

UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département des sciences de la vie

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques

Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

Titre

**Multiplication in vitro du palmier dattier (Phoenix dactylifera L.)
par bourgeonnement**

Présenté par :

- SETTINI Khalid

Encadré par :

- Pr AMRANI JOUTEI Khalid**
- Pr ANJARNE Mohamed**

Soutenu le : 07 juin 2018

Devant le jury composé de :

- Mr. AMRANI JOUTEI Khalid**
- Mr. ANJARNE Mohamed**
- Mr. DERRAZ Khalid**

Année universitaire
2017/2018

Remerciement

Le présent travail n'aurait pu avoir lieu sans la contribution de plusieurs personnes. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude en remerciant tous ceux qui m'ont aidé à bien mener ce travail.

Le présent travail a été réalisé au laboratoire de biotechnologie Végétale de l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA) centre Régional de Marrakech.

C'est avec beaucoup de plaisir que J'exprime mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à mes chers professeurs *AMRANI JOUTEI Khalid et ANJARNE Mohamed* d'avoir accepté d'encadrer et de diriger mon projet de fin d'étude. Je leur remercie également pour leur disponibilité, leur gentillesse, leur patience et pour le temps et l'intérêt qu'elles ont consacré pour ce travail.

Je tiens à remercier Mr le Directeur de l'institut national de recherche agronomique de m'avoir accueilli comme stagiaire au sein du laboratoire national de culture des tissus du palmier dattier à Marrakech.

Je veux adresser ma gratitude la plus profonde à tous ceux qui m'ont aidé à l'accomplissement de ce travail. Parmi eux je veux remercier toute l'équipe du laboratoire de biotechnologie végétale du CRRA de Marrakech où j'ai passé des bons moments de travail et d'amitié partagés.

Mes remerciements vont également à Mr DERRAZ Khalid, Mr AMRANI JOUTEI Khalid et Mr ANJARNE Mohamed d'avoir accepté de participer aux membres du jury, qu'ils trouvent ici l'expression de mes plus sincères remerciements et toute ma gratitude.

Finalement, j'adresse des sincères remerciements à ma famille et tous mes ami(e)s et mes collègues pour leur amitié, encouragement et leur soutien précieux.

Sommaire

Introduction.....	6
Etude bibliographique.....	8
I- Le palmier dattier.....	8
1- Taxonomie.....	8
2- Description botanique.....	8
3- Importance et répartition au Maroc.....	9
II- Les techniques conventionnelles de multiplication du palmier.....	10
1- Semis des graines.....	10
2- Multiplication par rejets.....	11
III- La culture in vitro du palmier.....	11
1- Avantages.....	11
2- Méthodes de multiplication in vitro du palmier.....	12
a) Embryogenèse somatique.....	12
b) Organogenèse.....	12
3- Les Facteurs de maîtrise.....	14
a) Milieu de culture.....	14
b) Environnement.....	14
c) Stérilité.....	15
IV- Problème de la phoeniciculture au Maroc.....	15
1- La maladie du Bayoud.....	15
2- La sécheresse	15
3- L'invasion du sable.....	15
4- Désintérêt des phoeniciculteurs.....	15
Matériel et méthodes.....	17
I- Matériel végétale.....	17
II- Milieu de culture.....	17
1- Préparation des solutions mères	17
a) Les macroéléments.....	17
b) Les microéléments	17
c) Le fer.....	18
d) Les vitamines.....	18
2- Préparation du milieu.....	18
III- Repiquage et culture des souches.....	19
IV- Observations et critères d'évaluation.....	20
1- Taux de multiplication	20
2- Nombre et longueur des feuilles	21
3- Indice de verdissement.....	21
4- Nombre et longueur des racines.....	21
5- Indice de la taille des bourgeons.....	21
Résultats et discussion.....	23
I- Résultats.....	23

1- Taux de multiplication.....	23
2- Nombre et longueur des feuilles.....	23
3- Indice de verdissement.....	24
4- Nombre et longueur des racines.....	25
5- Indice de la taille des bourgeons.....	26
II- Discussion.....	26
Conclusion.....	27
Références bibliographiques.....	28

Liste d'abréviations

- **MS : Murashige & Skoog**
- **INRA : Institut Nationale de la Recherche Agronomique**
- **KIN : Kinétine**
- **IPA : IsoPentenylAdénoside**
- **AIA : Acide Indole 3-Acétique**
- **ANA : Acide Naphtalène Acétique**
- **EDTA : EtylèneDiamineTétraAcétique**

Résumé

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) joue un rôle important sur la scène socio-économique dans le Maroc. Cependant la culture du palmier dattier est actuellement confrontée à plusieurs contraintes qui limitent la propagation de cette plante à grande échelle. C'est pour cela que nous avons faits cette recherche. Dans cette étude, l'objectif était de comparer l'action de différentes concentrations des régulateurs de croissance sur la multiplication des souches de cv. Boufeggous, dans le but d'améliorer la production de cette plante.

Les résultats de cette étude montrent que le milieu de culture contenant les concentrations hormonales suivantes : 1ml/L de KIN ; 0.75ml/L d'IPA ; 0.5ml/L d'AIA et 0.05ml/L d'ANA, a donné les meilleurs résultats avec des bourgeons de grand taille, des feuilles et des racines multiples et de grands tailles et un taux de multiplication et verdissement élevée par rapport au milieu témoin sans hormones qui a donné un taux de multiplication élevée mais avec peu des bourgeons, feuilles et racines qui sont de petite taille.

Mots clés : *Phoenix dactylifera L., Propagation, régulateurs de croissance, cv. Boufeggous, Milieu de culture, hormones.*

Introduction

La production de palmier dattier « *Phoenix dactylifera* L. » a subi un changement radical au cours des centaines d'années dernières. Lors du 19^{ème} siècle, la production nationale des dattes plaçait le Maroc au troisième rang mondiale. Ceci s'explique par sa culture qui occupait des superficies importantes avec plus de 15 millions de pieds. Mais à partir du 20^{ème} siècle, le palmier dattier occupait une superficie de 48 000 ha pour un effectif de 4,743 millions de pieds (El Hadrami et El Hadrami, 2008 ; Anonyme, 1991) avec une production annuelle des dattes qui est estimée en moyenne à 72 000 tonnes et un rendement moyen de l'ordre de 20 kg/pied. Par comparaison, dans les pays où la phoeniciculture moderne est pratiquée (pollinisation mécanisée, irrigation localisée et fumigation intensive), un pied de palmier dattier peut produire jusqu'à 200 kg/an (El Hadrami *et al.*, 1998). Cette régression est due essentiellement à :

- La maladie du Bayoud qui est à l'origine de la destruction de plus des deux tiers du patrimoine phoénicoles (Fernandez *et al.*, 1995)
- A l'effet de sécheresses prolongées qui ont entraîné le dessèchement partiel de plus de 500 000 palmiers. Durant les années 80, près de 350 000 palmiers ont été desséchés dans les seules palmeraies de Ouarzazate et d'Errachidiya (Haddouch, 1993).
- Au problème de l'ensablement des palmeraies.
- Enfin, au désintérêt des populations et à leur reconversion vers des secteurs plus rémunérateurs, laissant le palmier à son propre sort sans soins particuliers à l'exception des irrigations, des pollinisations et de la récolte (El Hadrami, 1998).

La méthode de multiplication sexuée reste non fiable, et la méthode végétative asexuée nécessite un nombre important de rejets. En effet, la production naturelle de rejets par un seul palmier ne dépasse pas 20 à 40 rejets dans toute sa vie. Ainsi, cette technique traditionnelle reste lente et incapable de répondre aux besoins importants exigés pour l'extension rapide des palmeraies (El Hadrami *et al.*, 1998).

C'est pour cela les phoeniciculteurs ont tournés vers les techniques de multiplication *in vitro* qui est une technique rapide et permet d'obtenir un nombre élevé de clones indemnes de *Fusarium*, permettant d'éviter la dispersion de la maladie du Bayoud.

Il existe plusieurs méthodes de multiplication in vitro mais au Maroc, on note l'utilisation de la technique d'organogenèse qui, en principe, permet une certaine authenticité variétale. Ainsi, environ 150 000 vitroplants issus d'une vingtaine de génotypes marocains ont été produits via cette méthode, ce qui représente moins de 15 à 20 % des besoins au Maroc (El Hadrami *et al.*, 1998).

L'objectif de ce travail est de comparer l'action de 4 différents milieux de culture avec des différentes balances hormonales sur les souches de la variété Boufeggous afin d'optimiser le rendement de la plante.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Le palmier dattier :

1- Taxonomie :

Le palmier dattier a été dénommé « *Phoenix dactylifera* » pour la première fois par Linné en 1734. Cette dénomination dérive de *Phoenix* (phénicien), car c'était les phéniciens qui ont diffusé cette plante. Le terme spécifique est composé de *dactylus* indiquant dattes dérivant du grec *daktulos*, signifiant doigt, en raison de la forme du fruit (Munier, 1973). Sa position systématique était donnée comme suit :

- **Embranchement** : Angiosperme
- **Classe** : Monocotylédone
- **Ordre** : Palmales
- **Famille** : Palmacées (*Arecaceae*)
- **Sous-famille** : *Coryphoïdées*
- **Tribu** : *Phoénicée*
- **Genre** : *Phoenix*

2- Description botanique :

Le palmier dattier est caractérisé par un stipe très élancé, pouvant atteindre 30 m de hauteur. Les feuilles, réunies en un nombre de 20 à 30 au maximum forment une couronne apicale clairsemée. Elles sont pennées et peuvent atteindre 6 m de longueur. L'espèce est dioïque et porte des inflorescences mâles ou femelles, appelées spadices, enveloppées d'une très grande bractée membraneuse, la spathe. Les fleurs femelles ont trois carpelles indépendants, dont un seul se développe pour former la datte. Les fruits (les dattes) groupées en régimes, sont des baies oblongues, de couleur orange-foncé à maturité, longues jusqu'à 5 cm chez les variétés cultivées, contenant une pulpe sucrée et une graine de consistance ligneuse (Zouine. 2007).

Le dattier est une espèce xérophile et adaptée aux conditions des zones arides et semi-arides. Il pousse sur des sols neutres, profonds, bien drainés, assez riches ou susceptible d'être fertilisés. L'intensité maximale de végétation est atteinte à des températures de 30 à 40°C. Comme tous les arbres fruitiers, le palmier dattier possède un cycle biologique au cours duquel il passe par une période de repos végétatif en hiver où la croissance de tous les organes

est bloquée à l'exception des inflorescences qui se trouvent en cours de formation. La reprise de végétation a lieu au printemps lorsque la température du sol dépasse 12°C. La période de maturation des fruits correspond aux mois les plus chauds de l'année (Zouine. 2007).

3- Importance et répartition au Maroc :

La culture du palmier dattier est pratiquée dans plus de 30 pays différents avec une superficie qui est estimée à 1 204 971 ha dont 73,71% soit 814 533 ha dans les pays arabes (Sedra, 2003). Ces effectifs ont produit 8 460 443 tonnes de dattes en 2016 au niveau mondiale dont 44,7% est produite par l'Afrique où se trouve le Maroc (FAO, 2016). Les statistiques actuelles indiquent que l'Egypte occupe la première place en production des dattes suivi de Iran puis l'Algérie. Actuellement le Maroc se trouve au 13^{ème} rang mondiale et 11^{ème} rang arabe (FAO, 2016).

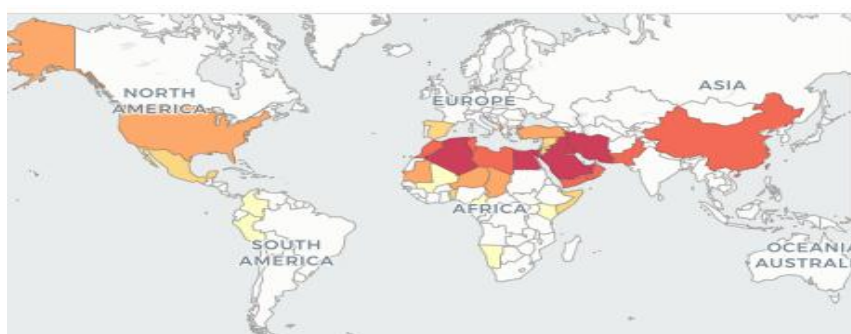


Figure 1 : Les pays producteurs des dattes au niveau du monde

Tableau 1 : Classement des pays producteur des dattes (Unité tonne)

Class ^o	Pays	Valeur
1	Egypte	1694813
2	Iran	1065704
3	Algérie	1029596
4	Arabie saoudite	964536
5	Emirats arabes unis	671891
6	Iraq	615211
7	Pakistan	494601
8	Soudan	439120
9	Oman	348642
10	Tunisie	241000
11	Libye	173546
12	Chine	159144
13	Maroc	125329
14	Koweït	98366
15	Yémen	57726

Sur une surface oasienne globale estimée à 84 500 ha en 1948, la palmeraie marocaine s'étalait en 1994 sur une superficie de 44 450 ha occupée par un effectif total de 4,425 millions de palmiers (Anonyme, 1994). Cet effectif a été auparavant estimé à 4,743 millions palmiers (Anonyme, 1991). En 2003, la surface occupée par le palmier a augmenté de 3550 ha, suite à l'installation de nouvelles plantations en marges des palmeraies anciennes, passant ainsi à 48 000 ha (Sedra, 2003).

Les principales palmeraies se présentent sous forme de longs cordons qui longent l'Oued Draâ et l'Oued Ziz. (El Hadrami, 1998). L'importance du palmier par province montre que les provinces de Ouarzazate, d'Errachidiya et de Tata sont les plus importantes et constituent de ce fait, les plus grandes régions phoénicoles. En effet, la province de Ouarzazate est en tête avec 40% de l'effectif totale de palmiers, suivie des provinces d'Errachidiya avec 28,24% et de Tata avec 19,72%. Les autres provinces ne représentent que moins de 4% de l'effectif totale de palmiers (Sedra, 2003)

Tableau 2 : Importance par province du palmier dattier au Maroc (Anonyme, 1994)

Province	Nombre de pieds	Pourcentage %
Ouarzazate	1 873 000	40,67
Errachidiya	1 250 000	28,24
Tata	800 000	19,72
Tiznit	139 140	3,14
Guelmine	138 000	3,12
Figuig	125 500	2,83
Marrakech	100 000	2,26
Total	4 425 640	

II- Les techniques conventionnelles de multiplication du palmier :

On connaît deux techniques de multiplication conventionnelles qui sont :

1- Semis des graines :

La méthode de semis par graine est le moyen le plus ancien pour la propagation du palmier dattier. Son principal avantage est la simplicité de son application et permet d'élargir la diversité génétique du palmier. Par conséquent, cette technique se révèle très pratique dans les programmes de reproduction et de sélection parmi la descendance ce qui peut conduire au développement de meilleurs palmiers à traits intéressants (Abahmane, 2011). Dans certains pays, le nombre de palmiers d'origine hybride est très important : l'Egypte par exemple contient 3.5 millions de pieds. Le Maroc lui contient plus que 2 millions de pieds. Dans

d'autre pays (l'Emirat arabe unis, Kuwait, Pakistan, Yémen, etc...), la propagation par graine est toujours pratiquée (Ferry *et al*, 1998). Cependant, cette méthode ne peut pas être utilisée pour propager des palmiers portant des caractères d'élite ou des génotypes sélectionnés puisque la descendance sera très variable à cause du caractère hétérozygote élevé du palmier dattier (Tisserat 1982). Plus que ça, la moitié de la descendance sera composée des pieds mâles qui ne peuvent pas être distingués avant la floraison. Les plantes femelles des graines dérivées vont produire une variété de fruits qui sont généralement de qualité inférieure (Abahmane, 2011).

2- Multiplication par rejets :

C'est une multiplication végétative du palmier, qui permet une reproduction pratiquement conforme et une transmission génétique fidèle des caractères des parents (Sedra, 2003), c'est la technique de multiplication végétative la plus conventionnelle. Cependant, il y a des contraintes qui limitent son utilisation à grande échelle, un seul arbre ne peut produire dans toute sa vie plus de 40 rejets d'une façon irrégulière qui dépend de l'environnement, de la variété et de l'âge de la plante. Cette méthode est aussi très lente, il nous faut au moins 30 années pour obtenir quelques milliers de palmiers à partir d'une plantation de rejets, et en plus que ça les rejets constituent un moyen de dissémination de la maladie du Bayoud et d'autres maladies infectieuses (El Hadrami *et al.*, 1998). Un autre inconvénient est que les rejets sont difficile à arracher et les taux de reprise et de réussite de ses plantations est généralement inférieure à 60% (Abahmane, 2011).

III- La culture in vitro du palmier :

Etant donné que les méthodes conventionnelles de propagation sont limitées en terme de fournir un nombre insuffisant de plantes de palmier dattier, la culture in vitro a fourni une alternative prometteuse pour répondre à la demande croissante de plantes au cours des dernières décennies. Elle permet la production rapide de plusieurs milliers de vitroplants conformes aux plantes mères (Sedra, 2003).

1- Avantages :

Cette technologie est indispensable pour :

- Multiplier en masse des plants des variétés désirées
- Multiplier les clones sélectionnés de hautes performances agronomiques qui ne sont représentés que par quelques spécimens, en vue de repeupler les palmeraies dévastées par le Bayoud dans un délai raisonnable, de restructurer les palmeraies traditionnelles et enfin de créer de nouvelles oasis.

- Sauvegarder les variétés ou cultivars rares menacés d'extinction à cause de facteurs d'érosion génétique d'origine abiotique ou biotique. Il en est de même pour les individus sélectionnés de bonne qualité dattière mais extrêmement sensibles au Bayoud.
- Produire des plants indemnes de maladies.

2- Méthodes de culture in vitro du palmier :

Deux principales méthodes de culture in vitro sont connues et les plus utilisées dans le monde :

a) L'embryogenèse somatique :

L'embryogenèse somatique (encore appelée embryogenèse asexuée) consiste à obtenir des embryons non zygotiques à partir de différents tissus de la plante mère. Ces embryons peuvent se développer à partir de cellules somatiques ou germinales placées sur des milieux de culture appropriés. De tels embryons se développent directement à partir de cellules méristématiques des explants ou indirectement à partir de cals. Les embryons somatiques produits sont, en principe, génétiquement identiques et capables de produire des clones à partir de génotypes donnés. Les explants utilisés, comme pour la technique d'organogenèse, proviennent de la base de jeunes feuilles de cœurs de rejets, des inflorescences...etc. (El Hadrami et Baaziz, 1995; Loutfi, 1999).

L'embryogenèse somatique *in vitro* est obtenue soit par voie directe, sans formation de cals, soit par voie indirecte, après formation d'un cal.

L'inconvénient principal est que les doses élevées des hormones dans le milieu rendent les plantules enclines à la mutation qui produit des variations somaclonales, et qui ne sont manifestés qu'après quelques années de plantation en champ. Cependant, ces variations somaclonales produites par l'embryogenèse somatique, représentent une diversité génétique induite qui peut avoir des traits génétiques souhaitables pour la sélection de nouveaux clones (Edwin F *et al.*, 2008)

b) Organogenèse :

La technique d'organogenèse est la base fondamentale de la multiplication végétative, laquelle s'appuie toujours sur la formation de nouveaux méristèmes. En partant d'un explant, elle aboutit à la néoformation d'un nouvel individu par l'élaboration de bourgeons apicaux (caulogenèse) et de racines (rhizogenèse). Ces bourgeons néoformés in-vitro peuvent apparaître sur l'explant initial (organogenèse directe) ou sur un cal (organogenèse indirecte). Les bourgeons peuvent être considérés comme un cas particulier de bourgeons adventifs. Ils

sont induits sur n'importe quel type d'organe ou de tissu y compris sur ceux qui ne les produisent pas dans les conditions naturelles. En outre, cette technique présente un maximum de conformité et d'homogénéité génétique des vitroplants produits puisque les bourgeons sont directement initiés à partir du tissu mère (Abahmane, 2011).

A l'état actuel, cette technique est l'unique voie de micropropagation utilisée pour la multiplication à grande échelle du palmier dattier au Maroc (El Hadrami, 1998). Les étapes de la technique d'organogénèses sont :

i) Initiation de bourgeons :

L'initiation de tissus organogènes se fait à partir de sites potentiellement méristématiques préexistants au niveau de l'épiderme interne de la base des jeunes feuilles du bourgeon terminal ou du cœur du rejet (Aissam, 1990) ; ces cellules préméristématiques commencent à fonctionner par suite de la levée d'inhibition exercée par le bourgeon axillaire ; cette levée peut être mécanique par élimination du bourgeon ou chimique sous l'action des hormones à dominance auxinique. Cette phase se déroule à l'obscurité et aboutit à la formation de souches réactives.

ii) Multiplication de bourgeons :

La multiplication des bourgeons se fait autant de fois qu'il faut pour atteindre le nombre de bourgeons désirés. Elle s'effectue à la lumière dans un milieu où la teneur en Cytokinines est élevée.

iii) Elongation de bourgeons :

Cette étape consiste à cultiver les plantules dans un milieu aillant des concentrations en hormones (Cytokinines) qui favorisent leur allongement.

iv) Enracinement de plantules :

Pour obtenir des plantes complètes, on transfère les tiges sur un milieu frais habituellement enrichi en auxines, c'est le principe du bouturage. Des cellules de la tige vont former un méristème qui va développer des racines.

v) Acclimatation de plantules :

C'est l'étape la plus importante, elle consiste à transférer les plantules sous serre pour s'adapter à la vie à l'air libre. Chaque échec à cette étape veut dire échec à tous les stades précédents, et perte du temps, des efforts, et des coûts.

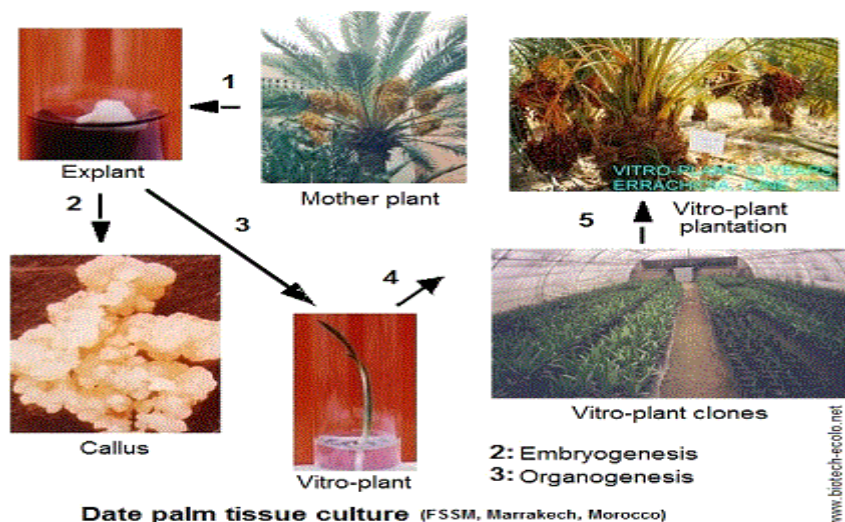


Figure 2 : étapes de la culture in vitro par la méthode d'organogenèse et l'embryogenèse somatiques

3- Les facteurs de maitrise :

a) Milieu de culture :

Généralement, un milieu basal de sels inorganiques de Murashige et Skoog (1962) (MS) est utilisé pour la micropropagation du palmier dattier. Basé sur la multiplication stade, il peut être utilisé à pleine force ou dilué habituellement à la moitié de la force en raison de son niveau élevé de sels principalement d'ammonium (Abahmane, 2011). Un milieu de culture est constitué principalement d'eau, de sels minéraux (macro-éléments, microéléments, fer), d'éléments organiques (vitamines, sucre, parfois des acides aminés, etc.), de régulateurs de croissance. Cette solution aqueuse est souvent solidifiée au moyen d'agar. L'agar est facilement dissous à 100°C, on doit donc atteindre le point d'ébullition afin de l'incorporer au milieu de manière uniforme.

Les milieux de culture sont distribués dans des tubes à essai (150 × 25 mm) à 15-20 ml ou bocal de culture (flacons de 250 ml, bocal de 170 ml ou contenants magenta) à 50 ml.

Les milieux sont ensuite autoclavés à 121 ° C et sous une pression de 1 bar pendant 15 à 30 minutes en fonction du volume du milieu de culture dans les récipients (Abahmane, 2011).

b) L'environnement :

Après transfert dans des milieux de culture, les explants sont incubés pendant 3-6 mois dans l'obscurité de manière à favoriser l'initiation des bourgeons et à empêcher l'oxydation des composés phénoliques qui se produit dans des conditions de lumière. Les explants doivent être transférés vers de nouveaux milieux chaque mois. Après l'initiation, les pousses sont transférées dans des conditions éclairées avec une photopériode de 16 h. La température de

l'air dans la chambre de croissance est maintenue à 27 ± 1 ° C pendant la période éclairée et 22 ± 1 ° C pendant la période sombre (Anjarne *et al.*, 2005 ; abahmane *et al.*, 1999).

c) Les conditions aseptiques :

Comme les milieux sont riches et les conditions de cultures chaudes et humides, toutes les conditions d'un développement bactérien ou fongique sont réunies. Les causes d'infection sont nombreuses. Il faut donc manipuler dans des conditions d'asepsie rigoureuses :

- ❖ Matériels passés à l'alcool et flambés,
- ❖ Désinfection des plantes à la Javel puis rinçage à l'eau distillée avant l'extraction de l'explant.
- ❖ Travailler sous la hotte

IV- Problèmes de la phoeniciculture au Maroc :

Le Maroc qui était au 19^{ème} siècle, exportateur de dattes de bonne qualité commerciale vers l'Europe, devient importateur au cours du 20^{ème} siècle (Sedra, 2003). Les principales causes de cette dégradation sont :

1- La maladie du Bayoud :

Le Bayoud sévit uniquement en Afrique du Nord, dans toutes les grandes palmeraies du Maroc (sauf Ouarzazate et Marrakech). La maladie est originaire de la vallée du Draa, au Maroc, où elle fut observée pour la première fois vers 1870. Elle s'est ensuite propagée dans l'ensemble des palmeraies marocaines. Les pertes ont été estimées à plus de 10 millions de palmiers détruits, soit les deux tiers des arbres productifs. De fait, le Bayoud a été, et demeure, la maladie la plus destructrice dans le Maroc (Fernandez *et al.*, 1995).

2- La sécheresse :

L'effet des sécheresses prolongées qui ont occasionné des dégâts sur les palmiers dus au dessèchement. Au début des années 80, près de 350 000 palmiers ont subi un dessèchement néfaste dans les palmeraies du Draâ et du Tafilalet (El Hadrami, 1998).

3- L'invasion par le sable :

L'invasion des palmeraies par le sable, qui a conduit les exploitants à abandonner leurs vergers phoénicoles, malgré leurs multiples tentatives de lutte désespérée dans l'ensemble, contre l'ensablement et les sécheresses prolongées (Sedra, 2003).

4- Désintérêt des phoeniciculteurs :

L'absence de la rentabilité souhaitée du secteur phoénicole à cause de la faiblesse des productions de dattes de qualité marchande élevée, qui a conduit la plupart des agriculteurs à se désintéresser de la culture du palmier et de son bon entretien. En effet, le palmier dattier ne

bénéficie plus désormais de soins spéciaux à l'exception des opérations de pollinisation, de récolte et d'irrigation qui se pratiquent globalement de façon traditionnelle et empirique (El Hadrami, 1998 ; Sedra, 2003).

Grâce à ces problèmes, le Maroc est confronté à un grand dilemme et les techniques conventionnelles se révèlent insuffisantes pour la restauration des palmiers détruits pendant toutes ces années.

Ainsi, le Maroc s'est tourné vers la culture in vitro et spécifiquement la multiplication par la technique d'organogenèse pour essayer de répondre à l'énorme demande de plantes in vitro.

Le présent travail a été entrepris afin d'optimiser la technique d'organogenèse chez le palmier dattier. Il vise la détermination de la concentration idéale des différentes hormones végétale qui donne le maximum effet sur la multiplication et l'élongation des souches de la variété Boufeggous.

Matériel et méthodes

I- Matériel végétal :

Ce travail a été réalisé sur la variété Boufeggous qui se caractérise par une bonne qualité dattiers. Des souches identiques ont été utilisées pour évaluer les effets des différentes concentrations en régulateurs de croissance. Les phases précédentes ont été réalisées au laboratoire de culture in vitro des tissus à l'INRA Marrakech à partir du cœur de rejets du palmier dattier.

II- Milieu de culture :

Le milieu de base utilisé est le milieu MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962). Certains composés comme les macroéléments, les microéléments, le fer et les vitamines sont requis en si petite quantité qu'il est impossible de les peser. On doit donc les concentrer préalablement sous forme de solutions-mères.

1- Préparation des solutions mères

Les différentes méthodes de préparation de ces solutions-mères sont montrées ci-dessous :

a- Les macroéléments :

Une solution mère concentrée 40 fois par rapport au milieu de culture est préparée en solubilisant sous agitation et sans chauffage les différentes quantités de macroéléments dans de l'eau distillée stérile. Chaque élément est solubilisé seul avant d'être ajouté à la solution mère. Cette dernière est par la suite ajustée à 1L dans une fiole jaugée.

Tableau 3 : composition en macroéléments par litre de la solution mère et du milieu MS

Composition	Milieu de culture en mg/L	Solution mère en mg/L
NH ₄ NO ₃	1650	33 000
KNO ₃	1900	38 000
CaCl ₂	332	6 640
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	7 400
KH ₂ PO ₄	170	3 400

b- Les microéléments :

Les microéléments sont préparés en solution mère 200 fois concentrés par rapport au milieu de culture. Chacun de ces microéléments est solubilisé sous agitation dans l'eau distillée stérile, puis ajouté dans une fiole jaugée, qu'on ajuste à 1L avec l'eau distillée stérile.

Tableau 4 : compositions en microéléments par litre de la solution mère et de milieu MS

Composition	Milieu de culture en mg/L	Solution mère en mg/L
MnSO ₄ ,H ₂ O	16,9	3 380
ZnSO ₄ ,7H ₂ O	8,6	1 720
CuSO ₄ ,5H ₂ O	0,025	5
H ₃ BO ₄	6,2	1 240
KI	0,83	166
NaMo ₄ ,2H ₂ O	0,25	50
CoCl ₂ ,4H ₂ O	0,025	5

c- Le fer :

La solution ferrique est obtenue en dissolvant a part du sulfate de fer FeSO₄,7H₂O et l'EDTA dans l'eau distillée stérile, en les mélangeant ensuite selon les quantités présenté dans le tableau 5 pour obtenir une solution mère 200 fois concentré par rapport au milieu de culture. Le rôle de l'EDTA est d'éviter la précipitation du fer dans le milieu.

Tableau 5 : composition en Fe-EDTA de la solution mère

composition	Milieu de culture en mg/L	Solution mère en mg/L
FeSO ₄ ,7H ₂ O	27,8	5 560
Na ₂ EDTA,2H ₂ O	37,3	7 460

d- Les vitamines :

Les vitamines sont dissoutes dans l'eau distillée stérile puis versé et ajusté dans une fiole jaugée de 100ml. Le tableau 6 présente la composition de la solution vitaminique en mg/100ml, et en mg/L de milieu de culture.

Tableau 6 : composition en vitamines de la solution mère et du milieu de culture

Composition	Milieu de culture en mg/L	Solution mère en mg/100ml
Thiamine, HCl	10	1000
Acide nicotinique	1	100
Pyridoxine	0,1	10
Biotine	0,01	1

2- Préparation du milieu :

Après l'obtention des différentes solutions, on procède à la préparation du milieu. Dans un erlenmeyer de 5L déposé sur un agitateur chauffant, on ajoute 1L d'eau distillé puis 9g d'agar, après homogénéisation on ajoute les différents constituants montré dans le tableau 7 à

l'exception de l'adénine qui doit être solubilisé seul avant son addition. Après on ajuste à 2,5L avec l'eau distillé.

Tableau 7 : concentration des constituants de milieu MS par litre puis par 2,5 litres

Constituant	Quantité par 1L	Quantité par 2,5L
Macroéléments	50 ml	125 ml
Microéléments	5 ml	12,5 ml
Vitamines	1 ml	2,5 ml
Fe-EDTA	5 ml	12,5 ml
Adénine	20 mg	50 mg
Myo-inositol	100 mg	250 mg
Glutamine	100 mg	250 mg
Saccharose	30 g	75 g

Après on distribue les 2,5L du milieu dans 5 erlenmeyers de 0,5L et on ajoute les hormones dans 4 de ces erlenmeyers suivant les différentes concentrations montré dans le tableau 8. Le 5^{ème} erlenmeyer va contenir le milieu témoin et donc ne doit pas contenir les hormones.

Tableau 8 : concentration des différentes hormones dans chaque milieu en ml/L

Milieu hormone	A1	A2	A3	A4	A5
KIN	2	1	0,5	0,25	0
IPA	1,5	0,75	0,36	0,25	0
AIA	1	0,5	0,25	0,1	0
ANA	0,1	0,05	0,025	0,05	0

Après l'ajustement du pH à 5,8 , les milieux de cultures sont distribués à l'aide d'un distributeur de milieu dans des tubes à essais à raison de 11 ml/tube, 30 tubes/milieu, puis enfermés avec des capuchons en polycarbonate, puis enveloppés avec du papier kraft et autoclaves pendant 20 min en phase de vapeur sous une température de 121°C et une pression de 1 bar.

III- Repiquage et culture des souches :

Les souches de Bouffegous ont été repiquées sur les différents milieux de culture sous une hotte à flux laminaire nettoyé avec de l'alcool 70% et du coton stérile. Puis les cultures sont incubées dans des étagères sous une température de 27 ± 2 °C avec une photopériode de 16h/8. L'éclairement est d'environ 2500 lux et est fourni avec des tubes à néon blanc, et l'humidité est au voisinage de 100%. Les cultures sont entretenues par repiquages sur des milieux frais tous les 30 jours.

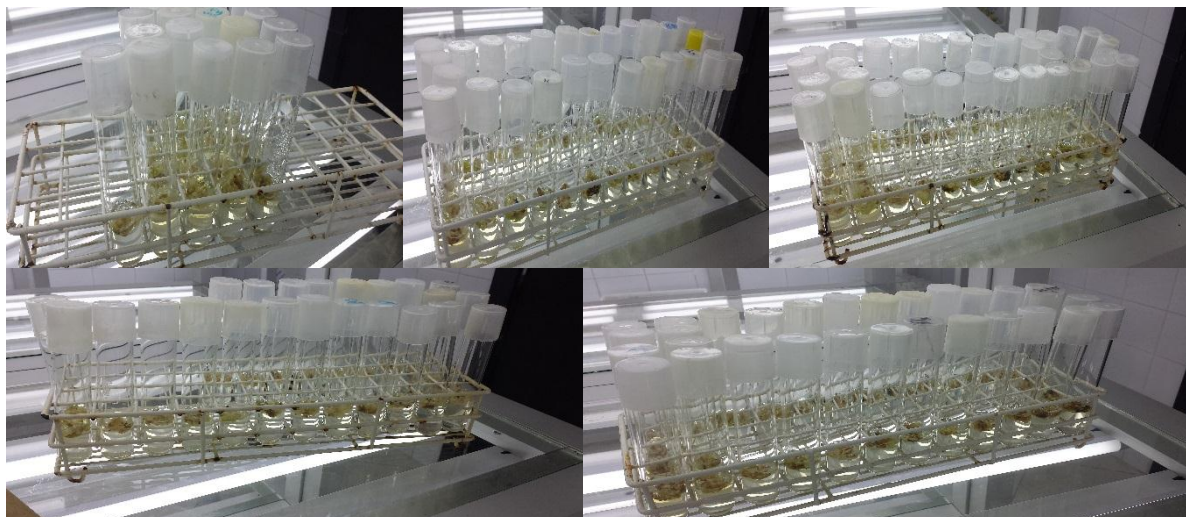


Photo 1 : souches végétales incubée dans les différents milieux

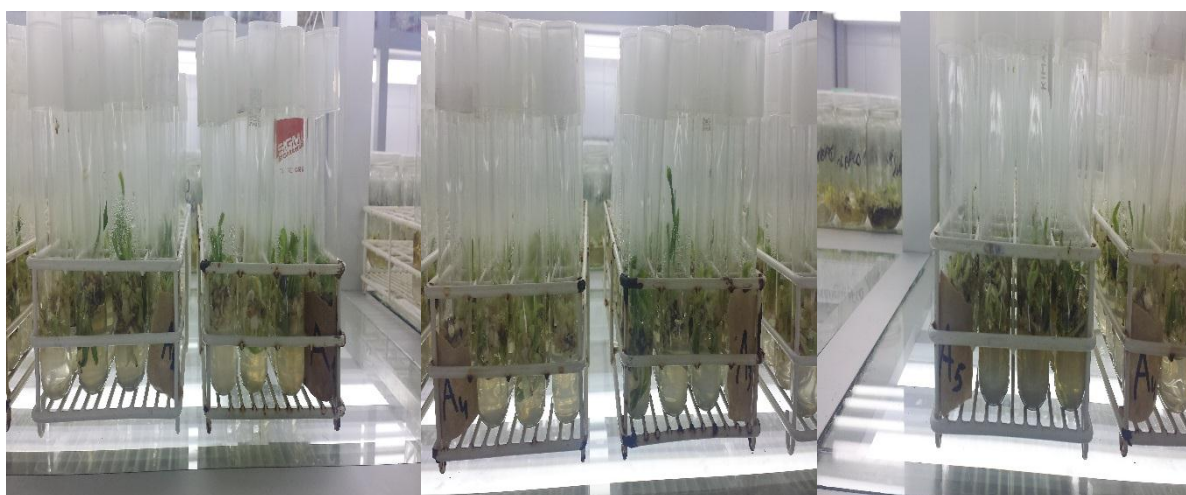


Photo 2 : souches végétales après 30 jours d'incubation

IV- Observations et critères d'évaluation :

Pour évaluer l'effet des différents milieux sur la multiplication des souches, des observations sur des critères donnés ont été faites pour chaque milieu :

1- Taux de multiplication :

Ce critère d'évaluation estime la capacité des souches mises en culture sur les différents milieux à se multiplier et donner des nouveaux bourgeons néoformés. A la fin du repiquage, on note combien on a eu des tubes par milieu et on divise le nombre obtenu par le nombre original des tubes et ce rapport nous donne le taux de multiplication.

2- Nombre et longueur des feuilles :

Ce critère d'évaluation représente une estimation de la capacité des souches mises en culture sur les différents milieux à néoformer des feuilles. Le nombre et longueurs des feuilles néoformées ont été noté au moment de chaque observation.

3- Indice de verdissement :

Ce critère d'évaluation donne une idée sur la quantité de chlorophylles synthétisées et aussi sur la capacité photosynthétique pour chaque souche. Ceci a été réalisé par comparaison de chaque souche à une gamme formée de 5 souches qui présentent un degré de verdissement progressif.

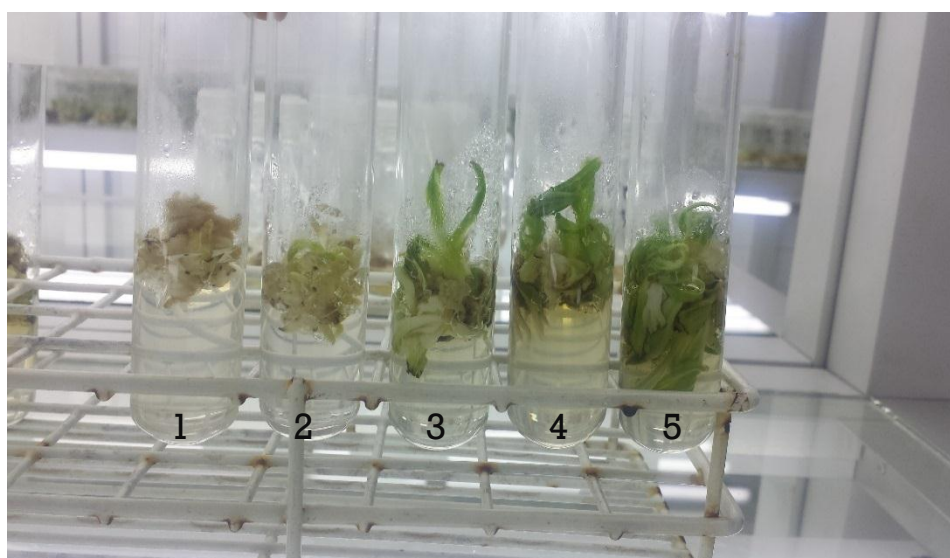


Photo 3 : échelle de verdissement progressif

4- Nombre et longueur des racines :

Ce critère d'évaluation estime la capacité des souches mises en culture sur les différents milieux à néoformer des racines. Le nombre des racines néoformées et leurs longueurs ont été noté au moment de chaque observation.

5- Indice de la taille des bourgeons :

Comme l'indice de verdissement, ce critère a été réalisé par comparaison de chaque souche à une gamme formée de 5 souches dont la taille des bourgeons varie progressivement.

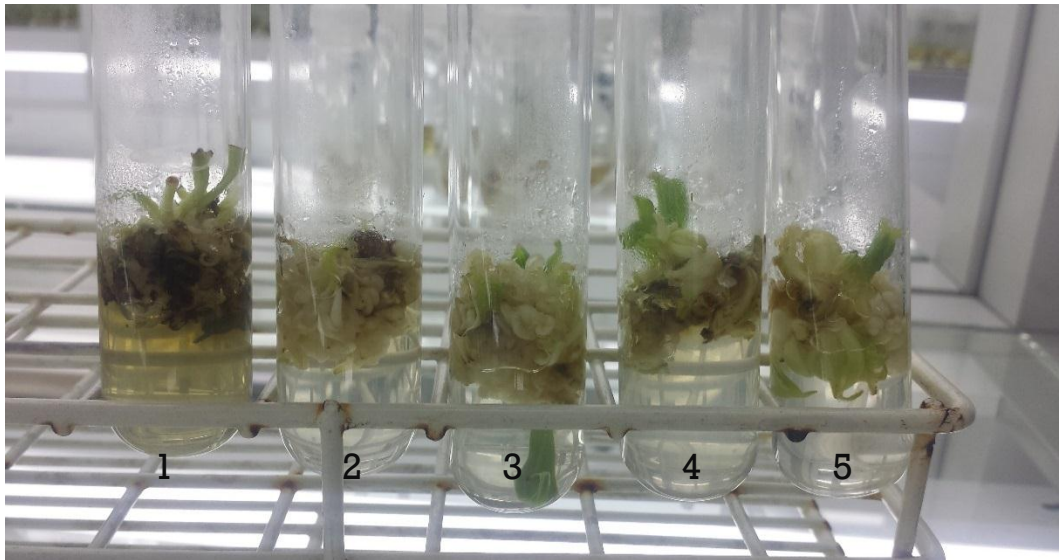


Photo 4 : échelle de taille des bourgeons progressif

Le calcul des résultats, les moyennes et les histogrammes ont été faites par Microsoft Office Excel.

Résultats et discussion

I- Résultats :

1- Taux de multiplication :

D'après la figure 3, nous constatons une distinction des milieux A4 (0.25ml/L de KIN ; 0.25ml/L d'IPA ; 0.1ml/L d'AIA et 0.05ml/L d'ANA) et A5 (sans hormones). Les concentrations faibles ou l'absence de ces hormones ont donné le meilleur taux de multiplication avec une moyenne de 1.7 pour A4, et 1.82 pour A5. Les concentrations des hormones dans les milieux A1 (2ml/L de KIN ; 1.5ml/L d'IPA ; 1ml/L d'AIA et 0.1ml/L d'ANA), A2 (1ml/L de KIN ; 0.75ml/L d'IPA ; 0.5ml/L d'AIA et 0.05ml/L d'ANA) et A3 (0.5ml/L de KIN ; 0.36ml/L d'IPA ; 0.25ml/L d'AIA et 0.025ml/L d'ANA) ont donné un taux de multiplication relativement faible. Ceci montre que les concentrations élevées des hormones défavorisent la multiplication des souches.

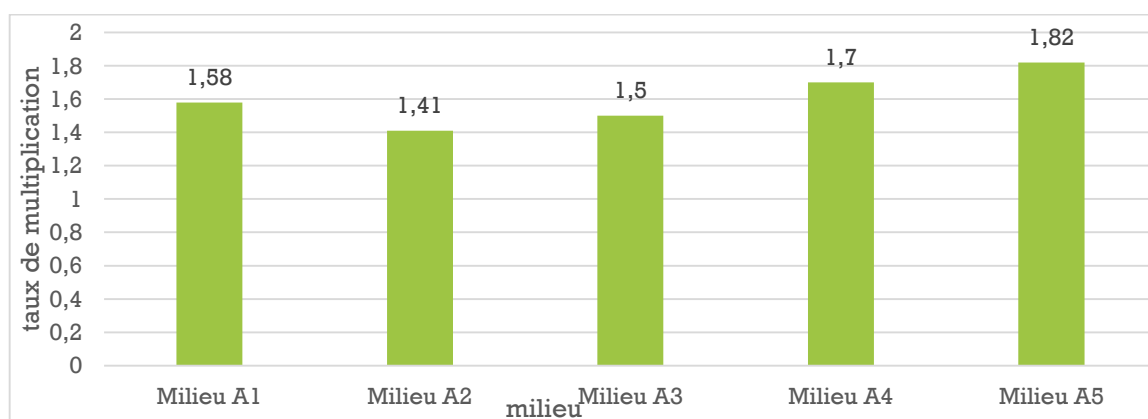


Figure 3 : effet des hormones sur la multiplication des souches

2- Nombre et longueur des feuilles :

Les résultats de la figure 4 montrent que les souches dans les milieux A1 (2ml/L de KIN ; 1.5ml/L d'IPA ; 1ml/L d'AIA et 0.1ml/L d'ANA) et A2 (1ml/L de KIN ; 0.75ml/L d'IPA ; 0.5ml/L d'AIA et 0.05ml/L d'ANA) ont le nombre le plus élevé des feuilles, mais également les autres milieux présentent un nombre assez élevé des feuilles. Cela nous dit que l'effet des hormones sur le nombre des feuilles n'est pas significatif.

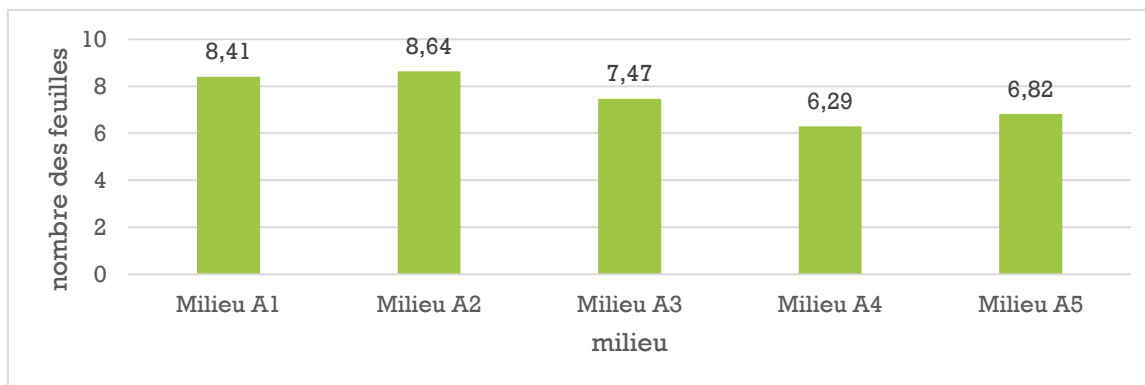


Figure 4 : effet des milieux sur le nombre des feuilles

D'un autre côté et en se concernant la longueur des feuilles, les milieux A2, A3 et A4 présentent des souches avec des feuilles longues par rapport au milieux A1 et A5 comme il est montré dans la figure 5. Le meilleur allongement des feuilles est trouvé dans le milieu A3 avec une valeur moyenne de 2.91 cm

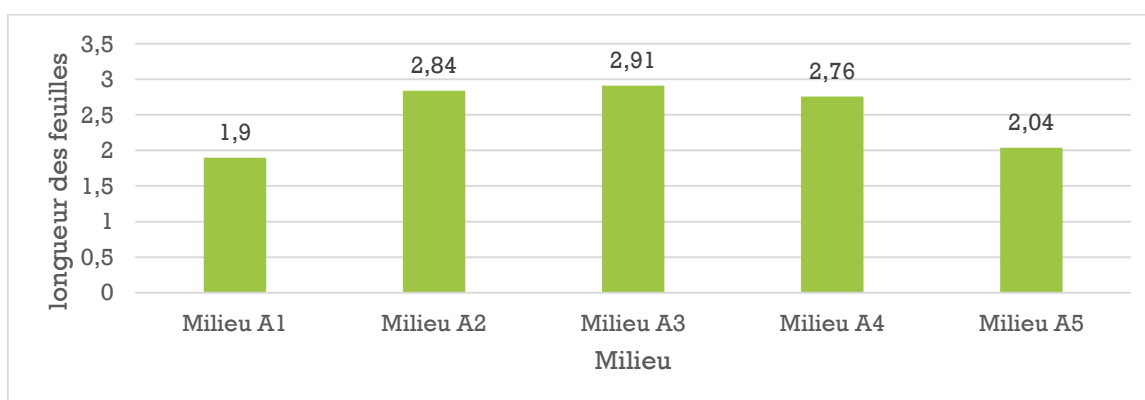


Figure 5 : effet des milieux sur l'allongement des feuilles

3- Indice de verdissement :

La figure 6 montre que les milieux A1, A2 et A3 représentent l'indice de verdissement élevé dont le plus grand est de A2 avec une valeur moyenne de 3.41. Mais même si les autres milieux représentent une valeur relativement faible, la gamme de différence n'est pas assez grand pour dire c'est un effet des hormones car les autres milieux ont montré des feuilles avec un indice de verdissement élevé.

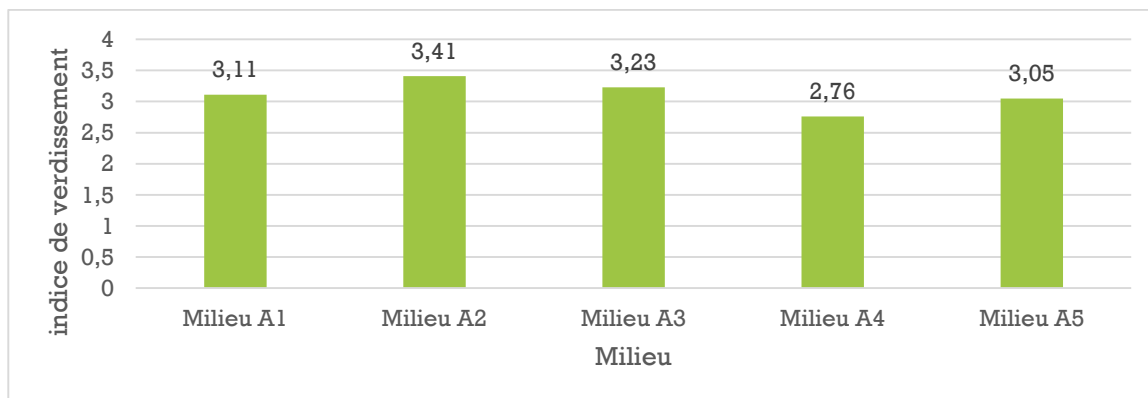


Figure 6 : effet des milieux sur l'indice de verdissement

4- Nombre et longueur des racines :

La figure 7 nous montre une bonne émission racinaire chez les souches mises dans les milieux A2, A3 et A5 dont le meilleur nombre a été obtenu dans les milieux A3 et A5 avec une valeur de 2.47 pour chaque milieu. Par contre les milieux A1 et A4 ont donné un nombre assez faible des racines. D'une autre côté la longueur des racines a été plus ou moins la même dans tous les milieux à l'exception des milieux A1 et A4 qui ont montré une valeur respectivement de 0.7 cm et 0.58 cm.

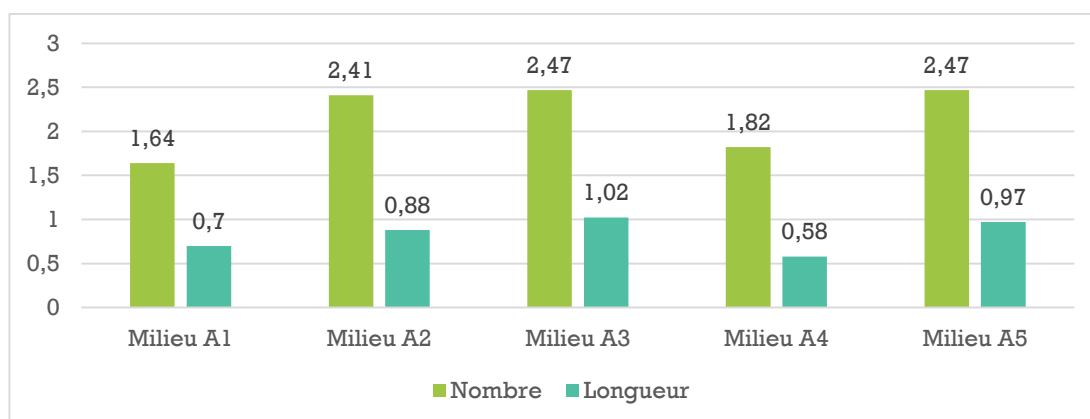


Figure 7 : effet des milieux sur le nombre et la longueur des racines

5- Indice de la taille des bourgeons :

La figure 8 nous montre une diminution progressive de la taille des bourgeons dont le milieu A1 présente les souches avec le plus grand indice de la taille et le milieu A5 présente les souches avec le plus faible indice.

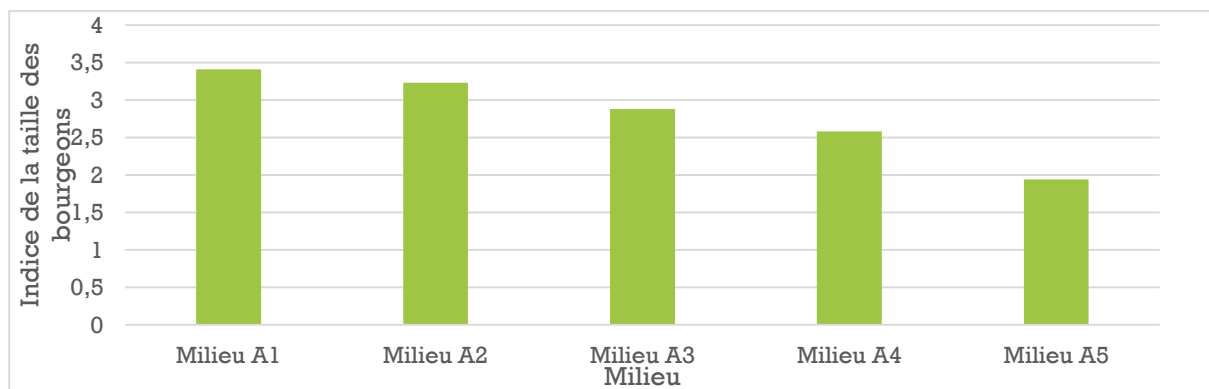


Figure 8 : effet des milieux sur la taille des bourgeons

II- Discussion :

Les régulateurs de croissance sont impliqués dans la morphogenèse en culture in vitro. Les 5 milieux différents présentent des résultats qui sont basés sur les différentes concentrations des hormones végétales. Le milieu A1 présente la meilleure taille des bourgeons avec une multiplication et un verdissement importants, mais il n'est pas très efficace pour le nombre et la longueur des feuilles et racines. Les milieux A2 et A3 présentent des tailles assez importantes des bourgeons, tailles et nombres très importants des feuilles et racines et un verdissement élevé mais ils ont un taux de multiplication faibles par rapport aux autres milieux. Et même si les milieux A4 et A5 présentent un taux de multiplication élevé, ils manquent dans les autres critères.

D'après ces résultats on peut dire que le milieu A2 (1ml/L de KIN ; 0.75ml/L d'IPA ; 0.5ml/L d'AIA et 0.05ml/L d'ANA) présente les meilleurs résultats puisque les bourgeons, les feuilles et les racines sont de très bonne qualité et il présente un taux de multiplication élevé.

Conclusion

En conclusion, le présent travail a mis en évidence le rôle des différentes concentrations en hormones végétales dans la multiplication des souches de la variété Boufeggous et a fourni une méthode pratique pour la production de ces souches.

Les résultats de ce travail indiquent que le milieu A2 (1ml/L de KIN ; 0.75ml/L d'IPA ; 0.5ml/L d'AIA et 0.05ml/L d'ANA) est le meilleur milieu pour la multiplication des souches qui présentent des bourgeons et des feuilles en très bon qualités ainsi que des racines nombreuses et de grand taille. Ces résultats pourraient aider à améliorer le rendement du palmier dattier et pourraient être aussi généralisés aux autres variétés de cette plante autre que la variété Boufeggous.

Comme deuxième perspective à ce travail on propose de faire une étude qui compare l'effet des différents comportements du milieu MS ou bien d'autres types du milieu afin d'opter pour le milieu le plus favorable pour la multiplication du palmier dattier.

Références bibliographiques

- **Abahmane L, Bougerfaoui M, Anjarne M** (1999) Use of tissue culture techniques for date palm propagation and rehabilitation of palm groves devastated by bayoud disease. Proceedings international symposium on date palm, Assiut University, Assiut (Egypt) Nov 9-11
- **Abahmane, L.** 2011a. Date palm micropropagation via organogenesis. In: S.M. Jain, J.M.Al-Khayri and D.V. Johnson (Eds), pp.69-90. Date Palm Biotechnology, Springer, Dordrecht
- **Aissam F**, 1990. Observation histologique sur l'organogenèse et le développement des bourgeons du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) en culture « in vitro », thèse de 3ème cycle, Université Cadi Ayyad Marrakech, Maroc, 99pp.
- **Anjarne M, Abahmane L, Bougerfaoui M** (2005) Les techniques de micropropagation du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : Expérience de l'INRA–Maroc. Actes du Symposium International sur le Développement Agricole Durable des Systèmes Oasiens. Erfoud, Morocco, Mar 8–10, pp 86–93.
- **Edwin, G., H. Mike, and G. J. De Klerk**. "Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition: Volume 1. The Background."(2008).
- **El Hadrami, I., and M. Baaziz**. "Somatic embryogenesis and analysis of peroxidases in *Phoenix dactylifera* L." *Biologia plantarum* 37.2 (1995): 197-203.
- **El Hadrami, Ismaïl, et al.** "Biotechnologies végétales et amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), pivot de l'agriculture oasienne marocaine." *Cahiers Agricultures* 7.6 (1998): 463-468.
- **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.
- **FAO** (2016) <http://faostat.fao.org>
- **Fernandez D, et al.**, 1995. Le Bayoud du palmier dattier, une maladie qui menace la phoeniciculture, phytoma, la défense des végétaux, 469 :36-39.

- **Ferry M, Bouguedoura N, El Hadrami I** (1998) Patrimoine génétique et techniques de propagation in vitro pour le développement du palmier dattier. Spécial Oasis. Sécheresse 9(2):139–146
- **Haddouch, M.** "Situation actuelle et perspectives de développement du palmier dattier au Maroc." *Options Mediterr* 28 (1996): 63-79.
- **Loutfi K** 1999. Organogenesis et embryogenèse somatique à partir des tissus floraux du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) cultivés *in vitro*. Aspects histologiques et caryologie des vitroplants. Thèse de Doctorat, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia- Marrakech.
- **Munier**, 1973. Le palmier dattier. Paris : Ed. Maison-neuve et Larose, 217p
- **Sedra, Moulay Hassan.** *Le palmier dattier base de la mise en valeur des oasis au Maroc: techniques phoénicoles et création d'oasis*. INRA Editions, 2003.
- **Tisserat B** (1982) Development of new tissue culture technology to aid in the cultivation and crop improvement of date palms. Proceedings first symposium on date palm. King Faisal University, Saudi Arabia, pp 126–140.