude de la mycorhization et la croissance des vitroplants ayant le même âge et se développant dans les mêmes conditions climatiques, même type du sol et même techniques (irrigation, fertilisants.....).

Dans une première partie, on a prélevé des échantillons des racines des vitroplants de petites taille et de grande taille de deux variétés (MJHL, NJD). Ensuite, on a pratiqué un éclaircissement et une coloration à ces racines pour détecter la présence de mycorhizes. De plus on a compté le nombre des spores au niveau de sol de ces vitroplants après isolement et concentration. Les résultats ont montré que les racines des vitroplants de grandes tailles sont mycorhizés avec une intensité très importante, alors que la mycorhization au niveau des plants de petites tailles est faible. De plus le nombre de spores est élevé dans le sol des plants de grande taille, et bas au niveau de petits plants.

Dans une seconde partie, on a ensemencé une série de dilution préparée à partir de sols des vitroplants étudiés dans un milieu PDA, pour chercher la présence de l'agent pathogène de la maladie de Bayoud *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa) dans la zone d'étude, qui est une nouvelle plantation des vitroplants, afin d'assurer les agriculteurs de l'absence du pathogène. Les résultats obtenus montrent la présence des colonies suspectes ayant un aspect morphologique qui se rapproche de celui de Foa. Mais une étude, d'inoculation des feuilles de plants de Boufegous par des suspensions de ces isolats, a montré que ces champignons n'ont pas d'effets sur ce palmier dattier, donc ces colonies ne correspondent pas à un Foa. Ce qui permet de conclure que la zone de culture de ces plants est non infectée par le Bayoud.



Table des matières

Introduction.....	1
Partie Bibliographique.....	3
Chapitre I :Le palmier dattier : description, exigences et problématique du secteur phoénicicole	4
1.1. Description morphologique.....	4
1.1.1 Le système racinaire	4
1.1.2 L'appareil végétatif.....	4
1.1.2.1. Le tronc ou stipe.....	4
1.1.2.2. Les bourgeons.....	4
1.1.2.3. Les feuilles.....	4
1.1.3. L'Appareil de reproduction	5
1.1.3.1. Les spathes ou inflorescences.....	5
1.1.3.2. Les fleurs.....	5
1.1.3.3. Le fruit.....	5
1.2. Cycle biologique et de développement annuel du palmier dattier au Maroc	6
1.3. Principales exigences du palmier	7
1.4. Situation de secteur phoénicicole marocain	7
1.5. Problèmes de Secteur phoénicicole marocain.....	8
1.5.1 Contraintes abiotique de la pheoniciculture	8
1.5.1.1. La sécheresse	8
1.5.1.2. Salinité.....	8
1.5.2 Contraintes Biotique de la pheoniciculture.....	9
1.5.2.1. Maladies à insectes (Cochenille blanche).....	9
1.5.2.2. Maladies à champignons	9
Chapitre II : Multiplication du palmier dattier	11
2.1. Techniques traditionnelles	11
2.2. Multiplication <i>in vitro</i> du palmier dattier. ..	11
2.2.1. Définition.....	11
2.2.2 Culture des tissus <i>in vitro</i>	11
2.2.3. Préparation du terrain et pratique de plantation des vitroplants du palmier dattier.....	13
Chapitre III : Symbiose mycorhizienne	15
3.1. Définition	15
3.2. Les différents types de mycorhizes	15
3.2.1. Les ectomycorhizes.....	15
3.2.2 Les endomycorhizes.....	15
3.2.3. Les ectendomycorhizes	15
3.3. Cycle de vie des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA).....	16
3.4. Rôles des symbioses mycorhiziennes.....	17



3.4.1. Amélioration de la nutrition phosphatée.....	17
3.4.2. Amélioration de la nutrition azotée.....	18
3.4.3. Tolérance aux stress environnementaux.....	18
3.4.4. Les champignons mycorhiziens sont des agents de bioprotection.....	18

Partie Matériels et Méthodes

1. Présentation de la zone d'études.....	21
2. Paramètres de croissance.....	22
3. Prélèvement des échantillons.....	22
4. Estimation des paramètres de Mycorhization.....	22
4.1. Eclaircissement des racines.....	23
4.2. Coloration des racines.....	23
4.3. Paramètres d'évaluation.....	24
5. Extraction des spores.....	25
5.1. Isolement des spores.....	25
5.2. Concentration des spores.....	25
6. Recherche du <i>Fusariumoxysporum</i> f.sp. albedinis (Foa) au niveau des sites prospectés.....	26
7. Purification des isolats par méthode de repiquage.....	27
8. Etude de l'effet des souches de champignons isolées (Foa) sur les feuilles de jeunes plants de palmier dattier.....	27

Partie Résultats et Discussions

1. La croissance des vitroplants.....	30
2. Fréquence et intensité de la mycorhization.....	31
3. Etude de la population de champignons mycorhiziens à arbuscules autochtones.....	33
4. Recherche de Foa au niveau des sites prospectés.....	34
4.1. Observation des boites après incubation.....	34
4.2. Etudes morphologique des colonies.....	35
4.3. Les isolats purifiés.....	37
4.4. L'effet pathogène des isolats.....	37

Conclusion et perspectives.....	40
---------------------------------	----

Références bibliographiques.....	41
----------------------------------	----



LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Présentation schématique du palmier dattier	5
Figure 02 : palmes desséchées ayant l'aspect de plumes mouillées	10
.....	
Figure 03 : un coté de palme desséché	10
Figure 04: Différentes étapes de multiplication in vitro du palmier dattier par organogénèse.....	12
Figure 05: Préparation de terrain de plantation	12
Figure 06: Plantation d'un plant de la variété sélectionnée NJD	14
Figure 07: Principaux types mycorhiziens actuels représentés sur une coupe transversale de racine.....	16
Figure 08: Cycle de développement du genre Glomus	17
Figure 09: Localisation de la zone d'étude (AL Bouya) dans la région d'Er-Rachidia.....	21
Figure 10: Plantation de la variété NJD et MJHL.....	22
Figure 11: Eclaircissement et coloration des racines.....	24
Figure 12 :Représentation schematique de degré d'infection mycorhizienne dans les fragments colonisés par les champignons endomycorhiziens.....	25
Figure 13: Opération de tamisage	26
Figure 14: Les boitesensemencées par les différentes dilutions préparées.....	27
Figure 15: Purification par repiquage en milieu PDA des colonies soupçonnées de correspondre à Foa	27
Figure 16 : Inoculation des feuilles dans la suspension des isolats à tester.....	28
Figure 17 : Hauteurs et diamètres des vitroplants des deux variétés NJD et MJHL âgés de trois ans.....	30
Figure 18 : Fragments de racines mycorhizées avec une intensité forte de la variété MJHL.....	31
Figure 19: Un fragment de racines mycorhizée avec une intensité faible, et un fragment non mycorhizé de la variété NJD.....	31
Figure 20 : Fréquence et intensité de mycorhization au niveau des racines des variétés NAJDA et MJHL.....	32
Figure 21 : Observation par la loupe les différents types de spores trouvées dans le sol.....	34
Figure 22 : le développement de différentes colonies après culture sur milieu PDA.....	35
Figure 23 : l'aspect du Foa sur le milieu PDA	36
Figure 24 : Caractéristiques microscopiques des spores de Foa.....	36
Figure 25 : Observation au microscope optique des spores des colonies soupçonnées d'être un Foa	36
Figure 26 : Morphologie des colonies sur le milieu PDA.....	37
Figure 27 : les feuilles de variété bouffgous inoculées dans des tubes Contenant la suspension à tester.....	39
Figure 28 : L'état des feuilles après 10 jours de l'inoculation dans la suspension à tester.....	39



Liste des tableaux

Tableau 01 : Cycle biologique et le développement annuel de la culture du palmier au Maroc	6
Tableau 02 : Principales exigences écologiques et culturelles du palmier dattier	7
Tableau 03 : Importance par province du palmier dattier au Maroc	8
Tableau 04 : les pratiques culturelles dans les deux sites.....	21
Tableau 05 : nombres des spores trouvées au niveau de la rhizosphère des plants des deux variétés NJD et MJHL	33

Liste des abréviations

NJD : Najda
MJHL :Mejhoul
PDA : Potato Dextrose Agar
Foa. *Fusariumoxysporum*f.sp.albedinis
CMA: Champignonsmycorrhiziens à arbuscules



Introduction

Le palmier dattier est l'une des plus anciennes espèces fruitières du Maroc. Sa culture, symbole de fertilité et de prospérité des zones sahariennes et présahariennes, constitue l'une des principales cultures agricoles au niveau de ces zones.

A la fin de 19^{ème} siècle, le Maroc occupait le 3^{ème} rang avec un effectif de 15 millions de palmiers dattiers, il occupait également une place de choix au niveau du commerce extérieur grâce à la qualité des dattes produites. Perreau Leroy a rapporté que jusqu'au 19^{ème} siècle, le marché de la datte de Londres était principalement approvisionné avec le mejhoul du Tafilalet.

Malheureusement, après cette période brillante, et à partir du début du 20^{ème} siècle, la situation de secteur est devenue très difficile car les palmeraies ont commencé à connaître une dégradation continue sous l'effet de plusieurs contraintes telles que la sécheresse prolongée, l'ensablement, le manque d'intérêt de la part des populations, le vieillissement des palmeraies et les maladies surtout le bayoud qui a détruit 2/3 de la palmeraie marocaine en un siècle.

Aujourd'hui le nombre de palmiers dattiers au Maroc est seulement de 4.5 millions, un chiffre qui est relativement faible par rapport aux autres pays du Maghreb (Algérie: 9 millions, Libye: 7 millions, Tunisie: 3 millions). De ce fait, la production des dattes au Maroc reste insuffisante et peut varier d'une année à l'autre selon les conditions du climat. Ce sont essentiellement des dattes de faible et moyenne qualité qui prédominent. Les meilleures dattes 'mejhouf' et 'boufchgous' sont rares et coûtent cher.

La reconstitution des palmeraies est basée uniquement sur l'utilisation des rejets (méthode traditionnelle) qui ne peut être envisagée puisque un pied de palmier dattier ne peut pas produire en moyenne qu'entre 20 et 30 rejets durant toute sa vie. Il devient nécessaire de faire appel à la culture *in vitro* par toutes ses composantes (organogénèse, embryogénèse, ..) qui a un grand pouvoir de multiplication en masse pour repeupler les palmeraies marocaines. La plantation des jeunes palmiers doit être accompagnée de mesures de protection, d'accompagnement et d'entretien pour augmenter les chances de peuplement réussie.

Après l'implantation des « vitroplants » ayant le même âge et les mêmes conditions climatiques, même type de sol et même techniques (irrigation, fertilisants.....), l'agriculteur constate que les plantes ne poussent pas à la même vitesse ; certaines poussent rapidement d'autres marquent un retard de croissance. La question qui se pose alors : pourquoi cette diversité de croissance ? S'agit-il d'une raison génétique ou existe-il un autre facteur qui engendre cette différence de croissance ?

Ainsi, le 1^{er} objectif de ce travail est d'essayer d'étudier un facteur qui pourrait à nos yeux justifier cette différence de croissance à savoir la mycorhization. On va d'abord détecter l'existence de cette symbiose et examiner sa relation avec la croissance des « vitroplants ».


Le 2^{ème} objectif est de chercher l'existence de l'agent pathogène *Fusarium oxysporum* sp. *albedinis* au niveau des sites prospectés pour rassurer les agriculteurs de l'absence de l'agent causal de la maladie de Bayoud.




Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma



FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

 B.P. 2202 – Route d’Imouzzer – FES

 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – **Fax** : 212 (35) 60 82 14

Partie bibliographique



CH1. Le palmier dattier : description, exigences et problématique du secteur phoénicicole.

1.1. Description morphologique



Le palmier dattier est une plante monocotylédone à croissance apicale dominante. Le diamètre du tronc de l'arbre demeure généralement stable sous les mêmes conditions à partir de l'âge adulte. On distingue 3 parties : un système racinaire, un organe végétatif composé du tronc et de feuilles et un organe reproductif composé d'inflorescences mâles ou femelles (Figure 1).

1.1.1. Le système racinaire

Le système racinaire du palmier est dense de type fasciculé, il peut s'étaler sur une superficie qui peut atteindre 167 m², il est formé de plusieurs types de racines dont le diamètre ne dépasse pas 1,5 cm. Les racines prennent une longueur pouvant aller jusqu'à 8 et parfois 15 m, en profondeur.

1.1.2. L'appareil végétatif

L'appareil végétatif est composé des parties décrites ci-dessous :

1.1.2.1. Le tronc ou stipe

Le tronc cylindrique appelé aussi stipe ou tige, est non ramifié, lignifié et de couleur marron brun. Le tronc est généralement, monopodique et recouvert à sa surface par la base des palmes coupées. Sa hauteur peut atteindre plus de 30 mètres.

1.1.2.2. Les bourgeons

Un bourgeon apical ou terminal est responsable de la croissance en hauteur du palmier et du développement des feuilles et de bourgeons axillaires. Les bourgeons axillaires peuvent se développer pour donner naissance à des rejets et le bourgeon apical permet au palmier dattier de tolérer et de s'adapter à l'hostilité des conditions sahariennes (Al-Bakr, 1972).

1.1.2.3. Les feuilles

On distingue :

- ✓ Les feuilles jeunes de plants issus de graines et âgés de moins de deux ans qui présentent un pétiole et un limbe entier.
- ✓ les feuilles adultes montrent un pétiole ou rachis bien développé, un limbe penné découpé en folioles.

1.1.3. L'appareil de reproduction

1.1.3.1. Les spathes ou inflorescences

Le palmier dattier est une plante dioïque : les organes de reproduction sont composés d'inflorescences mâles ou femelles portées par des palmiers différents. Les spathes ont une forme de grappes d'épis protégés par une bractée ligneuse close et fusiforme.

1.1.3.2. Les fleurs

Les fleurs sont unisexuées à pédoncule très court. Elles sont de couleur ivoire, jaune-verdâtre selon le sexe ou la variété.

— Les phénomènes de changement de sexe chez le palmier ou de l'existence d'inflorescences des deux sexes à la fois sont très rares (Sedra 2003).

1.1.3.3. Le fruit

C'est une baie contenant une graine appelée noyau. Après fécondation, l'ovule évolue pour donner un fruit. Cette évolution peut durer 100 à 250 jours en fonction des variétés et des conditions du milieu. (Sedra 2003).

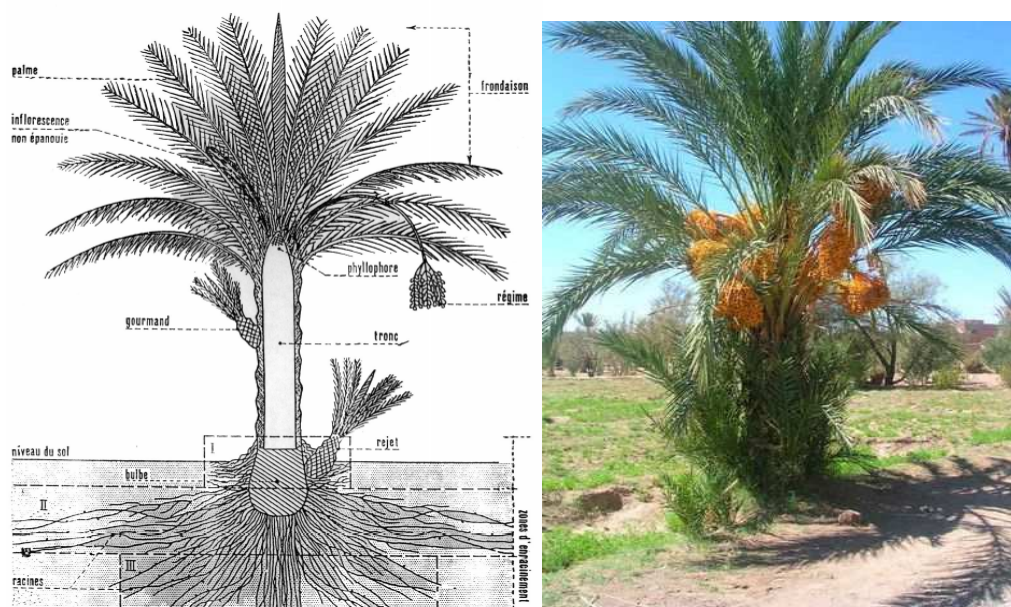


Figure 01 : Présentation schématique du palmier dattier (Munier 1973)

1.2. Le Cycle biologique et ledéveloppementannueldu palmier dattier au Maroc

Le cycle normal (conditions climatiques normales) du palmier dattier peut être décalé de 4 à 6 mois en fonction des variétés et des régions phoéniciques du monde.

Dans le cas du Maroc, le palmier dattier connaît une période de repos végétatif, juste après la récolte de novembre à janvier. Les activités biologiques essentielles du palmier notamment, l'ouverture des spathes et la maturité des dattes peuvent s'étaler sur 3 à 4 mois au cours de l'année, en fonction des variétés et des zones de culture. La période d'ouverture des spathes s'étale de Janvier à Avril. En général, les spathes mâles s'ouvrent



précocement par rapport aux spathes femelles. La végétation démarre au printemps et s'intensifie en été. La maturité finale des dattes débute en juin et se termine en novembre. (Sedra, 2001a).

Le tableau ci-dessous résume le cycle biologique du palmier dattier au Maroc.

Tableau 01 : Cycle biologique et développement annuel de la culture du palmier au Maroc
 (Sedra 2003)

Activités biologiques	Mois											
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Repos végétatif												
Développement des inflorescences à l'aisselle des jeunes palmes non encore sorties du bourgeon terminal												
Ouverture des spathes												
Démarrage de la végétation												
Nouaison des fruits après pollinisation												
Pleine activité végétative Début de maturité des dattes												
Ralentissement de ces activités Fin de maturité des dattes												

1.3. Principales exigences du palmier.

Le palmier dattier exige des étés chauds et sans pluie ni humidité élevée depuis la pollinisation jusqu'à la récolte. Il tolère bien la sécheresse mais il est très exigeant en eau d'irrigation pour son développement et pour une production convenable.

Le tableau ci-dessous indique les principales exigences écologiques et culturelles du palmier dattier (Sedra 2003) :

Tableau 02 : Principales exigences écologiques et culturelles du palmier dattier.



Adaptation climatique	Climat chaud, sec et ensoleillé
Zéro ou limites de végétation	7°C et 45°C
Sensibilité au gel	Extrémités de palmes : - 6°C Toutes les palmes : - 9°C
Durée de sécheresse tolérée	Plusieurs années mais croissance et production réduites
Besoins annuels en eau (moyenne)	15 000 à 20 000 m ³ /ha en fonction de la salinité et du type de sol
Pluies néfastes	Au moment de pollinisation et fin de la maturité des dattes
Concentration en sels tolérée: - arbre adulte: - jeune palmier:	- 9 à 10 g/l d'eau d'irrigation mais diminution de la qualité de production - 3 à 6 g/l d'eau d'irrigation
Adaptation pédologique	Tout type de sol, mais mieux en sol assez léger, profond, à pH neutre

1.4. Situation de secteur phoénicole marocain

Au Maroc, le palmier dattier, implanté principalement le long des vallées du Ziz et du Drâa, est considéré comme l'une des plus vieilles espèces fruitières du pays. Elle occupait, il y a plus d'un siècle, une importante superficie avec plus de 15 millions de pieds, ce qui plaçait le Maroc au 3^{ème} rang mondial pour la production des dattes. Une partie de cette production faisait même l'objet d'exportation, notamment sur le marché anglais qui appréciait la qualité des dattes marocaines représentées essentiellement par les variétés Mejhoul et Boufeggous.



Malheureusement, après cette longue période de prospérité des palmeraies marocaines, et à partir du début de ce siècle, la situation s'est totalement renversée et ne cesse de se dégrader sous l'effet des contraintes dont souffre le secteur.

Actuellement, ce secteur couvre une superficie d'environ 44 000 Ha correspondant à environ 4.430.000 palmiers. L'aire géographique de ce patrimoine est représentée dans le tableau suivant :

Tableau 03. Importance par province du palmier dattier au Maroc (Anonyme, 1994)

Province	Nombre de pieds	Pourcentage (%)
Ouarzazate	1873000	40,67
Errachidia	1250000	28,24
Tata	800000	19,72
Tiznit	139140	3,14
Guelmim	138000	3,12
Figuig	125500	2,83
Marrakech	100000	2,26

1.5. Problèmes de Secteur phoénicicole marocain

Le développement de la phoéniculture dépend de l'enlèvement de plusieurs contraintes d'ordre abiotique et biotique et dont les principales sont :

- la sécheresse, la salinité et la désertification
- les maladies comme le Bayoud
- l'ensablement des palmeraies

1.5.1. Contraintes abiotique de la phéoniculture

1.5.1.1. La sécheresse

Contrairement au concept populaire qui stipule que « le palmier dattier est un arbre du désert », cette espèce ne peut végéter et produire qu'après satisfaction de ses besoins en eau. Ainsi la production peut varier dans certains pays comme le Maroc, selon la pluviométrie. En effet, en 1985 (année sèche), la production était de 12000 tonnes ; alors



que cette production a atteint les 120000 tonnes en 1990 (année pluvieuse) (Direction de la production végétale (Mamva, 1990).

Au début des années 80, près de 350 000 palmiers ont subi un dessèchement néfaste dans les palmeraies du Drâa et du Tafilalet (Haddouch, 1995, Anonyme, 1998)

1.5.1.2. La Salinité

Malgré sa forte résistance à la salinité marquée par une croissance sur des sols contenant 3% de sels solubles, le palmier dattier ne se développe plus à des concentrations d'environ 6% (Arar, 1975). L'utilisation d'eau salée dans l'irrigation du palmier dattier a un effet direct sur la croissance des fruits. D'après Girard (1961, cité par Ben Abdallah, 1990) une eau contenant du sel à raison de 9-16g/l n'a pas d'effet sur la croissance végétative des palmiers, cependant, les fruits obtenus sont très petits avec une croissance très lente.

1.5.2. Contraintes Biotique de la phéoniculture

1.5.2.1. Maladies à insectes (Cochenille blanche)

Appelée 'Guemla' au Maroc, la cochenille blanche cause des dégâts importants au palmier dattier, elle se fixe sur les feuilles et diminue la respiration et la photosynthèse et cause des altérations métaboliques. Elle peut, également attaquer les fruits et entraîner l'arrêt de leur développement (Viladerbo, 1973)

1.5.2.2. Maladies à champignons

☛ La pourriture des inflorescences

La pourriture des inflorescences ou « khamdj » est une maladie qui sévit pendant les années humides ou dans les régions de phéoniculture à humidité élevée. L'agent causal de la maladie est un champignon de l'ordre des hyphales, *Mauginiella caetae* qui se conserve essentiellement à l'état de mycélium latent.

Les symptômes apparaissent sous forme de taches de couleur brune, marron sur les enveloppes des spathe encore fermées (Sedra 2012). La contamination survient lors de la pollinisation par utilisation d'inflorescences mâles contaminées.

La lutte contre le khamdj consiste aux entretiens préventives, à la destruction par le feu des inflorescences pourries et à l'utilisation de fongicides comme le Benomyl (Al Hassan et al., 1977)

🚧 Maladie de Bayoud

La maladie de Bayoud reste la maladie la plus grave qui touche les palmeraies du Maghreb. Au Maroc, les estimations montrent que ce fléau a détruit 2/3 de la palmeraie marocaine en un siècle, et de très bons cultivars ont presque disparu du patrimoine génétique.

L'agent causal de Bayoud est *Fusariumoxysporum* sp. *albedinis* (Foa) est un champignon microscopique qui fait partie de la microflore du sol, il peut être conservé pendant plusieurs années sur les débris de plantes ou dans le sol soit sous forme de chlamidospores soit en vie saprophytique. Dès l'infection la progression ascendante du champignon dans les vaisseaux est réalisée par le mycélium et les microconidies entraînées par la sève

Un des premiers symptômes externes du Bayoud est le dessèchement et le blanchissement unilatéral d'une ou plusieurs palmes de la couronne moyenne, ils vont du bas vers le haut (figure 2 et 3). Ensuite, le dessèchement se poursuit de l'autre côté progressant cette fois du haut vers le bas et la palme est ainsi entièrement desséchée, elle prend un aspect typique de « plume mouillée ». Après plusieurs semaines voire plusieurs mois, la totalité du bourgeon terminal finit par se dessécher et la plante meurt. (Djerbi, 1990 cité par Jaiti, 2008)



Figure02 : palmes desséchées ayant l'aspect de plumes mouillées



figure03 : un côté de palme desséché

Ainsi, face à ces problèmes, le repeuplement des palmeraies représente une démarche urgente qui permettra la réhabilitation et le rajeunissement de ces palmeraies dévastées. Ce repeuplement requiert la mise en place d'un



programme mettant à la disposition des agriculteurs un nombre élevé de plants qui ne peut être obtenu par les seules méthodes conventionnelles de multiplication (Abouraich et al., 2008).

CH II : MULTIPLICATION DU PALMIER DATTIER

2.1. Techniques traditionnelles

Les graines représentent le mode de dissémination le plus facile pour assurer la pérennité des plants du dattier. Toutefois, les plantations à graines sont peu utilisées à cause du caractère dioïque du palmier et des difficultés de reconnaissance des pieds mâles et femelles à un stade précoce. Néanmoins, la multiplication par graines est envisagée pour créer de nouveaux génotypes et fournir une base pour le choix d'arbres élites. Par ailleurs, les rejets constituent un moyen de reproduction fidèle des caractéristiques variétales. Cependant, le nombre restreint de rejets produits par un plant potentiel, compris entre 0 et 3 par an et entre 10 et 40 pendant toute sa durée de vie, limite leur utilisation en tant que principale technique de multiplication du palmier dattier.

Le recours, donc, à l'outil biotechnologique, fondé sur les techniques de culture des tissus, constitue sans doute le moyen le plus prometteur pour le repeuplement des palmeraies marocaines via une multiplication à grande échelle de l'espèce. Deux méthodes de micropropagation ont été adoptées, l'organogénèse et l'embryogénèse somatique (El Hadrami, 1995. Loutfi et Chlyah, 1998. El Hadrami et al., 1998. El Hadrami et El Hadrami, 2008).

2.2. Multiplication *in vitro* du palmier dattier

2.2.1. Définition

Nous appelons vitroplants, les jeunes palmiers issus de la multiplication *in vitro* qui ont été endurcis en pépinière et développés en sachets individuels avec un système racinaire important (Sedra 2003)

2.2.2 Culture des tissus *in vitro*

Malgré son coût relativement élevé, la culture *in vitro* constitue l'outil le plus performant permettant la production rapide de plusieurs milliers de vitroplants conformes au palmier-mère. En plus de son rôle dans l'amélioration génétique, cette nouvelle technologie est indispensable pour :

- ✚ Multiplier en masse des plants des variétés désirées.
- ✚ Sauvegarder les variétés ou cultivars rares menacés d'extinction à cause de facteurs d'érosion génétique d'origine abiotique ou biotique.
- ✚ Produire des plants indemnes de maladies.

Deux principales méthodes de culture *in vitro* sont connues et sont les plus utilisées dans le monde: l'organogénèse et l'embryogénèse somatique. Il semble que la technique de l'organogénèse est privilégiée puisque les risques de dérive génétique des plants produits, sont très minimes.

En effet, la comparaison entre les vitroplants produits par organogénèse et leurs pieds-mères n'a pas décelé de polymorphisme ni de variabilité.

La figure 4 illustre les principales étapes de production de plants par la technique d'organogénèse (Sedra 2012)



Figure 04: Différentes étapes de multiplication *in vitro* du palmier dattier par organogénèse. **a**: rejet nettoyé et prêt à être utilisé. **b**: prélèvement des explants (feuilles, bases des feuilles, bourgeons axillaires) à mettre en culture. **c**: production de souches bourgeonnantes. **d**: phase d'élongation puis d'enracinement des plantes. **e**: repiquage en tube individuels des plantules entières. **f**: transfert des plants en pots pour l'acclimatation en serre. **g**: développement des vitroplants en sachets. **h**: différents stades des plants développés en sachets de taille différente. **i**: phase de durcissement des plants sous abri ombragé avant d'être plantés. **j**: plantation d'un vitroplant. **k**: palmier adulte en production de rejets et de dattes. (Sedra 2012)

2.2.3. Préparation du terrain et pratique de plantation des vitroplants du palmier dattier

2.2.3.1. Préparation du terrain de plantation .

Pour préparer le terrain de plantation des vitroplants, on étudie d'abord le profil du sol pour éviter les sols peu profonds (vérifier la présence de la roche ou de pierres en profondeur), ensuite on choisit les distances de plantation des plants d'une manière à éviter le chevauchement des palmiers des arbres, car ceci entraîne un ombrage néfaste et crée des conditions favorables au développement des maladies et des ravageurs. Enfin, on installe des brise-vents de préférence à défilement.

La figure 5 illustre les autres opérations pour préparer le terrain :



Figure 05 : préparation de terrain de plantation. **A** :préparation du trou de plantation. **B** :apport du fumier et mélanger avec la terre retirée de haut.**C** :apport de fumure minérale du fond.**D** : mélange de la terre amendée. **E** :rebouchement du trou sur le mélange(terre+fumure de fond) avec la terre de sous- sol retirée du bas.**F** :préparation du trou de plantation au milieu

2.2.1.2 plantations des vitroplants

La figure suivante illustre les opérations de plantation des vitroplants du palmier dattier



Figure 06 :plantation d'un plant de la variété sélectionnée NJD.A :préparation de trou de plantation. B :réglage du niveau de plantation par rapport au niveau du sol.C :enlèvement de la base du sachet sans abimer les racines.D :enlèvement des racines si enroulées au fond du sachet ;couper soigneusement et garder les racines valables.E :plantation du plant avec cœur dégagé. (Sedra 2012)

Les techniques de biotechnologies mettent, donc, à la disposition des agriculteurs un très grand nombre de plants normaux et indemnes de maladies obtenus par organogénèse (conformité garantie par rapport au pied mère, Ferry ; 2008).Cependant, satisfaire la demande nationale en vitroplants ne signifie pas livrer aux agriculteurs des plants en quantité suffisante mais s'assurer de leurs taux de reprise et leurs productions de dattes de meilleure qualité. Actuellement, il n'existe pas de travaux publiés relatifs aux devenir des vitroplants



plantés dans les palmeraies marocaines excepté quelques rapports non chiffrés des offices nationaux de mise en valeur agricole.

Ainsi, déterminer l'implication des champignons mycorhizienstype des microorganismes, qui permettent l'amélioration de la croissance des plantes via une meilleure nutrition (Hatimi et al, 1997 ; Morke et Honrubia , 2002), dans ces programmes de repeuplement et de rajeunissement des palmeraies est d'une importance cruciale.

CHIII : SYMBIOSE MYCORHIZIENNE

3.1. Définition :

La mycorhize est une association mutualiste entre un champignon du sol et les racines d'une plante (Remy et al., 1994. Smith et Read, 1997). Cette association est bénéfique aux deux partenaires. Le champignon reçoit de la plante hôte les sucres et les acides aminés, qu'il ne peut synthétiser, indispensables à sa croissance et à son développement, et la plante absorbe mieux les élémentsminéraux (surtout le phosphore) ce qui lui assure une meilleurecroissance et une meilleure tolérance aux stress abiotiques et biotiques. (Voir Harley & Smith, 1983.Ouahmane 2007). On distingue trois principaux types de mycorhizes.

3.2. Les différents types de mycorhizes .

Plusieurs types de mycorhizes sont distingués selon le partenaire fongique impliqué dans la symbiose et les caractéristiques anatomiques et morphologiques qui leurs sont propres (Smith & Read, 1997). On distingue les ectomycorhizes, les endomycorhizes, et les ectendomycorhizes (Peyronel et al., 1969,Ouahmane 2007).

3.2.1. Lesectomycorhizes

C'est une association où le mycélium se présente sous forme d'un manteau fongique qui entoure la racine. Les hyphes progressent entre les cellules du cortex mais ne pénètrent pas dans les cellules vivantes. Elles forment un réseau intercellulaireappelé le réseau de Hartig, tout en s'étendant dans la rhizosphère.

3.2.2 Les endomycorhizes à arbuscules

Le mycélium se ramifie et se développe dans le parenchyme cortical des racines etforme des arbuscules, des vésicules et des pelotons au sein des cellules. Le mycélium externeest abondant avec des spores microscopiques au niveau du sol (Ouahmane,2007). C'est le type le plus répandu (Morton & Benny, 1990). Actuellement il y a environ 200 espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules formant des associations symbiotiques avec plus de 200000 plantes terrestres (Schüssler et al., 2001).

3.2.3. Lesectendomycorhizes

Ce sont des symbioses qui ont à la fois les caractéristiques des endo et desectomycorhizes: elles montrent à la fois un manteau fongique, qui peut être réduit, et unréseau de Hartig ainsi qu'une colonisation des cellules corticales (Smith & Read, 1997).

La figure 07 ci-dessous illustre les différents types de mycorhizes.

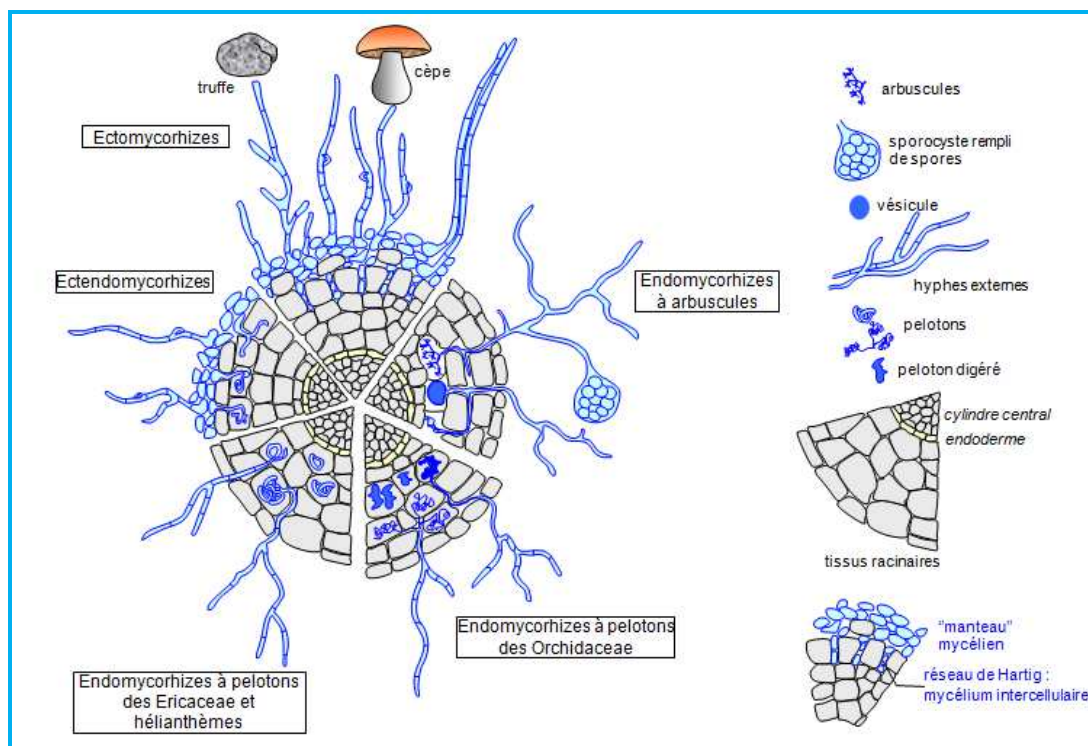


Figure 07. Principaux types mycorhiziens actuels représentés sur une coupe transversale de racine (modifié d'après de F. Le Tacon, INRA Nancy- La Recherche n° 166 mai 1985)

3.3. Cycle de vie des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

La colonisation des cellules racinaires de la plante hôte passe par plusieurs étapes (Smith & Read, 1997; Marsh & Schultz, 2001) au cours desquelles se produisent des modifications anatomiques et physiologiques importantes (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1989). L'infection de la plante hôte peut être initiée à partir de plusieurs propagules : spores, fragments racinaires mycorhizés, hyphes présents dans le sol ou même des vésicules isolées (Declerck et al., 1998; Fortin et al., 2002). On va présenter comme exemple le cycle de vie du genre *Glomus* (figure 8).

Les chlamydospores germent en donnant un promycélium (Stade 1), qui développe un appressorium lorsqu'il rencontre une racine (Stade 2). Ensuite, le champignon pénètre dans la racine en formant un mycélium secondaire et des arbuscules (Stade 3). Le mycélium progresse entre les cellules racinaires, se renfle en vésicules (stade 4). Le mycorhize ainsi formée produit un réseau extramatriciel qui est à l'origine des clamydospores lesquelles seront libérées dans le sol après maturation (Stade 5).

Lors de la sénescence de la racine ou des tissus corticaux, les vésicules sont libérées dans le sol et se développent selon un mode saprophytique (S).

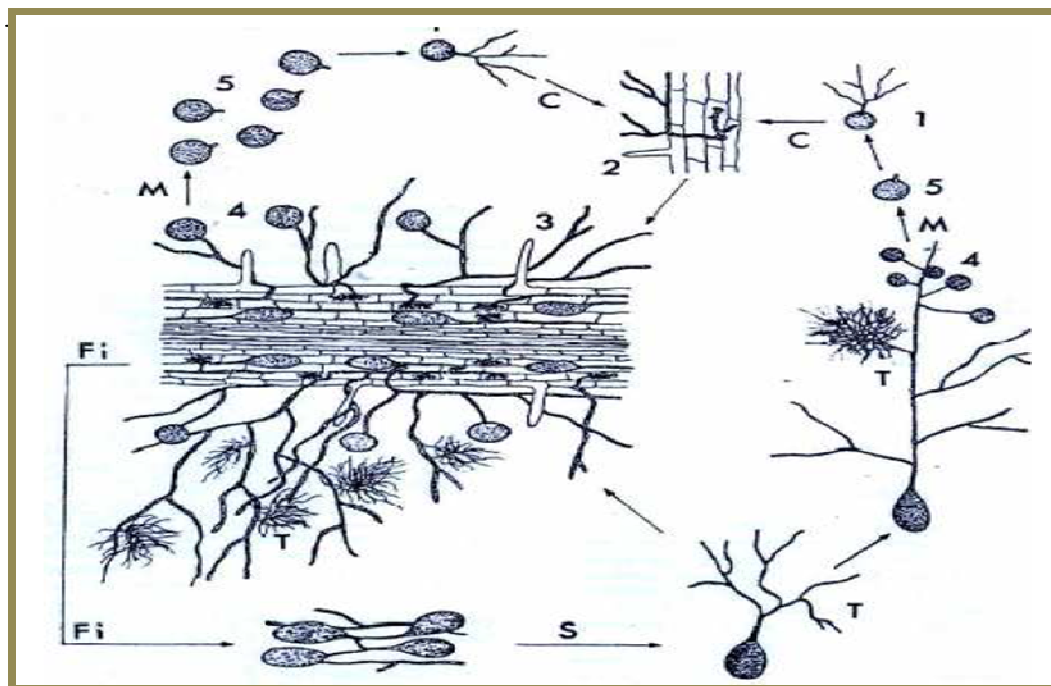


Figure 08. Cycle de développement du genre *Glomus*. (Strullu et al., 1997).

- | | |
|---|---------------------------|
| 1 : germination des spores | C : contact racinaire |
| 2 : colonisation des cellules corticales de la racine | Fi : forme intraracinaire |
| 3 : formation des arbuscules et des vésicules | M : maturation sporale |
| 4 : infection des racines néoformées | S : phase saprophytique |
| 5 : développement des spores. | |

3.4. Rôles des symbioses mycorhiziennes

L'association mycorhizienne permet à la plante une meilleure absorption des éléments minéraux, nécessaires à son développement, car le réseau mycélien extraracinaire permet d'augmenter la surface d'absorption et le volume de sol prospecté par la plante. Sylvia (1986) a estimé que la longueur d'hyphes qui se développent autour de la racine peut atteindre 200 à 1000 mètres pour un centimètre de racine.

3.4.1. Amélioration de la nutrition phosphatée

Le phosphore est considéré comme le principal facteur limitant la production agricole et forestière (Salin, 1995). Son immobilisation par le fer en milieu acide et par le calcium en milieu alcalin, limite son déplacement dans la solution du sol qui le rend difficilement accessible par la plante.

Les champignons mycorhiziens à arbuscules ont la capacité de mobiliser les formes de phosphore insolubles et non utilisables par les racines non infectées (Duponnois et al., 2005 a et b). Par ailleurs, le phosphore est stocké dans les structures fongiques sous forme de polyphosphates puis il est transféré à la plante (Gianinazzi-Pearson et Gianinazzi, 1986). La mycorhization favorise également l'activité de certaines enzymes telle que l'activité phytasique et phosphatasique ce qui augmente ainsi la disponibilité du phosphore pour la plante (Azcon & Barea 1997).



3.4.2. Amélioration de la nutrition azotée.

Plusieurs auteurs ont signalé une amélioration de la nutrition azotée par les endomycorhizes (Barea et al. 1991, Ouahmane et al., 2006 a).

Des études isotopiques ont démontré que le champignon endomycorhizien est le premier site de l'assimilation de l'azote pour la plante.

Par ailleurs, il convient de ne pas négliger le rôle indirect des endomycorhizes dans la fixation d'azote qui ne peut être efficace que si la nutrition phosphatée de la plante est satisfaisante.

3.4.3. Tolérance aux stress environnementaux.

La notion de stress se réfère à tout facteur environnemental non favorable au fonctionnement normal des organismes vivants. Les plantes mycorhizées acquièrent une protection accrue contre les stress environnementaux (Sylvia & William, 1992) notamment le déficit hydrique (Subramanian & Charest, 1997; Azcon & El Atrash, 1997; Meddich et al. 2000), le froid, les températures élevées (Paradis et al. 1995) et la pauvreté des sols enhumusés en éléments minéraux. Il se montre de ce fait bénéfiques pour les plantes des régions désertiques (Mikola, 1987).

3.4.4. Les champignons mycorhiziens sont des agents de bioprotection

Les champignons mycorhiziens ont un effet protecteur sur leurs plantes hôtes par l'amélioration de la nutrition (Jeffries, 1987 cité par Jaiti 2008), mais aussi par l'implication des interactions spécifiques. Ainsi, il a été rapporté que la mycorhization réduit le développement d'un grand nombre de maladies racinaires chez les plantes hôtes (Torres-Barragán et al., 1996 ; Gernnset al., 2001 ; Salonen et al., 2001 ; Lingua et al., 2002 ; Declerck et al., 2002 ; Pozoet al., 2002 ; Yao et al., 2002 ; Kasiandariet al., 2002 ; Gworgworet al., 2003 ; Yao et al., 2003 ; Tygesen et al., 2004 ; Selosse et al., 2004).

Cette capacité que possèdent ces microorganismes à coloniser les systèmes racinaires a été évaluée avec l'objectif de déterminer leur capacité à potentialiser les réactions de défense des jeunes plants dattier. En effet, le prétraitement des plantes par ces champignons a permis une réduction du taux de mortalité des plantes de 8 à 77% selon le champignon utilisé. De plus, tous les champignons mycorhiziens stimulent de manière significative la croissance des plantes qui ont présenté un allongement de la partie aérienne accompagné d'un accroissement de la masse fraîche et sèche des feuilles et également une augmentation du nombre de feuilles formées par plante (Jaiti et al., 2007). L'effet protecteur de ces champignons a été corrélé à l'induction amplifiée de nombreuses réactions de défense impliquant ainsi les peroxydases, les polyphénoloxydases et les composés phénoliques, notamment les dérivés hydroxycinnamiques non constitutifs (Jaiti et al., 2008).



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma



MATERIEL & METHODES

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

☒ B.P. 2202 – Route d’Imouzzer – FES

☒ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – **Fax** : 212 (35) 60 82 14



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma



FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

☒ B.P. 2202 – Route d’Imouzzer – FES

☒ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – **Fax** : 212 (35) 60 82 14

1. Présentation de la zone d'études

La zone d'étude nommée El Bouya, située à 7 km d'Erfooud sur la route d'ErfooudversTinejdad (figure 9), d'une superficie de 28 ha, est équipée d'un bassin d'irrigation d'une capacité de 40000m³ et de 2 puits d'une profondeur moyenne de 12m (l'eau se trouve à 5m seulement) et d'une station de fertigation. Cette zone d'étude est une nouvelle palmeraie plantée par des vitroplants, qui ont été donnés gratuitement aux agriculteurs. Cette nouvelle palmeraie est divisée en 5 sites, chacun est planté par une variété de vitroplants différente à savoir Najda (NJD), Mejhool (MJHL), et d'autres, de plus un site est attribué à la plantation des rejets.



Figure 9. Localisation de la zone d'étude (Al Bouya) dans la région d'Er-Rachidia

Dans ce travail on va étudier la croissance des deux variétés à savoir NJD et MJHL. Les résultats de notre diagnostic sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 4. Les pratiques culturelles dans les deux sites

	Site 1 (figure 10a)	Site 2 (figure 10b)
Type de plantation	Moderne	Moderne
Topographie	Terrain plat	Terrain plat
Texture	Argilo-limoneuse	Argilo-limoneuse
Variétés	Najda (NJD)	Mejhool (MJHL)
Nombre de plantes	400	600
L'espace de plantation	7m x 7m	7m x 7m
Le temps de plantation	Mai 2011	Mai 2011
Protection des plantes et brise-vent	Présence de brise-vent	Présence de brise-vent
Système d'irrigation	Irrigation goutte à goutte (25L/H) (figure 10c.)	Irrigation goutte à goutte (25L/H)
Amélioration du sol et fertilisation	apports du fumier (200kg/pied) lors de la plantation	apports du fumier (200kg/pied) lors de la plantation

Les produits phytosanitaires	ne sont pas utiliser au niveau de l'exploitation	ne sont pas utiliser au niveau de l'exploitation
------------------------------	--	--

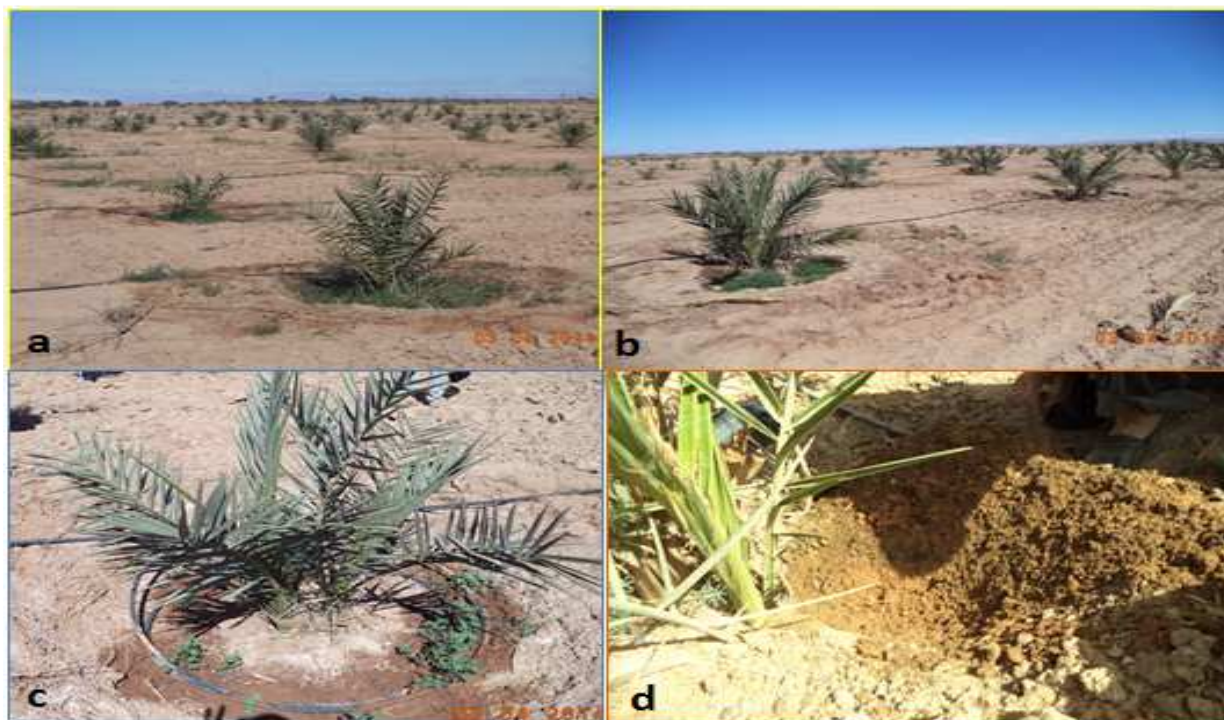
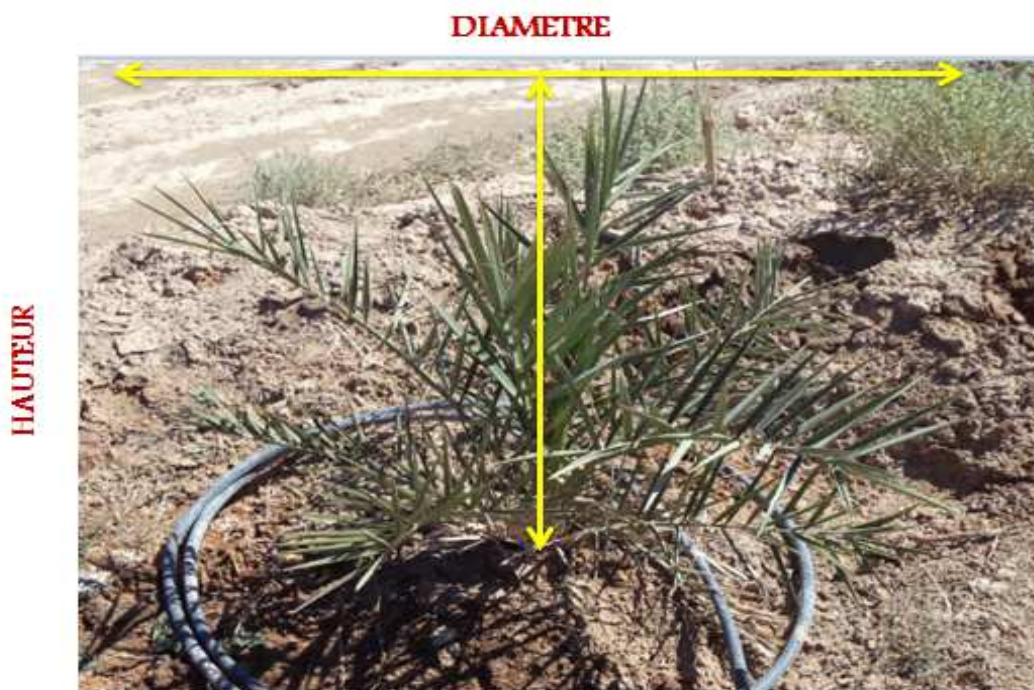


Figure 10 a : Plantation de la variété NJD, b : Plantation de la variété MJHL, c : Système d'irrigation goutte à goutte, d : Prélèvement de sol et des racines

2. Paramètres de croissances

Deux paramètres de croissance ont été étudiés à savoir la hauteur et le diamètre des plantes. On a mesuré manuellement à l'aide d'un mètre ruban rétractable la hauteur et le diamètre de la frondaison comme montre la figure

suivante :



3. Prélèvement des échantillons

La première étape a consisté au choix de plantes à étudier. Six plantes, présentant une croissance normale (hauteur variant entre 100cm et 175cm ; Diamètre allant de 110cm à 170cm) et six autres, présentant une croissance ralentie (hauteur variant entre 40cm et 90cm ; Diamètre allant de 40cm à 110cm) ont été sélectionnées pour chacune des variétés étudiées.

Les échantillons du sol ($\approx 200g$) et les racines ont été prélevés au pied de chaque vitroplant sélectionné à une distance de 50cm et une profondeur de 20 à 30 cm (figure 10d).

4. Estimation des paramètres de Mycorhization : Eclaircissement et Coloration des racines.

Pour mettre en évidence la présence de structures endomycorhiziennes, il est nécessaire d'éclaircir les racines en éliminant les contenus cellulaires puis de colorer ces racines avec un colorant spécifique comme la fuschine acide ou le bleu trypan.

4.1. Eclaircissement des racines.

La méthode de Phillips et Hayman (1970) est utilisée pour l'éclaircissement des racines, selon le protocole décrit ci-dessous :

Une solution de KOH 10% est utilisée afin de vider les cellules végétales de leur cytoplasme et de leurs pigments. Après lavage à l'eau courante, les racines sont plongées dans une solution de KOH 10% durant 60

minutes à 90°C (figure 11a), puis laissées refroidir à température ambiante. Les racines sont ensuite lavées à l'eau courante et l'ajout de quelques gouttes d'acide lactique 5% permet de neutraliser l'hydroxyde de potassium restant. Les racines sont à nouveau rincées à l'eau courante. Elles sont alors devenues blanches (figure 11b).

4.2. Coloration des racines.

La technique de coloration utilisée est modifiée à partir de celle décrite par Philips & Hayman (1970), le colorant utilisé est le bleu de trypan qui permet la coloration de la chitine des parois du champignon. Les racines éclaircies sont immergées dans une solution de Bleu de trypan acide à 0,5 %, diluée dans du lactoglycérol (1/3 d'eau, 1/3 de glycérol et 1/3 d'acide lactique) pendant 15 minutes à 90°C (figure 11c). Après un refroidissement à température ambiante, les racines sont lavées à l'eau, puis conservées dans une solution de lactoglycérol (qui est moins toxique que le lactophénol utilisé par Philips & Hayman (1970)). Les structures fongiques, telles que les arbuscules, les vésicules et le mycélium, apparaissent en bleu. Chaque système racinaire est découpé en morceaux de 1 cm. Les morceaux de racine sont montés entre lame et lamelle et observés au microscope au grossissement 40 x (figure 11d).



Figure 11 : a : Eclaircissement des racines dans une solution de KOH (10%) à 90°C. b : Blanchissement des racines. c : Coloration des racines éclaircies dans une solution de Bleu de trypan. d : Montage des morceaux de racine entre lame et lamelle.

4.3. Paramètres d'évaluation

Pour évaluer quantitativement les mycorhizes, un certain nombre de paramètres sont utilisés. Les plus importants sont :

- La fréquence de mycorhization "F" (en %) est définie comme le pourcentage de fragments racinaires mycorhizés par rapport au nombre total de fragments observés.

$$F(\%) = (n / N) \times 100$$

Avec : N = nombre total de fragments racinaires observés.

n = nombre de fragments mycorhizés.

- L'intensité globale de la mycorhization "I" (en %) correspond à la proportion de fragments racinaires observés et colonisés par le CMA.

$$I(\%) = (75 n_1) + (50 n_2) + (92 n_3) + (n_4) + (30 n_5) / N.$$

Avec : 75, 50, 92, 30, 0 = le pourcentage de mycorhization au niveau de chaque fragments

n_1, n_2, \dots, n_5 = nombre de fragments mycorhizés notés respectivement 1, 2, ..., 5

La figure suivante représente le degré d'infection mycorhizienne dans les fragments colonisés par les champignons endomycorhiziens.

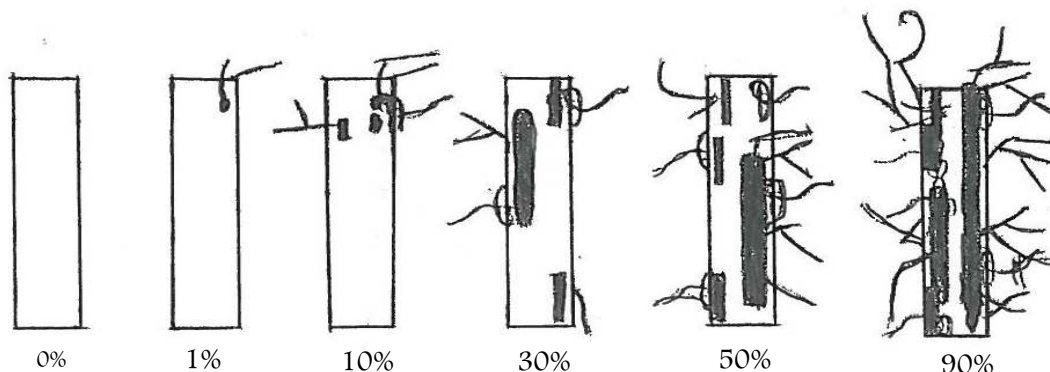


Figure 12 : Représentation schématique de degré d'infection mycorhizienne dans les fragments colonisés par les champignons endomycorhiziens

5. Extraction des spores.

Cette extraction fait appel à deux techniques. La première est basée sur le tamisage à l'eau des échantillons de sol et de leur décantation (Gerdemann & Nicholson, 1963). La deuxième consiste à concentrer les spores par une centrifugation sur une solution de saccharose (Brundrett et al., 1996).

5.1. Isolement des spores.

A partir de chaque échantillon de sol, soigneusement homogénéisé, 100 g sont prélevés et tamisés sur une série de tamis (500 μm , 300 μm , 200 μm , 100 μm , et 50 μm) sous jet d'eau (figure 13a). Le tamis est

transférédans un bēcher (200 ml) à l'aide d'une pissette d'eau. Le bēcher est rempli d'eau et au bout de 15 minutes de sédimentation, les débris végétaux flottant à la surface sont éliminés.

5.2. Concentration des spores.

La solution contenue dans le bēcher est centrifugée à 3000 rpm pendant 5 minutes dans des tubes à centrifugation (V = 50 ml). Le surnageant est éliminé puis remplacé par une solution de saccharose à 65 %. La centrifugation est de nouveau réalisée (1000 rpm) pendant 2 min.

Après centrifugation, le surnageant est filtré sous vide sur des filtres wathman (figure 13b) et les spores sont dénombrées sous une loupe binoculaire (figure 13c).



Figure 13. a : Opération de tamisage. b : Filtration de surnageant sous vide sur des filtres wathman.

c : Dénombrement des spores sous une loupe binoculaire (G x 40)

6. Recherche du *Fusarium oxysporum* sp. *albiedinis* (Foa) au niveau des sites prospectés.

6.1. Milieu de culture .

Le milieu de culture utilisé est Le PDA (Potato Dextrose Agar) qui est un milieu de culture microbiologique courant, produit à base d'infusion de pomme de terre et de dextrose, et utilisé pour évaluer la croissance mycélienne de l'agent pathogène *Foa*.

40g de milieu PDA et 50 mg/l d'antibiotique (chloramphénicol) est ajoutée à 1L d'eau distillée dans un erlenmeyer de 1000ml. Le milieu bien homogénéisé à l'aide d'un agitateur type SBS, est stérilisé dans un autoclave à 120°C pendant 20 min.

6.2. Préparation des échantillons

Les mêmes échantillons du sol ont été utilisés. Après séchage à l'air libre, les échantillons sont broyés et tamisés, à l'aide d'un tamis. Les outils utilisés (tamis, mortier ...) sont désinfectés à chaque opération.

6.3. Préparation de série de dilution

Une série de dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} est préparée sous les conditions aseptiques. La dilution 10^{-1} est obtenue en rajoutant 10g de sol à 90ml d'eau distillé stérile contenue dans un tube à essai stérile. Par la suite, 10ml de la dilution 10^{-1} est prélevé et ajouté à 90ml de l'eau stérile pour obtenir une dilution de 10^{-2} , et ainsi de suite pour l'obtention des autres dilutions.

6.4. Ensemencement du milieu

Les boîtes de pétri contenant le milieu de culture sont ensemencées par 0.5ml des dilutions préparés (4 boîtes de pétri pour chaque dilution). Une agitation manuelle circulaire est réalisée afin d'assurer une bonne répartition des échantillons à la surface du milieu (figure 14).

Les boîtes ensemencées sont incubées à l'obscurité et à une température de 26°C dans un incubateur pendant 7 jours.

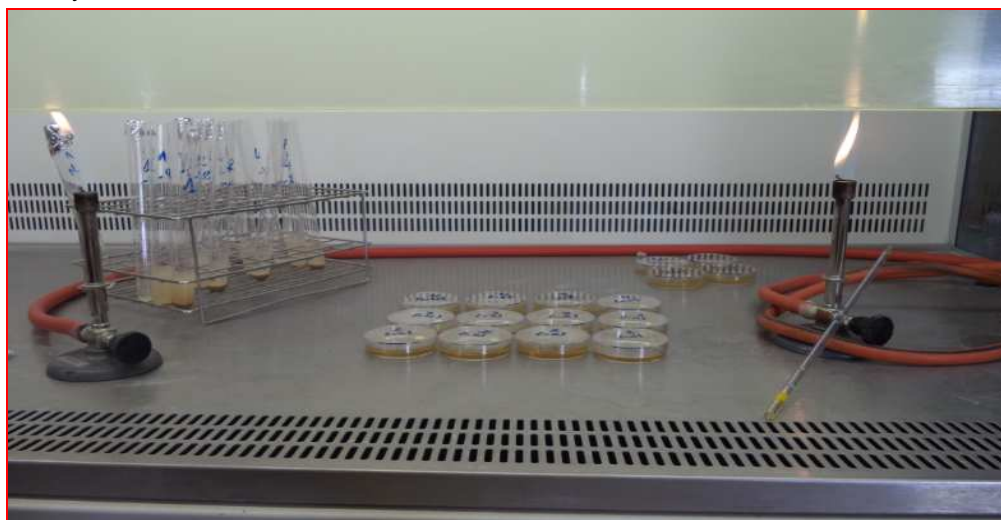


Figure 14 : Les boîtes ensemencées par les différentes dilutions préparées

7. Purification des isolats par méthode de repiquage :

Pour purifier les isolats soupçonnés de correspondre à Foa et les maintenir en culture pure, un repiquage est pratiqué sur milieu PDA. Cette technique consiste à prélever des différentes boîtes de Pétri, contenant les différentes colonies, quelques filaments mycéliens ou bien une bouture de la colonie mycélienne et à la déposer au centre des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (figure 15). Les boîtes sont ensuite mises à incuber à une température de 27°C.

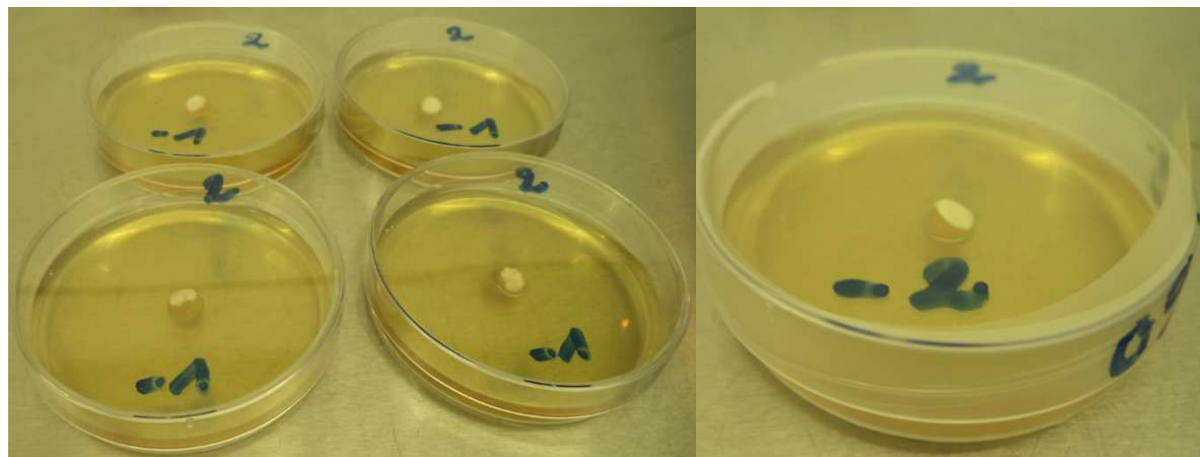


Figure 15: Purification par repiquage en milieu PDA des colonies soupçonnées de correspondre à Foa

8. Etude de l'effet des souches de champignons isolées (Foa) sur les feuilles de jeunes plants de palmier dattier.

Une suspension est préparée à partir de chaque isolat de champignons soupçonnées d'être un Foa, puis distribuée dans trois tubes stériles.

Les feuilles de jeunes plants de palmier dattier de variété sensible (variété boufgousse issue de station Expérimentale de la mise en valeur agricole d'Errachidia) sont détachées, ensuite nettoyées par l'alcool puis inoculées dans les tubes contenant la suspension à tester. Les feuilles des tests témoins sont trempées dans l'eau stérile. Les tubes sont laissés dans une salle éclairée pendant 7 jours à 10 jours (Amraoui, 2005).(figure 16).



Figure 16 Inoculation des feuilles dans la suspension des isolats à tester.



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma



RESULTATS & DISCUSSION

1. La croissance des vitroplants :

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

☒ B.P. 2202 – Route d’Imouzzer – FES

☒ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – Fax : 212 (35) 60 82 14

— Dans une palmeraie nommée El Bouya, d'une superficie de 28 ha, située à 7 km d'Erfooud sur la route d'Erfooud vers Aljorf, un agriculteur a planté en mai 2011 deux variétés de vitroplants de palmier dattier à savoir MJHL et NJD. Ces deux variétés ont été cultivées sous les mêmes conditions d'environnement et en utilisant les mêmes techniques d'irrigation et de fertilisation. La hauteur de ces vitroplants a été de 30 cm.

En avril 2014, on a mesuré la hauteur et le diamètre de ces vitroplants et on a constaté qu'il y a une différence à ce niveau. Les résultats de ces mesures sont rapportés dans la figure suivante :

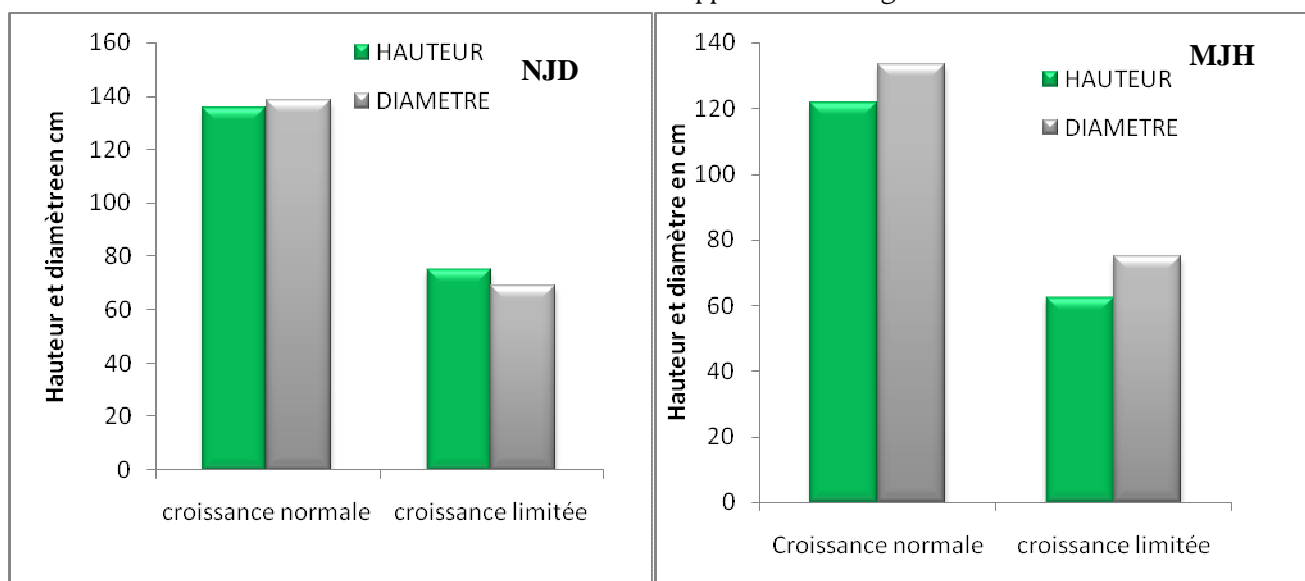


Figure 17. Hauteurs et diamètres des vitroplants des deux variétés NJD et MJHL âgés de trois ans. Les valeurs représentent une moyenne de six mesures

D'après la figure 17, on constate qu'il ya des vitroplants (pour les 2 variétés) enregistrant une hauteur comprise entre 100 et 120 cm et un diamètre de la frondaison de 120 à 130 cm. D'autres vitroplants ont une hauteur de 60 cm et un diamètre de 65 cm. Ainsi, certains vitroplants ont enregistré une croissance normale tandis que d'autres ont affiché une croissance lente. En plus, la croissance de plants NJD est en moyenne légèrement supérieure aux plants de MJHL.

Donc les vitroplants des deux variétés ne se développent pas à la même vitesse, en dépit de leur présence dans les mêmes conditions d'environnement et leur réception du même soin et d'attention.

Pour essayer de comprendre et d'expliquer cette différence de croissance, on a émis l'hypothèse d'une différence de mycorhization entre ces plantes. Pour ce, on a réalisé des prélèvements du sol et des racines et on a déterminé le nombre de spores dans le sol et le taux de mycorhization des racines.

2. Fréquence et intensité de la mycorhization

L'observation des racines, éclaircies et colorées, des plants étudiés au microscope optique a montré la présence des fragments mycorhizés avec les cellules corticales colonisées par le mycélium et les vésicules et des fragments non mycorhizés avec absence de mycélium et de vésicules. Les images suivantes (Figures 18 et 19) montrent la différence du degré de mycorhization entre les

fragments observés à partir des plants étudiés, ainsi que l'absence de mycorhization dans certains fragments.

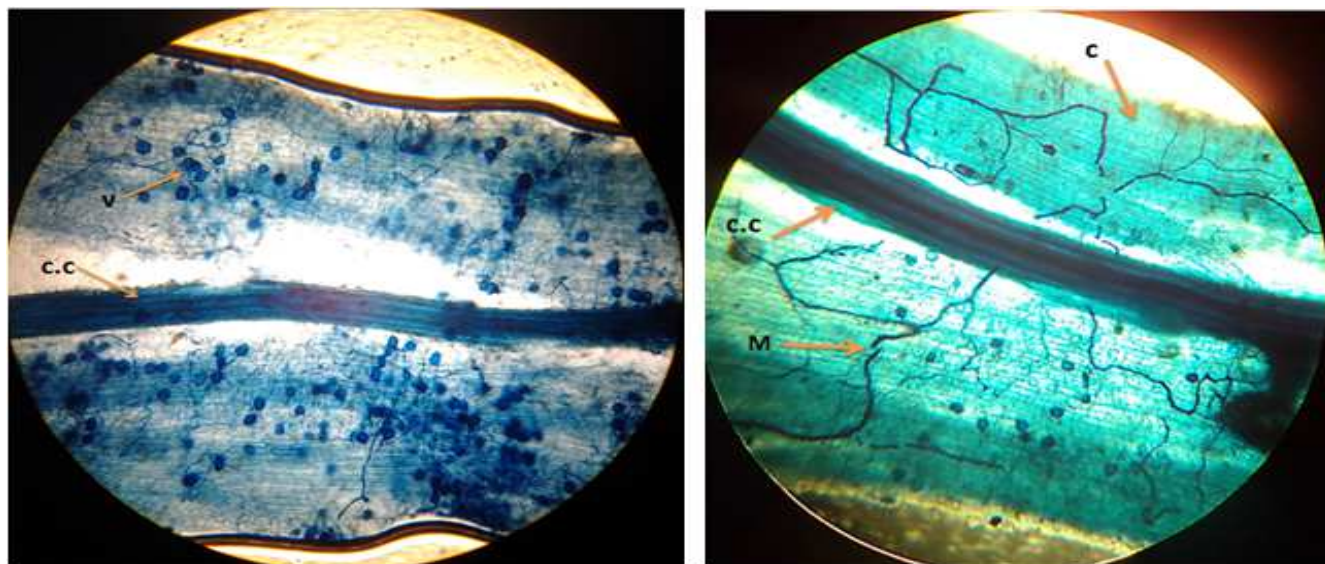


Figure 18. fragments de racines mycorhizées avec une intensité forte de la variété MJHL, observés au microscope optique (GX10). **V** : vésicules, **M** : mycélium, **C** : cellules corticales, **C.C** : cylindre centrale

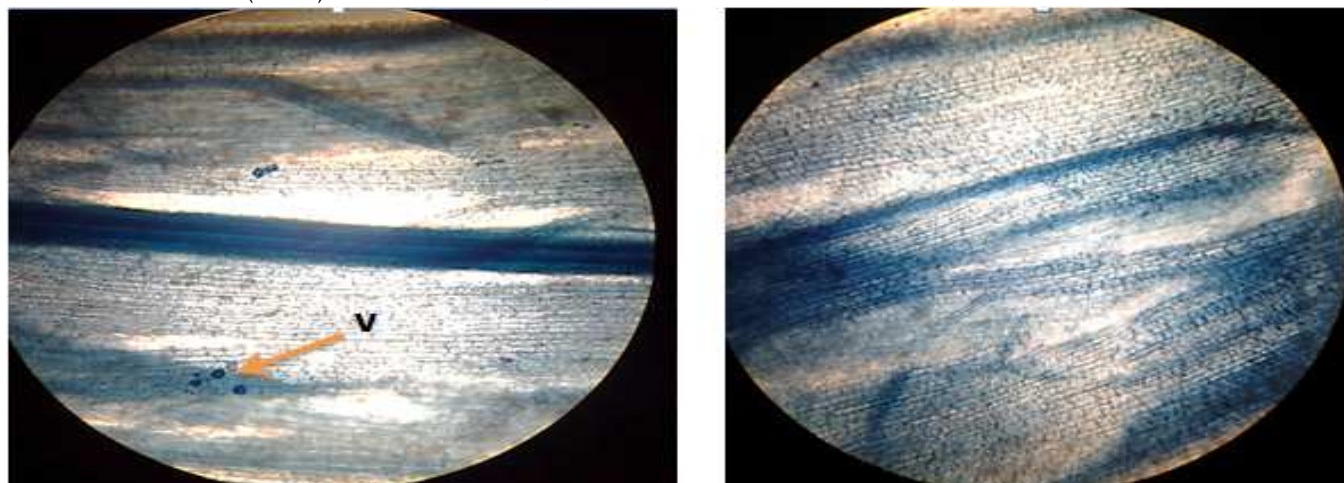


Figure 19. un fragment de racines mycorhizée avec une intensité faible, et un fragment non mycorhizée la variété NJD, observés au microscope optique (GX10). **V** : vésicules,

L'observation microscopique ($\times 10$) nous a permis d'observer les structures caractéristiques de l'endomycorhization notamment les vésicules et les arbuscules.

La figure 20 ci-dessous présente les taux de mycorhization des racines des différents plants prélevés pour les deux variétés NJD et MJHL. La fréquence de mycorhization, chez les plants de la variété MJHL, a été de l'ordre de 87% pour les plants ayant une croissance normale et de 41% pour ceux présentant une croissance limitée. Par contre, cette fréquence n'a pas dépassée les 41% chez la variété NJD même chez les plantes qui ont présenté une croissance normale avec des hauteurs et des diamètres similaires à ceux obtenus chez la variété

MJHL. Néanmoins, il faut noter que les plantes à croissance limitée présentent des fréquences de mycorhization plus faibles. Il en est de même concernant l'intensité de mycorhization

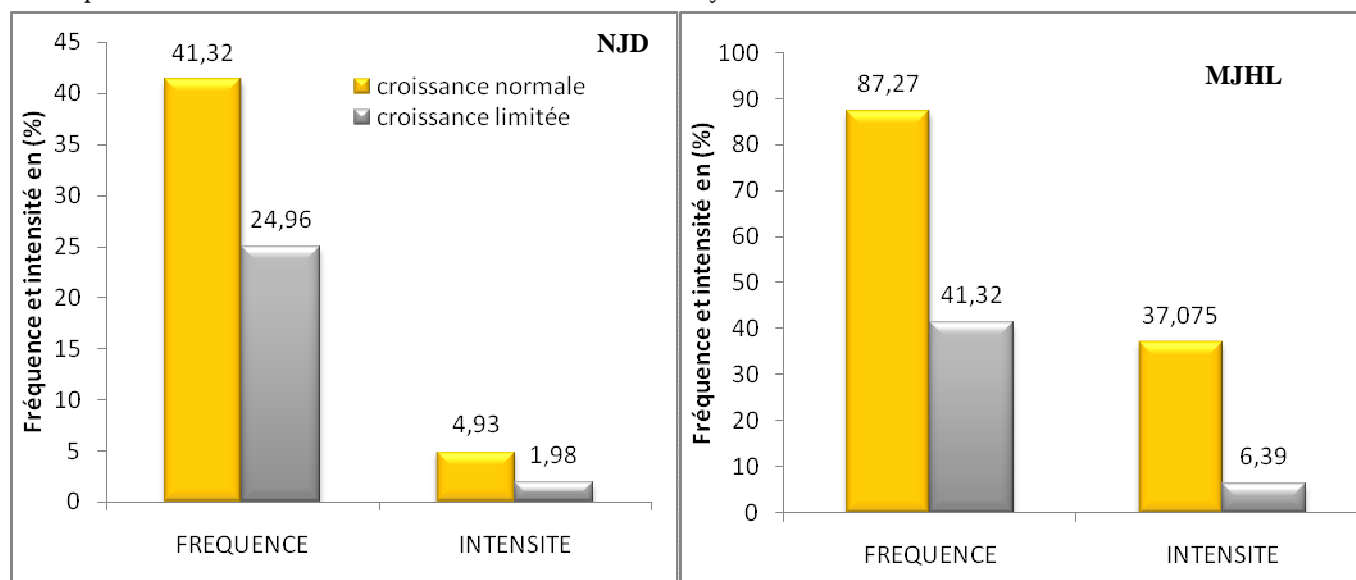


Figure 20. Fréquence et intensité de mycorhization au niveau des racines des variétés NJD et MJHL. Les valeurs représentent une moyenne de six mesures

Une intensité de mycorhization très forte indique que la surface de contact du champignon avec l'hôte végétale est importante, ce qui favorise les échanges de nutriments et de carbohydrates entre les deux partenaires de la symbiose. Tout cela permet une meilleure croissance des plants.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Jaiti et al. (2007) qui ont montré que chez le palmier dattier la mycorhization stimule la croissance des plantes qui ont présenté un allongement de la partie aérienne accompagné d'un accroissement de la masse fraîche et sèche des feuilles et également une augmentation de nombre de feuilles formées par plante. De même, Jeffries (1987) ; Hatimi et al., (1997) et Jung et al., (2012) ont stipulé que la première des réactions observées chez des plantes mycorhizées, est l'amélioration de leur croissance qui résulte d'une meilleure nutrition.

Si on compare la fréquence de la mycorhization au niveau des vitoplants à croissance normale chez les deux variétés, on constate que la mycorhization au niveau de la variété NJD ne dépasse pas 42%, tandis que la variété MJHL présente 87%. Puisque toutes les plantes étudiées sont cultivées dans les mêmes conditions édapho-climatiques, cette différence de la fréquence de mycorhization pourrait être expliquée par une différence génétique des deux variétés.

3. Etude de la population de champignons mycorhiziens à arbuscules autochtones

L'étude du statut mycorhizien de la rhizosphère de la zone prospectée montre la présence des spores mycorhiziennes dans tous les sites étudiés, avec une distinction du site MJHL. En effet, le nombre de spores avoisine 3 spores/g du sol, au niveau de la rhizosphère



des plantes de la variété MJHL qui ont une meilleure croissance. Cette valeur est presque le double de celle obtenue au niveau de la rhizosphère des plantes de la même variété (MJHL) à croissance limitée et le triple de celles obtenues au niveau du site planté par la variété NJD (Tableau 05). Ce résultat est concordant avec les résultats obtenus précédemment pour la mycorhization.

Tableau 05. nombres des spores trouvées au niveau de la rhizosphère des plants des deux variétés NJD et MJHL.

Variétés	Nombre de spores /g de sole	
	NAJDA	MEJHOUL
Croissance normale	0,87	2,91
Croissance limitée	0,83	1,33

On peut conclure que plus le nombre de spores est grand, plus la fréquence de mycorhization est importante et plus l'intensité est forte. Pour la variété NJD on constate qu'il n'y a pas une grande différence dans le nombre des spores/g de sol entre les plants.

Les valeurs obtenues sont similaires à celles relevées au niveau des nouvelles plantations de la région d'Errachidia (Aferdou) (résultats non présentés). Cependant, le nombre de spores au niveau des extensions des palmeraies reste largement inférieur à celui de la palmeraie traditionnelle. En effet, L'étude des champignons autochtones de la palmeraie ancienne de la région d'Aoufous avait montré que le sol est riche en plusieurs genres de spores endomycorhiziennes avec une forte abondance du genre *Glomus* (15 spores/g du sol) et *Sclerocystis* (9 spores/g du sol) (Meddich, 2001 ; Ben Khaled, 2003).

Dans les sols étudiés nous avons remarqué la présence de spores d'aspect, de taille et de couleur différents. Il y a des spores de petites taille (figure 21f), et de grande taille (figure 21c, 21b, 21e), des spores de couleur noire (figure 21c, 21b, 21e), ou de couleur marron claire (figure 21a, 21e, 21f) ou bien marron foncé (figure 21b, 21d) avec ou sans pédoncule. Les types de spores trouvés sont présentés dans la figure suivante 21 :

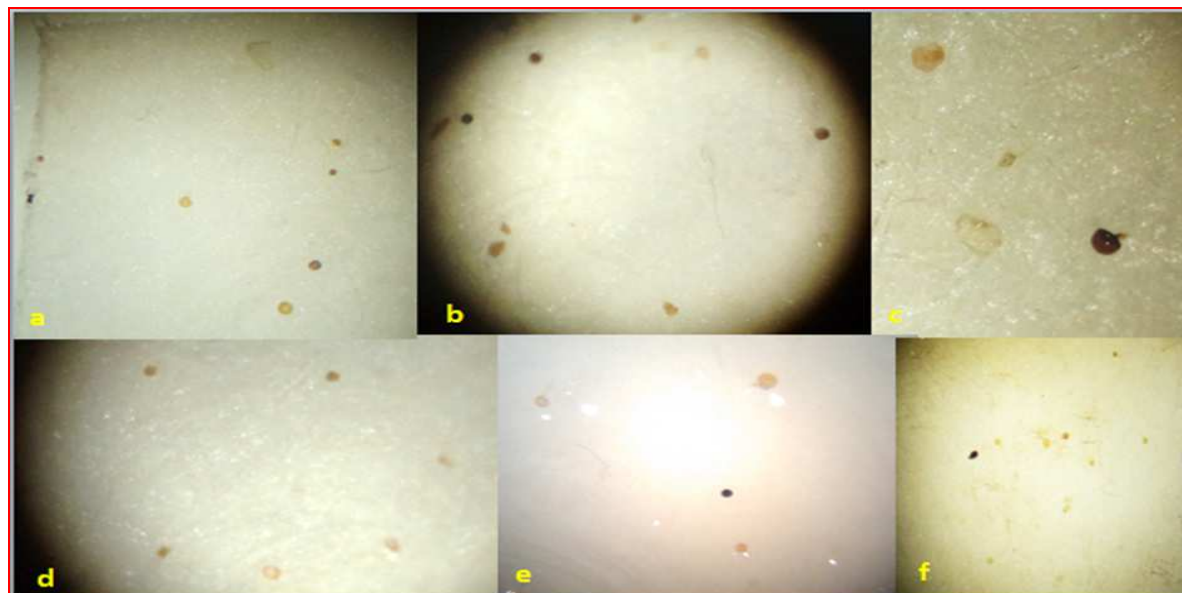


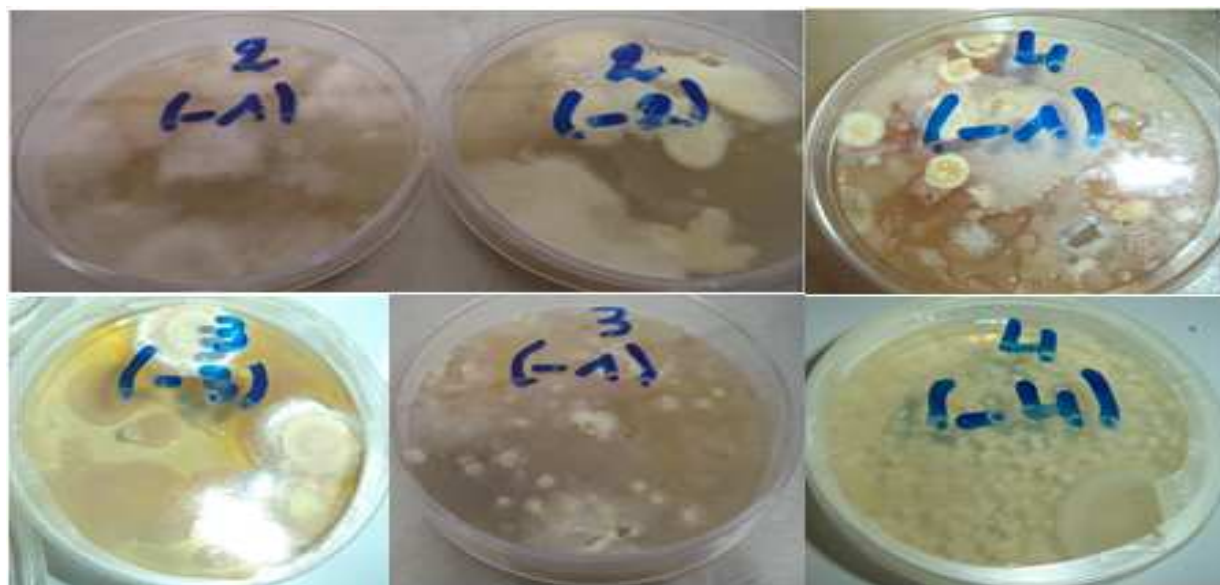
Figure 21. Observation par la loupe les différents types de spores trouvées dans le sol de la zone étudiée (GX40)

L'identification des champignons mycorhiziens, en se basant sur leurs spores, nécessite un travail consistant et des logiciels spéciaux. Pour ce, on s'est arrêté au dénombrement des spores.

4. Recherche de Foa au niveau des sites prospectés.

4.1. Observation des boîtes après incubation.

Après incubation des boîtes de cultures 7 jours à une température de 27°C, une mycoflore variée s'est développée comme le montre la figure suivante :



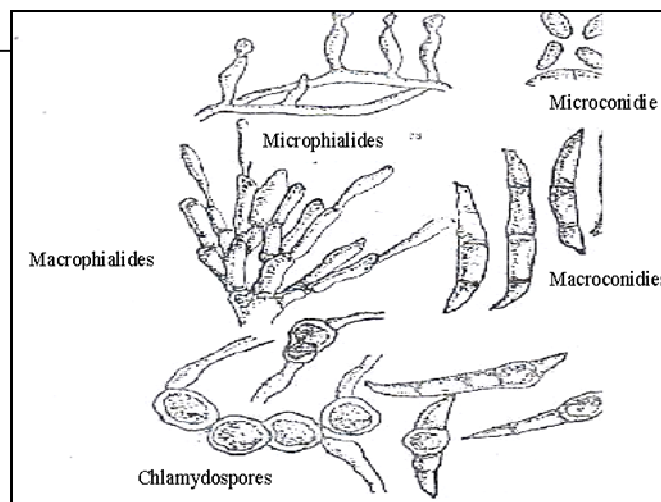


Figure 22. Développement de différentes colonies après culture sur milieu PDA

Après une observation à l'œil nu des boîtes de culture, on remarque que presque tous les échantillons soit du sol prélevé du champ de la variété MJHL (correspond aux échantillons 4 (dilution 10^{-1}) et 3 (dilution $10^{-1}, 10^{-3}$)) ou de la variété NJD (correspond à l'échantillon 2) ont donnés des colonies d'aspect, de couleur, et de taille différents. Le milieu de culture utilisé (PDA) est non sélectif, ce qui a permis le développement de toutes les spores trouvées dans l'échantillon de sol et l'apparition de colonies différentes. Généralement, pour identifier les souches de champignons qui constituent chaque colonie, il fallait réaliser une observation globale intégrant à la fois la morphologie des colonies (aspect, couleur,.....) et l'observation microscopique des spores. Dans cette étude, nous nous sommes intéressées à identifier la présence du *Foa* dans ces boîtes, en se basant sur les caractères morphologiques de ce dernier.

4.2. Etudes morphologique des colonies :

Selon Djerbi (1988), l'étude morphologique de (*Foa*) montre qu'à l'œil nu, le mycélium apparaît fin, frisé, arbustif et d'aspect grasseux, au sein duquel se forment des petits sporodochies roses saumon (figure 23). Les microconidies apparaissent au microscope optique sphériques ou allongées, légèrement courbées, généralement unicellulaires. Les macroconidies apparaissent fusoides à falciformes, pointues aux deux extrémités, ayant généralement 3 à 5 cloisons (figure 24) (Djerbi, 1988).

Figure 23. l'aspect du *Foa* sur le milieu PDA des

Après observation et examen des différentes colonies à l'œil nu, on a trouvé des colonies ayant l'aspect de *Foa* dans l'E2, l'E3, l'E4 (Figure 22), et pour s'assurer on est passé à une observation microscopique. Les résultats sont présentés dans la figure 25 :

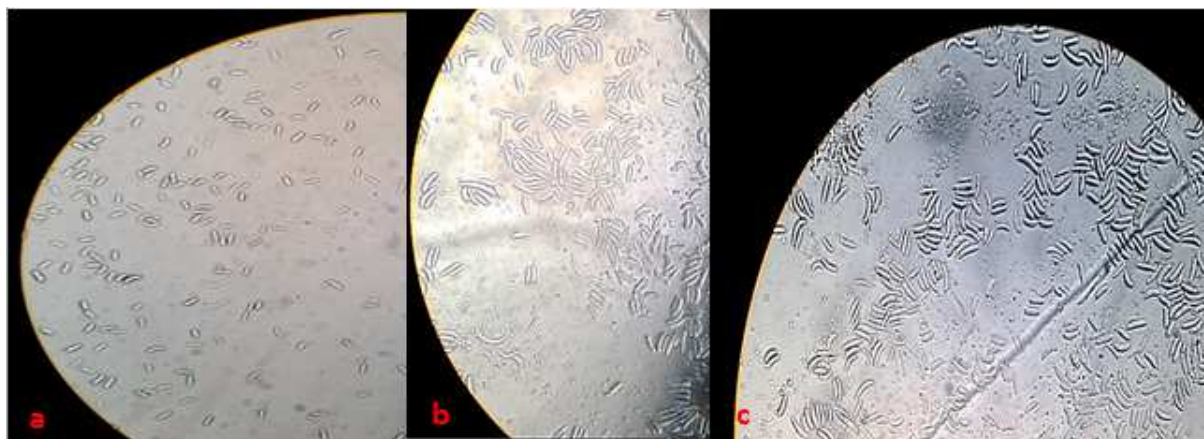


Figure 25 Observation au microscope optique des spores des colonies soupçonnées de correspondre à *Foa*

L'observation au microscope optique d'un fragment de colonies montre la présence des spores de forme et de taille différente (figure 25), de plus on a remarqué la présence des spores pluricellulaires fusiformes plus ou moins courbées dans une colonie de l'échantillon 2 du sol prélevé du champ de la variété NJD (figure 25b et 25c) ce qui ressemble aux caractères des macroconidies de *Foa*. La souche de *Foa* se différencie essentiellement par la forme des macroconidies.

Il est à noter que la souche de *Foa* peut être identifiée par méthodes moléculaires en utilisant une paire d'amorces (TL3-FOA28) mis au point par Fernandez *et al* 1998, et qui pourraient être utilisées comme sondes spécifiques pour le diagnostic de *Foa* par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Ce test permet de différencier l'agent pathogène du palmier dattier des autres *Fusarium oxysporum*, ainsi que des souches saprophytes. Les séquences d'amorces sont 3'-GGTCGTCGCGACTATACCGGC-5' (TL3) et 3'-ATCCCCGTAAAGCCC-TGAAGC-5' (FOA28).

4.3. Les isolats purifiés .

Après incubation de 7 jours on a obtenus les résultats présentés dans la figure suivante :

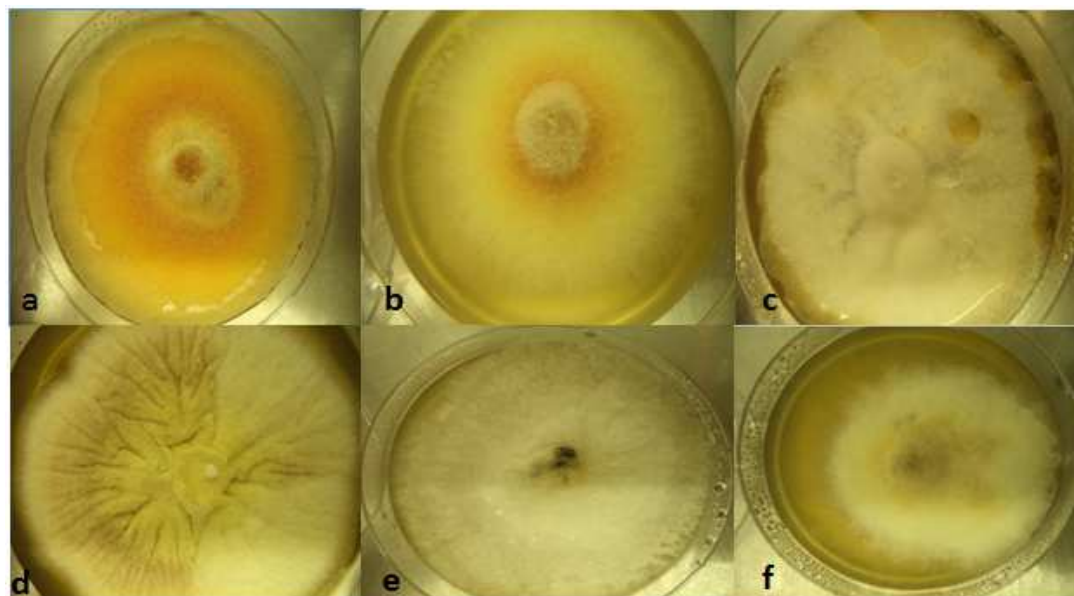


Figure 26. Morphologie des colonies d'isolats sur le milieu PDA

Premièrement, nous notons que les colonies se sont développées rapidement et ont recouvert toute la surface de la boîte, ce qui n'était pas le cas pour la première culture, dans laquelle on a eu des colonies de petites tailles. Ce qui pourrait être expliqué par la présence d'une compétition entre les colonies des champignons pour les éléments nutritifs, dans le cas de la première culture.

Les colonies obtenues sont d'aspect et de couleur différents, avec la présence des colonies ayant un aspect fin frisé (les colonies a,b,c,e de la figure 26) avec une coloration jaune rosâtre (les colonies a et b, de la figure 26) ou blanche (les colonies c et e de la figure 26), ce qui ressemble au Foa.

4.4. L'effet pathogène des isolats .

Pour s'assurer une fois pour toute qu'il s'agit de la souche Foa ,on peut tester le pouvoir pathogène de ces isolats sur des plantules de palmier dattier issues de germination de graines, en déposant un volume de 200 μ l de la suspension de 10^6 spores par ml de souches isolées sur les racines de ces plantules au stade de deux feuilles. La souche est considérée pathogène si le taux de mortalité des plantules dépasse 20% en comparaison avec un témoin inoculé par une souche connue non pathogène (Sedra&Djerbi 1985, Djerbi 1990).

En raison de contraintes de temps, nous n'avons pas pu utiliser cette méthode, nous avons alors étudié l'effet de ces isolats sur les feuilles détachées de jeunes plants de palmier dattier de la variété Boufeggous, celle-ci étant sensible à Foa.

Les résultats obtenus après 10 jours, montrent que ces isolats n'ont aucun effet sur les feuilles, car on n'a pas observé les symptômes de la maladie du bayoud à savoir l'enroulement et le dessèchement au niveau de ces feuilles (figure 28). Ces isolats de site prospecté ne sont pas donc des Foa, ainsi la zone étudiée est non infectée par le Bayoud.

Afin d'éviter la contamination de cette zone par le Bayoud, plusieurs mesures sont préconisées :

- Renforcer les actions de sensibilisation et de prévention auprès de la population oasienne.
- Encadrer et former les phoéniculteurs et les producteurs de dattes sur les moyens de dissémination de la maladie et les mesures de prévention



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma



- Eviter la plantation et la transplantation des palmiers et l'échange de tout matériel végétal (rejets, palmes...) susceptibles d'héberger le parasite et provenant de palmeraies contaminées.
- Eviter l'utilisation du matériel agricole et de l'outillage utilisés dans les vergers contaminés. En cas de nécessité, une désinfection à l'aide de l'alcool (90°) ou de l'eau de Javel est recommandée.



Figure 27: les feuilles de variété bouffgous inoculées dans des tubes contenant la suspension à tester



Figure 28: l'état des feuilles après 10 jours de l'expérience



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de notre étude montrent que les vitroplants mycorhizés présentent une croissance importante alors que ceux non mycorhizés ont une croissance faible. L'installation de mycorhizes est liée au nombre et aux types des spores présents dans la rhizosphère des vitroplants, car on a constaté que plus le nombre des spores est grand, plus la fréquence de mycorhization est forte et l'intensité est élevée. De plus, le facteur génétique joue également un rôle prépondérant dans l'établissement de la mycorhization.

Une intensité de mycorhization très forte indique que la surface de contact du champignon avec l'hôte végétale est importante, ce qui favorise les échanges de nutriments et de carbohydrates entre les deux partenaires de la symbiose. Tout cela permet une meilleure croissance des plants.

Par ailleurs, on a constaté que la zone étudiée est non infectée par l'agent pathogène du Bayoud.

A la lumière des éléments présentés ci-dessus, une énorme gamme d'axes de recherche-développement peut être ouverte dans les concepts suivants :

- ✚ Etendre les recherches sur des autres endroits et sur d'autres variétés de palmier dattier.
- ✚ Identifier les spores trouvées dans le sol des vitroplants présentant une forte intensité, en utilisant des lames permanentes sous un microscope connecté à un ordinateur avec un logiciel d'analyse des images.
- ✚ Sélectionner les meilleures souches mycorhiziennes et mettre au point des techniques adaptées à leur utilisation sur les jeunes palmiers (vitroplants en pépinière) et sur les palmiers plantés sur le terrain

Références bibliographiques :

-Abouraich E., Jaiti F. et El hadrami I., 2008. Problématique de la phoeniciculture au Maroc & présentation des acquis et des perspectives de recherche sur la maladie fatale du palmier dattier, le bayoud. Actes du 3ème séminaire international du réseau palmier dattier, 18-20 novembre 2008, Irdmontpellier-france pp : 45-54.

-Abourouh M., 1996 . Les évaluations quantitatives des mycorhizes en pépinière et sur le terrain. Zaragoza : CIHEAM Cahiers Options Méditerranéennes, n. 20

- Amraoui H 2005 fusariose vasculaire du palmier-dattier : contribution à l'étude des interactions biochimiques entre le palmier-dattier et *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* : agent causal du bayoud. Thèse de doctorat d'état, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc, 159p



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma



- Ben Khaled L., 2003. Rôles et interactions des symbiotes dans l'amélioration de la tolérance du trèfle à la salinité et leur influence sur la croissance du palmier dattier en présence d'un agent de biocontrôle (*Trichoderma harzianum* T22). Thèse de Doctorat, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia Marrakech, 121pp.
- Djerbi M., 1982. Bayoud disease in North Africa: history distribution, diagnosis and control. *Date Palm Journal* 1, 153-197.
- Djerbi M., 1983. Diseases of the date palm *Phoenix dactylifera*. FAO, Baghdad, Iraq.
- Djerbi M., 1990a. Méthodes de diagnostic du bayoud. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 20, 607-613.
- Djerbi M., 1990b. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, the causal agent of bayoud disease on the basis of vegetative compatibility. In: *Proceedings of the Eighth Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*, Agadir, Maroc, p. 533.
- Djerbi M., Aouad L., Filali H., Saaidi M., Chtioui A., Sedramy H., Allaoui M., Hamdaoui T., Oubrich M., 1986a. Preliminary results of selection of high-quality bayoud-resistant clones among natural date palm population in Morocco. In: *Proceedings of the Second Symposium on the Date Palm*, Saudi Arabia, pp. 383-399.
- Djerbi M., El Ghorfi A., El Idrissi Ammari M.A., 1985a. Etude du comportement du henné *Lawsonia inermis* et de la luzerne *Medicago sativa* et quelques espèces de palmacées vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du bayoud. *Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie* 58, 1-11.
- Djerbi M., 1988. La maladie des palmiers dattiers : Le Bayoud (15-36). *Rapport de Projet Régional de lutte contre le Bayoud (RAB/84/018)*.
- Djerbi M., 1990. Méthodes de diagnostic du bayoud du palmier dattier. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 20: 607-613.
- Djerbi M., Sedramy H., El Idrissi Ammari M.A., 1985. Caractéristiques culturelles et identification du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du Bayoud. *Ann. Inst. Nat. Rech. Agro.Tunisie*, 58 :1-8.
- El hadrami I., El hadrami A., 2008 -« breeding date palm ». In *breeding plantation tree crops: tropical species*, Jain Shri Mohan; priyadarshan, p.m. (eds.), 2008, approx. 660 p., hardcover ISBN: 978-0-387-7199-7.
- El hadrami I., El bellaj M., El Idrissi A., Jaiti F., El Jaafari S., Daayf F., 1998. Biotechnologies végétales et amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), pivot de l'agriculture oasienne marocaine. *Cahiers agricultures*, 7 : 463-468.
- El Hadrami I., 1995. L'embryogenèse somatique chez *Phoenix dactylifera* L. quelques facteurs limitants et marqueurs biochimiques. Thèse d'état. Université Cadi Ayyad. Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 227 p.
- Ferry M., 2008. Intérêts, limites et perspectives de la multiplication in vitro du dattier pour le développement de cette culture. Actes du 3ème séminaire du réseau auf-bioveg « biotechnologies du palmier dattier », Montpellier (France), 18-20 novembre 2008. Éditrice scientifique : Frédérique Aberlenc-Bertossi. Ird éditions collection colloques et séminaires Paris, 2010.



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma



- ~~-Hatimi A., Achouri M., Oihabi A., 1997. Endomycorhization des légumineuses fixatrices des dunes: croissance et nutrition phosphate. Sécheresse 8 :99-102~~
- Jaiti F., kassami M., Meddich A., El Hadrami I., 2008. Effect of arbuscularmycorrhization on the accumulation of hydroxycinnamic acid derivatives in date palm seedlings challenged with fusariumoxysporumf.sp. albedinis. Journal of phytopathology, 156 : 641-646
- Jaiti F., Meddich A , El hadrami I., 2007.Effectiveness of arbuscularmycorrhizal fungi in the protection of date palm against bayoud disease. Physiological and molecular plant pathology 71: 166-173.
- Jaiti F., 2008 .interaction palmier dattier-fusariumoxysporumalbedinis. Elicitation et études des mécanismes de défense. Biotechnologie et physiologie végétales.Thèse de Doctorat,Fac.,Sc.,Sémlalia,Maroc
- Jeffries P., 1987. Use of mycorrhizae in agriculture.Crit Rev Biotechnol 5:319-357
- Jung S C. & Martinez-Medina A., Lopez-Raez J A &Pozo M J., 2012. Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses. J ChemEcol 38: 651-664.
- Loutfi k., chlyah H., 1998 .Vegetative multiplication of datepalms from in vitro cultured'inflorescences: effect of some growthRegulator combinations andorganogenetic potential of variouscultivars.Agronomie, 18 : 573-580.
- Meddich A., 2001. Rôle des endomycorhizes VA des zones arides dans la tolérance du treffe et de l'orge austress hydrique. Thèse de Doctorat, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia Marrakech, 234pp.
- Oihabi A., 1991. Etude de l'influence des mycorhizes à V.A. sur le Bayoud et la nutrition du palmier dattier. Thèse de Doctorat, Université CadyAyad Marrakech Maroc
- Ouahmane L., 2007. Rôles de la mycorhization et des plantes associées (lavande et thym) dans la croissance du cyprès de l'atlas (cupressus atlantica g.) : conséquences sur la biodiversité rhizosphérique et la réhabilitation des milieux dégradés.Thèse de doctorat,Fac.Sc.,Sémlalia,Marrakech,Maroc
- Sedramy.H., 2003.guide du phoeniciculteur, Mise en place et conduite des vergers phoenicicoles. Edit.INRA Maroc.
- Sedramy.H., 2012.guide du phoeniciculteur, Mise en place et conduite des vergers phoenicicoles. Edit.INRA Maroc.