

EFFET DE DIFFERENTES DOSES D'IRRADIATION DE COBALT 60 SUR LES CALS EMBRYOGÈNES DE DEGLET NOUR (*Phoenix dactylifera L.*)

F.ABED. - H. SAKA.- B. AMARA.- A. KERMICHE

Laboratoire de physiologie végétale C.R.P. Mehdi Boualem B.P. 37 Baraki Alger

Résumé : *Des souches embryogènes provenant d'explants de rejets de Deglet Nour sont soumises à l'irradiation de rayons Gamma, dans le but de tester leur radiosensibilité et obtenir à moyen terme des mutants résistants au bayoud et de bonne qualité dattière. Six doses sont testées allant de 0 à 30 Gy. La dose de 30 Gy peut être considérée comme étant la dose létale (DL 100). A la dose 25 Gy, la moitié des souches ne survit pas et est considérée comme DL 50. La dose optimale pour l'irradiation des souches est estimée à 20 Gy . Quatre subcultures ont été effectuées pour arriver au stade M1V4, soit 8 mois après l'irradiation. Après leur transfert sur milieu de germination, les embryons bien différenciés ont germé et ont donné des plantules morphologiquement identiques aux plantules témoin.*

Mots clés : *Deglet Nour, souches embryogènes, rayon Gamma, radiosensibilité, DL50, DL100.*

Summary : *The embryogenic calli obtained by explant offshoot of date palm were treated with Gamma rays to test the radiosensitivity of tissues and induce later mutations. Six doses was used from 0 to 30Gy. After one month of post-irradiation culture, the 30Gy dose was evaluated as the lethal dose (DL100). At 25Gy dose , half survival of embryogenic calli was obtained . The optimal dose to irradiate embryogenic calli was estimated at 20Gy . Four subcultures are necessary to obtain the generation of M1V4 which meant 8 months of post irradiation. Differentiated somatic embryos developed into plantlets morphologically identical to control plantlets .*

Key words : *Deglet Nour, embryogenic calli, Gamma rays, radiosensitivity, DL50, DL100.*

INTRODUCTION :

Le palmier dattier est menacé de disparition. Plus de trois millions d'arbres ont été décimés par le Bayoud, maladie due au *Fusarium oxysporum* f. *sp.* *albedinis*. Cette maladie ne cesse de progresser vers le Sud Est du pays et menace les palme-raises des cultivars d'élite comme la Deglet nour, très sensible au Bayoud. Une méthode de lutte contre cette maladie réside dans l'amélioration génétique de l'espèce.

La combinaison des techniques de culture *in vitro* aux radiations pour induire des mutations est considérée comme une méthode rapide et efficace pour l'obtention de nouveaux cultivars (Ahloowalia, 1997). Dès 1976, des traitements mutagènes ont été appliqués à des cultures de tissus pour accroître le nombre de mutations des caractères agronomiques ou de résistance aux maladies (Dix et Street, 1976; Jung, Heiliger et Horn, 1980; Preil et al., 1982, 1983; Broertjes et al., 1983; Broerjtes et Lock, 1985; De jong et Custers, 1986; Walter et Sauer, 1986;). Les mutations peuvent être provoquées par diverses méthodes. Il existe deux types d'agents mutagènes, les agents chimiques et les agents mutagènes physiques.

Les agents mutagènes physiques les plus souvent utilisées sont les rayons gamma (Cobalt 60 ou Cesium 137)

(Basilio DONINI 1991). Les doses et le seuil de sensibilité à l'irradiation varient selon le matériel à irradier (Novak et al, 1986). Cependant, les mutations provoquées par ces agents mutagènes sont très aléatoires et ne peuvent pas être dirigées avec certitude (Boukernous 1986) . A l'exception de Omar M.S. et Novak F.J. (1990), Les exemples de mutagenèse chez le palmier dattier sont inexistantes.

Dans ce présent travail, différentes doses de cobalt 60 seront testées sur des souches embryogènes de Deglet Nour afin de définir le seuil de radiosensibilité et déterminer la dose optimale d'irradiation. Cet essai fait partie d'un projet AIEA régional (Maroc, Tunisie, Algérie), où l'on se propose d'obtenir des variants de Deglet Nour alliant sa qualité dattière à la résistance au bayoud.

MATERIEL ET METHODES :

Matériel végétal :

L'expérience a été réalisée avec des souches embryogènes de Deglet Nour, cultivar de haute qualité dattière mais très sensible au Bayoud, obtenues telles que décrites par Saka et al (1997).

Méthodes :

Après induction de cals embryogènes, cent souches sont soumises à différentes doses d'irradiation de Cobalt 60. Cinq doses d'irradiation ont

été testées (10, 15, 20, 25, 30 Gy). Le témoin est représenté par la dose 0 Gy. Vingt souches sont utilisées par dose. L'irradiation des souches est faite dans des tubes en pyrex sur un milieu frais (le même que celui de l'induction).

L'irradiation du matériel végétal a été effectuée au laboratoire Seibesdorf à Vienne. Une semaine après l'irradiation, les souches embryogènes ont été repiquées sur le même milieu de culture et placées dans les mêmes conditions de culture.

RESULTATS :

Effet des différentes doses d'irradiation après la première subculture :

Après un mois de culture, toutes les souches brunissent. Ce brunissement

s'est accentué pour la dose 30 Gy. Ces souches se sont nécrosées totalement (95,84%) et se sont révélées incapables de réagir à l'exception d'une seule souche. A la dose 25Gy, près de la moitié des souches ne survit pas (47,83%). Pour les doses 10, 15 et 20 Gy, Le brunissement des cals est réversible et la majorité des souches survit (tableau I). On note cependant une nécrose irréversible de 7 souches à la dose 10 Gy, 2 souches à la dose 15 Gy, et 1 souche à la dose 20Gy, ce qui représente respectivement un taux de mortalité de 36,85 , 11,12 et 5,56%.

Tableau I : Effet des différentes doses de rayons Gamma sur les cals embryogènes de Deglet Nour après un mois de culture

| Doses d'irradiation | Nombre de souches irradiées | Nombre de souches restantes | % de mortalité |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|
| 0 | 16 | 16 | 0 |
| 10 | 19 | 12 | 36,85 |
| 15 | 18 | 16 | 11,12 |
| 20 | 18 | 17 | 5,56 |
| 25 | 23 | 12 | 47,83 |
| 30 | 24 | 1 | 95,84 |

Prolifération des cals :

La multiplication des cals irradiés a lieu sur un milieu à plus faible concentration en substances de croissance et placés à l'obscurité. Les subcultures ont lieu tout les deux mois, temps nécessaire pour observer la prolifération des cals. Quatre subcultures ont été effectuées pour arriver au stade que l'on a qualifié M1V4, soit 8 mois après irradiation (tableau II). Dans le

cas du palmier, il est difficile de parler de générations. Dans notre expérimentation, nous avons utilisé la prolifération des cals, c'est à dire les divisions cellulaires ou la prolifération cellulaire à partir de la cellule mère irradiée comme génération. Le cal secondaire aurait pu être considéré comme génération, mais il ne s'est rencontré que dans le cas de la dose 30Gy, où la souche nécrosée restante a produit du cal secondaire.

Tableau II : Prolifération des cals embryogènes de Deglet Nour jusqu'à la quatrième subculture

| Doses d'irradiation (Gy) | Nombre initial de souches irradiées | Nombre de souches restantes à la 1ère subculture | Nombre de souches obtenues après les 4 subcultures | Particularité des cals obtenus |
|---------------------------------|--|---|---|--|
| 0 | 16 | 16 | 30 | Cals friables + ou - vitrifiés. |
| 10 | 19 | 12 | 16 | Cals hétérogènes : vitrifiés + ou - friables + cals noduleux |
| 15 | 18 | 16 | 22 | Cals hétérogènes : vitrifiés + ou - friables + cals noduleux |
| 20 | 18 | 17 | 67 | Cals friables et granuleux. |
| 25 | 23 | 12 | 25 | Cals friables et granuleux. |
| 30 | 24 | 01 | 01 | Cals secondaires de texture lâche. |

Germination des embryons :

Les cals embryogènes obtenus sont alors placés sur milieu de germination dépourvu de substance de croissance à une photopériode de 16 heures. Après 6 mois de culture, les embryons bien différenciés se sont développés et ont

donné des plantes. A la dose 10 et 15 Gy les embryons bien différenciés ont germé pour donner des plantules vertes. On observe du cal qui évolue soit en racines (46 et 45%) soit se nécrose complètement sans aucune évolution. (voir tableau III).

Tableau III : Effet des différentes doses d'irradiation sur la germination des embryons somatiques.

| Dose en Gy | Nbre * d'E.S.en germination | Nbre E.S.germés | | De Plantes vertes+racine | | Cotylédons soudés+racine | | Racines seulement | |
|------------|-----------------------------|-----------------|------|--------------------------|------|--------------------------|------|-------------------|------|
| | | N** | ***% | N | % | N | % | N | % |
| | | 0 | 15 | 10 | 66,6 | 9 | 60 | 1 | 6,6 |
| 10 | 15 | 8 | 53,3 | 9 | 60 | 7 | 46,6 | 7 | 46,6 |
| 15 | 22 | 10 | 45,5 | 7 | 31,8 | 10 | 45,4 | 10 | 45,4 |
| 20 | 50 | 20 | 40 | 20 | 40 | 13 | 26 | 0 | |
| 25 | 15 | 10 | 66,6 | 10 | 66,6 | 4 | 26,6 | 0 | |
| 30 | 01 | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | |

* Nombre d'embryons somatiques en germination.

** Nombre d'embryons somatiques ayant germé.

*** Pourcentage d'embryons ayant germé.

DISCUSSION - CONCLUSION :

L'irradiation des cals embryogènes de palmier dattier a permis de déterminer le seuil de sensibilité ou de radiosensibilité. Après un mois de culture, les souches irradiées à la dose 30 Gy, se sont nécrosées totalement et se sont révélées incapables de réagir à l'exception d'une seule, ce qui révèle que la dose toxique ou proche de la létale (DL 100) se situe à partir de 30 Gy. A la dose 25 Gy, la moitié des souches ne survit pas. La DL 50 serait cette dose. Pour les doses 10, 15 et 20 Gy, Le brunissement des cals est réversible et la majorité des souches survit, ce qui montre que les cals résistent à ces doses. Les résultats ont montré des sensibilités différentes des souches aux doses d'irradiation, ainsi sur les doses 10 et 15 Gy le pourcentage de mortalité variait respectivement de 36,85% à 11,12%, alors que pour une dose plus élevée 20Gy on enregistre 5,56% (tableau I).

Le cal irradié en prolifération se présente comme étant hétérogène. Un mélange de cal embryogène et de cal non embryogène sont présents sur une même culture. Ceci a été rapporté pour diverses espèces (Tomes, 1885 ; Cai et Butler, 1990) et se traduit par une évolution du cal en racines ou à un type de cal qui n'évolue pas.

Les résultats obtenus durant la prolifération des cals irradiés ont montré

qu'avec les doses 10 et 15 Gy, le taux de prolifération est de 1,3 alors que sur les doses 20 et 25 Gy, le taux de prolifération est respectivement de 3 et 2. Ceci nous laisse supposer que les cals irradiés présentaient une hétérogénéité des stades de différenciation cellulaire. Cette sensibilité des cals à des doses décroissantes peut s'expliquer par une densité cellulaire différentes, ou par le fait que certains cals sont en phase de multiplication ou en phase de différenciation. En effet, Devreux et al (1986), montre qu'une population de protoplastes à forte densité cellulaire sont moins radiosensibles que ceux à une faible densité. Leurs résultats montrent aussi sans ambiguïté que les cals en différenciation sont plus sensibles que ceux qui ne font que se multiplier activement.

L'asynchronisation de la germination des embryons somatiques est observée pour les cultures témoins ainsi que sur les échantillons traités. Les plantes vertes obtenues ne sont pas différentes morphologiquement de celles obtenues avec le témoin. Cependant, certaines anomalies ont été observées au cours de la germination chez les embryons irradiés aux différentes doses. Quarante cinq pour cent des embryons somatiques en germination ont donné des racines seulement sur les doses 10 et 15 Gy alors que ce phénomène ne s'est pas rencontré à dose 0 Gy. L'obtention de cotylédons soudés racinés était de 45% aux doses 10 et 15 Gy, de 26%

aux doses 20 et 25 Gy alors qu'il est de 6,6 % pour le témoin. D'après les résultats obtenus, et malgré l'hétérogénéité observée sur la prolifération des cals et la germination des embryons somatiques, les cals embryogènes de palmier dattier supportent une dose de rayonnement allant jusqu'à 20 Gy. Des études similaires sur des cultures *in vitro* de palmier dattier au Maroc et en Tunisie, sur des cultivars différents, des stades de différenciation divers, ont montré que la dose d'irradiation se situait autour de 20 Gy (Rapport AIEA résultats non publiés).

Novak et al (1986) et Donini (1991) situent la dose d'irradiation au rayon Gamma proche de la dose DL50, où 50% du matériel irradié a survécu, ce qui confirme les résultats obtenus.

Le but de ce travail est d'arriver à déterminer la dose radiosensible, et de suivre l'effet des doses d'irradiation sur les étapes de l'embryogenèse somatique de la Deglet Nour. La dose létale où l'on observe une nécrose irréversible de la totalité des cals embryogènes est de 30 Gy et représente la DL 100. La dose DL 50 où la moitié des cals irradiés survivent est de 25 Gy.

Cependant, les souches restantes prolifèrent et les embryons somatiques en germination ont donné des plantes entières. A la suite de ces résultats, des études complémentaires

sont à mener pour améliorer le processus d'obtention de souches embryogènes homogènes et poursuivre les travaux qui visent l'obtention de variants alliant qualité dattière et résistance au Bayoud.

Références Bibliographiques :

- Ahloowalia B.S. 1997.** Improvement of horticultural plants through in vitro culture and induced mutations Hort. Biotech. In vitro Cult. And Breeding Eds. A. Altman, M.Ziv Acta Hort.- pp 447 .
- Basilio Donini, 1991.** Mutagenesis applied for the improvement of vegetatively propagated plants. II. Technical aspects of mutagenic treatment. FAO/ IAEA Interregional training course on the induction and use of mutations in plant breeding
- Broertjes, C., Koene, P., Pronk, T. 1983.** Radiation-induced low-temperature tolerant cultivars of *Chrysanthemum morifolium* Ram. Euphytica 34, 97-101
- Broertjes, C., Lock, C.A.M. 1985.** Radiation-induced low-temperature tolerant solid mutants of *Chrysanthemum morifolium* Ram. Euphytica 34, 97-103
- Boukernous, B. 1986.** Etude d'un nanisme récessif induit par mutagenèse chez le Tournesol (*Helianthus annuus, L.*). Quelques aspects génétiques, physiologiques et agronomiques. Thèse de Docteur-Ingénieur : Amélioration des plantes, Orsay n°736 1986.
- Cai T., Butler L.-1990.** Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of several high-tannin sorghums. Plant Cell, Tissue and Organ culture 20 :101-110

- De Jong, J.B.M. 1985.** Induced changes in growth and flowering of *Chrysanthemum* after irradiation and culture of pedicels and petal epidermis. *Euphytica* 35, 137-148.
- Devreux M., Magnien E., Dalschaert X. 1986.** Cellules végétales in vitro et radiations ionisantes in Nuclear techniques and in vitro culture for improvement AIEA/FAO 1985
- Dix,P.J., Street,H.E. 1976.** Selection of plant cell lines with enhanced chilling resistance. *Ann. Bot.* 40, 903-910.
- Horn, W. 1984.** Treating *in vitro* cultures of floriculture crops with mutagens. *Mutation Breeding Newslett.* Nr 24, 13-15.
- Jung-HeiLiger, H., Horn, W. 1980.** Variation nach mutagener Behandlung von Stecklingen und in vitro-Kulturen bei *Chrysanthemum*. *Z. f. Pflanzenzüchtg.* 85, 185-199. In *Vitrovariation et selection in vitro. Biotechnologies végétales UNISAT 1996*
- Novak, F.J., Afza, R. Daskalov, S., Hermelin, T., Lucretti, T. 1986.** Assessment of somaclonal and radiation-induced variability in maize In *Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement AIEA / FAO* p 29- 33
- Novak,F.J., Afza R., Phadvibula V., Hermelin T. Brunner h; Donini B. 1986.** Micropropagation and radiation sensitivity in shoot-tip cultures of banana and plantain In *Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement AIEA/FAO* p 167-174
- Omar M.S., Novak F.J. 1990.** In vitro plant regeneration and ethylmethanesulphonate (EMS) uptake in somatic embryos of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* Vol 20 N° 3 p 185-190
- Rapport Technique AIEA/ FAO-1997.** Projet Control of bayoud disease of date palm- 4° rapport 1997.
- Saka H., Abed F., Amara B., Kermiche A. 1997.** Embryogenèse du palmier dattier :I - Induction de la callogenèse à partir d'organes de rejets de quelques cultivars. *Recherche Agronomique, n° 0 , p 1-8 .*
- Tomes DT, 1985.** Cell culture, somatic embryogenesis in maize ,rice and sorghum. In : Bright SWJ, Jones MGK (eds) *Cereal tissue and cell culture* p175-203
- Walter, F., Sauer,A. 1986.** Analysis of radio-sensitivity : A basic requirement for in vitro somatic mutagenesis In : *Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement AIEA/FAO* p 155-159