

Production et analyse moléculaire de vitroplants de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) régénérés à partir de cultures embryogènes traitées aux rayonnements Gamma

R. MZID¹, A. OTHMANI², L. FKI², S. JOUA³, N. DRIRA².

¹ Laboratoire de Physiologie Moléculaire des Plantes (LPMP). Centre de Biotechnologie de Borj Cédria (CBBC). BP901, Hammam-Lif 2050, Tunisie

² Laboratoire de biotechnologies Des Plantes, Faculté des Sciences de Sfax. Route de Soukra Km 3,5, BP 802, 3018 Sfax, Tunisie

³ Department of Biological & Environmental Sciences. Qatar University. P.O. Box 2713, Doha, Qatar

* Corresponding author: r_mzid@yahoo.fr

Abstract - Date palm (*Phoenix dactylifera* L.), is one of the most important cultivated fruit crop. It constitutes the main factor of ecologic and socio economic stability in the Saharan and sub-Saharan areas. Selective assays based on mutagenesis have been investigated and aimed either at the elaboration a fighting strategy against the bayoud plague due to the *Fusarium oxysporum* fsp *albedenis* or to enlarge the biodiversity in this phytogetic resources. Diverse buds and immature inflorescences sampled from the Deglet Nour variety were used to regenerate vitroplants. Embryogenic cals were irradiated by gamma rays in order to induce genomic mutations. Study of the vitroplants' variability was carried out by the help of the random amplified polymorphic DNA method (RAPD). By using universal primers. Data have permitted to produce a large number of vitroplants derived from the treated emryogenic cal.. In addition, the RAPD banding profiles generated using universal primers were nearly similar suggesting that the derived vitroplants are characterised by a gentic stability. Taking in account the observed satbility, we assume that the gamma rays did not induce obvious variations in the date palm's genome.

Keywords: Date palm/ vitroplants/ Gamma rays / RAPD/ genetic stability

Résumé : Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), fait figure à part parmi les espèces végétales cultivées. En effet, il présente pour les régions sahariennes et subsahariennes, une importance écologique et socio-économique considérable. Face aux problèmes posés par le Bayoud, maladie cryptogamique mortelle, causée par *Fusarium oxysporum* fsp *albedinis*, des essais de sélection par mutagenèse induite sont entrepris afin d'enrichir les ressources génétiques et d'améliorer les variétés existantes. des inflorescences femelles ainsi que des bourgeons végétatifs axillaires et apicaux prélevées sur des palmiers adultes de la variété Deglet Nour ont été utilisées pour la régénération de vitroplants. Les cals embryogènes ont été irradiés par des rayonnements ionisants gamma afin d'induire des variations génétiques. L'analyse de la variabilité génétique a été effectuée par la technique d'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD). Les résultats montrent qu'il est possible d'obtenir plusieurs vitroplants à partir des cals embryogènes. En effet les doses d'irradiation 15, 30 et 45 Gy n'affectent pas les capacités morphogénétiques de ces cals. En outre, les profils RAPD générés par les différentes amorces testées en présence de l'ADN cellulaire total issu des différents clones étudiés se sont avérés similaires. Ce résultat témoigne d'une grande stabilité génétique qui caractérise les vitroplants. Tenant compte de la stabilité génétique observée chez tous les vitroplants analysés, nos résultats suggèrent que les rayonnements ionisants de type gamma n'induisent pas de variations génotypiques décelables par la technique RAPD.

Mots clés : palmier dattier / vitroplants/ rayonnements Gamma / RAPD/ stabilité génétique



1. Introduction

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) $2n=36$ (Beal et al. 1973) est une monocotylédone dioïque caractérisée par de grandes capacités d'adaptation aux conditions désertiques. En dépit de la richesse, du germoplasme phoénicien ce dernier se trouve menacé par divers types de stress biotiques (Ferry et Gomez 2002 ; Haddouch 1996 ; Marquez et al. 2008). D'où le grand intérêt de conduire des actions d'amélioration et de sélection de cultivars présentant une bonne qualité dattière et résistants aux pathogènes. Dans ce cadre, plusieurs essais d'hybridation, d'isolement de fusion et de transformation de protoplastes chez le palmier dattier ont été entrepris (Gabr et Tisserat 1984 ; Mousavi et al. 2009, 2014 ; Ream 1975 ; Saaidi et al. 1981). Toutefois, ces méthodes se sont avérées peu efficaces étant donné que les plantes produites n'ont pas préservé les caractères essentiels associés à la plante mère. D'où l'intérêt de la mise en œuvre de nouvelles techniques inductrices de petites modifications de sorte que l'ensemble des caractères recherchés liés au cultivar étudié soient maintenus. Dans cette optique, la transformation génétique, la variation somaclonale ainsi que la mutagenèse constituent des alternatives prometteuses à condition de bien maîtriser la régénération de plantes. En effet, grâce à ces techniques, il est actuellement possible de favoriser une meilleure adaptation aux différents types de stress (Daub et Jenks 1989 ; Freytag et al. 1990). De même, l'exploitation de certaines voies de culture *in vitro* associées à celles de la mutagenèse pourraient répondre aux objectifs fixés. A cet égard, l'action des fortes concentrations des hormones de croissance sur l'induction de variations somaclonales a été rapportée (Bolik et al. 1986 ; Kaepler et al. 2000). La mutagenèse utilisant des agents chimiques et/ou physiques est également susceptible de modifier n'importe quel trait de caractère et de favoriser une meilleure adaptation aux différents types de stress (Ahloowalia et Maluszynski 2001 ; Miah et al. 1966 ; Mike et al., 1990 ; Nakai et al., 1990 ; Silveira et al. 2014). Compte tenu de toutes ces considérations, nous nous sommes fixés comme objectif l'induction de modifications sur le génome du palmier dattier à l'aide de rayonnements ionisants Gamma effectués sur des cultures embryogènes initiées à partir d'inflorescences femelles prélevées sur des pieds adultes dans l'objectif de la validation de ce système au palmier dattier. Par ailleurs, dans le but d'analyser la variabilité susceptible d'être induite sur les vitroplants obtenus, nous avons mis à profit les possibilités offertes par la technique d'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe « RAPD » (William et al. 1990). En effet, cette technique s'est avérée généralement efficace en terme de mise en évidence du polymorphisme moléculaire tant chez les végétaux supérieurs (Al-Khalifah et al. 2003) que chez les animaux (Welsh et al. 1991). Ainsi, nombreuses sont les applications de la RAPD dans le domaine de l'établissement des empreintes génétiques (Erdem et Oldacay 2004 ; Gilbert et al. 1999 ; Khan et al. 2007 ; Lai et al. 2001 ; Othmani et al. 2010). Dans le présent article, nous rapporterons les résultats de l'analyse moléculaire par la technique RAPD de vitroplants de palmier dattier obtenus à partir d'un matériel végétal irradié par des rayonnements gamma. L'effet de ces traitements associé à celui des hormones de croissance est également discuté dans le but d'analyse de la variabilité génétique de ces vitroplants.

2. Matériels et méthodes

2. 1. Matériel végétal

Des inflorescences jeunes de 5 à 10 cm ainsi que des jeunes palmes de taille comprise entre 0,5 et 2 cm issues de bourgeons apicaux sont prélevés au mois de février sur des pieds femelles adultes de Deglet Nour âgés de plus de 20 ans. Les tissus végétatifs et inflorescentiels sont désinfectés à l'aide d'une solution aqueuse de chlorure mercurique à 100 mg/l pendant 60 minutes, puis rincés trois fois à l'eau distillée stérile et transférés sur les milieux de culture. L'analyse moléculaire des vitroplants a été réalisée sur 50 individus choisis arbitrairement à partir de chaque type de culture. Ainsi, un total de 200 vitroplants a servi pour la conduite de cette analyse.

2. 2. Milieux et conditions de culture

Les différents organes sont cultivés pendant les 6 premiers mois à l'obscurité sur différents milieux de culture dont le milieu de base (MB) est celui de Murashige et Skoog (1962), légèrement modifié par Drira (1985). Il s'agit de l'addition du saccharose, de l'adénine et du phosphate de potassium à raison de 50 g.l⁻¹, 30 mg.l⁻¹ et 120 mg.l⁻¹ respectivement. Les variantes de ce milieu, qui diffèrent en particulier par la

nature et la concentration des hormones de croissance, ont été utilisées afin d'orienter les cultures vers les processus morphogénétiques assurant la régénération des vitroplants (Tableau 1). Après l'établissement de cals embryogènes, les cultures sont transférées à la lumière sous une photopériode de 16 heures. l'éclairage est de l'ordre de 15 W/m² (3000 lux), avec une température diurne de 27± 2°C et nocturne de 22 ± 2°C.

2. 3. Irradiation du matériel végétal

L'irradiation effectuée à l'aide d'un rayonnement ionisant gamma (laboratoires de l'Agence Internationale de l'Energie atomique, Vienne, Autriche) est réalisée sur des cultures embryogènes et des souches bourgeonnantes issues d'explants végétatifs et inflorescentielle cv Deglet Nour et initiées sur des milieux renfermant différentes concentration de 2,4-D (Tableau 1).

Tableau 1. Milieux de régénération des différents types de tissus utilisés et les doses d'irradiation employées.

	Matériel végétal	Traitement hormonal	Dose d'irradiation (Gy)
DNA4	inflorescences femelles	MB + 10 mg.l ⁻¹ 2,4 - D	45
DNA5	inflorescences femelles	MB + 10 mg.l ⁻¹ 2,4 - D	30
DNA9	inflorescences femelles	MB +100 mg.l ⁻¹ 2,4 - D + IPA à 3 mg.l ⁻¹	30
DN64	Bourgeons végétatifs axillaires, apicaux et des feuilles qui en dérivent	MB + 0,5 mg.l ⁻¹ 2,4 - D	30
DN 49	bourgeons végétatifs axillaires, apicaux et des feuilles qui en dérivent	MB + 5 mg.l ⁻¹ 2,4 - D	20

Le gray (Gy) est la nouvelle unité de l'absorption physique de la dose d'irradiation 1Gy = 1 J. Kg⁻¹ = 100 rad. Cette dernière est l'ancienne unité avec 1 rad = 10⁻² J. Kg⁻¹.

2. 4. Extraction des acides nucléiques

L'extraction de l'ADN cellulaire total est réalisée à partir de feuilles de vitroplants selon le protocole de Dellaporta et al. (1984). après purification, l'ADN est quantifié par un spectrophotomètre GeneQuant (Pharmacia). Une électrophorèse analytique sur gel d'agarose permet de tester son intégrité. La purification de l'ADN cellulaire total a été également effectuée à partir de vitroplants issus de cultures non irradiées (NI). Celui ci servira de témoin quant à l'effet des irradiations sur les plantes régénérées (I) dans nos conditions expérimentales.

2. 5. Amorces et réaction d'amplification

Dans le but de générer des profils d'amplification aléatoire, nous avons testé plusieurs amorces universelles (Operon technologies, Alemada, USA) issues des kits OPA, OPC, OPD, OPE et OPM en présence des ADNs utilisés comme matrice. Seules les amorces qui amplifient d'une manière reproductible chez le génotype Deglet Nour ont été prise en compte (Ben Abdallaha et al. 2000).

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un volume total de 25 µl contenant : 20 ng d'ADN (1µl), 200 mM du mélange de dNTPs (Pharmacia), 2,5 µl de tampon de la taq DNA polymérase et 2 U de taq DNA polymérase (QBIOgène, France). L'amplification est faite dans un thermocycleur (Crocodile III, QBIOgène, France). L'appareil est programmé pour effectuer une dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C suivie de 35 cycles comportant chacun les étapes suivantes : 30 secondes à 94°C, 1 minute à 35°C, 1 minute à 72°C et une élongation finale de 10 minutes à 72°C. Afin d'assurer la reproductibilité des amplifications, des mélanges majeures comportant tous les composants ont été préparés puis répartis dans les tubes contenant l'ADN matrice. De même, un témoin négatif constitué par le mélange réactionnel sans ADN a été également utilisé. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % (P/V).

3. Résultats

3. 1. Établissement de vitrocultures à partir de cals irradiés

L'établissement d'un tissu indifférencié et homogène aux capacités organogènes et/ou embryogènes évidentes est l'étape cruciale pour la bonne conduite des opérations ultérieures d'irradiation des cals suivie de la régénération des plantes.

3. 1. 1. Induction d'une callogenèse à partir des explants végétatifs et inflorescentiels mis en culture

Elle a lieu lorsque les tissus inflorescentiels jeunes sont ensemencés sur le milieu MB, additionné de 2,4 D à 100 mg.l⁻¹ ou de la combinaison hormonale 2,4 D à 100 mg.l⁻¹ et IPA à 3 mg.l⁻¹. Cette phase d'induction de la callogenèse se déroule à l'obscurité et nécessite un délai de 4 à 6 mois en moyenne.

Après la mise en culture des explants et une phase de latence de 4 semaines environs, nous notons un certain allongement des axes floraux en même temps que leur épaississement avec une individualisation des ébauches florales. Quelques semaines plus tard, une callogenèse est initiée à partir des ébauches florales et de certaines pièces qui les constituent ou encore des pédicelles qui les portent. Cette callogenèse s'intensifie au cours du temps pour atteindre son taux maximum au terme de 5 à 6 mois de culture. Ce sont surtout les cals issus des ébauches florales notamment ceux dérivant de leurs pièces périnthaires qui sont les plus aptes à évoluer ultérieurement en cals granulaires aux potentialités embryogènes marquées. Ce sont précisément ces cals qui sont soumis à plusieurs cycles de multiplication sur des milieux renfermant du 2,4 D à 1 mg.l⁻¹ jusqu'à la constitution d'une souche homogène apte, après irradiation aux rayons gamma, à régénérer des plantes structurées et viables.

Dans le cas des feuilles, au terme d'une phase de latence assez longue de 8 semaines environ, on observe un léger gonflement des tissus, parallèlement à la formation de cals minuscules, localisés souvent dans la région basale des feuilles. Durant les semaines qui suivent, cette callogenèse prend de l'ampleur et les cals montrent des variations morphologiques nettes (Figure 1 A).

En effet, à côté de cals nodulaires et compacts de taille parfois importante, certaines se montrent plutôt friables et de taille plus faible. Ces cals, dont la nature est influencée tant par l'état de différenciation des explants foliaires que par l'environnement hormonal, peuvent néanmoins coexister sur un même explant (Figure 1 B).

Plusieurs conditions hormonales se sont révélées favorables pour la formation de cals embryogènes notamment l'addition du 2,4 - D de 0,5 à 5 mg.l⁻¹ au milieu de base. Toutefois, ces doses ont la capacité de provoquer occasionnellement la formation de bourgeons mêlée à la différenciation d'embryons somatiques. Par ailleurs, il est possible d'induire le développement d'un grand nombre d'embryons par transfert des cals embryogènes dans des milieux liquides agités dépourvus d'hormone. Les embryons dont le développement est plutôt hétérogène se présentent soit à l'état isolé, soit sous forme de petits ensembles constitués de plusieurs embryons accolés les uns aux autres au niveau de leur partie basale.

3.1.2. Capacités morphogénétiques des vitrocultures irradiées

Les cals friables aux capacités embryogènes nettes sont transférées en tubes sur le milieu de base MB dépourvu d'hormones et envoyé à l'agence d'énergie Atomique de Vienne pour être irradiés. Ces cals sont partagés en 4 lots (L1 à L4) et soumis aux doses respectives de 15, 30, 45 et 60 Gy. Si le lot L4 n'a pas survécu à la dose de 60 Gy jugée beaucoup trop forte compte tenu de l'état de nécrose totale des tissus, au terme de 4 semaines de cultures et d'une manière moins accentuée pour le lot L3 avec 45 Gy. Le lot L1 traité à la dose de 15 Gy n'a pas été affecté d'une façon sensible. C'est pourquoi notre étude a porté sur l'analyse du comportement du lot L2 soumis à l'irradiation de 30 Gy. D'autant que cette dose a provoqué l'arrêt de toute prolifération des cals correspondant à la nécrose de certaines de leurs régions. La réponse d'une croissance lente et progressive est assurée à partir de certaines parties localisées des cals ayant échappés aux effets nécrotiques des traitements ionisants aux rayons gamma.

3. 1. 3. Multiplication des cultures irradiées et régénération des plantes

Après irradiation, les cultures sont repiquées sur des milieux de différenciation autant de fois qu'il en faut pour atteindre le nombre désiré de bourgeons ou d'embryons. Cette phase est commune aux deux types d'explants végétatif ou inflorescentiel utilisés. Les milieux employés ainsi que la nature des réponses

enregistrées figurent dans le tableau 2. Les milieux M2 et M3 ont permis le maintien d'une callogenèse relativement intense durant plusieurs repiquages successifs avec tendance des cultures à former des bourgeons mêlés à des embryons somatiques. Le milieu M4 manifeste une tendance plus accusée vers l'organogénèse.

Tableau 2. Composition des milieux utilisés et nature des réponses enregistrées.

milieu	Composition	Nature de la réponse
M2	MB1 + ANA (1 mg.l ⁻¹) + BAP (1 mg.l ⁻¹)	Callogenèse avec développement de bourgeons et d'embryons somatiques
M3	MB1 (sans hormone)	Callogenèse discrète avec développement de quelques embryons
M4	MB2 + ANA (1 mg.l ⁻¹) + BAP (1 mg.l ⁻¹)	tendance à l'organogénèse plus nette des cals

3. 1. 4. La phase d'élongation

La phase d'élongation est réalisée de la même manière pour les deux types de néoformations induites. En effet, les bourgeons et les embryons formés au cours de la phase précédente sont transférés sur un milieu de développement. Ce milieu est caractérisé par la présence du couple ANA (1 mg.l⁻¹) / BAP (1 à 2 mg.l⁻¹), capable de stimuler la néoformation de nombreuses pousses feuillées tout en favorisant davantage leur élongation. Cet allongement des jeunes pousses peut être assuré par des transferts en alternances entre M3 / M2 et M3 / M4. La dernière étape de la culture bien qu'elle ne soit pas indispensable dans notre cas correspond à l'induction de la rhizogénèse, celle-ci est réalisée sur un milieu de base additionné d'AIB (1 mg.l⁻¹) (Figure 1 C).

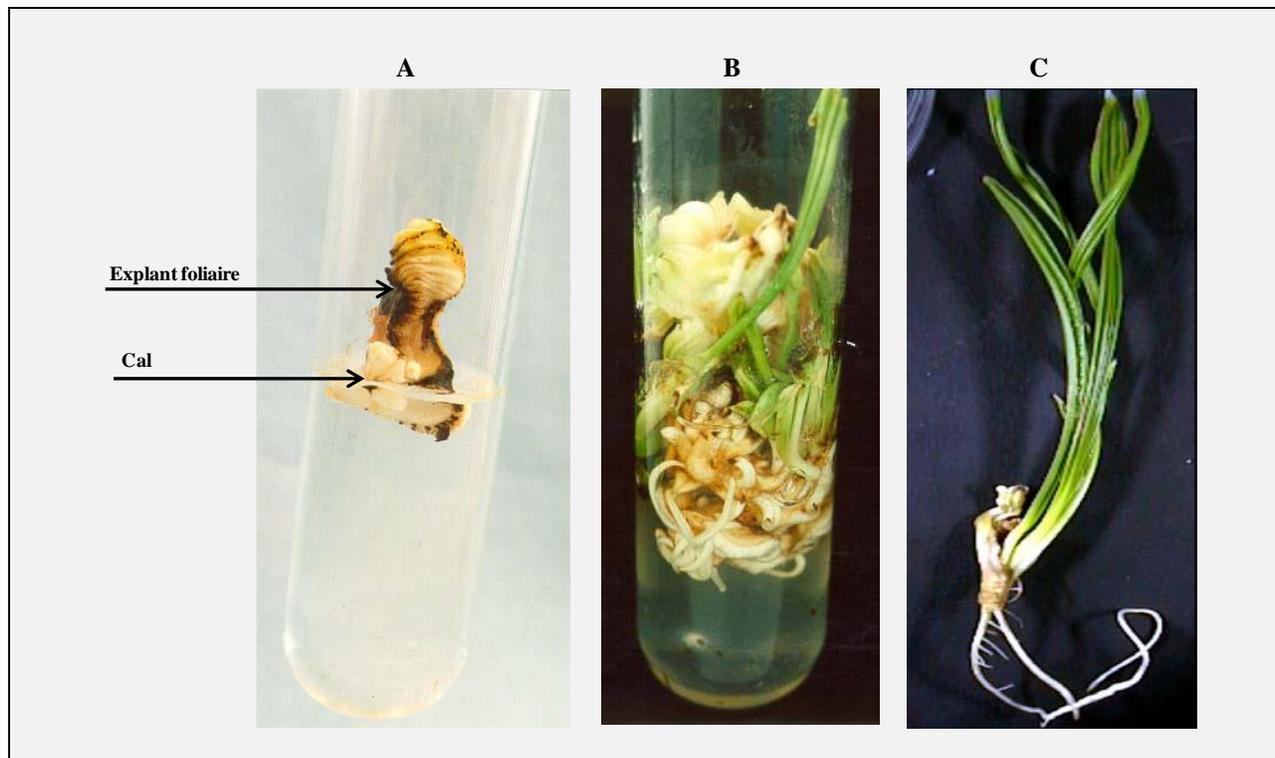


Figure 1. Les différentes étapes de l'établissement de vitrocultures à partir de cals irradiés (A) Jeune palme ayant formé un cal à sa base (B) Pousses feuillées issues du développement de bourgeons en phase de croissance active (C) Vitroplant de Deglet Nour.

3. 2. Analyse moléculaire

Parmi les amorces testées pour leur aptitude à générer des profils d'amplification, seuls neuf ont permis d'obtenir des amplifications reproductibles. Il s'agit des amorces : (OPA04, OPA 07, OPA16, OPC7, OPD05, OPD06, OPD16, OPD19 et OPE16). Des exemples typiques de patterns RAPD sont illustrés dans la figure 2. Dans ces conditions les amorces OPE16 (panel 1 figure 2) et OPD16 (panel 2 et 3 figure 2) ont été utilisées en présence des ADNs matrices purifiées à partir des divers vitroplants. Le clone DN64 constitue de plantes régénérées à partir de cals issus des bourgeons végétatifs axillaires, apicaux et des feuilles qui en dérivent, initiés sur 2,4 - D à 0,5 mg.l⁻¹ et traités par la dose 30 Gy et le clone DNA9 représente des plantes issues de souches inflorescentielles induites sur des milieux de culture renfermant de fortes doses de 2,4 -D (100 mg.l⁻¹) et traitées par une dose de 30 Gy.

Par ailleurs, l'analyse des résultats obtenus montre que selon l'amorce utilisée des différences qui concernent la taille et le nombre de bandes amplifiées sont enregistrées. Ainsi, au total nous avons obtenu (60) pour toutes les amorces testées (Tableau 3). Un minimum de 5 bandes a été généré par les amorces OPA-04 et OPD-06 par contre un maximum de 9 bandes l'a été à l'aide des amorces OPC-7 et OPD-19 avec une moyenne de (6,66) bandes par amorce. Ces résultats témoignent de l'efficacité de la technique RAPD en terme de mise en évidence de la diversité au niveau de l'ADN des vitroplants.

Tableau 3. Les amorces utilisées et le nombre de bandes générées.

Amorce		Nombre de bandes
Code	Séquence	
OPA-04	AATCGGGCTG	5
OPA-07	GAAACGGGTG	7
OPA-16	AGCCAGCGAA	6
OPC-7	GTCCCACGA	9
OPD-5	TGAGCGGACA	7
OPD-06	ACCTGAACGG	5
OPD-16	AGGGCGTAAG	6
OPD-19	CTGGGGACTT	9
OPE-16	GGTACTGTT	6
Total	60	

En outre, selon le type de traitement et quelque soit l'amorce utilisée, les profils d'amplification obtenus se sont avérés aussi bien identiques entre eux qu'à celui du vitroplant témoin. Ce résultat suggère que tous les vitroplants obtenus suite au traitement des cals embryogènes par l'irradiation au rayonnement gamma se caractérisent par une grande stabilité génétique. D'ailleurs, des observations morphologiques sont en faveur de cette suggestion étant donné qu'aucune différence significative n'a été enregistrée chez tous les vitroplants analysés.

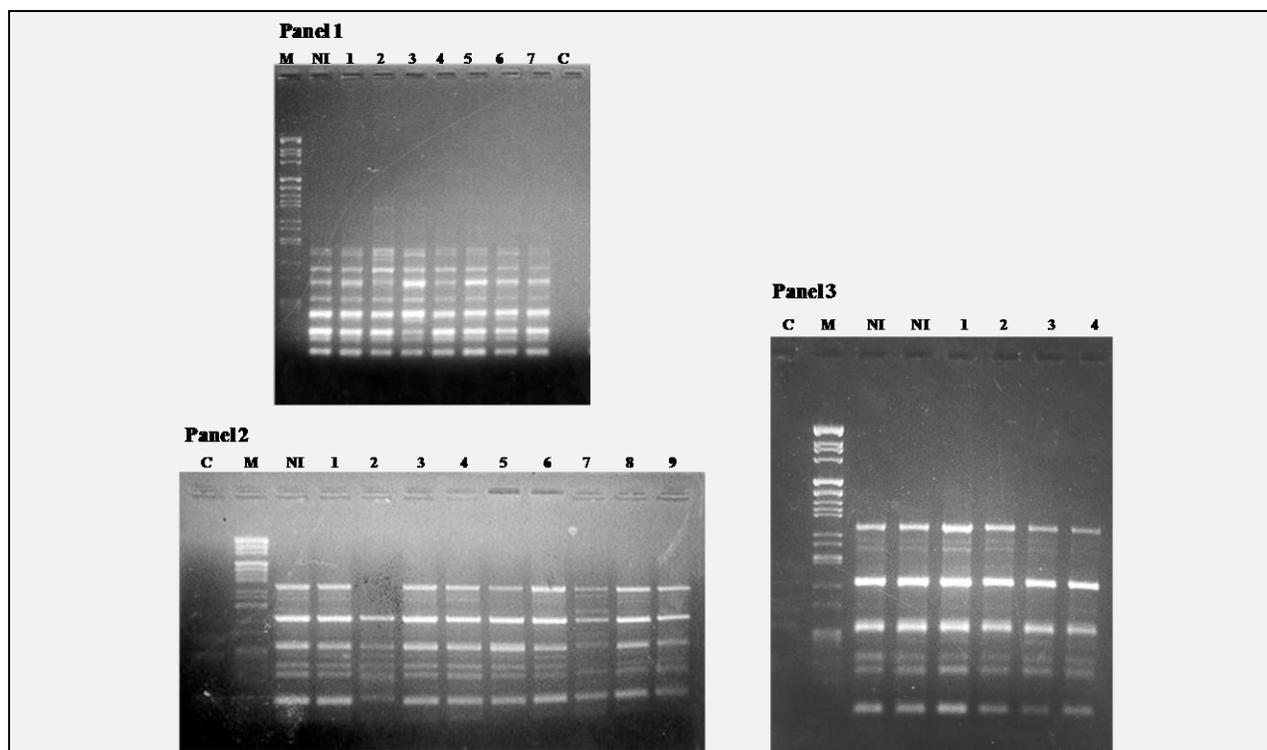


Figure 2. Panel 1. Profil d'amplification RAPD, utilisant l'oligonucléotide OPE16 de 8 échantillons d'ADN de plantes régénérées à partir de cals irradiés DN 64. Voies : (M): ADN du phage λ digéré par HincII; (C) : Témoin négatif ; (NI) : Témoin DN 64 non irradié ; (1-9) : échantillons irradiés DN 64.

Panel 2. Profil d'amplification RAPD, utilisant l'oligonucléotide OPD16 de 9 échantillons d'ADN de plantes régénérées à partir de cals irradiés DN A9. Voies : (C), témoin négatif ; (M), ADN du phage λ digéré par HincII ; (NI), DNA9 non irradié ; (1), DNA9-I-1 ; (2), DNA9-I-2; (3), DNA9-I-3 ; (4), DNA9-I-4 ; (5), DNA9-I-5 ; (6), DNA9-I-6; (7), DNA9-I-7; (8), DNA9-I-8 et (9), DNA9-I-9.

Panel 3. Vérification de certains échantillons. Voies : (C), témoin négatif ; (M), ADN du phage λ digéré par HincII ; (NI), DNA9 non irradié ; (5) et (6), DNA9-I-1 ; (7) et (8), DNA9-I-2.

4. Discussion et Conclusion

L'objectif principal de la présente étude est d'apprécier l'effet de l'irradiation au rayonnement gamma sur la régénération du palmier dattier et l'état de variation des plantes qui en dérivent le tout dans la perspective de la mise en œuvre de cette technique d'amélioration du palmier dattier par induction de mutations utiles. Les résultats montrent que dans nos conditions expérimentales, une intensité d'irradiation de 60 Gy s'est avérée létale puisque une nécrose totale a été enregistrée pour tous les cals traités. Par contre, des doses d'irradiation allant jusqu'à 45 Gy sont tolérées par les cals. En effet, des vitroplants ont pu être obtenus suite à ces traitements.

L'analyse moléculaire des vitroplants ainsi obtenus, montre que ces derniers se caractérisent par une grande stabilité génétique comme en témoignent les profils d'amplification RAPD. Cette propriété a été également rapporté chez cette espèce (Othmani et al. 2010 ; Sakka et al. 2002). En effet, en se basant sur les techniques du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction « RFLP » et de polymérisation enzymatique en chaîne « PCR », l'analyse de plusieurs variétés de palmier dattier montre de faibles divergences aussi bien concernant le génome nucléaire que chloroplastique (Zehdi et al. 2012). Fki et al. 2003 ont décrit l'utilisation de la technique de cytophotométrie de flux pour examiner la ploïdie au niveau de plantules régénérées à partir d'embryons issues de cultures en suspension de le palmier dattier (cv. Deglet Nour) et a révélé que le degré de ploïdie est identique dans la plante mère et sa progéniture in vitro.

Cependant, la stabilité enregistrée s'expliquerait au moins par les deux hypothèses suivantes : (i) le génome du palmier dattier est insensible aux doses des mutagènes physiques ; (ii) la technique adoptée n'est pas suffisamment puissante pour révéler les variations génotypiques. D'ailleurs, les travaux de Rival

et al. (1997), décrivant la RAPD comme étant une technique de détection des lésions très importantes, sont en faveur de cette dernière hypothèse. D'autres études renforcent également cette hypothèse chez cette espèce. En effet, en analysant le polymorphisme des microsatellites nucléaires chez le palmier dattier, les empreintes génétiques des vitroplants de la variété Deglet Nour sont identiques pour 13 locus microsatellites sur 14 testés (Zehdi et al. 2004). Les travaux portant sur le suivi des vitroplants acclimatés ainsi que l'utilisation d'autres techniques plus puissantes sont en cours de réalisation afin d'élucider cette argumentation.

Remerciements

Ce travail a bénéficié du soutien du ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche scientifique et des Technologies de l'Information et de la Communication.

5. Références bibliographiques

- Al-Khalifah NS, Askari E (2003)** Molecular phylogeny of date palm (*Phoenix dactylifera* L) cultivars from Saudi Arabia by DNA fingerprinting. *Theor Appl Genet* 107: 1266-1270
- Beal jm (1973)** Cytological studies in the genus. phoenix *Bot Gaz* 99 : 400-407
- Ben Abdallaha A, Stiti K, Lepoivre P, du ardin P (2000)** Identification de cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par l'amplification aléatoire d'ADN (RAPD). *Cahier Agricultures* 9: 103-107
- bolik m, foroughi-wehr b, kohler f, schuchmann r, wenzel g (1986)** *In vitro* selection for disease resistance in potato and barley. In : Nuclear Techniques and *in vitro* culture for plant Improvement. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 275-285
- Daub ME, Jenns AE (1989)** Field and greenhouse analysis of variation for disease resistance in tobacco somaclones. *Phytopathology* 70: 600-605
- Dellaporta sl, wood j, hicks jb (1984)** Maize DNA miniprep. In molecular Biology of Plants, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, New York, pp 36-38
- Drira N, Benbadis A (1985)** Multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par réversion, en culture *in vitro*, d'ébauches florales de pieds femelles. *J Plant Physiol* 119: 227-235
- Erdem G, Oldacay S (2004)** Employment of RAPD technique to assess the genetic stability of *Helianthus annuus* treated with different mutagenic agents. *J Appl Sci* 4 (2) :277-281
- Ferry M, Gomez S (2002)** The red palm weevil in the Mediterranean area. *Palms (formerly Principes)* 46:172-178
- Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A (2003)** An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Rep* 21:517-524
- Freytag AH, Wrather JA, Erichsen AW (1990)** Salt tolerant sugar beet progeny from tissue cultures challenged with multiple salts. *Plant Cell Rep* 8 : 647-650
- Gabr MF, Tisserat B (1984)** Parameters involved in the isolation, culture, cell wall regeneration and callus formation from palm and carrot protoplasts. *Date Palm J* 3: 359-365
- Gilbert JE, Lewis RV, Wilkinson MJ, Caligari PDS (1999)** Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theor App Genet* 98 : 1125-1131
- Haddouch M (1996)** Situation actuelle et perspectives de développement du palmier-dattier au Maroc. *Options Medit A*-28: 63-79
- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000)** Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43:179-88
- Khan IA, Dahot MU, Dhatri A (2007)** Study of genetic variability in sugar-cane induced through mutation breeding. *Pak J Bot* 35 (8) :1489-1501
- Lai JA, Yang WC, Hsiao JY (2001)** An assessment of genetic relationships in cultivated teas clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. *Bot Bull Acad Sc* 42: 93-100
- Marques J, Fadda ZG, Duran-Vila N, Flores R, Bove JM, Daros JA (2008)** A set of novel RNAs transcribed from the chloroplast genome accumulates in date palm leaflets affected by brittle leaf disease. *Phytopathology* 98(3):337-44
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15: 473-497
- Mike A, Donini B, Maluszynski M (1990)** Induced mutations for crop improvement. *Mut Breed Rev* 7 : 1-41

- Mousavi M, Mousavi A, Habashi AA, Arzani K (2009)** Efficient transformation and expression of gus gene in Somatic Embryos of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) via particle bombardment. *Afr J Biotechol* 8: 3721–3730.
- Mousavi M, Mousavi A, Habashi AA, Dehsara B (2014)** Genetic transformation of date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. ‘Estamaran’) via particle bombardment. *Mol Biol Rep* in press
- nakai h, nakamura k, kuwahara s, saito m (1990)** A new gene, developed through mutagenesis, for resistance of rice to bacterial leaf blight (*Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae*). *J agric Sci cambridge* 111: 309-315
- Othmani A, Rhouma S, Bayouhd C, Mzid R, Drira N, Trifi M (2010)** Regeneration and analysis of genetic stability of plantlets as revealed by RAPD and AFLP markers in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Deglet Nour. *International Research Journal of Plant Science* 1(3):048-055
- Ream CL (1975)** Date palm breeding. *Date Growers Inst Rep* 52: 8-9
- Rival a, bertrand l, beule t, combes m c., trouslot p, lasherms p (1997)** Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Plant Breeding*. 117 73-67
- Saaidi M, Toutain G, Bannerot H, Louvet J (1981)** La sélection du palmier dattier pour la résistance au Bayoud. *Fruits* 36 : 241-249
- Sakka H, Zehdi S, Ould Mohamed Salem A, Rhouma A, Petit RJ, Marrakchi M, Trifi M (2002)** Genetic polymorphism of plastid DNA in Tunisian date-palm gemplasm (*Phaenix dactylifera* L.) detected with PCR-RFLP. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 497-487
- Silveira G, Moliterno E, Ribeiro G, Costa PM, Woyann LG, Tessmann EW, Oliveira AC, Cruz CD (2014)** Increasing genetic variability in black oats using gamma irradiation. *Genet Mol Res*. 4;13(4):10332-40.
- Triki MA, Zouba A, Kouldia O, Ben Mahmoud O, Takrouni MI, Garnier M, Bové JM, Montarone M, Poupet A, Flores R, Daros JA, Fadda ZGN, Moreno P., Duran Villa N (2003)** “Maladie des feuilles cassantes” or brittle leaf disease of date palms in Tunisia: Biotic or abiotic disease?. *Journal of plant Pathology* 85(2) :71-79
- Welsh J, Petersen C, McClelland M (1991)** Polymorphisms generated by arbitrary primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res* 19: 303-306
- Williams GK, Kubelick AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990)** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genitic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535
- Zehdi S, Trifi M, Billotte N, Marrakchi M, Pintaud JC (2004)** Genetic diversity of Tunisian date palms (*Phoenix dactylifera* L.) revealed by nuclear microsatellite polymorphism. *Hereditas* 141 (3): 278–287
- Zehdi S, Cherif E, Rhouma-Chatti S, Santoy S, Salhi Hannachi A, Pintaud JC (2012)** Molecular polymorphism and genetic relationships in date palm (*Phoenix dactylifera* L.): the utility of nuclear microsatellite markers. *Sci Hortic-Amsterdam* 148 : 255–263