

## Les techniques de micropropagation du palmier dattier : Expérience de l'INRA-Maroc

Anjarne M., Bougerfaoui M. et Abahmane L.

INRA Maroc

**Résumé.** Le développement du palmier dattier connaît actuellement de grandes difficultés à cause de la maladie du Bayoud qui a décimé plus des 2/3 de la palmeraie marocaine. La multiplication *in vitro* constitue la voie la plus prometteuse pour la reconstitution rapide des palmeraies nationales. A l'échelle internationale, l'organogenèse et l'embryogenèse somatique sont les principales techniques utilisées pour la micropropagation du palmier dattier. La multiplication par organogenèse est basée sur l'utilisation des milieux de culture qui favorisent l'initiation et la multiplication des bourgeons à partir de méristèmes pré-existants à la base de jeunes feuilles du cœur du rejet. Ces bourgeons évoluent en plantules complètes qui sont transférées au champ après leur acclimatation. Cette technologie de micropropagation, mise au point au niveau du Laboratoire de Physiologie Végétale (INRA - Maroc), a été transférée au secteur privé où elle a déjà permis la production et la plantation de plus de 350.000 vitroplants appartenant à différents variétés et clones de palmier dattier. Les observations recueillies et relatives aux premières fructifications ont confirmé la stabilité génétique des vitroplants produits via la technique d'organogenèse *in vitro*. La multiplication par embryogenèse somatique consiste en une régénération d'embryons somatiques à partir d'une cal initiée *in vitro*. La germination de ces embryons donne naissance à des plantules acclimatables. La production de vitroplants via cette technique est relativement simple et rapide. Cependant, il a été noté que, chez plusieurs espèces végétales, le passage par la phase callogène peut engendrer des variations somaclonales.

**Mots clés :** Palmier dattier, *Phoenix dactylifera*, Culture *in vitro*, Micropropagation, Embryogenèse somatique, Variations somaclonales.

### Date palm micropropagation: Research achievements in INRA Morocco

**Summary.** The bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* is the most important constraint that hampers development of date palm groves. This disease has destroyed more than 2/3 of Moroccan oasis. The use of micropropagation techniques is the best mean that can allow fast reconstitution of destroyed palm groves. Internationally, two techniques can be used for date palm micropropagation: organogenesis or somatic embryogenesis. Organogenesis is based on the regeneration of vegetative buds from the bottom of the young leaves isolated from the offshoot. These buds can be multiplied to give rise to whole date palm plantlets that can be acclimatized and transferred to soil. This technology was developed in INRA Plant Physiology Laboratory at Marrakech regional center and already transferred to the private sector where it allowed the production of more than 350.000 plants of different varieties and selected clones. Somatic embryogenesis is based on callus initiation and regeneration from meristematic tissues. This callus can be multiplied and produce somatic embryos that germinate and transform into complete plantlets. The use of this technology is simple and easier than organogenesis. However, for many plant species, it is noted that the use of callus is often linked to the appearance of somaclonal variations.

**Key words :** Date palm, *Phoenix dactylifera*, *in vitro* culture, Micropropagation, Somatic embryogenesis, Somaclonal variations

## Introduction

Les palmeraies maghrébines sont actuellement confrontées à de sérieuses contraintes liées principalement à l'insuffisance des ressources en eau, au vieillissement des plantations et à la maladie du Bayoud qui a détruit plus des deux tiers de la palmeraie marocaine. Plusieurs millions de plants de palmier sont nécessaires pour la réhabilitation et l'extension de ces palmeraies. En conséquence, la maîtrise de la multiplication *in vitro*, une technique rapide et efficace pour la production de centaines de milliers de vitroplants, compte parmi les actions nécessaires et essentielles pour le développement des écosystèmes oasiens. Les travaux de recherche entrepris dans ce cadre ont permis la régénération de plantules à partir de tissus de l'embryon zygotique, de plantules issues de semis (ZAID et TISSERAT, 1983), de bourgeons axillaires (DRIRA, 1983; BOUGUEDOURA et al., 1990), des jeunes feuilles du cœur de rejet (BEAUCHESNE et al., 1986; RHISS et al., 1979; AIT CHITT, 1989; ANJARNE et ZAID, 1993; BOUGERFAOUI et ZAID, 1993) et des explants inflorescenciels (LOUTFI, 1989, ABAHMANE, 1998). Dans tous les cas, la technique de régénération utilisée est soit l'embryogénèse somatique, soit l'organogénèse directe.

Le choix de la technique à utiliser pour la multiplication à grande échelle du palmier dattier est d'une importance capitale. En effet, la principale justification de l'utilisation de la micropropagation *in vitro* réside dans la production de vitroplants conformes aux variétés et clones demandés par les agriculteurs. La préservation de cette authenticité variétale est parmi les facteurs déterminants dans ce choix. A l'échelle de l'INRA-Maroc, les recherches sur la micropropagation du palmier dattier ont permis le développement et l'adaptation de différentes techniques de multiplication *in vitro* aux principaux cultivars marocains (ANJARNE et al., 1995). Ces recherches concernent :

- l'organogénèse directe (ou Bourgeonnement adventif) à partir des tissus du cœur de rejet ;
- l'embryogénèse somatique à partir des tissus méristématiques du cœur de rejet ;
- la régénération de bourgeons végétatifs ou de cals à partir des tissus inflorescenciels.

## Multiplication du palmier dattier par organogénèse *in vitro*

La technique d'organogénèse exploite les potentialités méristématiques des bases des jeunes feuilles du cœur de rejet à donner naissance à des bourgeons végétatifs aptes à se multiplier. L'origine préexistante de ces bourgeons confère à cette technique un niveau élevé de conformité génétique des vitroplants produits (AISSAM, 1990). L'obtention de plantules via cette technique suppose l'initiation des bourgeons pour l'établissement des souches réactives, leur multiplication, élongation et enracinement et, l'acclimatation des plantules.

### 1. Etapes de la technique

#### a. Initiation des bourgeons

Les recherches réalisées par notre laboratoire ont montré que la réaction des tissus cultivés *in vitro* dépend de l'interaction de plusieurs facteurs dont les principaux sont l'état physiologique du rejet, le génotype et la composition du milieu de culture. En effet, une grande hétérogénéité de réponse a été observée chez les tissus des différents variétés et clones cultivés *in vitro*. Celle-ci concerne le type de réaction (vitesse de croissance, vitrification, brunissement,...), la durée

nécessaire à l'initiation des bourgeons et le pourcentage d'initiation de bourgeons. En effet, certains génotypes ou groupes de génotypes manifestent parfois des comportements particuliers tels que la vitrification (BOUGERFAOUI, 1998), le brunissement, le verdissement des tissus ou l'émission précoce de racines. En conséquence, la réussite de l'initiation de bourgeons nécessite l'optimisation du milieu, ou de la séquence des milieux de culture, en fonction du génotype et le choix de rejets réactifs et indemnes de contaminations endogènes. Parmi les différents milieux que nous avons testés, ceux dont les équilibres hormonaux sont en faveur des auxines, ont donné les meilleurs résultats quant à l'initiation de bourgeons. Cependant, chez certains génotypes, les milieux auxiniques peuvent parfois engendrer l'initiation précoce de racines et l'apparition de cals hyperhydriques (ANJARNE et ZAID, 1993). Des ajustements du milieu en fonction du comportement manifesté par les tissus s'avèrent donc nécessaires pour orienter les explants vers l'initiation de bourgeons. Par contre, les milieux avec des équilibres hormonaux en faveur des cytokinines ont plus tendance à favoriser le brunissement et la vitrification des tissus. Dans ce cadre, plusieurs études nous ont permis de maîtriser l'initiation de bourgeons chez plusieurs génotypes.

### ***b. Multiplication des souches***

La multiplication des bourgeons dépend du génotype à multiplier et de la composition du milieu de culture. En effet, il a été noté que certains génotypes présentent un coefficient de multiplication élevé, alors que d'autres présentent des problèmes variables. Les recherches entamées dans ce cadre ont permis de développer des milieux de multiplication adaptés à la plupart des variétés et clones de palmier dattier. Ces milieux permettent d'obtenir des coefficients de multiplication de l'ordre de 2 à 4, chez des cultivars tels que Boufeggous, Aguellid, Sayer Laayalat, clone Najda et clone JDFZ. Le problème de la chute de la capacité de régénération des bourgeons observé chez certains génotypes (Mejhool, Bouskri, clone 3002, Bouzeggagh) constitue un handicap pour la multiplication de ces cultivars. Ce phénomène, variable selon les génotypes, se manifeste soit par un verdissement des tissus souvent accompagné d'un allongement des bourgeons soit par une émission précoce de racines (ANJARNE, 1998). Les recherches sur ce phénomène ont permis de développer certains milieux de culture qui améliorent la capacité de régénération de bourgeons ainsi que le taux de multiplication, notamment chez la variété Aziza Bouzid.

### ***c. Elongation et enracinement des bourgeons***

Chez la plupart des génotypes, l'élongation des bourgeons se produit facilement sur le milieu de multiplication. Toutefois, certains génotypes présentent des feuilles fines et chétives et évoluent difficilement en plantules acclimatables. Dans ce cas, des traitements supplémentaires sont nécessaires pour améliorer l'élongation et l'individualisation des bourgeons en plantules. L'apparition de racines a lieu souvent vers la fin de la phase de multiplication. Cependant, chez certains génotypes, le transfert des bourgeons sur un milieu d'enracinement s'avère nécessaire et permet d'améliorer la qualité et la vigueur des plantules produites.

### ***d. Acclimatation des plantules***

La réussite de l'acclimatation des plantules dépend principalement de la maîtrise d'un certain nombre de facteurs, à savoir les conditions de l'environnement lors de l'acclimatation, le substrat utilisé, le stade de la plantule à acclimater, l'irrigation, la fertilisation et la protection

phytosanitaire durant les premières semaines de l'acclimatation. Les études relatives à cette étape ont montré que seules les plantules vigoureuses, ayant 2 à 3 feuilles, un collet bien développé et un système racinaire ramifié, repotées sur un substrat drainant et incubées pendant les premières semaines sous une humidité relative élevée garantissent un pourcentage de reprise de l'ordre de 70 à 85 %. Le pourcentage de reprise en acclimatation est aussi variable selon les génotypes et peut atteindre 90% lorsque les plantules régénérées sont très vigoureuses. Toutefois, chez les génotypes qui présentent des problèmes d'élongation ou d'étiollement, les plantules régénérées sont souvent chétives et leur taux de reprise en serre est très faible.

## **2. Principaux acquis de recherche**

Les travaux de recherche entrepris sur la technique d'organogenèse ont permis d'aboutir à un ensemble de résultats pratiques qui ont contribué à la réhabilitation des palmeraies marocaines. Parmi ces principaux résultats, nous citons :

- Le développement du procédé de multiplication *in vitro* du palmier dattier par organogenèse dans toutes ses étapes de laboratoire et de la serre ;
- L'adaptation de ce procédé de multiplication à plus de 30 cultivars marocains appartenant à différentes variétés et clones sélectionnés ;
- Le transfert de cette technologie de micropropagation au laboratoire privé El Bassatine à Meknès pour servir à la multiplication industrielle du palmier dattier. Les souches bourgeonnantes des différentes variétés et clones sélectionnés livrés à ce laboratoire ont permis la production de centaines de milliers de *in vitro* plants distribués dans les différentes palmeraies ;
- Les clones résistants au bayoud et de bonne qualité dattière (Mabrouk, El Amal, Bourihane) ont été également multipliés et livrés pour la multiplication à grande échelle ;
- Le clone INRA-3014, alliant la résistance au bayoud et la qualité dattière, a été multiplié et distribué aux agriculteurs. Ce clone, évolué en une nouvelle variété appelée Najda, est actuellement en pleine expansion chez les agriculteurs ;
- La collaboration entre l'INRA et le laboratoire El Bassatine a permis jusqu'à présent la production de plus de 350.000 *in vitro* plants du palmier dattier de différentes variétés et clones sélectionnés ;
- Les observations relatives à la production dattière chez les *in vitro* plants confirment la stabilité génétique des plants produits via la technique d'organogenèse. La production des *in vitro* plants en dattes de qualité a engendré l'augmentation de la demande en plants de la part des agriculteurs et des investisseurs.

### **Multiplication du palmier dattier par embryogénèse somatique**

L'embryogénèse somatique est basée sur l'induction de la callogenèse à partir de tissus de jeunes feuilles du cœur de rejet, des bourgeons axillaires ou des jeunes inflorescences. La différenciation d'embryons somatiques prend naissance à partir des cals embryogènes et des plantules complètes sont régénérées à la suite de la germination de ces embryons.

## ***1. Etapes de la technique***

### ***a- Initiation et multiplication des cals embryogènes***

La première étape consiste en l'obtention d'un cal embryogène et dont la multiplication est maintenue par repiquages successifs sur des milieux appropriés. Selon les génotypes, ces cals apparaissent entre le troisième et le sixième mois de culture. Les recherches conduites par notre laboratoire ont montré que différents types d'auxines peuvent être utilisés pour l'initiation de cals à savoir: le 2,4-D, le 2, 4,5-T, le NOA, l'ANA, le Picloram, et le Dicamba. L'utilisation de concentrations élevées en auxines, en présence du charbon actif, permet d'obtenir les cals embryogènes plus rapidement. Toutefois, il s'est avéré que l'utilisation de faibles concentrations en auxines permet également de régénérer des cals embryogènes sans affecter leur capacité à régénérer des embryons somatiques. Chez la plupart des génotypes, la multiplication des cals embryogènes peut être réalisée sans grandes difficultés sur des milieux appropriés. Cependant, cette multiplication doit être raisonnée afin de minimiser les risques d'apparition des variations somaclonales. L'exploitation des potentialités de l'embryogenèse secondaire pour la micropropagation du palmier dattier constitue une alternative pour éviter une multiplication excessive des cals.

### ***b. Régénération et germination des embryons somatiques***

Le transfert des cals embryogènes sur des milieux très pauvres ou dépourvus de régulateurs de croissance favorise la formation des embryons somatiques. Toutefois, seul un faible pourcentage de nodules complète son évolution en embryons somatiques. Ceci peut s'expliquer par l'hétérogénéité du cal qui engendre un développement asynchrone des structures embryogènes formées. En effet, les structures embryogènes qui sont à des stades précoces se réorientent vers la callogenèse au lieu de la germination. La régénération d'embryons peut être améliorée par utilisation de milieux liquides agités au lieu des milieux gélosés. Toutefois, un séjour prolongé en milieu liquide engendre la vitrification des embryons. Les résultats ont montré que malgré l'obtention des embryons, un certain pourcentage n'arrive pas à germer et reste parfois emprisonné dans le sac embryonnaire. Il a été noté que la maturation des embryons à l'aide de certains traitements et aussi suite à la réduction de la teneur en eau des embryons, améliore le pourcentage de germination.

## ***2. Principaux acquis de recherche***

Les études sur l'embryogenèse somatique ont été conduites avec succès chez certains cultivars et les étapes de multiplication via cette technique ont été maîtrisées. Les principaux résultats obtenus dans ce cadre ont permis le développement de la technique de l'embryogenèse et son adaptation à 5 génotypes marocains. Dans ce cadre, l'initiation de cals embryogènes est actuellement possible à partir de différents tissus (base de feuilles, bourgeons axillaires et tissus inflorescentiels). Par ailleurs, la culture cellulaire et la régénération d'embryons somatiques, qui constituent une voie alternative à l'embryogenèse classique, ont été développées dans toutes leurs phases de régénération chez certains cultivars tels que la variété Mejhoul.

### **Multiplication du palmier dattier à partir des tissus inflorescentiels**

Pour palier au problème de manque de rejets chez certains cultivars et plus particulièrement les

têtes de clones sélectionnés, des recherches récentes sur l'utilisation de nouvelles sources d'explants, autres que les rejets, ont montré la possibilité d'utilisation des tissus inflorescentiels pour la multiplication en masse de ces obtentions de l'INRA. En effet, les apex inflorescentiels correspondent à un état transitoire qui n'est pas engagé de manière irréversible dans la voie florale. Ces méristèmes peuvent, sous certaines conditions, être orientés vers la voie végétative. Le succès de cette voie de multiplication réside dans l'utilisation de jeunes inflorescences et la connaissance des facteurs et des conditions favorables à la réversion vers l'état végétatif.

## ***1. Etapes de la technique***

### ***a. Initiation et multiplication de bourgeons***

Les recherches entreprises sur l'initiation et la multiplication de bourgeons, à partir des tissus inflorescentiels, ont montré qu'à l'inverse des tissus de cœurs de rejets, l'initiation de bourgeons végétatifs est conditionnée par l'utilisation des milieux de culture à dominance cytokiniques. En revanche, sur des milieux auxiniques, seul un développement de racines et de carpelles a été observé. En outre, les tissus prélevés sur des jeunes inflorescences sont plus réactifs que ceux issus des inflorescences plus âgées qui ont tendance à former des racines. Par ailleurs, du fait de leur origine florale, la durée nécessaire à l'initiation de bourgeons demeure plus longue et nécessite jusqu'à 10 mois de mise en culture. Outre l'initiation de bourgeons, les explants inflorescentiels manifestent d'autres réactions sous forme de multiplication des pièces florales ou d'apparition de racines. La multiplication des bourgeons néoformés à partir du matériel floral est réalisée sur des milieux à faible concentration en régulateurs de croissance. Au début de cette phase, les bourgeons produisent d'abord des feuilles épaisses et manifestent un faible taux de multiplication durant les premiers transferts. Cependant, ce taux a tendance à s'améliorer avec les repiquages et se stabilise autour de 2 à 2,5 en fonction des génotypes.

### ***b. Elongation et enracinement des bourgeons***

Les bourgeons bien individualisés sont transférés sur un milieu de culture favorable à leur allongement. Parallèlement à cet allongement, le système racinaire commence à se former et à se ramifier. Dans certains cas, le passage par un dernier milieu s'avère nécessaire pour l'amélioration de la qualité des plantules produites.

## ***2. Principaux acquis de recherche***

- Les recherches entreprises dans ce domaine ont permis de réussir les différentes étapes de régénération de bourgeons et leur évolution en plantules complètes chez certains clones sélectionnés ;
- L'initiation de bourgeons a été réussie chez 7 nouveaux clones présumés résistants et de bonne qualité dattière ;
- Des centaines de vitro-plants, produits à partir des tissus inflorescentiels de trois clones sélectionnés sont bien acclimatés et prêts à la plantation au champ ;
- Des dizaines de plants obtenus par cette technique sont plantés au Domaine Expérimental de l'INRA à Zagora pour l'évaluation de leur comportement au champ.

## Références bibliographiques

Abahmane L. 1998. Utilisation des tissus inflorescentiels comme explants pour la micropropagation du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Proceeding de la conférence sur le palmier dattier organisée par le "Réseau de Recherche et Développement du Palmier dattier" ACSAD, Marrakech, Maroc, 16 -18 février 1998, pp: 256-260.

Aissam S. 1990. Observations histologiques sur l'organogénèse et le développement des bourgeons du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) en culture in vitro. Thèse de 3ème cycle de physiologie Végétale, Université Cadi Ayyad, Faculté des sciences de Marrakech, 99 p.

Aitchitt M. 1989. Multiplication du palmier dattier par organogénèse in vitro. Compte rendu du 2ème séminaire maghrébin sur la culture in vitro du palmier dattier, FAO/PNUD/RAB/88/024, Marrakech, 9-12 Octobre 1989.

Anjarne M. 1998. Effect of early rooting on tissue culture of date palm. Proceeding de la conférence sur le palmier dattier organisé par le "Réseau de Recherche et Développement du Palmier dattier", ACSAD, Marrakech, Maroc, 16 -18 février 1998, pp: 237-243.

Anjarne M. Bougerfaoui M., Cheikh R. et Aitchitt M., 1995. Production de vitroplants de palmier dattier par la technique d'organogénèse in vitro: l'expérience marocaine. Proceeding du séminaire international sur la culture du palmier dattier dans les oasis des pays méditerranéens, Elche (Espagne), Avril 25-27, 1995

Anjarne M. et Zaid A. 1993. Effet de certains équilibres hormonaux sur l'enracinement précoce des tissus du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *Al Awamia* N° 82, spécial palmier dattier, pp: 197-210.

Beauchesne G., Zaid A. and Rhiss A. 1989. Rapid propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) through tissue culture. Proceedings of the second symposium on date palm in Saudi Arabia , MARCH 3-6, 1986.

Bougerfaoui M. 1998. Vitrification and its effect on tissue culture of date palm. Proceeding de la conférence sur le palmier dattier organisé par le "Réseau de Recherche et Développement du Palmier dattier" ACSAD, Marrakech, Maroc, 16 -18 février 1998, pp: 230-236.

Bougerfaoui M. et Zaid A. 1993. Effet de la teneur du milieu de culture sur la vitrification des tissus du palmier dattier cultivés in vitro. *AL AWAMIA*, 82, Numéro Spécial palmier dattier.

Bouguédoura N. Michaux-ferriere N. et Bompar J.L., 1990. Comportement in vitro de bourgeons axillaires de type indéterminé du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *Can. J. Bot.*, 68, 2004-2009.

Cheikh R., Zaid A. et Aitchitt M. 1989. Travaux de recherche conduits en embryogénèse somatique chez le palmier dattier. Compte rendu du 2ème séminaire maghrébin sur la culture in vitro du palmier dattier, FAO/PNUD/RAB/88/024 Marrakech, 9-12 Octobre 1989.

Drira N. 1983. Multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par la culture in vitro de bourgeons axillaires et de feuilles qui en dérivent. *C. R. Acad. Sci. Paris.*, Série III, 296, 1077-1082.

Loutfi K. 1989. Multiplication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à partir de la culture in vitro d'explants inflorescentiels. Thèse Doctorat Troisième Cycle, Fac.Sci. Marrakech, 105p.

Rhiss A., Poulain C. et Beauchesne G. 1979. La culture in vitro appliquée à la multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L). *Fruits*, 34(9): pp : 551-555.

Zaid A. et Tisserat B., 1983. In vitro shoot tip differentiation in *Phoenix dactylifera* L. *Date Palm J.*, 2 (2), 163-18.