Recherche Agronomique, 2024
Vol. 22, N° 1, p. 33-49

Morphologie et histologie des cals de trois cultivars de palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.) en réponse à deux milieux de culture *in vitro*

S. Ezzouaoui*(1), D. Yatta-El Djouzi(1), R. Slamani(1), L. Bouamra(1), R. Ayadi(2)

[1] Division de Biotechnologie et Amélioration des plantes. Institut National de la Recherche Agronomique. CRP Mehdi Boualem BP 37, Baraki 16210. Alger
[2] Département de Biotechnologie Végétale. Faculté SNV. Université de Blida 1. BP 270 Route Soumâa -BLIDA
*Auteur correspondant : ezzouaouisana@gmail.com

Reçu : 5 avril 2023 Révisé : 24 mars 2024 Accepté : 26 mars 2024

Résumé : L'embryogenèse somatique est utilisée dans le but de conserver les cultivars appréciés, chez le palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.), pour leur qualité dattière, leur résistance aux maladies et à l'exploitation de la variation somaclonale. La voie de l'embryogenèse somatique indirecte est employée pour induire la formation de cals sur des explants de trois cultivars Taquerbucht, Deglet Nour et Teggaza provenant des régions d'Adrar et de Touggourt. Ces cultivars ont été choisis par rapport à leur réponse à la maladie du Bayoud (résistance ou sensibilité). L'objectif de cette étude est d'assurer un taux de multiplication élevé des cals afin de disposer de matériel végétal indispensable pour l'isolement et la fusion de protoplastes.

Pour cela, deux milieux de culture de base MS (1962) modifiés nommés M100 et P12,5 et additionnés de régulateurs de croissance (2,4-D et Picloram) à raison, respectivement, de 100 mg.L^{-1} et 12,5 mg.L^{-1}, ont été utilisés pour l'initiation de cals embryogènes.

La multiplication des cals a eu lieu sur des milieux de culture ayant des compositions hormonales identiques à celles des milieux de culture d'induction (M100 et P12,5). Nos résultats montrent que tous les types d'explants du cœur des rejets testés, réagissent positivement sur ces deux milieux.

L'étude histologique a montré que les cals sont constitués par des amas de cellules partiellement épidermiques, initiés superficiellement à partir de cellules épidermiques et sous-épidermiques. Ces cals s'isolent des explants et donnent naissance à des nodules méristématiques présentant une zone pseudocambiale composée de plusieurs assises cellulaires alignées qui permettent la croissance de ces cals.

Mots clés : Palmier dattier, embryogenèse somatique, callogenèse, multiplication *in vitro*, histologie.

Summary : This study aims to conserve popular cultivars of date palm (Phœnix dactylifera L.), for their quality, resistance to diseases and somaclonal variation exploitation by ensuring high callus multiplication rate for protoplast isolation and fusion. Somatic embryos were induced using different segments of offshoots of three cultivars of date palm based on the response to Bayoud disease such as Taquerbucht, Deglet Nour and Teggaza.

Embryogenic calli were successfully induced on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 100 mg.L^{-1} 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) (M100) and 12.5 mg.L^{-1} Picloram (P12,5). In terms of callus morphology, friable calli were induced on medium with Picloram and NAA while compact calli were obtained on medium with 2,4-D. Callus multiplication was effectively obtained on the same concentrations of growth regulators used for initiation media.

The histological study showed that calluses consisted of partially epidermic cell clusters, initiated from outer-epidermal and sub-epidermal cells. These calluses were isolated from explants and gave rise into meristematic nodules. They feature a pseudocambial zone made up of several aligned cell layers that allowing callus growth.

Key words : Date palm, somatic embryogenesis, callogenesis, multiplication, histology.

INTRODUCTION

Le palmier dattier, *Phœnix dactylifera* L. (Arecaceae), est subtropical anciennement domestiqué. Il est largement cultivé pour ses multiples usages et ses services écosystémiques, en particulier pour ses fruits comestibles dont des milliers de variétés ont été sélectionnées (Munier, 1973 ; Bouguedoura, 1979 ; Barrow, 1998 ; Abul-Soad et *al.,* 2017 ; Ait-El-Mokhtar et *al.,* 2019) et pour sa capacité d'adaptation aux conditions des climats arides les plus sévères. Sa présence crée un microclimat permettant le développement de diverses formes de vie animale et végétale indispensables pour le maintien et la survie des populations du désert (El Houmaizi, 2002).

Dénommé par Linné depuis 1734 (*Phœnix dactylifera* L.), le palmier dattier est une plante pérenne et lignifiée bien adaptée aux climats sahariens chauds et secs. C'est une espèce dioïque, diploïde (2n=36) et polyploïde pour certaines variétés. Elle est angiosperme, monocotylédone.

La production mondiale de dattes varie selon les années mais occupe aujourd'hui une grande place dans l'économie. En 2020 la production mondiale enregistrée est de 8 millions de tonnes, l'Egypte devance tous les pays producteurs en restant à la tête du

classement par une production s'élevant à 1.501.799 tonnes (FAOSTAT, 2020).

L'Algérie, par une production de 848.199 tonnes, occupe la quatrième place parmi les pays producteurs et exportateurs de dattes dans le monde. Ces paramètres économiques démontrent à eux seuls l'importance de cette culture tant par l'apport financier qu'elle engendre, que par la stabilité des populations des oasis (Yatta et *al.,* 2020).

L'existence du palmier est en péril car l'espèce est confrontée à diverses contraintes telles que la sécheresse, la salinité et la désertification, le vieillissement des palmeraies, l'érosion génétique et les problèmes phytosanitaires qui ont un effet dépressif sur la production et la qualité du fruit et peuvent même causer la mort des palmiers. La maladie la plus connue est le Bayoud, ou fusariose, engendrée par un champignon (*Fusarium oxysporum f.sp albedenis*) vivant dans le sol. Cette maladie tellurique contamine les racines du palmier et finit par atteindre l'intégralité de la plante.

Apparue au Maroc cette maladie a progressé vers l'Algérie et constitue une véritable menace de disparition du patrimoine phœnicicole. Celle-ci a infesté les palmeraies de l'ouest et du centre de l'Algérie en détruisant 3 millions de palmiers qui pour la plupart était de bonne qualité dattière (Djerbi, 2013 ; Sedra, 2013 et Meddich et *al.,* 2018). La lutte contre le Bayoud diffère suivant les caractères que ce dernier présente.

Actuellement, la multiplication végétative par culture *in vitro* s'avère efficace pour le maintien et la préservation de la diversité, indispensables pour accroître la vitesse de reconstitution des palmeraies détruites, leurs rajeunissement, et l'extension des palmeraies existantes (Abed et *al.,* 2014 ; Yatta et *al.,* 2014 ; Yatta et *al.,* 2020).

La multiplication *in vitro*, ou lutte génétique, par embryogenèse somatique utilise les facultés de différenciation et de dédifférenciation cellulaire pour la formation d'embryons, à partir de cellules somatiques apportant ainsi des solutions pour compléter les méthodes traditionnelles, dans un délai raisonnable (John Smith, 2004 ; Abed et *al.,* 2014 ; Mazri et *al.,* 2019 ; Yatta et *al.,* 2023).

La culture *in vitro* permet donc soit la multiplication conforme, soit la création variétale (Yatta et Bouguedoura, 2013 ; Bouguedoura, 2017).

Ces investigations s'inscrivent dans le cadre des travaux de recherche de la division du palmier dattier de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA) qui a pour objectif la préservation du palmier dattier par les voies biotechnologiques.

Cette étude comporte deux parties ; (1) une induction de la callogenèse et

une multiplication des cals sur deux milieux de culture de base de MS (Murashige et Skoog, 1962), différents (M100, et P12,5) de trois cultivars de palmier dattier (Deglet Nour, Teggaza, Taquerbucht), (2) une analyse histologique permettant de décrire la nature et l'origine des cals obtenus.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal

Des rejets ont été prélevés le 28/03/2019 pour les trois cultivars : Deglet Nour, Taquerbucht et Teggaza avec des poids variant de 2,67 à 4,45 kg dans les palmeraies de deux régions différentes (station INRAA d'Adrar et de Sidi Mahdi à Touggourt).

- ✓ Le cultivar « Deglet Nour », de qualité dattière exceptionnelle mais sensible au Bayoud.
- ✓ Le cultivar « Taquerbucht », de qualité dattière moyenne avec la particularité d'être résistant au Bayoud.
- ✓ Le cultivar « Teggaza » possédant une assez bonne qualité dattière mais sensible à la maladie du Bayoud.

2. Initiation de la callogenèse

L'induction de la callogenèse a eu lieu sur le milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962) modifié, additionné de (en $mg.L^{-1}$) 1 thiamine, 100 myo-inositol, 170 Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4), 100 Phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4), 450000 saccharose, 2000 Phytagel, 200 Citrate d'ammonium, 100 glutamine, 200 à 3000 Charbon actif. Deux milieux ont été utilisés, le milieu M100 (charbon actif 3 $g.L^{-1}$, IPA 3 $mg.mL^{-1}$, 2,4 diclorophénoxyacetique 100 $mg.L^{1}$) et le milieu P12,5 (charbon actif 200 $mg.L^{-1}$, l'acide 4-amino-3,5,6 trichloropicolinique (picloram) 12,5 $mg.L^{-1}$, IPA 1 $mg.mL^{-1}$).

La dissection des rejets consiste à se débarrasser des feuilles externes jusqu'à l'apparition de la partie blanche et tendre (cœur) du rejet. Après désinfection de cette dernière les explants sont découpés (Apex, feuilles, bases de feuilles et bourgeons) et mis en culture sur le milieu M100 et P12,5 (Figure 1). Les cultures sont placées à l'obscurité totale à une température de 28°C pendant 16 heures et à 22°C pendant 8 heures et ce pour 6 à 8 subcultures successives.

3. Multiplication des cals

Les cultures sont repiquées toutes les 4 à 5 semaines sur un milieu neuf, de composition identique au milieu initial. Les repiquages consistent à éliminer toute partie brunie et à remettre les explants dans un milieu frais. Les explants devenus volumineux sont fragmentés.

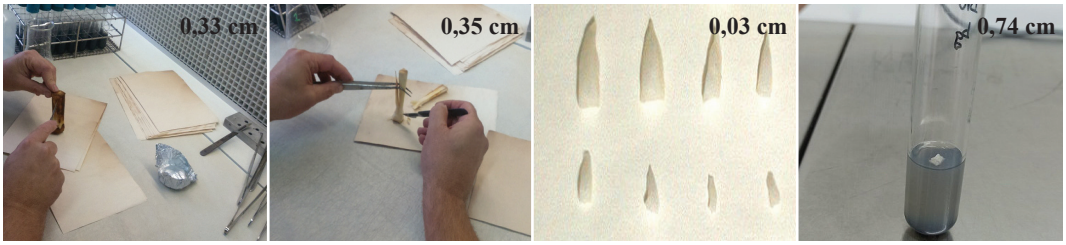


Figure 1. Dissection et mise en culture des explants des « cœurs » de rejets.

Les cultures sont observées régulièrement tous les 5 à 10 jours. Tout développement ou simple croissance des organes est noté. L'observation porte sur l'évolution de la couleur de l'explant, la date d'apparition du cal ainsi que sa nature et sa structure (friable et/ou nodulaire).

3. Histologie

Les fragments de cals sont fixés dans 100 mL d'une solution contenant 4 mL de glutaraldehyde à 25%, 50 mL de tampon phosphate, 20 mL de paraformaldehyde à 10%, 1 g de caféine et 26 mL d'eau distillée (Schwendiman, 1988). La déshydratation se fait par passages successifs des cals dans des bains d'alcool à des concentrations croissantes. L'imprégnation des cals se fait dans un mélange composé d'alcool 100% et de toluène, ils sont ensuite placés dans trois bains successifs de toluène, 1 bain de toluène et paraffine et 1 bain de paraffine (entre 55 et 65°C). L'inclusion et la polymérisation se font à une température ambiante dans des moules contenant une quantité d'environ 1,5 mL de paraffine. La confection des coupes est effectuée à l'aide d'un microtome (Leica RM 2125RT) à une épaisseur de 10 µm. Les coupes sont colorées par une double coloration Periodic Acid Schiff qui colore en rouge les polysaccharides des parois et en rose violacé, le mucus et les réserves amylacées (cellulose, composés pectiques, hémicelluloses…). Le Naphtol Blue Black colore en bleu clair le cytoplasme (protéines solubles), en bleu foncé le noyau et le nucléole et en bleu noir les corps protéiques (les réserves de protéines).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Initiation de la callogenèse

L'objectif de cette phase est d'initier la callogenèse en testant deux milieux de culture (M100 et P12,5) de base de MS (Murashige et Skoog, 1962).

Au total, nous avons obtenu 326 explants qui sont composés de 130 explants pour le cultivar Teggaza, 100 explants pour le cultivar Taquerbucht

et 96 explants pour le cultivar Deglet Nour. Aucune infection fongique ou bactérienne n'est observée lors de mise en culture des explants. Dès les quatre premiers mois de culture, les explants gonflent et grossissent sur les deux milieux (M100 et P12,5) dont certains évoluent plus rapidement que d'autres. Le taux de multiplication des explants varie en moyenne de 4,5 à 7,4 pour les trois cultivars (Tableau I). Les explants volumineux sont fragmentés.

Nous avons constaté des changements importants dans l'évolution des explants. Certains montrent de petites proportions de cals blancs d'aspect nodulaire qui, après leur isolement, donnent naissance à une souche embryogène. Par contre, l'explant initial se nécrose. A noter que les différents explants testés sont dotés d'une capacité de multiplication remarquable (Figure 2).

La callogenèse est précédée par une importante augmentation de volume des explants dont la croissance des explants est observée à des intervalles allant de 5 à 9 semaines de culture. Les premiers signes de prolifération sont visibles au bout de 5 à 7 mois. Cette prolifération se fait tout d'abord en périphérie des explants avant de se propager sur tout l'explant.

L'induction de la callogenèse est lente quel que soit le milieu. Les cultures réagissent généralement, après une période de 5 mois à une année. A ce stade, le nombre d'explants obtenus est de 164 pour Deglet Nour, 134 pour Taquerbucht et 159 pour Teggaza.

A l'œil nu, tous les types d'explants (les bourgeons axillaires, les jeunes feuilles, les bases de feuilles, et l'apex) testés réagissent positivement sur les milieux de culture par la formation de cals mais ce sont les fragments d'apex et les bases de feuilles qui ont montré une grande capacité callogène.

En effet, les apex et les bases des très jeunes feuilles donnent tous des cals sur les deux milieux. Les cals sont de nature granuleuse, friables, blancs et manifestent une bonne prolifération. Les parties hautes de ces jeunes feuilles donnent moins de cals et présentent un faible développement.

Les travaux de Mater (1986), Saka et Abed (1989), Bouguedoura (1991), Yatta (2007) et Mazri et *al.* (2017)

Tableau I. Taux de multiplication des explants

Cultivars testés	Nombre des explants initiaux	Nombre des explants obtenus	Taux de multiplication des explants
Teggaza	130	594	4,5
Taquerbucht	100	743	7,4
DegletNour	96	442	4,6
Total	326	1779	5,4

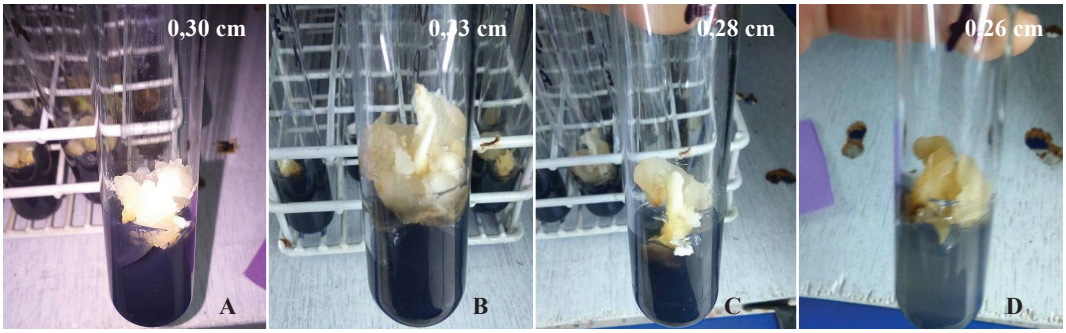


Figure 2. Grossissement des différents explants du « cœur » de rejets : apex (A et B), feuille (C), base de feuille (D).

Yatta et *al.* (2023) confirment qu'une callogenèse prend naissance sur tous les types d'explants, extraits du cœur de rejet. Concernant notre matériel végétal, les cals produits sur le milieu de culture contenant du picloram à une concentration de 12,5 mg.L^{-1} associée à 1 mg.L^{-1} d'IPA sont compacts, granuleux et friables, de couleur blanc-beige. L'emploi de ce régulateur de croissance s'est révélé efficace pour la phase d'induction. De nombreux travaux tels que ceux de Huang et Murashige (1983), Zaid (1989), Abed et *al.* (2014) ; Yatta et *al.* (2014) et Mazri et *al.* (2019) rapportent la rapidité et la performance de cette hormone dans l'initiation de l'embryogenèse à partir de cœur du rejet. L'induction de la callogenèse est lente et ce quel que soit le milieu utilisé. Les cultures réagissent, généralement après une période allant de 3 mois à une année. Des différences variétales existent : ainsi les cultivars Taquerbucht et Teggaza réagissent au bout de 6 à 7 mois, tandis que pour le cultivar Deglet Nour la phase d'initiation peut durer jusqu'à 13 mois. L'effet de ces régulateurs de croissance testés sur les différents explants de cœur du rejet est considérable dont le pourcentage de cals obtenus est le plus élevé dans les milieux M100 et P12,5. Nos résultats concordent avec ceux de Yatta (2007), Abed et *al.* (2014) et Yatta et *al.* (2023).

2. Multiplication des cals

La multiplication des cals est une étape nécessaire afin d'augmenter le nombre de cals initiés et d'améliorer la capacité de production en embryons somatiques. Les cals qui prolifèrent sont subdivisés au cours des subcultures, en deux parties ou plus selon leur taille (0,5 à 4 cm). Nous avons utilisé les mêmes milieux que ceux de l'étape de l'induction pour la multiplication des cals c'est-à-dire M100 et P12,5. La multiplication intense de cals formés se

fait soit directement soit après hachage du cal initial.

Dans nos conditions expérimentales, deux types d'auxines ont été utilisés: le 2,4-D et le picloram, chacune est combinée à une cytokinine (IPA).

Le 2,4-D est une substance de choix pour l'obtention de cals. Il possède une capacité auxinique marquée et provoque, à forte concentration de 100 mg.L^{-1}, une dédifférenciation des tissus, suivie d'une prolifération cellulaire conduisant à la production de cals (Yatta, 2007). Des chercheurs rapportent l'efficacité du picloram par rapport au 2,4-D (Zaid, 1989).

Dans notre expérimentation, cette auxine a été utilisée à une concentration de 12,5 mg.L^{-1}, combinée avec 200 mg.L^{-1} de charbon actif. L'association auxines/cytokinines (2,4-D 100 mg.L^{-1}, IPA 3 mg.L^{-1} pour le M100 et picloram 12,5 mg.L^{-1}, IPA l mg.L^{-1} pour le P12,5), les rendent encore plus efficaces et avantageuses dans la dissociation des tissus en groupes cellulaires séparés et dans le développement des cals pour l'induction de l'embryogenèse somatique.

2.1 Analyse comparative de la multiplication sur les deux milieux de culture

Les résultats obtenus sur les deux milieux de culture sont inscrits dans la figure 3. Elle montre que les milieux d'initiation et de multiplication testés (M100 et P12,5) se sont révélés stimulateurs d'une multiplication intense de la callogenèse. Les cals obtenus sont bien développés et présentent un aspect compact granuleux, ou friable de couleur blanc-beige. Leur taille varie de 0,5 cm à 4,5 cm. En outre l'aspect morphologique est le même (couleur et texture) (Tableau II). En effet, les cals friables ont une croissance rapide et leur masse double en un mois contrairement aux cals compacts qui croissent plus lentement. Le repiquage des cals friables est très délicat. Ces derniers peuvent produire secondairement des cals noduleux. Les cals compacts ont une croissance lente et certains d'entre eux peuvent acquérir le pouvoir de multiplication après 9 mois de culture. La substitution du 2,4-D par l'IPA (1 mg.L^{-1}) paraît avoir un pouvoir de multiplication considérable

Tableau II. Aspect des différents cals obtenus après 3 subcultures en présence du picloram et du 2,4-D

		Aspect des cals	
Milieux	**Taille des cals en cm**	**Texture**	**Couleur**
P12,5	0,5 à 03	Compact granuleux friable	Blanc beige
M100	0,5 à 4,5	Compact friable	Blanc beige

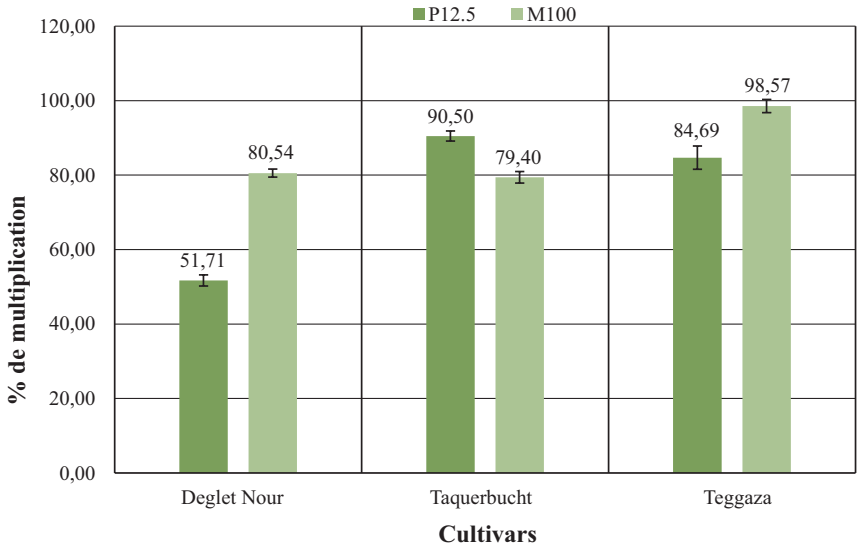


Figure 3. Pourcentages de variation des cals obtenus après 3 subcultures sur les milieux de culture M100 et P12,5 chez les trois cultivars.

sur les différents cals. De plus le picloram associé à l'IPA possède un pouvoir inducteur et multiplicateur non négligeable.

2.2 Analyse comparative de la callogenèse chez les trois cultivars

Les trois cultivars ont réagi positivement aux deux milieux de culture avec une prolifération de structures callogènes petites, de couleur blanc-beige facilement dissociables qui grandissent avec le temps (cals friables). D'autres sont noduleuses de couleur beige (cals compacts). Les différents explants sont dotés d'une capacité de multiplication remarquable.

Nous remarquons une légère variabilité de réponse selon les cultivars, la composition et la concentration du milieu en régulateurs de croissance (Figure 3).

L'analyse de la variance a montré des différences très significatives entre les cultivars pour le taux de multiplication dans les deux milieux. Le taux de multiplication le plus élevé a été enregistré chez le cultivar Teggaza sur le milieu M100 (98,750 ± 0,015) et chez le cultivar Taquerbucht (90,000 ± 0,013) sur le milieu P12,5. Le taux de multiplication le plus faible (51,250 ± 0,029) est enregistré chez le cultivar Deglet Nour (Tableau III).

Tableau III. Effet du milieu de culture sur le taux de multiplication des cals embryogènes chez les trois cultivars après 8 mois de culture

Cultivars	Milieux	
	Taux de multiplication sur M100 (%)	Taux de multiplication sur P12,5 (%)
Deglet Nour	80,000± 0,015 b	51,250± 0,029 c
Taquerbucht	79,250±0,008 b	90,000± 0,013 a
Teggaza	98,750± 0,015 a	84,000± 0,014 b
General Mean	86,000	75,080
p-value	0,001	0,001
LSD	2,010	3,230

Les moyennes ± écart type suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test Least Significant Difference (LSD) au seuil 5%

2.3 Les contraintes de la multiplication

Au cours des repiquages, l'évolution de la multiplication rencontre généralement les difficultés énumérées ci-dessous :

✓ L'infection: deux types majeurs de contaminations sont détectés. La contamination chimique qui est causée par des agents invisibles, donc difficilement détectables. La contamination biologique qui est due à la présence de levures, des bactéries et des champignons est facilement détectable (changement de couleur de l'explant qui devient blanc velouté et de turbidité).

✓ La nécrose (brunissement) : est une entrave récurrente et difficile à éviter, elle se manifeste par un changement de couleur du cal qui atteint d'abord la surface de la coupe en contact avec le milieu, puis s'étend sur la totalité du cal.

✓ La vitrification: les cals vitrifiés sont gorgés d'eau, présentant un aspect translucide et ne croissent plus même sur un milieu frais.

Le contrôle des cultures, 3 à 4 jours après chaque subculture, a permis de déterminer le pourcentage d'infection correspondant à chaque cultivar et cela indépendamment du type de milieu de culture. Il ressort de la figure 4 que le taux de contamination obtenu durant toute l'expérimentation pour les trois cultivars varie de 8 à 17%.

Nos résultats montrent que la production des cals s'est manifestée sur les deux milieux de culture testés et présente des structures callogènes différentes (friable et compacte). En effet l'emploi des différents régulateurs de croissance (2,4-D 100 $mg.L^{-1}$, IPA 3 $mg.L^{-1}$ pour le M100 et picloram

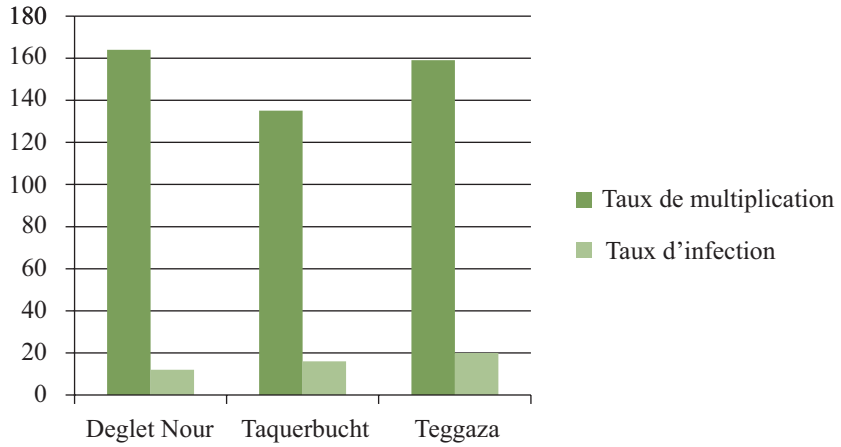


Figure 4. Taux de multiplications de cals embryogènes après 4 subcultures et d'infections des cultures chez les trois cultivars.

12,5 mg.L^{-1}, IPA 1 mg.L^{-1} pour le P 12,5) s'est révélé très efficace pour la multiplication des cals embryogènes. Ces résultats confirment ceux obtenus par Zaid (1989), Yatta (2007), Abed et Yatta (2014) et Al-Khayri et Naik (2017).

L'addition du charbon actif à des quantités différentes, respectivement 3 g.L^{-1} et 200 mg.L^{-1} pour le M100 et le P12,5 s'est révèlé être efficace pour lutter contre l'effet toxique des régulateurs de croissance ajoutées dans les milieux. L'addition de la glutamine à 100 mg.L^{-1} permet une rapidité dans la durée de la formation des cals (de 4 à 6 mois) et paraît contribuer à la multiplication en améliorant leur pourcentage et nature callogènes. Les travaux de Reuveni (1979) ; Reynolds et Murashige (1979) ; Sharma et *al.* (1986) ; Zaid (1989); Letouzé *et al,* (2000) ; Vanneste et Friml (2009) ; Yatta et *al.* (2013 ; 2023) ; confirment que la glutamine à 100 mg.L^{-1} améliore le pourcentage des cals et non pas l'aspect et la taille des cals néoformés. Nos résultats montrent que la multiplication des cals a eu lieu sur des milieux de culture ayant des compositions hormonales identiques à celles des milieux d'initiation. D'après certains auteurs (Mater 1986, Letouzé et *al.,* 1998, Yatta 2007 et Yatta et *al.,* 2014) la multiplication du cal a également donné de bons résultats sur le milieu d'induction.

3. Histologie

L'histologie est employée comme un guide permettant d'apprécier l'évolution

(bonne ou mauvaise) des cals et des cultures au cours du temps. Les coupes histologiques effectuées montrent la présence de cals compacts granulaires visibles à l'œil nu, qui sont constitués de nombreux globules sphériques indépendants d'un diamètre variant entre 300 à 500 µm. Ils sont méristématiques et bien individualisés, à proximité des tissus vasculaires. Les petites cellules de ces îlots méristématiques présentent un noyau et un cytoplasme dense très riche en réserves protéiques intensément colorées en noir par le Naphtol Blue Black (Figures 5 A, B et C). Elles sont entourées par des assisses cellulaires denses et visibles à la périphérie des nodules. Ces zones cellulaires sont le lieu de divisions nombreuses et fonctionnent comme un cambium (pseudo cambium) qui est à l'origine de la croissance des nodules.

Les nodules possèdent trois couches cellulaires concentriques (Figure 5 B) :

- une zone centrale formée de cellules méristématiques,
- une zone intermédiaire constituée de cellules pseudo cambiales en division active,
- une zone périphérique formée de plusieurs assisses cellulaires peu actives.

Les cals compacts sont constitués de la juxtaposition de nodules plus au moins volumineux, reliés entre eux par des cellules peu actives formant un léger mucilage qui permet la cohésion de l'ensemble. Ils se divisent activement entre le 6^{e} et le 12^{e} mois de culture, donnant naissance aux cals souches embryogènes qui sont constituées de cellules embryogènes renfermant de gros noyaux très riches en protéines solubles (Figure 5 C).

Les indicateurs de l'embryogenèse somatique, comme la présence des protéines et les grains d'amidon qui rendent le cytoplasme dense, ne sont décelables qu'à partir du 6^{e} au 10^{e} mois

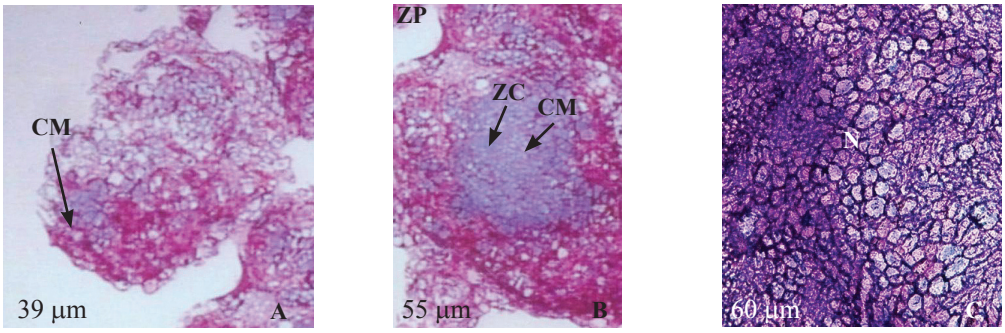


Figure 5. A : Aspect d'un microcal après 12 mois de culture, constitué de cellules méristématiques (CM), **B** et **C** : Aspect de cellules du cal embryogène avec un gros noyau (N).
Légend e: ZC (zone centrale) et ZP (zone périphérique).

de culture, ce qui induit l'expression des cals en embryons somatiques.

L'histocytologie est utilisée comme une complémentarité des techniques de culture *in vitro* pour mieux comprendre les phénomènes cytologiques qui se déroulent tout au long du processus d'évolution, allant de la mise en place de l'explant jusqu'à la formation d'embryons somatiques capables de germer. Les analyses histologiques réalisées, nous ont permis de décrire la nature et l'origine de la callogenèse dans le cœur du rejet du palmier dattier de trois cultivars. Les cals friables présentent une origine superficielle à partir de cellules de l'assise épidermique et sous épidermique des explants par contre les cals compacts naissent à partir de cellules péri vasculaires. L'assise épidermique et sous épidermique, les cellules péri vasculaires sont à l'origine des cals friables. Les cellules péri vasculaires constituent le point de départ des cals nodulaires. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Meguellati (2005). La mise en évidence du rôle joué par les cellules périvasculaires dans la formation des cals avait déjà été observé chez le Cocotier (*Cocos nucifera*), le Cafetier (*Coffea robusta*), l'Hévéa (*Hevea brasiliensis*), le Palmier à l'huile (*Elaeis guineensis Jacq*) et le Palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.) (Schwendimen et *al.,*1988 ; Zaid, 1989). Les cals nodulaires et friables révèlent un pouvoir embryogène non négligeable grâce à la présence de cellules de petite taille (à l'état juvénile) qui ont un rapport noyau/cytoplasme élevé. La détermination du cal embryogène par la petite taille des cellules, avec un cytoplasme riche en petites vacuoles et un gros noyau est un caractère largement rapporté chez le Cocotier (*Cocos nucifera*) (Verdeil et *al.,* 2001).

CONCLUSION

Le secteur phœnicicole, les oasis en particulier subissent sans cesse l'effet de facteurs d'agressions biotique et abiotique. Parmi les difficultés biotiques, l'exposition au Bayoud (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*) qui ravage des palmeraies entières.

L'utilisationdel'outilbiotechnologique fondée sur la technique de culture *in vitro* par embryogenèse somatique constitue sans doute le moyen le plus prometteur pour la reconstitution des palmeraies dévastées via une multiplication massive du palmier dattier.

A travers ce travail, nous avons appliqué une méthodologie permettant la multiplication des cals embryogènes à partir des cœurs de rejets chez les trois cultivars Deglet Nour, Teggaza et Taquerbucht.

Les hormones de croissance utilisées dans les deux milieux de culture (M100 et P12,5) ont des effets importants sur

le développement et la multiplication des cals. La prolifération des cals sur les deux milieux d'initiation était forte.

Ces milieux de culture déjà utilisés pour l'induction des cals, nous ont conférés une multiplication intense de cals friables et granuleux de couleur blanche et blanche-beige et cela après deux subcultures.

L'examen histologique des cals embryogènes, à différents stades de leur culture est très important afin de définir l'état embryogène des cals et leurs capacités de régénération.

Références

Abed F., Yatta D., Amara B. et Yakhou M.S. (2014). Somatic embryogenesis from offshoot of different cultivars of date palm (*Phœnix dactylifera* L.) of three regions of southern Algerian. Biotechnology and conservation of species from arid regions, vol 1. NOVA publishers, New York: 275-286.

Abul-Soad A.A., Jain S.M., Jatoi M.A. (2017). Biodiversity and conservation of date palm. In: Ahuja M.R., Jain S.M. (eds) Biodiversity and conservation of woody plants, Sustainable development and biodiversity, vol 17. Springer, Cham, pp 313-353.

Ait-El-Mokhtar M., Ben Laouane R., Anli M., Boutasknit A., Wahbi S. et Meddich A. (2019). Use of mycorrhizal fungi in improving tolerance of the date palm (*Phœnix dactylifera* L.) seedlings to salt stress. Scientia horticulturae, 253: 429-438.

Al-Khayri J.M. et Naik P.M. (2017). Date palm micropropagation: Advances and applications. Ciênc Agrotec. 41: 347-358.

Barrow S. (1998). A monograph of *Phœnix* L. (Palmae: Coryphoideae). Kew Bull. 53:513.

Bouguedoura N., Si-Dehbi F., Fergani K., Arban A. et Chabane D. (2017). Somatic embryogenesis in date palm (*Phœnix dactylifera* L.) "Deglet Nur" and "Takerbucht" cultivars. The International Journal of Plant Reproductive Biology, 9: 43-48.

Bouguedoura N. (1979). Contribution à la connaissance du palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.). Etude des productions axillaires. Thèse de 3ème cycle, Université des Sciences et de la Technologie d'Alger.

Chabane D., Assani A., Bouguedoura N., Haicour, R., Ducreux G. (2007). Induction of callus formation from difficult date palm protoplasts by means of nurse culture. CR Biologies 330: 392-401.

El Houmaizi M.A. (2002). Modélisation de l'architecture du palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.) et application à la simulation du bilan radiatif en oasis. Thèse de fin d'étude du troisième cycle, Université Cadi-Ayyad, Marrakech au Maroc.

FAOSTAT. (2020). Website of the Food and Agriculture Organisation of the United Nations. 2020. http: //apps.fao.org/

Fergani K., (1998). Embryogenèse somatique du palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.). Cultivar Deglet Nour. Thèse de Magister. USTHB, p117.

Huang L.C. et Murashige T (1983). Tissue culture investigations of bamboo. I. Callus culture of Bambusa, Phyllostachys and Sasa. Bot Bull Acad Sin 24: 31-52.

John E Smith (2004). Biotechnology, Cambridge University press p37-38.

Letouzé R., Daguin F., Hamama L., Paquier K., Marionnet F. et Javouhey M. (2000). Mass micropropagation of date palm (*Phœnix dactylifera* L.) through somatic embryogenesis. Histological study of embryo formation and cultivar identification by RAPD markers. Proceeding of date palm International Symposium. Held in Windhoek, Namibia 22-25 Februry, 55-64.

Letouzé R., Daguin F., Satour P., Hamama L. et Marionnet F. (1998). Somatic embryogenesis mass micropropagation of date palm (*Phœnix dactylifera* L.) and genetic stability of regenerated plantlets by RAPD markers. Proceedings the first international conference on date palm. Al-Ain, United Arab Emirates, March 8-10, 158-167.

Mater A.A. (1986). In vitro propagation of *Phœnix dactylifera* L. Date palm. J. 2, 57 77.

Mazri M.A., Belkoura I., Meziani R., Es-Saoudy H., Rachad F. et Elmaataoui S. (2019). Impact of Osmotica and Plant Growth Regulators on Somatic Embryogenesis of Date Palm. Current Agriculture Research Journal. ISSN: 2347-4688, 7 (3): 296-303.

Mazri M.A., Belkoura I., Meziani R., Mokhless B. et Nour S. (2017). Somatic embryogenesis from bud and leaf explants of date palm (*Phœnix dactylifera* L.) cv. Najda. 3 Biotech, 7 (1): 58.

Meddich A., El Mokhtar M.A., Bourzik W., Mitsui T., Baslam M. et Hafidi M. (2018). Optimizing growth and tolerance of date palm (*Phœnix dactylifera* L.) to drought, salinity, and vascular fusarium-induced wilt

(*Fusarium oxysporum*) by application of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). RootBiology, soilbiology, 52: 239-258.

Meguellati H. (2005). Optimisation de la callogenèse chez le palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.) en vue de l'obtention de suspensions cellulaires et de protoplastes. Thèse de Magister. USTHB, p74.

Munier P. (1973). Le palmier dattier. Paris: Ed. Maison-neuve et Larose.

Reuveni O. (1979). Embryogenesis and plantlets growth of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) derived from callus tissue. Plant Physiol. Suppl. n°63, p138.

Reynolds J. et Murashige T. (1979). Asexual embrogenesis in callus culture of palms. *In vitro*, 15, 5 383-387.

Schwendiman J., Pannetier C. et Michaux-Ferriere N. (1988). Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. Annals of Botany, 62: 43-52.

SedraH., Lazrek H.B. (2013). *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* toxin characterization and use for selection of resistant date palm to Bayoud disease. In: Jain S.M., Al-Khayri J.M., Johnson D.V. (eds) Date palm biotechnology. Springer, Cham, pp 253–270 Sen A, Alikamanoğlu S. (2012) Analysis of drought-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) mutants induced with gamma radiation using SDS-PAGE and ISSR markers. Mutation Res 738-739: 38-44.

Sharma D.R., Dawrak S. et Chowdhury J.B. (1986). Regeneration of plantlets from somatic tissues of the date palm, (*Phœnix dactylifera* L.). C.V "Khadrawi" through tissue culture. Indian Journal of exprimental Biology Vol 24. 763-766.

Verdeil J.L. et Buffard-Morel J. (2001). Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.) In Bajaj YPS, ed. Somatic embryogenesis and synthetic seed I, biotechnology in agriculturae and forestry. Berlin: Springer-Verlag.

Yatta D. (2007). Etude de l'embryogénèse somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et caractérisation moléculaire du matériel végétal initial en vue de l'étude de la conformité des vitroplants. Thèse de Magister en science de la nature, spécialité : Ecobiologie et Amélioration végétal. USTHB. Alger.

Yatta D. et Bouguedoura N. (2013). The Date palm in Algeria. Congress

on Dies Palmarum 2013 - European biennial of palm trees. CSRP (Study and Research Center for the Palm) Sanremo; Italy from December 5-6, 2013.

Yatta El Djouzi D., Abed F., Amara B.,Yakhou M.S. et Benhafsi F. (2014). The genomic DNA structure in somatic embryogenesis of date palm (*Phœnix dactylifera* L.) by flow cytometric, RAPD and AFLP analysis. NOVA publishers New York 1: 241-252.

Yatta El Djouzi D., Al-khayri J.M., Bouguedoura N. (2020). Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of three date palm cultivars. PropagOrnam Plants 20 (1): 28-38.

Yatta El Djouzi D., Khelafi H., Al-Khayri J.M. et Jain S.M. (2023). Mutation Breeding in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). Springer Nature. In book Suprasanna Penna and S. Mohan Jain (Eds): Mutation Breeding for Sustainable Food Production and Climate Resilience pp735- 778.DOI: 10.1007 978-981-16-9720-3-25.

Zaid M., (1989). Embryogenèse somatique chez le palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.). Thèse de Doctorat, Université de Paris Sud. Orsay, France. 92p.