

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie Végétale

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا و علم البيئة النباتية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : *Biotechnologie et Génomique Végétale*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Utilisation des marqueurs SSRs dans l'identification du sexe chez le
palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)**

Présenté par : BENHAMADA Imen
BOUGHEDDAD Amina

Le 25/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : BOUCHEMAL Karima (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur 1 : LOUALI Yamouna (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur 2 : HAMPLA Chourouk (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire
2021 - 2022

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère :

*A mes chères parents **Abd El-Krime** et **Nassima** qui m'ont appris le sens des responsabilités, l'optimisme et la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Leurs conseils ont toujours été ce qui m'a guidé vers le succès. Leur patience, leur compréhension et leurs encouragements sans fin sont pour moi le soutien indispensable qu'ils ont toujours su m'apporter. Je leur dois qui je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester leur fierté et ne jamais les décevoir.*

*A ma chère sœur **Nesrine** qui n'a pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.*

*A mon chère frère **Abd El-Fatah** pour son aide et support dans les moments difficiles.*

*A mon adorable petit frère **Abd El-Mouiz** qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.*

*A tous mes ami(e)s, et spécialement **Aya** mon amie adorable et fidèle.*

*Sans oublier mon binôme de travail, **Amina** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce stage.*

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

- Amen -

Dédicace

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude, à tous ceux qui ont sacrifié pour m'offrir les conditions propices à ma réussite :

*Mon très cher papa **Azzeddine**, l'homme de ma vie, tu a toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour. Mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, J'implore Dieu, le tout puissant, de t'accorder une bonne santé, une longue vie et beaucoup de bonheur.*

*A ma très chère maman **Baghddad oulia**, la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore. Puisse Dieu, le tout puissant te combler de santé, de bonheur et te procurer une longue vie.*

*A mes frères **Amir** et **Seif eddine** Pour leurs encouragements et soutient tout au long de mes études. Je leurs souhaite tout le bonheur et la réussite.*

*A ma famille, mon cher oncle **Bougheddad Abdelhamid** et mes chères tantes. Que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.*

A tous les cousins, les voisins et les amis que j'ai connu jusqu'à maintenant.

*A ma très chère binôme, **Benhamada Imen**, et toute sa famille, Je lui souhaite de réussir et d'être heureuse dans sa vie.*

-Amina-

Remerciements

En tout premier lieu, nous remercions le bon Dieu, tout puissant, pour la patience et la santé qui nous ont été utiles tout au long de notre parcours.

Avant tout développement sur cette expérience enrichissante, autant sur le plan scientifique qu'humain, il apparaît opportun de commencer ce rapport de stage par des remerciements, à ceux qui nous ont beaucoup appris au cours de ce stage, et même à ceux qui ont eu la gentillesse de faire de ce stage un moment très profitable :

*Nous ne trouvons pas les mots pour exprimer notre gratitude envers notre encadrante **Melle. BOUCHEMAL Karima** maître de conférences 'B' à l'université des frères Mentouri Constantine 1. Ses conseils et ses encouragements ont permis à ce travail d'aboutir. Ses capacités scientifiques et ses compétences étaient notre grand support. Faire notre travail sous sa direction était pour nous un grand honneur et un immense bonheur. La liberté qu'elle nous a accordée et les responsabilités qu'elle nous a confiées ont beaucoup contribué à la formation de nos personnalités et à notre autonomie de travail.*

*Nous savons gré également aux membres du jury, **Mme. LOUALI Yamouna** et **Melle. HAMLA Chorouk** maîtres de conférences 'B' à l'université des frères Mentouri Constantine 1, qui ont eu l'obligeance d'accepter d'évaluer ce travail.*

*Nous tenons à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (GBBV) où nous avons été affiliées à la thématique du palmier dattier durant notre stage de M2 : **Mr. BELBEKRI Med Nadir** et **Mme. BOULDJEDJ Ryma** pour leur aide et leur disponibilité.*

*Nos vifs remerciements s'adressent également à **Mr. BENBELKACEM A**, Directeur de recherche de l'Institut national de la recherche agronomique d'Algérie (INRAA) et **Mr BOUZID** de l'INRAA de Adrar pour leur aide à l'octroi des variétés de palmier dattier pour ce travail.*

*Un grand merci à **Melle. MOUELLEF Adra**, maîtres de conférences 'B' à l'université des frères Mentouri Constantine 1. Ses conseils nous ont aidés à surmonter beaucoup de difficultés. Nous la remercions chaleureusement pour sa pédagogie, sa patience, sa disponibilité et son dévouement.*

Dans l'impossibilité de citer tous les noms, nos sincères remerciements vont à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont permis par leurs conseils et leurs compétences la réalisation de ce mémoire

*Enfin, nous n'oserais oublier de remercier tout le corps enseignant de la filière **Biotechnologie et génomique végétale**, pour le travail énorme qu'il effectue tout au long de l'année, afin nous créer les meilleures conditions pour le bon déroulement de nos études. Merci...*

Utilisation des marqueurs SSRs dans l'identification du sexe chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.).

Résumé

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est espèce dioïque, caractérisée par des fleurs unisexuées situées sur des arbres mâles ou femelles séparés. La dioïcité a toujours été un problème dans la sélection des palmiers dattiers, car le sexe de la plante ne peut être connu qu'une fois qu'elle a atteint son stade de reproduction, qui prend 5 à 8 ans pour la première floraison. Par conséquent, l'identification précoce du sexe peut améliorer le succès de la reproduction et de l'amélioration génétique du palmier dattier. Les marqueurs microsatellites contenant des séquences simples répétées (SSR) sont un outil précieux pour l'analyse génétique. Dans la présente étude, 5 amorces microsatellites ont été utilisées sur 15 cultivars de palmiers dattier locaux. Seulement 3 paires d'amorces ont été amplifiées et leurs produits d'amplification ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les profils électrophorétiques obtenus des trois marqueurs SSR, n'ont pas montré de traits distinctifs entre les génotypes mâles et femelles. Notre étude a été donc réorientée vers une analyse de la diversité génétique des cultivars étudiés. Les résultats montrent que les différents génotypes présentent peu ou pas de polymorphisme avec les deux marqueurs SSR mPdCIR16, mPdCIR32. Cependant, un total de 18 allèles a été identifié avec le marqueur mPdCIR70 avec un taux de polymorphisme de 90%. L'analyse UPGMA qui a montré une structure génétique conservée pour les trois génotypes mâles et les deux génotypes femelles GHE et TINA, suggère que ces pollinisateurs mâles pourraient être nommés comme le type femelle de ces deux cultivars. Cette approche moléculaire a permis également, d'identifier le marqueur mPdCIR70 comme marqueur candidat dans l'analyse de la diversité génétique des palmiers dattiers.

Mots clés : Palmier dattier ; Marqueurs SSR ; Diversité génétique ; Extraction d'ADN ; Cultivars ; Sélection

Sex identification in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) using SSRs Markers

Abstract

The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is a dioic species, characterized by unisexual flowers on distinct male or female trees. Dioicity has always been a problem in the selection of date palms, as the sex of the plant can only be known once it has reached its reproductive stage, which takes 5 to 8 years for the first flowering. Therefore, early sex identification can improve breeding success and genetic enhancement of date palm. Microsatellite markers containing simple sequence repeats (SSR) are a valuable tool for genetic analysis. In this study, 5 microsatellite primers were used on 15 local date palm cultivars. Only 3 pairs of primers were amplified, and their amplification products were revealed by electrophoresis on agarose gel. The electrophoretic profiles obtained from the three SSR markers did not show distinctive traits between male and female genotypes. Our study has therefore been reoriented towards an analysis of the genetic diversity of the cultivars studied. The results show that the various genotypes show little to no polymorphism with both of mPdCIR16, mPdCIR32 SSR markers. However, a total of 18 alleles have been identified with the mPdCIR70 marker with a 90% polymorphism rate. The UPGMA analysis, which showed a conserved genetic structure for the three male genotypes and the two female GHE and TINA genotypes, suggests that these male pollinators could be named as the female type of these two cultivars. This molecular approach also enabled the mPdCIR70 marker to be identified as a candidate marker in the analysis of the genetic diversity of date palms.

Keywords : Date palm ; SSR markers ; Genetic diversity ; ADN extraction ; Cultivars ; Selection

تحديد الجنس عند نخيل التمر (*Phoenix dactylifera* L.) باستخدام مؤشرات ال SSRs

ملخص

نخيل التمر هو نوع ثنائي الجنس يتميز بأزهار أحادية الجنس تقع على أشجار منفصلة للذكور والإناث. لطالما كانت الازدواجية مشكلة في اختيار نخيل التمر، حيث لا يمكن معرفة جنس النبات إلا بعد وصوله إلى مرحلة التكاثر، والتي تستغرق من 5 إلى 8 سنوات لأول إزهار. لذلك، يمكن أن يؤدي التعرف المبكر على الجنس إلى تحسين نجاح التكاثر والتحسين الوراثي لنخيل التمر. تعد علامات (SSRs) أداة قيمة للتحليل الجيني. في هذه الدراسة تم استخدام 5 بادئات ميكروسات على 15 صنفاً محلياً من نخيل التمر. تم تضخيم 3 أزواج فقط من البادئات وتم الكشف عن نواتج تضخيمها عن طريق الرحلان الكهربائي لهلام الاغاروز. لم تظهر الملامح الكهربائية التي تم الحصول عليها من العلامات الثلاثة أي سمات مميزة بين الأنماط الجينية للذكور والإناث. لذلك أعيد توجيه دراستنا نحو تحليل التنوع الجيني للأصناف المدروسة. تظهر النتائج أن الأنماط الجينية المختلفة لها تعدد أشكال قليل أو معدوم مع علامتي mPdCIR16 mPdCIR32 SSR. ومع ذلك، تم تحديد مجموعة 18 أليلاً بعلامة mPdCIR70 بمعدل تعدد الأشكال الذي بلغ 90%. يشير تحليل UPGMA، الذي أظهر بنية جينية محفوظة للأنماط الجينية الذكورية الثلاثة والأنماط الجينية الأنثوية GHE وTINA، إلى أنه يمكن تسمية هذه الملقحات الذكور على أنها النوع الأنثوي من هذين الصنفين. هذا النهج الجزيئي جعل من الممكن أيضاً تحديد علامة mPdCIR70 كعلامة مرشحة في تحليل التنوع الجيني لنخيل التمر.

الكلمات المفتاحية: نخيل التمر، علامات SSR، التنوع الجيني، استخراج الحمض النووي، أصناف، تحديد.

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Chapitre I. Synthèse bibliographique

| | |
|--|----|
| Introduction générale..... | 1 |
| I. Généralités sur le palmier dattier | 3 |
| 1. Origine et historique du palmier dattier | 3 |
| 2. Classification taxonomique | 4 |
| 3. Répartition et importance du dattier dans le monde et en Algérie | 6 |
| 3.1. Dans le monde..... | 6 |
| 3.2. En Algérie | 8 |
| 4. La botanique du palmier dattier..... | 10 |
| 4.1. L'appareil végétatif..... | 11 |
| 4.2. Le système racinaire..... | 11 |
| 4.3 L'appareil de reproduction..... | 12 |
| 5. Le cycle de développement du palmier dattier..... | 14 |
| 6. Méthodes de multiplication du dattier | 15 |
| 6.1. Multiplication par semis des graines (noyaux) | 15 |
| 6.2. Multiplication par plantation des rejets ou 'djebbars ou rkebs' | 15 |
| 6.3. Multiplication par culture des tissus <i>in vitro</i> | 16 |
| 7. Le génome de <i>Phoenix dactylifera</i> | 16 |
| II. Vers la détermination du sexe chez le palmier dattier..... | 17 |
| 1. Identification morphologique (traditionnelle) | 18 |
| 2. Identification biochimique..... | 19 |
| 3. Identification chromosomique | 21 |
| 4. Identification moléculaire..... | 23 |

Chapitre II. Matériels et méthodes

| | |
|--------------------------|----|
| 1. Matériel végétal..... | 27 |
|--------------------------|----|

| | |
|--|----|
| 2. Méthodes expérimentales | 27 |
| 2.1. Isolement et purification de l'ADN génomique | 27 |
| 2.2. Contrôle de la qualité d'ADN | 29 |
| 2.3. Analyse quantitative des ADN extraits | 29 |
| 2.4. Dilution des ADN | 29 |
| 2.5. Choix des marqueurs moléculaires utilisés | 30 |
| 2.6. Amplification de l'ADN par PCR | 30 |
| 2.7. Séparation des marqueurs SSR par électrophorèse | 31 |
| 2.8. Traitement des données et analyse statistique | 31 |

Chapitre III. Résultats et discussion

| | |
|---|----|
| 1. Résultats d'extraction de l'ADN | 32 |
| 2. Résultats de l'amplification par la technique PCR-SSR | 32 |
| 2.1. Résultat d'amplification des marqueurs mPdCIR010 et mPdCIR85 | 32 |
| 2.2. Résultat d'amplification des marqueurs mPdCIR016, mPdCIR32 et mPdCIR70 | 34 |
| 3. Analyse des profils électrophorétiques des marqueurs SSR | 36 |
| 3.1. Analyse du profil électrophorétique du marqueur mPdCIR32 | 36 |
| 3.2. Analyse du profil électrophorétique du marqueur mPdCIR16 | 36 |
| 3.3. Analyse du profil électrophorétique du marqueur mPdCIR70 | 37 |
| Conclusion..... | 39 |
| Références bibliographiques..... | 41 |
| Annexe 1 | 47 |
| Annexe 2 | 48 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Répartition des espèces de <i>Phoenix</i> en Europe, en Afrique et en Asie occidentale . | 3 |
| Figure 2: Répartition géographique et culture du palmier dattier dans le monde..... | 6 |
| Figure 3 : Production de dattes dans le monde | 7 |
| Figure 4: Carte de l'Algérie indiquant les différentes zones de culture du palmier dattier..... | 9 |
| Figure 5 : Figure schématique des différentes parties d'un palmier dattier adulte | 10 |
| Figure 6 : Diagramme florale des fleurs du palmier dattier | 12 |
| Figure 7 : (A) : Schéma d'une palme, (B) : Les différents niveaux du système racinaire chez le dattier, (C) : Inflorescence mâle et femelle du dattier, (D) : Morphologie et anatomie du fruit et de la graine du palmier dattier | 13 |
| Figure 8 : Inflorescences femelle (A) et mâle (B) du palmier dattier | 18 |
| Figure 9 : Profil d'isozymes de peroxydase dans cinq géotypes mâles et cinq femelles de <i>H. rhamnoides</i> L..... | 21 |
| Figure 10 : Plaques de métaphase et d'interphase montrant des combinaisons fluorescentes de chromomycine XX et XY chez <i>Phoenix dactylifera</i> : Deux chromosomes homomorphes (A) ou chromocentres (C) sont apparus sur les plantes femelles, et une paire de chromosomes ... | 22 |
| Figure 11 : Principe des SSR ou microsatellites basé sur un motif (GA) _n dans trois géotypes différents..... | 25 |
| Figure 12 : Analyse d'extraits d'ADN sur gel d'agarose 0,8%. M : marqueur de taille..... | 33 |
| Figure 13: Profil d'amplification généré avec les deux amorces SSR (mPdCIR10) et (mPdCIR85) sur gel d'agarose 3%, en utilisant l'ADN génomique de plants de palmier dattier mâles et femelles. M : marqueur de taille | 33 |
| Figure 14 : Profil d'amplification généré avec les deux amorces SSR (mPdCIR32) et (mPdCIR16) sur gel d'agarose 3%, en utilisant l'ADN génomique de plants de palmier dattier mâles et femelles. M : marqueur de taille. | 34 |
| Figure 15 : Profil d'amplification généré avec l'amorce SSR (mPdCIR70) et sur gel d'agarose 3%, en utilisant l'ADN génomique de plants de palmier dattier mâles et femelles. M : marqueur de taille..... | 34 |
| Figure 16 : Profils d'amplification des trois marqueurs SSR (mPdCIR32) et (mPdCIR16) et (mPdCIR70) traités avec le logiciel PhotoCapt. M : marqueur de taille..... | 35 |
| Figure 17 : Dendrogramme de similarité (utilisant la méthode UPGMA) basé sur les profile électrophorétique du marqueur SSR mPdCIR70 des 15 géotypes de palmiers dattiers..... | 37 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Espèces du genre <i>Phoenix</i> avec leur nom locale et répartition géographique | 5 |
| Tableau 2 : Cycle végétatif annuel du palmier dattier | 14 |
| Tableau 3 : Comparaison des principales caractéristiques des marqueurs moléculaires les plus couramment utilisés..... | 24 |
| Tableau 4 : Noms et Acronymes des génotypes étudiés | 27 |
| Tableau 5 : Caractéristiques des marqueurs SSR utilisés | 30 |
| Tableau 6 : Matrice de similarité génétique pour le marqueur SSR mPdCIR70 basée sur le coefficient de Jaccard entre les différents génotypes étudiés..... | 38 |

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AFLP : Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés.

CTAB : Cetyltriméthylammonium Bromide.

dNTP : Désoxyribonucléide triphosphate.

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique.

F.A.O : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.

g : gramme.

H₂O up : H₂O ultra-pure.

INRA Adrar : INRA Institut National de la Recherche Agronomique – Adrar.

ISSR : Amplification intermicrosatellite (inter-simple sequence repeat).

M : Molaire.

mA : milliampère.

MgCl₂ : Le chlorure de magnésium.

ml : Millilitre.

mM : Millimolaire.

TBE Tampon : Tampon Tris - Borate- EDTA.

TE : Tris-EDTA.

Tris HCL : Tris hydrochloride.

UV : Ultraviolet.

V : Volt.

µl : Microlitre.

Na₂ EDTA : Sel disodique de l'acide éthylènediaminetétracétique.

NaCl : Chlorure de sodium.

ng : Nano gramme.

pb : Paire de base.

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

PM : Poids moléculaire

POX : Peroxydase

PVP : Polyvinylpyrrolidone.

RAPD : ADN polymorphe amplifié au hasard.

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction.

RNase A : Ribonucléase A.

Rf : Rapport frontal

rpm : Révolutions par minute.

SDS : Dodécylsulfate de sodium.

SSR : Simple sequence Repeat

Taq polymérase : ADN polymérase thermostable isolée partir des bactéries.

Introduction

Introduction

Introduction générale

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est l'une des 14 espèces reconnues du genre *Phoenix*, lui-même l'un des 183 genres de palmiers actuellement connus. *Phoenix* appartient à la tribu des Phoeniceae, à la sous-famille des Coryphoideae et à la famille des Arecaceae (Palmae) et a une large distribution naturelle dans l'Ancien Monde. Il est l'une des espèces fruitières les plus anciennement cultivée par l'homme, domestiqué depuis 3000 ans avant J-C en Mésopotamie (Johnson, 2011). En Algérie, cette culture occupe une place de premier rang dans l'agriculture saharienne (emploi, sédentarisation des populations, produits) (Benzouche, 2008). Le pays figure parmi les plus importants producteurs de dattes dans le monde avec plus de 1,15 million de tonnes de dattes par an (FAOstat, 2020).

Les palmiers dattiers sont généralement distingués entre des plantes dérivées de graines (semis ou khalt) ; résultat de la propagation sexuée, et celles dérivées de ramifications (rejets) retirées de cultivars femelles ou mâles intéressants. Les dattes de semis présentent des caractères hérités des deux parents et peuvent être de sexe féminin ou masculin, le sexe étant uniquement révélé au début de la floraison, à 5–7 ans avant l'induction des premières floraisons pour connaître le sexe des plants, ce qui constitue un frein à l'exploitation raisonnée de ces palmiers (Johnson, 2011). En revanche, une plante dérivée d'un rejet, présentera le même sexe et les mêmes critères agro-morphologiques du parent désiré. Cependant, ce mode de culture avec un nombre très limité de ramifications (environ 10 à 15 par arbre), reste moins efficace par rapport aux procédures de micropropagation *in vitro* (Bouguedoura *et al.*, 1990), qui elles-mêmes restent très limités et peu exploitées dans le pays. La reproduction sexuée, reste donc le meilleur choix pour assurer la variabilité génétique des palmiers et un meilleur rendement si elle est maîtrisée.

L'identification précoce des sexes mâle et femelle chez le palmier dattier revêt donc un intérêt primordial. En effet, le problème majeur des phœniciculteurs est l'identification du sexe des jeunes arbres afin qu'ils puissent cultiver un grand nombre d'arbres femelles productifs. La biotechnologie, en tant que nouvel outil dans la sélection des palmiers dattiers, peut être utile pour améliorer les qualités des palmiers grâce à une identification précoce du sexe. Au cours des dernières années, de sérieux efforts ont été déployés pour identifier les individus mâles et femelles. Des études portant sur l'utilisation d'isoenzymes et des marqueurs moléculaires comme la RAPD et les SSRs ont été mises en œuvre chez *Phoenix dactylifera* L.

Introduction

dans le but de faciliter l'identification précoce du sexe pour les programmes d'amélioration génétique (Atia et Adawy, 2015).

Bien que des marqueurs moléculaires aient été introduits dans plusieurs programmes d'amélioration des plantes, peu de données sur le déterminisme du sexe sont disponibles chez le palmier dattier, et l'identification de marqueurs de sexe chez cette espèce reste toujours d'actualité.

Les marqueurs microsatellites se sont avérés très utiles et constituent un outil puissant pour l'évaluation de la diversité génétique des plantes (Elmeer *et al.*, 2011 ; Racchi *et al.*, 2014), de plus, ils ont été utilisés dans beaucoup de recherches portant sur la diversité génétique et les relations entre les cultivars de palmier dattier (Sabir *et al.*, 2014 ; Chaouch Khouane *et al.*, 2020).

Dans ce contexte, nous avons tenté d'identifier des marqueurs d'ADN spécifiques au sexe pour certains cultivars de palmier dattier par des marqueurs à ADN de type SSR. Trois chapitres composent ce mémoire. Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique où des généralités sur la plante *Phoenix dactylifera* L. seront présentées, ainsi qu'un résumé sur l'état des connaissances actuelles sur les techniques de marquage moléculaire du sexe chez le palmier dattier. Une présentation du matériel végétal et des techniques utilisées pour répondre à notre objectif est effectuée dans le second chapitre. Le troisième chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus et leur discussion. La dernière partie du manuscrit, se termine par une conclusion et quelques perspectives suggérées.

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur le palmier dattier

1. Origine et historique du palmier dattier

Le palmier dattier est une culture emblématique des régions chaudes et arides de l'Afrique du Nord et du Moyen-Orient, (Figure 1). Il fait partie du genre *Phoenix* qui comprend 14 espèces, monocotylédones vivaces et dioïques de la famille des *Arecaceae* (Barrow, 1998).

L'histoire de la domestication et de la diversification du palmier dattier est restée une question déroutante malgré des décennies de recherche dans différentes disciplines. L'identité de son géniteur sauvage a longtemps été inconnue et a entravé la recherche sur ses origines (Pintaud *et al.*, 2013). Les premières traces archéologiques d'exploitation et de consommation des dattes datent du 6ème millénaire avant notre ère. Il existe des preuves de culture du palmier dattier dans la région du Golfe depuis la fin du 4ème / début du 3ème millénaire avant notre ère tout en semblant apparaître plus tard en Afrique, bien que ceux-là doivent être confirmés par des études plus approfondies (Tengberg *et al.*, 2012). De nombreuses recherches portant sur la compréhension de l'histoire de la domestication du palmier dattier ont été réalisées au cours de la dernière décennie sur la base de la génétique et plus tard de la génomique à mesure que la séquence du génome est devenue disponible et que des études de reséquençage ont été réalisées.

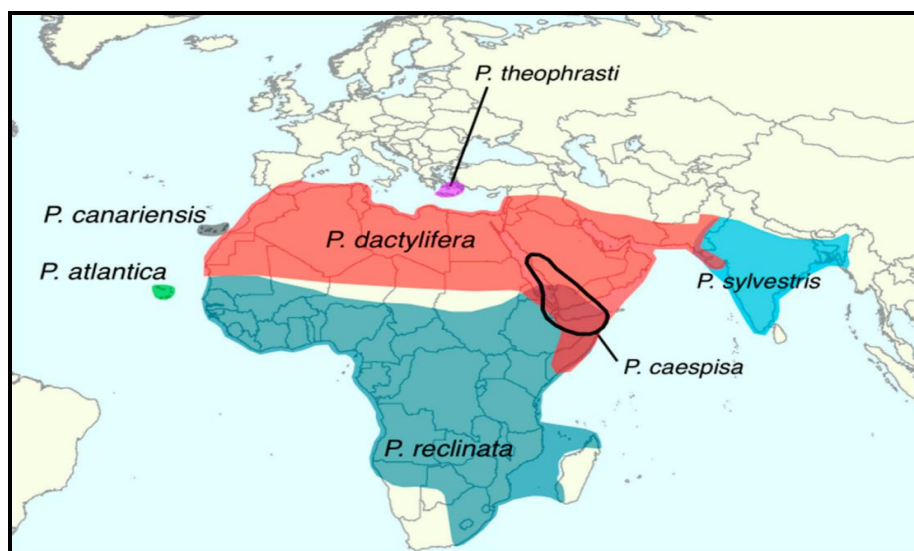


Figure 1 : Répartition des espèces de *Phoenix* en Europe, en Afrique et en Asie occidentale (Henderson, 2009)

Synthèse bibliographique

Les documents les plus anciens en Mésopotamie (Irak actuellement) montrent que sa culture se pratiquait depuis 3500 ans avant J.C. Dans la même époque, les dattiers étaient cultivés en Irak occidental, à travers l'Arabie Saoudite et jusqu'en Afrique du Nord (Gilles, 2000). Au cours des trois derniers siècles, des dates ont été également introduites dans de nouvelles zones de production en Australie, en Inde/ Pakistan, au Mexique, en Afrique australe, en Amérique du Sud et aux États-Unis (Chao et kruger, 2007) In [Benkaidia, 2020].

Des méthodes utilisant la morphométrie géométrique sur les graines de dattes modernes ont réussi à distinguer les variétés cultivées des palmiers dattiers sauvages et semblent également prometteuses pour la détermination des échantillons archéologiques (Terral *et al.*, 2012). Cependant, l'ancêtre sauvage du palmier dattier reste à identifier. En l'absence de candidat définitif, différentes hypothèses ont été avancées, par exemple, que le palmier dattier cultivé résulterait soit de la domestication d'une autre espèce *Phoenix*, soit de l'hybridation de plusieurs espèces différentes au sein de ce genre. Néanmoins, des analyses génétiques récentes montrent que *Phoenix dactylifera* possède profile allélique, suggérant qu'il est issu de populations sauvages appartenant à la même espèce (Pintaud *et al.*, 2010).

2. Classification taxonomique

Le dattier est une monocotylédone, arborescente et diploïde ($2n= 36$) de l'ordre des Arecales (anciennement spadaciflore), de la famille des Aracaceas, composée d'environ 200 genres et plus de 2 500 espèces. *Phoenix* (Coryphoideae phoeniceae) est l'un des genres avec environ 14 espèces (tableau 1), qui sont originaires des régions tropicales ou subtropicales du sud de l'Asie ou de l'Afrique, y compris *Phoenix dactylifera* L (Siddiq *et al.*, 2013 ; Eoin, 2016).

La position systématique actuelle de *Phoenix dactylifera* L, basée sur des données récentes de l'International Code of Botanical Nomenclature est la suivante (Henderson, 1999 ; Dransfield, 2008) :

Synthèse bibliographique

Embranchement : Angiospermes

Classe : Monocotylédones

Ordre : Principes

Famille : Arécacées

Sous-famille : Coryphoidées

Tribu : Phoenicées

Genre : *Phoenix*

Espèce : *Phoenix dactylifera L.*

Tableau 1 : Espèces du genre *Phoenix* avec leur nom locale et répartition géographique (Al-Alawi *et al.*, 2017)

| Espèces | Nom local | Distribution géographique |
|-------------------------------|------------------------------------|---|
| <i>Phoenix acaulis</i> | Palmier dattier sans tige | Bhoutan, Népal, Inde du Nord |
| <i>Phoenix andamanensis</i> | Palmier dattier de l'île d'Andaman | Birmanie |
| <i>Phoenix atlantique</i> | Île du Cap-Vert | Îles du Cap-Vert |
| <i>Phoenix cespitose</i> | Palmier dattier | Djibouti, Oman, Arabie Saoudite, Somalie, Yémen |
| <i>Phoenix canariensis</i> | Palmier dattier des Canaries | Australie, Bermudes, Îles Canaries, Italie, Espagne |
| <i>Phoenix dactylifera L.</i> | Palmier dattier | Péninsule arabique, Australie, Californie, Chine, El Salvador, Fidji, Iran, Inde, Maurice, Afrique du Nord et de l'Ouest, Pakistan, Espagne |
| <i>Phoenix loureiroi</i> | Palmier dattier des montagnes | Chine, Himalaya, Inde, Indochine, Philippines |
| <i>Phoenix paludosa</i> | Palmier dattier de mangrove | Andaman, Inde, Indochine, Sumatra |
| <i>Phoenix pusilla</i> | Palmier dattier de Ceylan | Inde, Sri-Lanka |
| <i>Phoenix allongé</i> | Palmier dattier du Sénégal | Afrique, péninsule arabique, Comores, Madagascar |
| <i>Phoenix roebelenii</i> | Palmier dattier pygmée | Chine (Yunnan) à Indochine du Nord |
| <i>Phoenix rupicole</i> | Palmier dattier des falaises | Îles Andaman, Bhoutan, Inde |
| <i>Phoenix sylvestre</i> | Palmier dattier indien | Sous-continent indien, Myanmar, Sud de la Chine |
| <i>Phoenix Théophraste</i> | Palmier dattier crétois | Îles grecques, Turquie |

3. Répartition et importance du dattier dans le monde et en Algérie

3.1. Dans le monde

L'aire de répartition écologique de *Phoenix* est large, certaines espèces poussant dans des endroits constamment humides (comme *P. roebelenii*) et d'autres dans des maquis secs (par exemple *P. caespitosa* ou *P. loureiroi*), parfois même dans des sols salés (*P. paludosa* poussant dans les marécages côtiers). Indépendamment du degré d'aridité ou de salinité de leur habitat, il semble que toutes les espèces aient besoin d'eau souterraine pour fournir de l'humidité autour des racines (Barrow, 1998).

D'après Ben Abes (2011), le palmier dattier existe dans les cinq continents, il est cultivé intensivement dans les zones arides et semi arides de l'Afrique et est considéré comme l'une des principales cultures fruitières dans le monde arabo-musulman du Moyen Orient (Gros-Balthazard *et al.*, 2013). Il est cultivé également en Espagne, qui est le seul pays européen producteur de datte principalement dans la célèbre palmeraie d'Elche (Toutain, 1996) et en faibles intensités au Mexique, l'Argentine et l'Australie.

Les humains ont disséminé de nombreuses espèces à l'intérieur et à l'extérieur de leur aire de répartition naturelle. Plusieurs espèces de *Phoenix* peuvent être trouvées dans les palmeraies de la rivière française et italienne, d'autres, comme la variété algérienne "Deglet Nour" ont été introduites en Amérique durant les années 1911-1922, en particulier aux États-Unis où le département de l'agriculture de l'U.S a mené des programmes de sélection (Krueger, 2015).

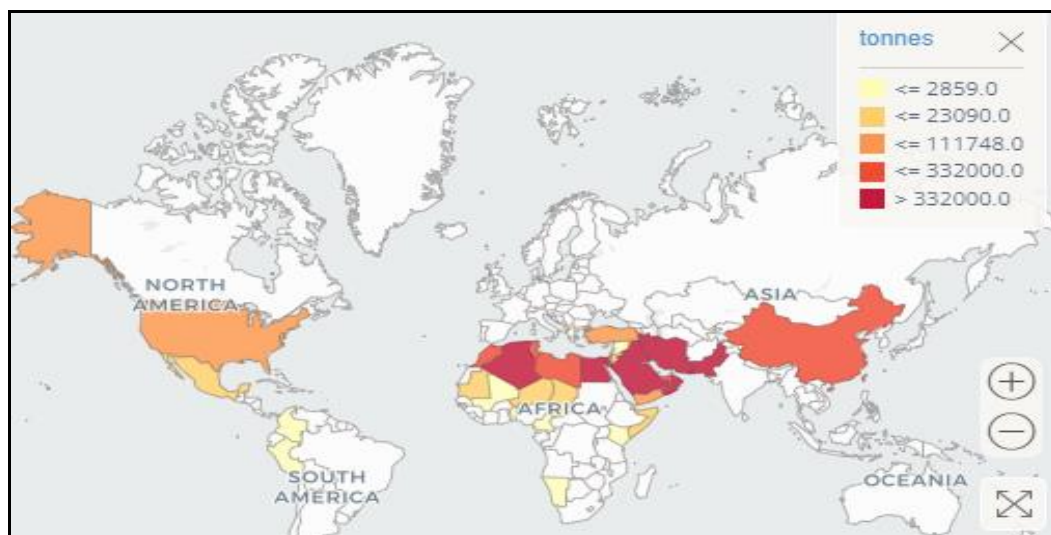


Figure 2: Répartition géographique et culture du palmier dattier dans le monde (FAOstat, 2020)

Synthèse bibliographique

Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO, 2020), la superficie cultivée en palmier dattier dans le monde est estimée à 1,2 millions ha répartie dans plus de 30 pays. L'analyse de la répartition régionale indique qu'environ 60 millions de palmiers dattiers se trouvent en Asie (l'Arabie saoudite, Bahreïn, les Emirats arabes unis, Iran, Iraq, Koweït, Oman, Pakistan, Turkménistan et Yémen) et environ 32,5 millions d'arbres se trouvent en Afrique (Shafik *et al.*, 2018). Ces effectifs ont produit 9,454,213 tonnes de dattes en 2020 au niveau mondial dont 56,3% sont produites par l'Asie (Figure 3-A). Les statistiques actuelles indiquent que l'Égypte occupe la première place quant à la production de dattes suivie de l'Arabie Saoudite puis l'Iran (Figure 3-B). L'Algérie se trouve actuellement en 4ème rang mondial avec une production estimée à 1, 151,909 tonnes (FAOstat, 2020).

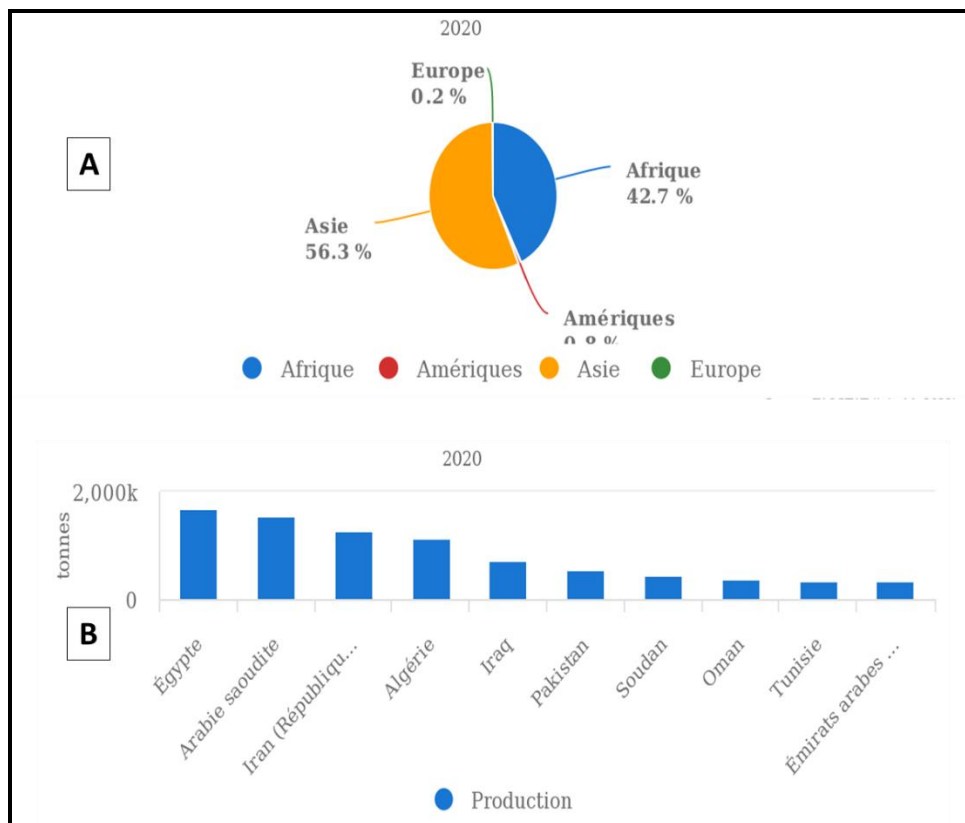


Figure 3 : Production de dattes dans le monde (FAOstat, 2020). (A) : Part de la production de dattes par région, (B) : les dix principaux producteurs de dattes

3.2. En Algérie

Avec 18,6 millions palmiers dattiers éparpillés sur une surface globale de 170500 ha et une production de plus de 1,15 million de tonnes de dattes par an, l'Algérie figure parmi les grands pays à fort potentiel phoenicicole (FAOstat, 2020).

Actuellement, la culture des palmiers dattiers dans les oasis occupe les régions situées au sud des montagnes de l'Atlas saharien. Elle commence à la frontière marocaine, à l'ouest, et se termine à l'est de la frontière est tuniso-libyenne. Du nord au sud de l'Algérie, elle s'étend des contreforts du sud de l'Atlas saharien à Reggane à l'ouest, Tamanrasset au centre et Djanet à l'est (Figure 4) (Bouguedoura *et al.*, 2015).

Compte tenu de la géographie de l'Algérie, il est possible de décrire plusieurs régions de culture du palmier dattier (Fadlaoui, 2017) :

(a) Dans les contreforts des montagnes de l'Atlas (Ksour Ouled Naïl, les Zibans et Aures), il existe une chaîne d'oasis qui marque la porte d'entrée du Sahara.

(b) A l'est, les Zibans (Biskra), Oued Ghir, Oued Souf (El Oued), et le bassin de Ouargla notamment avec le cultivar Deglet Noor à haute valeur commerciale.

(c) À l'ouest, Saoura (Beni Abbès), le Touat (Adrar), le Gourara (Timimoun) et le Tidikelt (Reggane) où les palmeraies comprennent des cultivars de qualité commerciale relativement faible. C'est dans cette zone que le seul cultivar véritablement résistant au bayoud, « Taqerbucht », existe.

(d) Au centre. El Golea, le M'zab (Ghardaïa) et Laghouat.

Selon (Hannachi *et al.*, 1998), les palmeraies du sud-ouest renferment une diversité très appréciable et c'est justement cette diversité qui leur a permis de rester productives malgré le fléau du Bayoud (*Fusarium oxysporium*). Une cinquantaine de cultivars se retrouvent dans deux ou trois régions mais la majorité des cultivars reste endémique à leur région ou à leur zone d'origine.

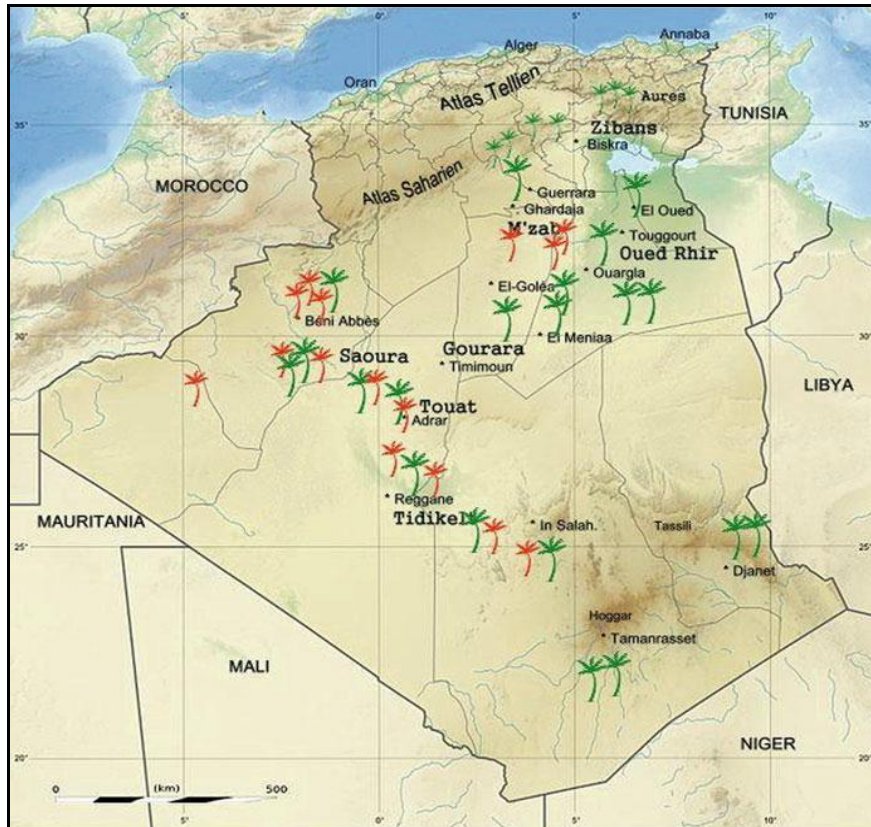


Figure 4: Carte de l'Algérie indiquant les différentes zones de culture du palmier dattier (Bouguedoura *et al.*, 2015)

Le fruit du palmier dattier peut être consommé frais ou séché ou transformé en une grande variété de produits tels que du sirop ou de la pâte. Le fruit sucré joue un rôle de premier plan dans les sociétés nomades des régions désertiques et est fermement ancré dans la culture arabe (Gros-Balthazard *et al.*, 2018). Le palmier dattier est également une espèce clé des agrosystèmes oasiens car pratiquement chaque partie de la plante trouve un usage particulier dans la vie quotidienne : le stipe (ou tronc) est utilisé pour la construction, les feuilles pour la vannerie, et surtout, le palmier dattier offre un microclimat favorable à la culture d'autres cultures dans un environnement par ailleurs très rude (Tengberg, 2012).

En Algérie, chaque palmeraie possède une composition variétale qui lui est propre, résultant d'une sélection locale au sein d'un oasis déterminé. L'inventaire variétal a identifié plus de 1100 cultivars (Allam *et al.*, 2021) dont les plus importants sont « Deglet Nour », variété commerciale par excellence, considérée comme étant la meilleure variété de datté du fait de son aspect, son onctuosité et sa saveur et les variétés « Ghars », « Degla Beida » et « Mèche-Degla » qu'on appelle les variétés communes qui sont de moindre importance économique par rapport à Deglet nour (Benzouche, 2017).

Synthèse bibliographique

4. La botanique du palmier dattier

Phoenix dactylifera est une plante angiosperme monocotylédonaire, dioïque, diploïde, classée selon le modèle de Corner, elle est généralement caractérisée par un seul axe végétatif à croissance apicale et continue (développement monopodial) (Bouguedoura, 1979) In [Mimoun, 2014]. Ses caractéristiques dépendent du milieu, de l'âge et des conditions culturales.

On distingue 3 parties : un système racinaire, un organe végétatif composé du tronc et de feuilles et un organe reproductif composé d'inflorescences mâles ou femelles (Figure 5).

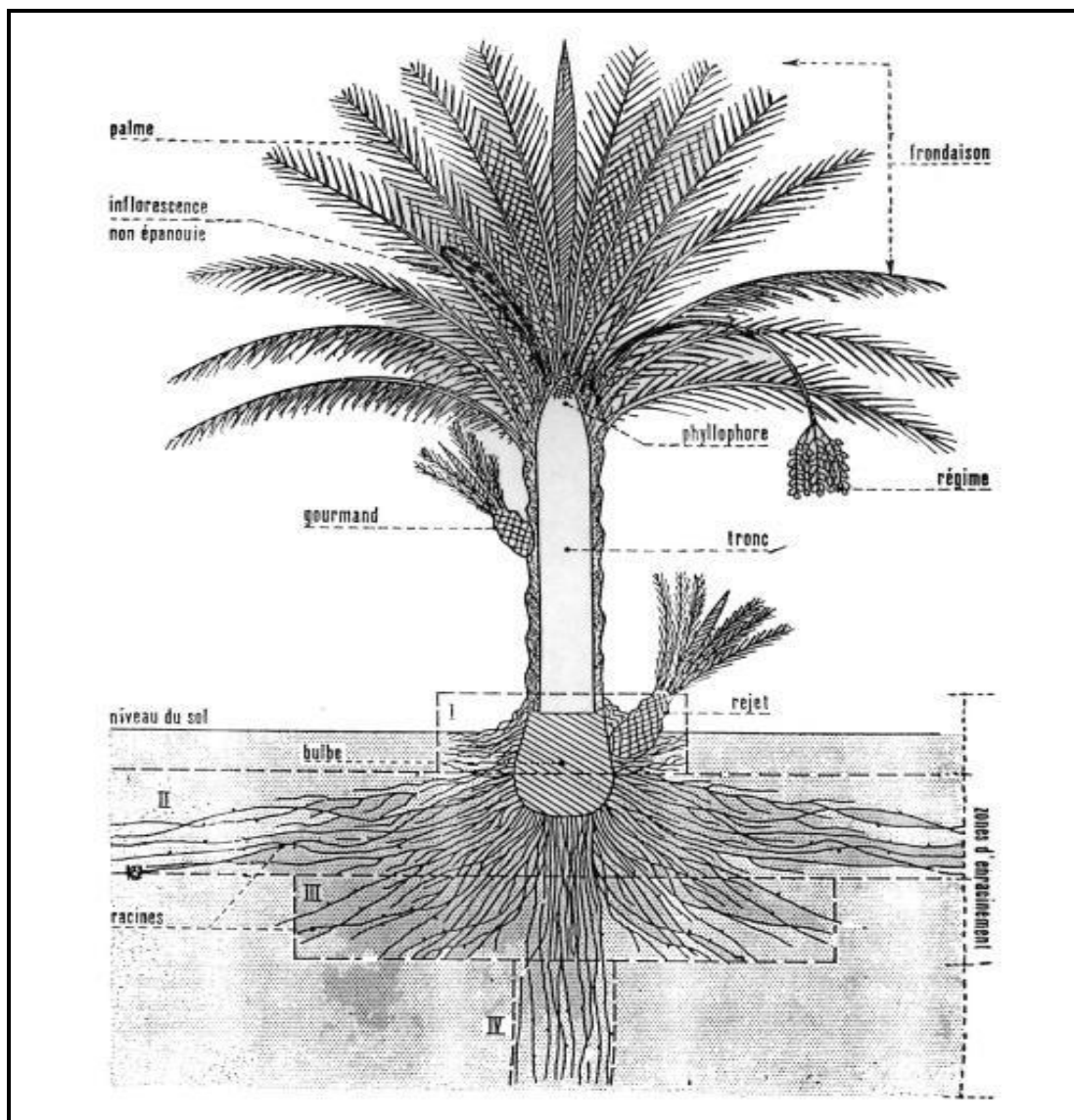


Figure 5 : Figure schématique des différentes parties d'un palmier dattier adulte (Munier, 1973)

Synthèse bibliographique

4.1. L'appareil végétatif

4.1.1. Le tronc

Le tronc, qu'on appelle plus justement « stipe » est de forme cylindrique, c'est-à-dire d'un même diamètre de bas en haut, sauf à la base, où l'on trouve les racines respiratoires (Peyron, 2000). Lignifié, de couleur marron brun et généralement monopodique, le stipe est recouvert à sa base par des palmes coupées qu'on appelle « cornaf » (Belaroussi, 2019).

L'élongation annuelle du stipe est d'environ 20 à 30 cm, Il ne se ramifie pas, mais le développement des gourmands ou des rejets peut donner naissance à des pseudo-ramifications (Bouguedoura, 1979) In [Bedjaoui, 2019]. Selon les facteurs écologiques, la longueur du stipe peut dépasser les 20 mètres et son diamètre de 40 à 90 cm (Guettouchi, 2017).

4.1.2. Les palmes

La palme, en arabe « djerid », est une feuille composée, pennée avec une forme et une structure très caractéristique. L'ensemble des palmes vertes forme la couronne du palmier. On dénombre de 50 à 200 palmes chez un arbre adulte (Peyron, 2000). La palme peut atteindre une longueur de 6m (Khenfar, 2004) In [Benkaïdia, 2020]. Elle est composée des pennés formées des folioles, des épines, d'un rachis et d'un pétiole (Figure 7-A).

Les palmes adultes demeurent actives durant trois à sept ans selon la variété et le mode cultural (Peyron, 2000). Elles se dessèchent après et tombent en laissant sur le tronc une cicatrice correspondant aux bases pétiolaires, qui servent de protection et d'escalier pour grimper sur le palmier lors de la pollinisation ou de la récolte. (Meraneh, 2010).

4.2. Le système racinaire

Les racines se développent entre 12 et 20 m de profondeur, et peuvent s'étendre latéralement à plus de 7 m (El-Houmaïzi, 2002) dont le diamètre ne dépasse pas 1,5 cm et qui émergent partiellement au-dessus du niveau du sol à une hauteur allant jusqu'à 50 cm de la base du tronc.

Selon Munier (1973) et plusieurs auteurs, le système racinaire est subdivisé en fonction de la profondeur, sans description des ramifications, en trois zones d'enracinement dont l'extension est variable en fonction de la nature du sol, du mode de culture, de la profondeur du niveau aquifère, du cultivar et de l'origine du sujet comme suit (Figure 7-B) :

- a. **Racines respiratoires** : de 0 à 20 cm même jusqu'à 150 cm au-dessous du sol. Elles permettent des échanges gazeux avec l'air de l'atmosphère du sol.

Synthèse bibliographique

- b. **Racines de nutrition** : de 20 à 100 cm, formant la partie la plus importante du système racinaire.
- c. **Racines d'absorption** : sont les plus longues pouvant atteindre 17 m à la recherche de l'eau.

4.3 L'appareil de reproduction

4.3.1. Les inflorescences (spathes)

Tous les *Phoenix*, et donc le palmier dattier, sont des arbres dioïques. Les sexes étant séparés, sont portées par des individus différents (Peyron, 2000). Le palmier dattier commence à fleurir après une longue phase juvénile, entre 5 et 8 ans après la germination des graines dans des conditions de culture favorables. La floraison est généralement annuelle et dure durant toute la vie de la plante. (Merrah, 2010). Les spathes ont une forme allongée pour les femelles, plus courte et renflée pour les mâles avec une légère dépression en haut (Figure 7-C) (Munier, 1973) In [Hamzaoui, 2021], elles sont de couleur vert-jaunâtre et sont formées à partir de bourgeons développés à l'aisselle des palmes (Yahiaoui, 2016).

Seuls les arbres femelles produisent des fruits mais un seul arbre mâle suffit à produire du pollen pour polliniser 40 à 50 arbres femelles, par conséquent il faut attendre la floraison pour reconnaître les pieds mâles des femelles (Sane, 2007).

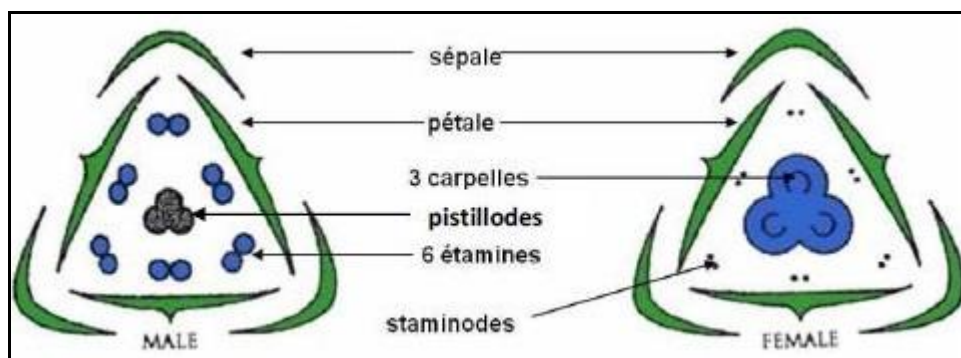


Figure 6 : Diagramme florale des fleurs du palmier dattier (Meraneh, 2010)

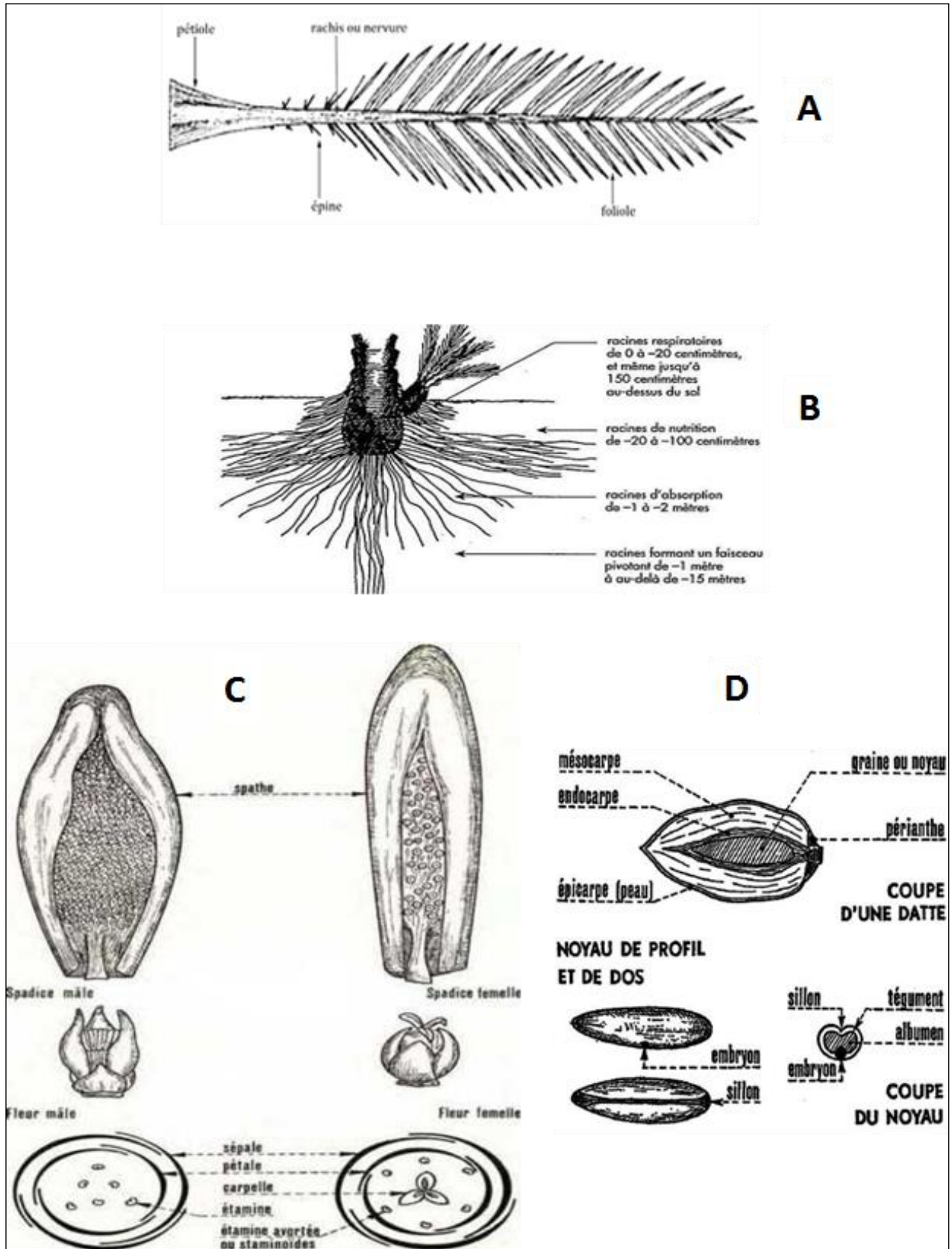


Figure 7 : (A) : Schéma d'une palme, (B) : Les différents niveaux du système racinaire chez le dattier, (C) : Inflorescence mâle et femelle du dattier, (D) : Morphologie et anatomie du fruit et de la graine du palmier dattier (d'après Munier, 1973)

Synthèse bibliographique

4.3.2. Le fruit

La datte est le fruit du palmier dattier, généralement de forme allongée, ou arrondie. C'est une baie contenant une seule graine vulgairement composée d'un fin épicarpe protégeant le mésocarpe charnu et d'un endocarpe formé d'une membrane fine enveloppant la graine. Cette dernière est appelée noyau (Figure 7-D). Les dimensions de la datte sont très variables, de 2 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 grammes selon les variétés (Seghir et Ghenaim, 2020).

5. Le cycle de développement du palmier dattier

Le cycle de développement de la datte passe généralement par quatre phases (Belguedj, 2002) :

- **Phase jeune** : Depuis la plantation jusqu'aux premières productions. Cette phase dure entre 5 à 7 années, selon le milieu et les soins apportés à la culture ;
- **Phase juvénile** : période d'entrée en production. Elle se situe autour de 30 ans d'âge du palmier ;
- **Phase adulte** : Autour de 60 ans d'âge, début de décroissance de la production en particulier quand les conditions de culture sont médiocres ;
- **Phase de sénescence** : 80 ans et plus. Caractérisée par une chute de la production.

Le palmier dattier passe par un repos végétatif en hiver, où la croissance de tous les organes est arrêtée sauf les inflorescences qui se trouvent en cours de formation. La reprise de végétation a lieu au printemps lorsque la température du sol dépasse les 12° C. (Guettouchi, 2017). Dans le tableau 02, nous présentons le cycle végétatif annuel du palmier dattier.

Tableau 2: Cycle végétatif annuel du palmier dattier (Belguedj, 2002)

| | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Stade et période | | | | | | | | | | | | | |
| Apparition des spathes | ■ | | | | | | | | | | | | |
| Croissance des spathes | | ■ | | | | | | | | | | | |
| Ouverture des spathes | | | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | |
| Nouaison | | | | | ■ | ■ | | | | | | | |
| Grossissement des fruits | | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| Prématuration (Bser) | | | | | | | | ■ | ■ | | | | |
| Maturation (Tmer) | | | | | | | | | ■ | | | | |
| Récolte | | | | | | | | | | ■ | ■ | | |
| Repos végétatif | | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ |

Synthèse bibliographique

6. Méthodes de multiplication du dattier

La pérennité du palmier dattier peut être assurée par trois méthodes de multiplication : le semis des graines, le semis des rejets et la micro-propagation.

6.1. Multiplication par semis des graines (noyaux)

La multiplication par semis est le mode de propagation du dattier le plus anciennement pratiqué par les phœniciculteurs (Sane, 2007). Cette méthode de production est une technique peu consommatrice du temps, facile à concevoir, nécessitant peu de matériel et d'effort physique (Adwa, 2021). Les phœniciculteurs ont besoin de 2 à 3 pieds mâles pour 100 pieds femelles.

Cette technique de multiplication est utilisée dans les programmes d'amélioration génétique, par croisement des descendances, afin d'obtenir de nouveaux cultivars qui peuvent se révéler d'excellente qualité (Mimoun, 2014), en se basant sur les caractères morphologiques et agronomiques (Sedra, 2003).

Toutefois, le palmier dattier est une espèce dioïque et ce caractère entraîne une très forte hétérozygotie de la descendance. De plus, une population issue de graines est composée de 50% de pieds mâles et 50% de pieds femelles (Sane, 2007) et la distinction de sexe n'apparaît qu'à partir de la cinquième ou la huitième année de semis. Bien que cette reproduction sexuée soit source de diversité génétique, les caractères agronomiques (qualité et quantité des dattes, période de floraison, récolte, etc.) des plants femelles issus de semis s'avèrent différents voire inférieurs à ceux du pied mère (Meraneh, 2010).

6.2. Multiplication par plantation des rejets ou 'djebbars ou rkebs'

Traditionnellement, la propagation végétative du palmier dattier se fait grâce aux rejets (appelé en arabe Djebbar) se développant à la base du stipe ou sur le bulbe, à partir des bourgeons axillaires (Toutain et Rhiss, 1973) In [Sane, 2007].

Le nombre de rejets par arbre varie d'un cultivar à l'autre (de 1 à 30). L'arbre peut produire de 0 à 3 rejets par an, en général pas plus de 10 à 40 pendant son cycle de vie, ceci est en fonction des cultivars et des conditions environnementales (Bouguedoura, 1991).

Le dattier produit également ce que l'on appelle communément des « gourmands », qui sont des petits rejets aériens non racinés situés loin du sol. Ces gourmands peuvent être aussi utilisés de la même façon que les rejets mais il semble d'après certains travaux que la rhizogenèse soit difficile à provoquer, par conséquent le taux de reprise n'est pas élevé (Toutain, 1970) In [Hannachi, 2012].

Synthèse bibliographique

C'est la méthode de propagation la plus stable et la plus efficace, utilisée pour constituer de nouvelles plantations pour la rénovation d'anciennes palmeraies (Guettouchi, 2017). Elle permet une conservation des caractères génétiques du pied mère et assure une homogénéité du sexe, de la variété, de la vigueur et de la qualité des fruits (Meraneh, 2010).

6.3. Multiplication par culture des tissus *in vitro*

Pour contourner les faiblesses des techniques traditionnelles de reproduction (faible nombre de rejets, transfert de maladies,...) et pour mieux répondre à la demande croissante en plants, le recours aux méthodes de multiplication végétative *in vitro* demeure la seule alternative permettant la multiplication en masse et la diffusion rapide des cultivars aux phœniciculteurs. (Meraneh, 2010). Il y a deux techniques de propagation qui sont l'embryogenèse somatique qui utilise la différenciation cellulaire pour la formation d'embryons à partir de cellules somatiques et l'organogenèse de bourgeons qui repose sur les capacités de bourgeonnement de plusieurs types d'explants (Bouguedoura, 1991). Ces techniques permettent la production massive en garantissant l'authenticité du cultivar et la santé végétale. Cette approche favorise l'extension et la création des nouvelles palmeraies (Adwa, 2021).

7. Le génome de *Phoenix dactylifera*

Le séquençage du génome du palmier dattier peut fournir des informations sur les mécanismes qui sous-tendent le développement des fruits, la détermination du sexe, la résistance aux insectes, la résistance à la sécheresse et d'autres processus biologiques importants au niveau phénotypique. Le génome peut également faire progresser nos connaissances sur l'évolution de la famille des palmiers (Arecaceae) (Zhang *et al.* 2011).

Le premier projet de séquençage du génome du palmier dattier a été publié en 2011 (Al-Dous *et al.*, 2011) par une équipe de Cornell-Qatar qui a constitué une avancée majeure dans la génomique et la génétique du palmier dattier. Cette équipe a tenté de séquencer l'intégralité du génome du palmier dattier à l'aide d'un séquenceur Solexa (illuminé) basé sur une méthode de fusil de chasse et a réussi à caractériser un assemblage du génome à une taille d'environ 550 Mbp.

Des efforts concertés ont été déployés par la suite, pour étudier la génomique des palmiers dattiers et ont pu fournir des données clés et permis de nouvelles analyses génétiques pouvant servir de base aux futurs travaux d'amélioration agronomique et fournir des indices sur la domestication et diversification des cultures arborées pérennes (Capote *et al.*, 2021).

Synthèse bibliographique

Il a été rapporté que le palmier dattier avait des niveaux de ploïdie variés en raison du travail limité et de la rareté des connaissances cytogénétiques sur cette espèce, et aussi selon le cultivar et sa multiplication (Jatt *et al.*, 2019). Plus tôt, en 1910, Nêmec a signalé que le niveau de ploïdie est de $2n = 28$ chromosomes chez le palmier dattier, alors que Beal (1937) a déclaré que le dattier avait $2n = 2x = 36$ chromosomes de la même taille. Par ailleurs, (Al-Salih *et al.*, 1987) ont rapporté $2n = 32, 34, 36$ et 64 chromosomes chez le palmier dattier.

En 2013, une équipe saoudo-chinoise a déchiffré l'ADN du dattier, où ils ont rapporté un assemblage du génome d'une variété élite (Khalas), d'une taille de 605,4 Mb, couvrant plus de 90 % du génome (~ 671 Mb) et plus de 96 % de ses gènes (~ 41. 660 gènes) (Al-Mssallem *et al.*, 2013). Cela soulève la possibilité d'une variation de la taille du génome chez les palmiers dattiers. Cependant, une étude plus récente ; résultat d'une collaboration entre NYU Abu Dhabi, le Khalifa Center for Genetic Engineering and Biotechnology et l'Université de l'Arizona (NYUAD/KCGEB/UoA) a conclu à partir d'une plante mâle BC4 que l'espèce est un diploïde ($2n = 36$) avec une taille du génome de 870 à 899 Mb répartis sur 18 chromosomes (Hazzouri *et al.*, 2019). Aujourd'hui, Le site Web : Date Palm Génome Hub, héberge un navigateur de génome interactif et un accès à des outils supplémentaires et à des ressources téléchargeables liées à l'assemblage mâle BC4 (Tiago Capote *et al.*, 2021).

Enfin, toujours en 2019, un projet d'assemblage du génome a été mis à disposition par l'Université de Nizwa à Oman pour la variété femelle Khanizi, les détails de l'assemblage ne sont pas encore publiés (Tiago Capote *et al.* 2021).

Concernant les chromosomes sexuels, Des études cytologiques suggèrent que le chromosome Y du palmier dattier est plus petit que le X (AbdAlla et Abd El-Kawy, 2010). Une étude a identifié au moins trois gènes potentiels supposés être impliqués dans la détermination du sexe chez le *Phoenix* : CYP703, GPAT3 et LOG. L'expression différentielle du gène LOG entre les fleurs mâles et femelles suggère un rôle dans la suppression de la formation des fleurs femelles chez les mâles, les deux autres gènes, CYP703 et GPAT3 ont des fonctions dans la formation du pollen (Tiago Capote *et al.*, 2021).

II. Vers la détermination du sexe chez le palmier dattier

Les plantes dioïques sont incapables de s'autopolliniser et ont donc besoin d'une pollinisation allogame efficace pour la production des graines (Oster et Erikson 2007 ; Schlessman *et al.*, 2014). Elles constituent un système particulièrement intéressant pour étudier la génétique et l'évolution des chromosomes sexuels. (Bekheet et Hanafy, 2011). La

Synthèse bibliographique

pollinisation du palmier dattier est réalisée naturellement au moyen d'insectes et du vent. Elle est également pratiquée manuellement, assurant une variabilité génétique et une productivité plus élevée dans les vergers commerciaux (Maryam *et al.*, 2017).

La détermination du sexe est un élément fondamental dans le processus sélection des plantes à reproduction sexuée. Chez le palmier dattier, le facteur limitant le plus important dans la sélection est le temps nécessaire à la maturation des plantes, puisque le palmier devient identifiable au sexe après 5 à 7 ans (Shaheen, 1990). La sélection chez cette plante est un travail de longue haleine qui nécessite une description complète de la morphologie, de la physiologie, de la génétique et de la morphogénèse (Zango *et al.* 2017 ; Haider *et al.*, 2018).

De nombreux chercheurs ont adopté l'identification des chromosomes et l'application de marqueurs moléculaires pour distinguer les plantes mâles et femelles (Naqvi *et al.*, 2021).

1. Identification morphologique (traditionnelle)

Divers gènes régissent les caractéristiques phénotypiques de la plante et peuvent être divisés en traits qualitatifs et quantitatifs. Auparavant, des caractérisations morphologiques (par exemple, la hauteur de la plante, la largeur du tronc, la longueur des feuilles et des folioles, la longueur et la largeur de la spathe) été utilisées pour vérifier la diversité de diverses cultures ; cependant, les résultats fournis par ces marqueurs sont ambigus en raison des effets de l'environnement et du stade de développement et ne peuvent pas être utilisés qu'à la maturité sexuelle (Haider *et al.*, 2015 ; Gros-Balthazard *et al.*, 2020).

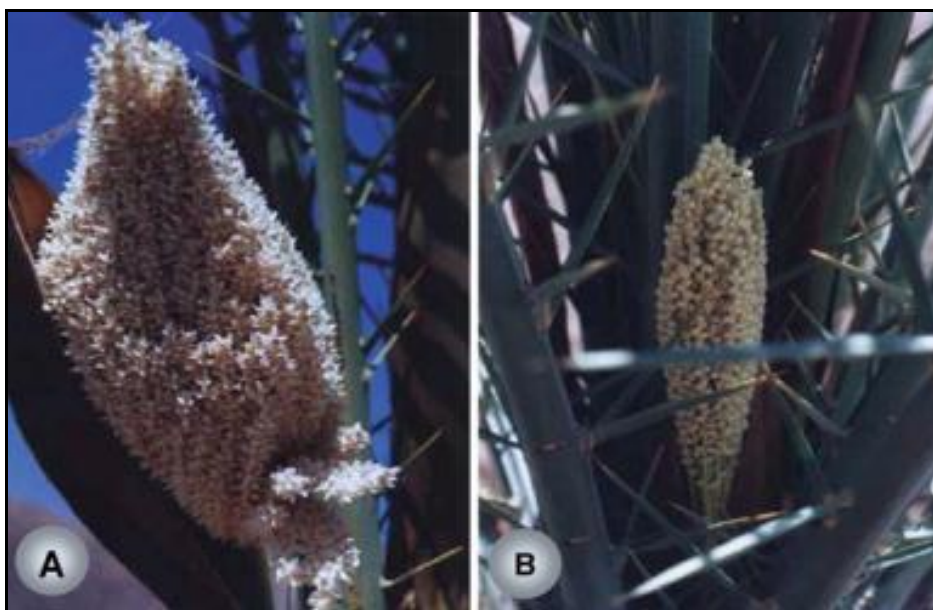


Figure 8 : Inflorescences femelle (A) et mâle (B) du palmier dattier (Source: Zaid et de Wet, 2002)

Synthèse bibliographique

Chez le palmier dattier, Ageez et Madboly (2011) ont cherché à savoir s'il y avait un plus grand nombre et une plus grande longueur de nouvelles feuilles et limbes chez les arbres mâles que chez les arbres femelles.

Auparavant, il a été également rapporté que, le foliole du tiers inférieur de la feuille est fort et rigide chez le mâle par rapport aux semis femelles (Royal Botanic Gardens Kew, 1914).

Les cultivateurs de dattiers traditionnels du sud-est du Niger identifient habituellement le sexe du palmier dattier à deux stades : graine et plantule. Les graines ayant des bouts pointus recourbés et un aspect lisse peuvent faire germer un semis femelle ; droit avec un aspect lisse serait un semis mâle. Deuxièmement, au stade de la plantule, la graine est semée sous la natte de paille, et si la plantule pousse la natte de paille et en ressort droite, ce serait un mâle. Si le semis se plie sous la natte de paille, ce serait une femelle (Zango *et al.*, 2016). Aucune étude scientifique ne soutient ce moyen d'identification du sexe.

2. Identification biochimique

Avant l'emploi des méthodes moléculaires, des traits physiologiques et biochimiques ont été utilisés dans la distinction des plantes mâles et femelles chez le palmier dattier :

L'utilisation des hormones par exemple, dans l'expression sexuelle, a été étudiée en utilisant différentes approches. Toutes les hormones végétales semblent influencer l'expression sexuelle, mais des rôles non équivoques ne peuvent être attribués à une seule hormone en raison de la disparité des résultats chez les différentes espèces (Bekheet et Hanafy, 2011). Généralement, il a été constaté que la cytokinine; l'acide indoylacétique et l'acide abscisique sont plus élevés chez les mâles que chez les femelles (Bracale *et al.*, 1990). En conséquence, l'induction de l'organe mâle peut être attribuée à une perturbation de la régulation de l'expression des gènes causée par une variation de l'équilibre hormonal qui peut conduire à une activation inhabituelle des locus mâles inhibés dans la fleur femelle.

De nouvelles études de spectroscopie infrarouge et de résonance magnétique nucléaire (RMN) couplées à une analyse chimiométrique approfondie ont été utilisées pour identifier la différenciation sexuelle chez des palmiers immatures (Khan *et al.*, 2021). Les résultats suggèrent que les signaux des monosaccharides (glucose et fructose) et/ou des disaccharides (maltose et saccharose) jouent un rôle clé dans la différenciation sexuelle.

Synthèse bibliographique

Le sucre est un élément essentiel de la sève des palmiers dattiers quel que soit le sexe (Jagannadha Rao *et al.*, 2009). Le sexe des plantes peut affecter la qualité de la sève, et les palmiers dattiers mâles révèlent des niveaux plus élevés de teneur en sucre et en matière sèche par rapport aux palmiers femelles.

L'estimation du sexe des lignées de dattier développées *in vitro* a été identifiée par l'activité des enzymes (glutamate oxaloacétate et phosphatase acide) qui assurent une forte différenciation des plantes mâles et femelles (Naqvi, *et al.*, 2021).

La comparaison entre mâle et femelle avec une carte protéomique, a identifié une tache protéique claire qui est liée au sexe chez le palmier dattier et correspond au transporteur de cassette de liaison à l'ATP de la superfamille ABC. La protéine ABC est associée au développement du pollen et à la fertilité masculine (Navqui *et al.*, 2021).

L'électrophorèse des isoenzymes a été longtemps utilisée pour l'identification des clones, des hybrides et des cultivars. Aujourd'hui, elle joue un rôle très important pour la détermination du sexe des plantes dioïques et ce depuis quelques années (Khosla et Kumari, 2015). Etant donné les formes variantes des isoenzymes, sont peu affectés par l'environnement et sont presque des produits génétiques directs, elles fournissent d'excellents marqueurs monogéniques, fiables et faciles à obtenir pour les plantes vivaces à longue durée de vie (Torres *et al.*, 1978). Le polymorphisme des isoenzymes est répandu dans de nombreuses plantes et a été utilisé pour l'identification des cultivars et du sexe dans de nombreuses espèces de plantes horticoles et d'arbres (Sharma *et al.*, 2010) In [Benkaidia, 2018]. La peroxydase par exemple, s'est révélée très utile dans la détermination du sexe, car ce système enzymatique est impliqué dans le contrôle hormonal du sexe dans de nombreuses plantes dioïques telles que le kiwi (**Shirkot, 2002**). Par ailleurs, des études ont montré la présence d'isoenzymes de POX chez des plantes femelles de *Hippophae rhamnoides* (Sharma *et al.*, 2010) (Figure 9) alors qu'elles étaient absentes chez les individus mâles. Majourhat *et al.*, (1999) ont noté l'abondance de certains phénotypes de POX chez les palmiers femelles qui se distinguent par la présence d'isoformes très anodiques. Des marqueurs biochimiques ont été utilisés par Bekheet *et al.*, (2008) pour différencier le sexe des palmiers dattiers et ont rapporté que les plantes adultes femelles et les ramifications femelles présentaient un niveau élevé d'activités de peroxydase. Des zymogrammes d'estérases ont été étudiés dans des extraits de feuilles de palmiers pour déterminer les différences entre les sexes (**Suganuma, 1984**).

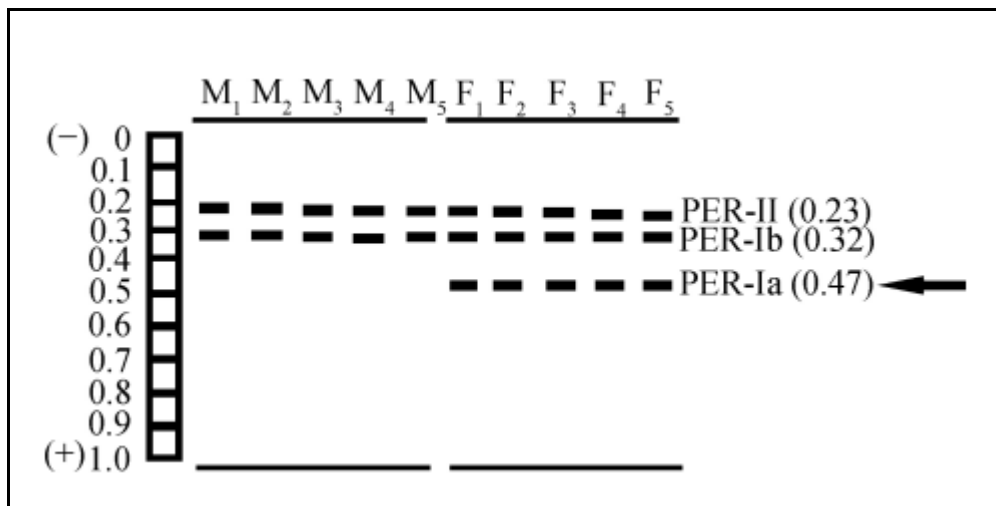


Figure 9 : Profil d'isozymes de peroxydase dans cinq géotypes mâles et cinq femelles de *H. rhamnoides* L. (Sharma *et al.*, 2010)

3. Identification chromosomique

Les systèmes de chromosomes sexuels ont émergé à plusieurs reprises au cours de l'évolution des plantes à fleurs (Charlesworth, 2002). Les systèmes de détermination du sexe basés sur les chromosomes sexuels hétéromorphes X et Y sont particulièrement intéressants à étudier d'un point de vue développemental et évolutif. (Bekheet et Hanafy, 2011). L'haplotype femelle porterait un allèle récessif de stérilité male, alors que le chromosome déterminant le sexe male serait dominant et porterait des allèles de stérilité femelle.

Chez les espèces dioïques, la présence de chromosomes sexuels (allosomes X/Y) est également impliquée pour déterminer le dimorphisme sexuel (Honys et Twell 2004). A cet effet, des cellules totipotentes (grains de pollen ou bouts de racine) sont utilisées, la colchicine est utilisée pour arrêter leur multiplication à la métaphase de la méiose ou de la mitose et observée au microscope après coloration avec un colorant spécifique (Khosla et Kumari 2015). Cependant, le palmier dattier est un matériel cytogénétiquement récalcitrant, ayant de minuscules et collants chromosomes (Soliman and Al-Mayah, 1978). La coloration classique au Giemsa (C banding) ne permet pas de différencier les individus mâles des individus femelles (Marks, 1975). En conséquence, les chercheurs ont fait appel aux colorants fluorescents.

En effet, la méthode cytogénétique basée sur la coloration à la chromomycine A3, qui met en évidence la présence de chromosomes sexuels porteurs d'hétérochromatine nucléaire distinctive, a été décrite chez le palmier dattier et a permis pour la première fois, la possibilité

Synthèse bibliographique

d'identifier des individus mâles et femelles par simple analyse des méristèmes racinaires (Siljak-Yakovlev *et al.*, 1996). La chromomycine A3 a été utilisée pour colorer les chromosomes racinaires, identifiant ainsi les différences subtiles entre l'hétérochromatine des chromosomes isolés des cellules mâles et femelles (Figure 10).

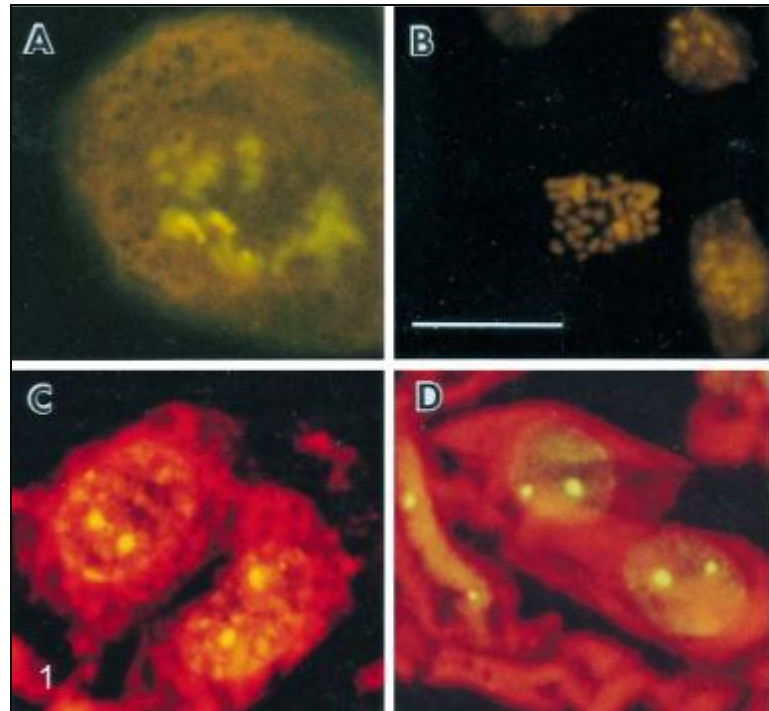


Figure 10 : Plaques de métaphase et d'interphase montrant des combinaisons fluorescentes de chromomycine XX et XY chez *Phoenix dactylifera* : Deux chromosomes homomorphes (A) ou chromocentres (C) sont apparus sur les plantes femelles, et une paire de chromosomes (Source : Siljak-Yakovlev *et al.*, 1996)

Des techniques telles que l'hybridation in situ (ISH), l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH), la détection concomitante d'oncoprotéines (CODFISH) et le caryotypage spectral (SKY) sont appliquées pour identifier les chromosomes et les aberrations chromosomiques ; par conséquent, l'identification du sexe dans les semis peut être élaborée à l'aide de ces techniques (Al-Ani *et al.*, 2010).

La discrimination sexuelle des palmiers basée sur l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) a été testée chez le palmier dattier par Adawy *et al.*, (2015), qui ont hybridé des séquences de sondes complémentaires pour visualiser les séquences d'ADN identifiées de préparations cellulaires. La cartographie physique des chromosomes végétaux avec des marqueurs utiles tels que les gènes de l'ADN ribosomal (ADNr 45S et 5S) est pratiquée pour déterminer le sexe du palmier dattier et étudier l'organisation génomique (Adawy *et al.*, 2015).

4. Identification moléculaire

La plupart des études sur la caractérisation des palmiers, la détection des gènes, la variation et la mutation génétique se sont concentrées sur la variation du nombre de chromosomes et de la diversité biochimique. Malgré l'augmentation des efforts de recherche sur le nombre d'espèces végétales différentes, il y a relativement peu d'informations disponibles sur la base moléculaire de la détermination du sexe (Bekheet et Hanafy, 2011).

Le développement de marqueurs moléculaires est porteur de nombreuses promesses pour les sélectionneurs et les phytogénéticiens dans différents domaines ; dans l'identification variétale ou les empreintes digitales, l'estimation de la parenté entre différents génotypes, le discernement des relations évolutives et plus récemment, dans le déterminisme sexuel des plantes mâles et femelles.

Ces différents ADN ou variants génétiques sont appelés allèles. Parmi tous les marqueurs moléculaires, les marqueurs à ADN s'avèrent plus adaptés et omniprésents pour la plupart des organismes vivants (Khosla et Kumari, 2015). Ils sont répartis sur tout le génome, peuvent être détectés à n'importe quel stade de développement et ne sont pas influencés par la saison et l'environnement.

Un marqueur génétique peut être défini comme une séquence d'ADN avec un emplacement identifiable sur un chromosome (Jonah *et al.*, 2011). Il peut s'agir d'une longue séquence répétée, telle que les minisatellites, ou courte, comme une séquence présentant un changement d'une seule paire de bases (polymorphisme d'un seul nucléotide ; SNP). Un marqueur efficace doit garantir la reproductibilité et il doit être facile à détecter.

Différents types de marqueurs moléculaires qui ont été utilisés pour évaluer le polymorphisme de l'ADN, sont généralement classés en tant que marqueurs basés sur l'hybridation (comme les RFLP) et marqueurs basés sur la réaction en chaîne de la polymérase (RAPD, AFLP, SSR, ISSR, etc.) (Khosla et Kumari, 2015).

Synthèse bibliographique

Tableau 3 : Comparaison des principales caractéristiques des marqueurs moléculaires les plus couramment utilisés (Nadeem *et al.*, 2018)

| Caractéristiques | RFLP | RAPD | AFLP | ISSR | SSR | SNP |
|--------------------------|-------------|---------------|---------------|----------------|---------------|-------------|
| Co-dominant/dominant | Co-dominant | Dominant | Dominant | Dominant | Co-dominant | Co-dominant |
| Reproductibilité | Elevée | Elevée | Intermédiaire | Moyenne-élevée | Elevée | Elevée |
| Degré de polymorphisme | Moyen | Très élevée | Elevé | Elevé | Elevé | Elevé |
| Qualité d'ADN requise | Elevée | Elevée | Elevée | Faible | Faible | Elevée |
| Quantité d'ADN requise | Elevée | Moyenne | Faible | Faible | Faible | Faible |
| Indice de marqueur | Faible | Elevé | Moyen | Moyen | Moyen | Elevé |
| Abondance dans le génome | Elevée | Très Elevée | Très Elevée | Moyenne | Moyenne | Très Elevée |
| Coût | Elevée | Bas | Elevée | Elevée | Elevée | Variable |
| Séquençage | Oui | Non | Non | Non | Oui | Oui |
| Statut | Ancienne | Ancienne | Ancienne | Actuelle | Actuelle | Actuelle |
| Exigence PCR | Non | Oui | Oui | Oui | Oui | Oui |
| Visualisation | Radioactive | Gel d'agarose | Gel d'agarose | Gel d'agarose | Gel d'agarose | VISTA-SNP |
| ADN requis (ng) | 10000 | 20 | 500-1000 | 50 | 50 | 50 |

Chez le palmier dattier, ces marqueurs moléculaires ont été utilisés pour différencier génétiquement des cultivars, analyser la diversité génétique et les relations génétiques, et différencier les pieds mâles des pieds femelles (Naqvi *et al.*, 2021).

Les marqueurs microsatellites se sont avérés très utiles et constituent un outil puissant et important pour l'évaluation de la diversité génétique des plantes (Billotte *et al.*, 2004; Racchi *et al.*, 2014). Ils sont plus recommandés sur la discrimination entre les accessions en raison de leur degré de polymorphisme élevé, de leur hérédité codominante, de leur reproductibilité élevée, de leur nature multiallélique, de leur abondance relative et de leur couverture génomique étendue (Kalia *et al.*, 2011).

Synthèse bibliographique

Les microsatellites ou répétitions de séquences simples (SSR) consistent en un nombre variable d'unités répétées en tandem de 1 à 6 pb chacune et représentent une classe d'ADN répétitif communément trouvé dans les génomes eucaryotes et procaryotes (Hancock, 1999). Ce degré élevé de polymorphisme est le résultat d'un taux de mutation élevé (de 10^{-6} à 10^{-2} mutations par site par génération (Schlotterer, 2000)) et est attribué à des événements d'insertion et de suppression lors de la réplication de l'ADN. En raison du degré élevé de polymorphisme dans la taille des marqueurs, ils sont codominants.

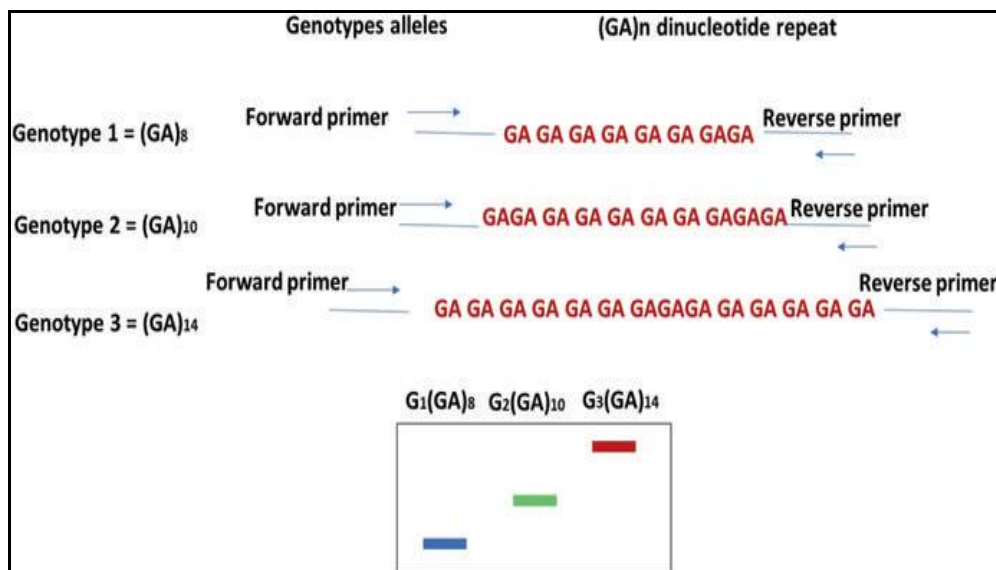


Figure 11 : Principe des SSR ou microsatellites basé sur un motif (GA)_n dans trois génotypes différents (Mourad *et al.*, 2019)

Des microsatellites ont été développés et utilisés comme étiquettes moléculaires pour des traits agronomiques clés notamment le sexe, mais aussi pour évaluer la diversité génétique et les relations phylogénétiques de matériel génétique pour un large éventail d'espèces végétales, y compris le palmier dattier (Elmeer et Mattat, 2012 ; Cherif *et al.*, 2013 ; Maryam *et al.*, 2016 et Awan *et al.*, 2017). Par exemple, la détermination selon laquelle les palmiers dattiers du Moyen-Orient et d'Afrique du Nord sont génétiquement différenciés est le résultat d'études portant sur des marqueurs SSR (Arabnezhad *et al.*, 2012 ; Zehdi-Azouzi *et al.*, 2015).

Akkak et ses collaborateurs (2009), ont utilisé pour leur étude, des cultivars de palmiers algériens afin de caractériser et évaluer des locus microsatellites sélectionnés. Une autre étude menée par Hussein en 2015 sur des palmiers dattiers égyptiens, a démontré un niveau de polymorphisme de 100 % avec 6 marqueurs spécifiques aux pieds mâles et 4 marqueurs spécifiques aux pieds femelles. Ce travail est l'un des premiers rapports pour l'étude de la

Synthèse bibliographique

détermination génétique du sexe chez des cultivars de palmier dattier utilisant des analyses SSR (Benkaidia, 2018).

Des travaux récents de Chaouch Khouane *et al.*, (2020), portés sur l'identification de marqueurs SSR chez des palmiers mâles et femelles, suggèrent des marqueurs potentiels comme le mPdCIR35 pour sélectionner des pollinisateurs chez la variété économique Deglet Noor. Wang *et al.*, (2020) ont développé des marqueurs SSR liés au sexe et les ont validés chez le palmier dattier.

Chapitre II

Matériels et méthodes

Chapitre II. Matériels et méthodes

1. Matériel végétal

Quinze cultivars de palmier dattier ont été utilisés dans cette étude, tous considérés comme des palmiers adultes. Douze de ces cultivars sont des femelles et trois cultivars sont des mâles (Tableau 4). Des échantillons de jeunes feuilles ont été prélevés sur des arbres de la station INRA de la wilaya d'Adrar. Dès l'obtention des feuilles, elles ont été plongées immédiatement dans de l'azote liquide puis congelées à -80 °C. Les travaux ont été menés au niveau du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (GBBV), Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Tableau 4 : Noms et Acronymes des géotypes étudiés

| Géotype | Acronyme |
|---------------------|----------|
| Adam rab اعضم الرب | ADR |
| بمحلوف | BMH |
| Aghqres أغراس | AGH |
| Tegaza تقازة | TEG |
| Taqerbucht تكربوشت | TAQ |
| Timjouher تيم جوهر | TIM |
| لحميرة | LEH |
| Timedowel تيم دول | DOW |
| Tinduken تندكان | TDK |
| Tinourigh تي نو غين | TIR |
| Tinasser تي ناصر | TINA |
| الغرس | GHE |
| ذكر | MALE1 |
| ذكر | MALE2 |
| ذكر | MALE3 |

2. Méthodes expérimentales

2.1. Isolement et purification de l'ADN génomique

Deux protocoles ont été utilisés :

Chapitre II. Matériels et méthodes

Protocole d'extraction 01

Le protocole de base utilisé est une modification de la méthode classique de CTAB. L'extraction de l'ADN a été réalisée sur feuilles de palmier dattier congelées à -80 °C. Le matériel végétal (150 mg) a été broyé en poudre fine avec un mortier en utilisant de l'azote liquide. Le broyat a été ensuite transféré dans un tube Eppendorf de 2 ml puis traité avec 900 µl de tampon d'extraction composé de 2% (p/v) CTAB (bromure de cetyltriméthylammonium) préchauffé, additionné de β-mercaptoéthanol (1%) qui est ajouté juste avant utilisation sous hotte. Le mélange est ensuite bien vortexé (30 à 40 secondes par tube) puis incubé pendant 1 heure dans un bain-marie à 65 °C. Après centrifugation de 15 mn (13000 rpm à 4 °C), le surnageant a été récupéré et traité à température ambiante avec un volume égal de chloroforme et d'alcool isoamylique (24 : 1), puis soumis à une agitation de 30 min (100 à 150 rpm) sur une table d'agitation. Cette étape a été répétée deux fois sur le surnageant afin de clarifier la phase aqueuse. 3 à 5 µl de RNase (10 mg/ml) (Qiagen) ont été ajoutés à chaque tube, suivis d'une agitation manuelle (par inversement des tubes) et d'une incubation des échantillons de 37 °C pendant 30 min. Le surnageant a été récupéré et traité avec 2 / 3 du volume prélevé d'isopropanol conservé à -20 °C puis soumis à une agitation manuelle (par inversement des tubes) jusqu'à l'apparition d'une pelote blanche. Les échantillons ont été laissés précipiter à -20 °C pendant 5 à 10 min. Pour la séparation des acides nucléiques, les tubes ont été centrifugés à 13 000 rpm pour 10 minutes à 4 °C. Le surnageant a été jeté et le culot a été lavé avec 500 µl de solution de lavage 1 (Annexe 1). Après incubation de 15 min à température ambiante, les tubes ont été centrifugés une seconde fois à 13000 rpm à 4° C pendant 5 min. Le surnageant a été jeté et le culot a été lavé avec 500 µl de solution de lavage 2 (Annexe 1). Les tubes ont été ensuite incubés à température ambiante (pas plus de 5 min) puis centrifugés à 13000 rpm à 4° C pendant 5 min. le surnageant obtenu a été éliminé et le culot a été séché pendant 30 à 40 min. le culot d'ADN a été ensuite suspendu dans 100 µl de TE (0,1X). Les échantillons d'ADN ont été stockés à 4 °C pour une utilisation ultérieure.

Protocole d'extraction 02

Le protocole utilisé est la méthode CTAB décrite par Al-Qurainy *et al.*, (2018) : Les feuilles de palmier dattier (200 mg) congelées à -80 °C, ont été broyées en fine poudre avec un mortier utilisant de l'azote liquide. Les tissus en poudre obtenus ont été transférés dans un tube d'Eppendorf de 2 ml et traités avec 800 µl de tampon d'extraction préchauffé et

Chapitre II. Matériels et méthodes

10 µl de RNase A (10 mg/ml) (Qiagen). Au mélange ci-dessus, 100 µl de PVP à 3% et 8 µl de β mercaptoéthanol ont été ajoutés, suivis d'une incubation à 65 ° C pendant 30 min avec agitation toutes les 5 min. Le mélange a ensuite été refroidi à température ambiante et traité avec un volume égal de chloroforme et d'alcool isoamylique (24 : 1), suivi d'une agitation de 20 min (100 à 150 rpm) sur une table d'agitation. Le mélange a été soumis à une centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 min à 4 °C. La suspension aqueuse supérieure claire a été transférée dans un nouveau tube Eppendorf et traitée avec un volume égal d'isopropanol glacé à -20 ° C pendant 1 h. Pour la séparation des acides nucléiques, les tubes ont été centrifugés à 13 000 rpm pendant 20 min. Le surnageant a été jeté et le culot a été lavé deux fois avec de l'éthanol froid à 70 %. Le culot d'ADN a été séché à l'air libre pendant 30 min et dissous dans 200 µl de tampon TE (0,1X). Les échantillons d'ADN ont été stockés à 4 °C pour une utilisation ultérieure.

2.2. Contrôle de la qualité d'ADN

L'intégrité des extraits d'ADN est vérifiée par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 0,8% dans du tampon TBE (0,5 X) (Annexe 1). La migration est effectuée dans une cuve d'électrophorèse horizontale Mupid ONE à un voltage constant (100 V) pendant 45 min. Le gel coloré auparavant au bromure d'éthidium (BET), est ensuite visualisé sous illumination aux ultraviolets.

2.3. Analyse quantitative des ADN extraits

Les ADN purifiés sont quantifiés en déposant 1µl d'échantillon sur un spectrophotomètre Nanodrop (1000 Thermo Scientific, Wilmington, USA). Pour considérer un échantillon pur en ADN, le rapport A260nm/A280nm doit être compris entre 1,8 et 2,0 ; un rapport inférieur à 1,8 traduit généralement une contamination en protéines. D'après les résultats du contrôle au Nanodrop (Annexe 2), le degré de pureté des ADN des échantillons est bon.

2.4. Dilution des ADN

Pour réaliser les différentes amplifications, il faut que les échantillons d'ADN aient la même concentration. Pour cela des dilutions ont été effectués pour une concentration finale de 40ng/µl. Les échantillons d'ADN dilués ont été conservés à -20 °C.

Chapitre II. Matériels et méthodes

2.5. Choix des marqueurs moléculaires utilisés

Après une recherche bibliographique, notre choix c'est porté sur des marqueurs SSR (Tableau 5) qui ont déjà fait l'objet de plusieurs publications (Billote, 2004 ; Maryam *et al.*, 2016 ; Chaouch Khouane *et al.*, 2020). Les marqueurs SSR proviennent, en leur grande majorité, des banques ESTs (Expressed Sequence Tags), c'est-à-dire, que les séquences qu'elles contiennent sont des séquences de génome exprimées et donc elles correspondent à des séquences codantes.

Tableau 5 : Caractéristiques des marqueurs SSR utilisés

| Locus marqueur | Séquence des primer | Tm optimale | Motif de répétition | Taille attendue | Taille des allèles |
|----------------|--|-------------|---------------------|-----------------|--------------------|
| mPdCIR010 | F : ACCCCGGACGTGAGGTG R : CGTCGATCTCCTCCTTTGTCTC | 55,9 | (GA) ₂₂ | 180 | 118-161 |
| mPdCIR016 | F : AGCGGGAAATGAAAAGGTAT R : ATGAAAACGTGCCAAATGTC | 51,7 | (GA) ₁₄ | 209 | 130-138 |
| mPdCIR032 | F : CAAATCTTTGCCGTGAG R : GGTGTGGAGTAATCATGTAGTAG | 51,5 | (GA) ₁₉ | 376 | 284-305 |
| mPdCIR070 | F : CAAGACCCAAGGCTAAC R : GGAGGTGGCTTTGTAGTAT | 48,7 | (GA) ₁₇ | 265 | 182-208 |
| mPdCIR052 | F : GAGAGAGGGTGGTGTATT R : TTCATCCAGAACCACAGTAT | 50,4 | (GA) ₂₉ | 375 | 152-183 |

2.6. Amplification de l'ADN par PCR

La réaction PCR a été réalisée en utilisant 25 µl de mélange réactionnel contenant : 12,5 µl de Master Mix, 8,5 µl d'H₂O up, 1 µl d'amorce F (20µM), 1 µl d'amorce R (20 µM). A ce mélange, a été rajouté 2 µl de l'ADN génomique (40 ng).

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur à 96 puits (Applied Biosystem) dans les conditions suivantes :

- Une étape de dénaturation : 5 minutes à 95°C appelée étape de pré-incubation pour dénaturer l'ADN et activer l'enzyme.

- Une étape d'amplification de 35 cycles, avec pour chaque cycle : dénaturation 30 s à 95 °C, hybridation 1 min à Tm optimale pour chaque couple d'amorces et élongation 1 min à 72 °C.

- Une étape d'élongation finale : 7 min à 72 °C, 1 min

Chapitre II. Matériels et méthodes

2.7. Séparation des marqueurs SSR par électrophorèse

Une fois l'étape d'amplification terminée, il est nécessaire de réaliser une électrophorèse afin de visualiser vos résultats. Le tampon d'électrophorèse préparé pour la migration des ADN est composé de TBE (0,5X). La migration se fait sur gel d'agarose à 3% dans une cuve d'électrophorèse horizontale SCIE-PLAS MIDI de chez Biorad, à un voltage constant (250 V) et un ampérage de 40 Ma pendant 4 heures. Le gel est ensuite visualisé sous illumination aux ultraviolets.

2.8. Traitement des données et analyse statistique

La visibilité des bandes peut être améliorée, notamment par des traitements numériques des images réalisés avec un logiciel de traitement d'images (PhotoEditor, Paint Shop Pro, PhotoCapt...etc). On peut jouer sur la luminosité, sur le contraste, sur l'intensité relative des couleurs. On peut également obtenir une image en négatif souvent plus lisible.

Nos gels ont été traités avec le logiciel PhotoCapt qui, à travers l'analyse densitométrique des intensités de chaque produit de PCR, permet de donner et estimer les valeurs des proportions relatives des fragments d'ADN dont la taille et le poids moléculaire PM. Le traitement de chaque gel est ensuite scoré à l'aide d'un logiciel tableur Excel, et la présence d'une bande (1) ou l'absence (0) a été enregistrée dans une matrice binaire et analysée par le logiciel XLSTAT 2014-Windows, basé sur le coefficient de similarité de Jaccard. Le dendrogramme de similarité a été construit en utilisant la méthode UPGMA (Unweighted Pair group Method using arithmetic Averages).

A partir profiles électrophorétiques obtenus, nous avons évalué la variabilité génétique selon les principes avancés de Hardy-Weinberg. Pour chaque type SSR analysé chez les 15 génotypes étudiés, nous avons préconisé son déterminisme génétique en tenant compte du nombre et du niveau de migration des bandes, de la fréquence allélique et du taux de polymorphisme.

Chapitre III

Résultats et discussion

Chapitre III. Résultats et discussion

1. Résultats d'extraction de l'ADN

La feuille du palmier dattier, se caractérise par la présence de fibres et de textures dures qui rendent l'extraction de l'ADN difficile, en plus d'une forte concentration de métabolites secondaires, tels que les polysaccharides, les protéines, les polyphénols et les tanins. Ces composants, lorsqu'ils sont présents dans la feuille, interfèrent avec l'extraction de l'ADN et donnent une faible qualité et quantité de celui-ci. Par conséquent, de nombreux chercheurs ont travaillé sur ce point pour trouver un moyen approprié d'extraire une bonne qualité et quantité d'ADN (Mirbahar *et al.*, 2014).

Pour cette raison, nos premiers efforts ont porté sur la mise en point d'une technique d'extraction capable de donner un ADN pouvant être utilisé comme support pour une éventuelle amplification par PCR.

Deux protocoles pour extraction d'ADN ont été testés :

- Protocole d'extraction d'ADN selon la méthode de CTAB modifié (**protocole 01**).
- Protocole de CTAB décrit par Al-Qurainy *et al.*, (2018) (**protocole 02**).

Les extraits d'échantillons d'ADN obtenus après extraction par le protocole 01 à partir d'une gamme de feuilles de palmier dattier, donnent un profile clair (Figure 12), mais avec de maigres quantités allant de 30 à 224,8 ng/μl d'ADN (Annexe 2). Cependant ces concentrations suffisent pour établir une amplification par PCR .

Les extraits d'échantillons d'ADN obtenus après extraction par le protocole 01 ont données des quantités d'ADN médiocres (> 5 ng/μl). On a jugé qu'il n'était pas nécessaire d'analyser la qualité de ces extraits sur gel d'agarose et de continuer notre démarche avec les extraits du protocole 01.

2. Résultats de l'amplification par la technique PCR-SSR

2.1. Résultat d'amplification des marqueurs mPdCIR010 et mPdCIR85

Le test d'amplification du marqueur mPdCIR10 a été effectué sur 15 cultivars de palmiers dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Le produit d'amplification a été analysé sur gel d'agarose 3%, en présence du marqueur de taille 100 pb. Le résultat visualisé était négatif (Figure). Ceci peut être expliqué soit par une détérioration d'un réactif, soit à une perturbation au niveau de l'amplification (température d'hybridation non conforme ?). Par manque de temps, on n'a pas pu faire d'autres tests pour vérifier ou ça a mal fonctionné.

Chapitre III. Résultats et discussion

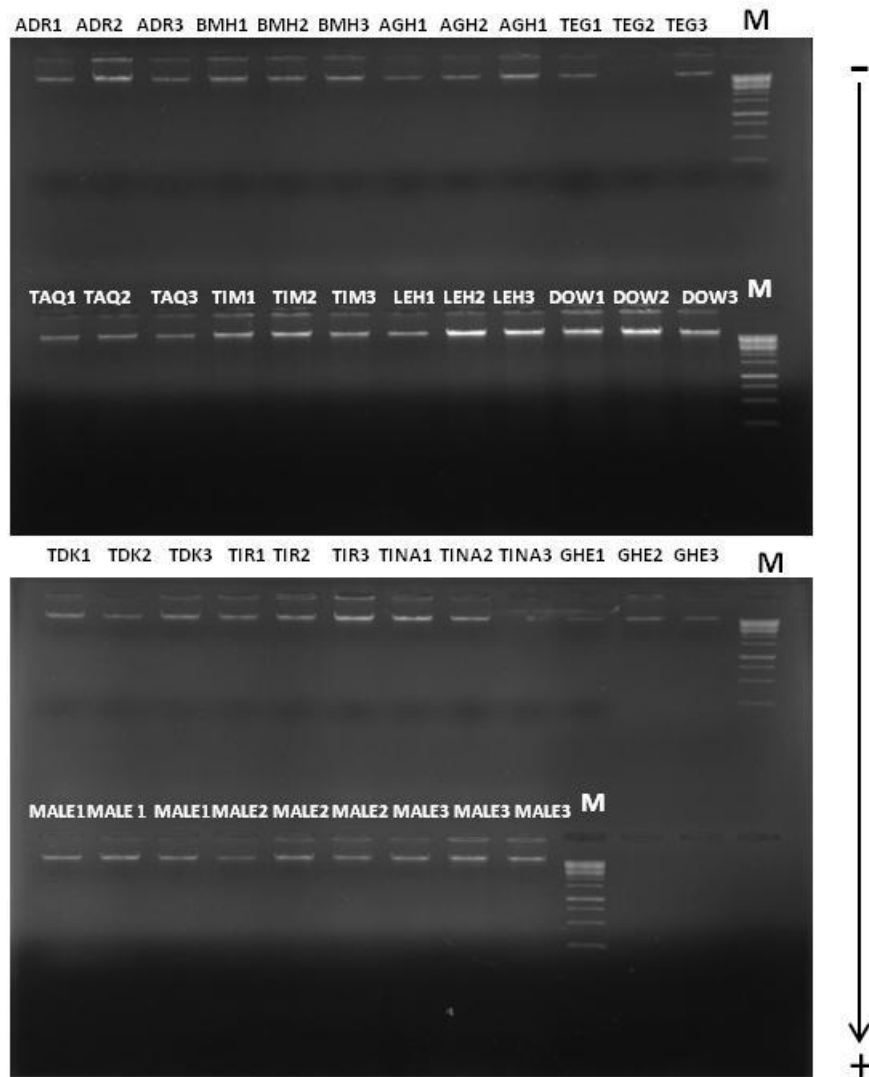


Figure 12 : Analyse d'extraits d'ADN sur gel d'agarose 0,8%. M : marqueur de taille

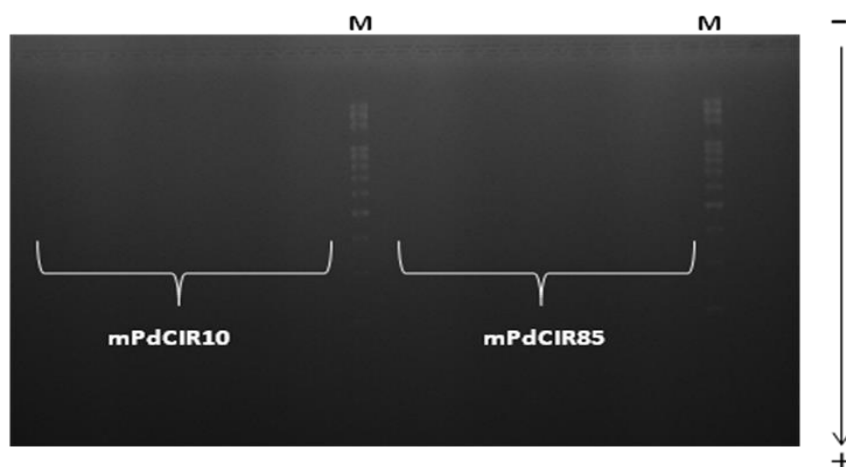


Figure 13: Profil d'amplification généré avec les deux amorces SSR (mPdCIR10) et (mPdCIR85) sur gel d'agarose 3%, en utilisant l'ADN génomique de plants de palmier dattier mâles et femelles. M : marqueur de taille

Chapitre III. Résultats et discussion

2.2. Résultat d'amplification des marqueurs mPdCIR016, mPdCIR32 et mPdCIR70

Le test d'amplification des marqueurs mPdCIR16, mPdCIR32 et mPdCIR70 a été effectué sur 15 cultivars de palmiers dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Le produit d'amplification a été analysé sur gel d'agarose 3%, en présence du marqueur de taille 100 pb (Figures 14 et 15). Les gels ont été traités par la suite avec le logiciel PhotoCapt, pour une meilleure visualisation des allèles (Figure 16).

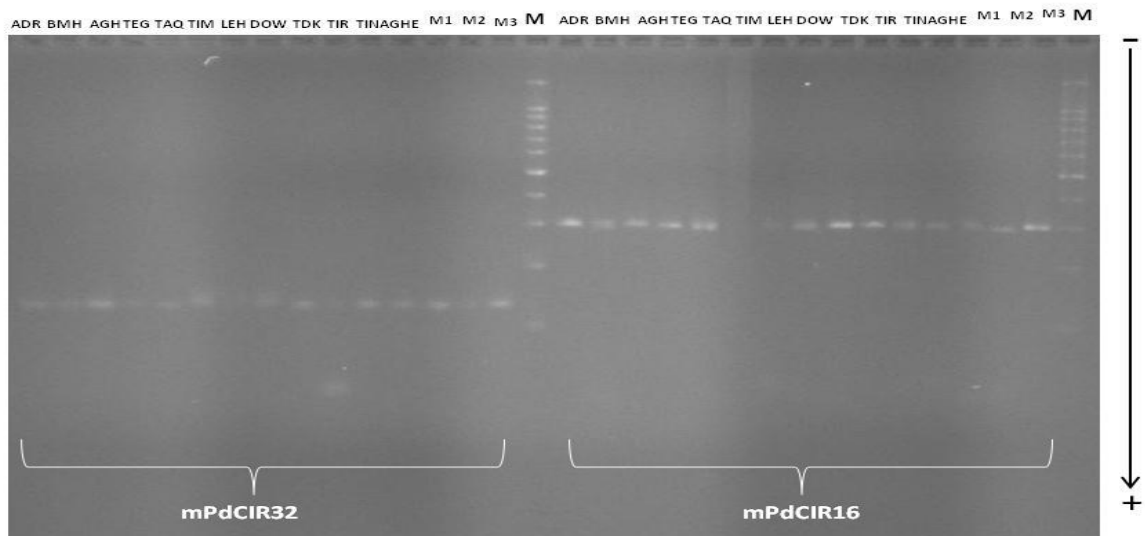


Figure 14 : Profil d'amplification généré avec les deux amorces SSR (mPdCIR32) et (mPdCIR16) sur gel d'agarose 3%, en utilisant l'ADN génomique de plants de palmier dattier mâles et femelles. M : marqueur de taille.

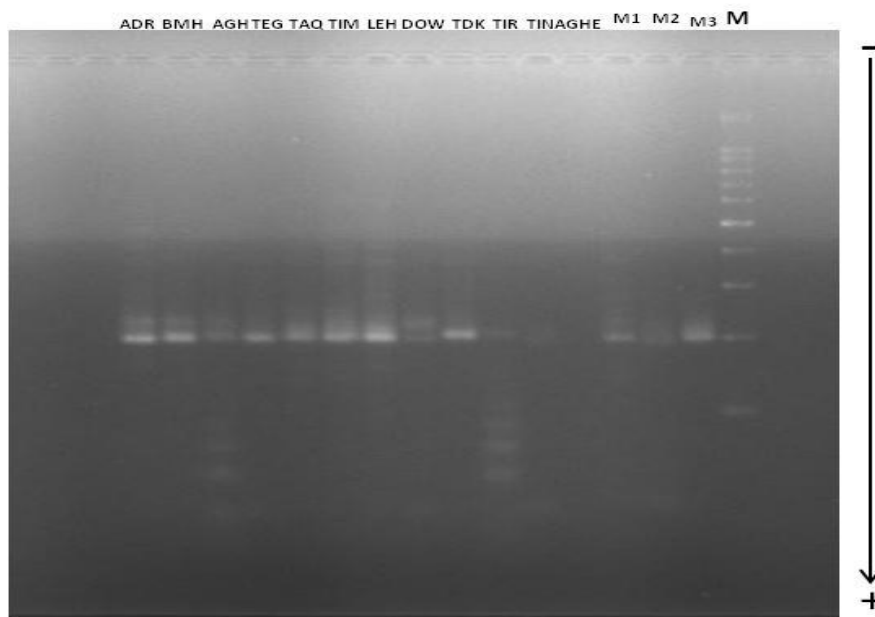


Figure 15 : Profil d'amplification généré avec l'amorce SSR (mPdCIR70) et sur gel d'agarose 3%, en utilisant l'ADN génomique de plants de palmier dattier mâles et femelles. M : marqueur de taille.

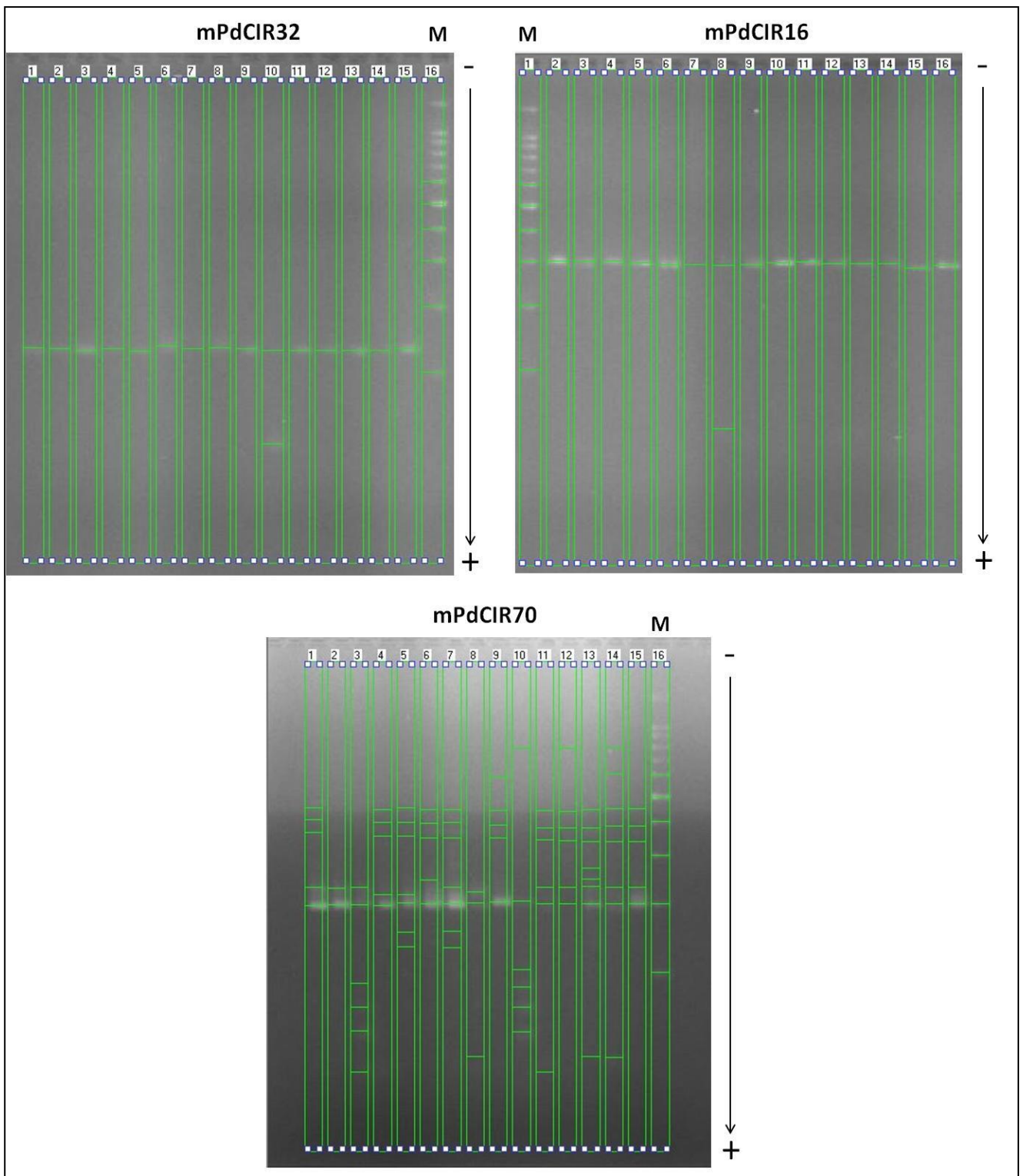


Figure 16 : Profils d'amplification des trois marqueurs SSR (mPdCIR32) et (mPdCIR16) et (mPdCIR70) traités avec le logiciel PhotoCapt. M : marqueur de taille.

Chapitre III. Résultats et discussion

3. Analyse des profils électrophorétiques des marqueurs SSR

D'après les profils électrophorétiques obtenus des trois marqueurs SSR (mPdCIR16, mPdCIR32 et mPdCIR70), il n'y pas de traits distinctifs entre les génotypes mâles et femelles. Cependant un polymorphisme intra-variétal est observé pour le marqueur mPdCIR70. Nous avons donc réorienté notre étude vers l'analyse de la diversité génétique des différents cultivars de palmiers dattier.

3.1. Analyse du profile électrophorétique du marqueur mPdCIR32

Le polymorphisme intra-variétal n'est pas détecté pour le marqueur mPdCIR32, la présence d'une seule bande d'un poids moléculaire presque identique (~130 pb) ($R_f = 0.56$) chez les 15 génotypes de palmiers dattiers le confirme (Figure 16). Cependant, une deuxième bande unique de taille ~20 pb ($R_f = 0.75$) est observée chez le génotype TIR. Ceci peut être le résultat d'un excès d'amorce, ou bien un marqueur SSR de moins de 100 pb, et dans ce cas-là, on peut parler d'un taux de polymorphisme de 50%. Des résultats similaires aux nôtres, ont rapporté que le marqueur mPdCIR32 était monomorphe et a présenté seulement deux bandes dans l'analyse de la diversité génétique de palmiers dattier (Chaouch Khouane *et al.*, 2020).

Billote *et al.*, (2004) ont été les premiers à établir une liste de marqueurs SSR chez *Phoenix dactylifera*. Ces auteurs ont proposé ces marqueurs dont le mPdCIR16, le mPdCIR32 et le mPdCIR70 pour l'identification des cultivars, l'analyse des pedigrees, la diversité du germoplasme ainsi que les études de cartographie génétique.

Plusieurs études ont testé le marqueur SSR (mPdCIR32) dans l'analyse de la variabilité génétique et l'identification du sexe chez le palmier dattier (Elmeer et Mattat, 2015 ; Maryam *et al.*, 2016 ; Awan *et al.*, 2017), mais peu de travaux confirment l'état polymorphe de ce dernier.

3.2. Analyse du profile électrophorétique du marqueur mPdCIR16

Le polymorphisme intra-variétal n'est pas détecté pour le marqueur mPdCIR16, la présence d'une seule bande d'un poids moléculaire presque identique (~300 pb) ($R_f = 0.39$) chez les 15 génotypes de palmiers dattiers le confirme (Figure 16). Cependant, un polymorphisme peut être suspecté par la présence d'une bande unique de 26 pb ($R_f = 0.72$) chez la variété LEH, ce qui induit un polymorphisme de 50%. Plusieurs travaux similaires ont rapporté le caractère monomorphe du marqueur mPdCIR16 (Bodian *et al.*, 2014 ; Chaouch

Chapitre III. Résultats et discussion

Khouane *et al.*, 2020).). Néanmoins, son utilisation est toujours d'actualité dans les études de la diversité génétique.

3.3. Analyse du profil électrophorétique du marqueur mPdCIR70

Un total de 18 allèles avec un polymorphisme bien visible entre les 15 cultivars de palmiers dattiers. Le nombre d'allèles amplifiés varie d'un génotype à un autre. La taille des bandes varie entre 14 pb chez les deux variétés AGH et TIR et 720 pb chez les variétés TIR, GHE et MALE2 et la fréquence allélique varie entre 0,1 chez le génotype BMH et 0.4 chez les génotypes MALE 1 et MALE 2, avec un taux de polymorphisme de 90% (Figure 16).

Une bande commune de (Rf=0.3) a été générée par tous les génotypes étudiés. Pour une meilleure interprétation, les résultats ont été convertis en dendrogramme de similarité en utilisant la méthode UPGMA (Figure 17).

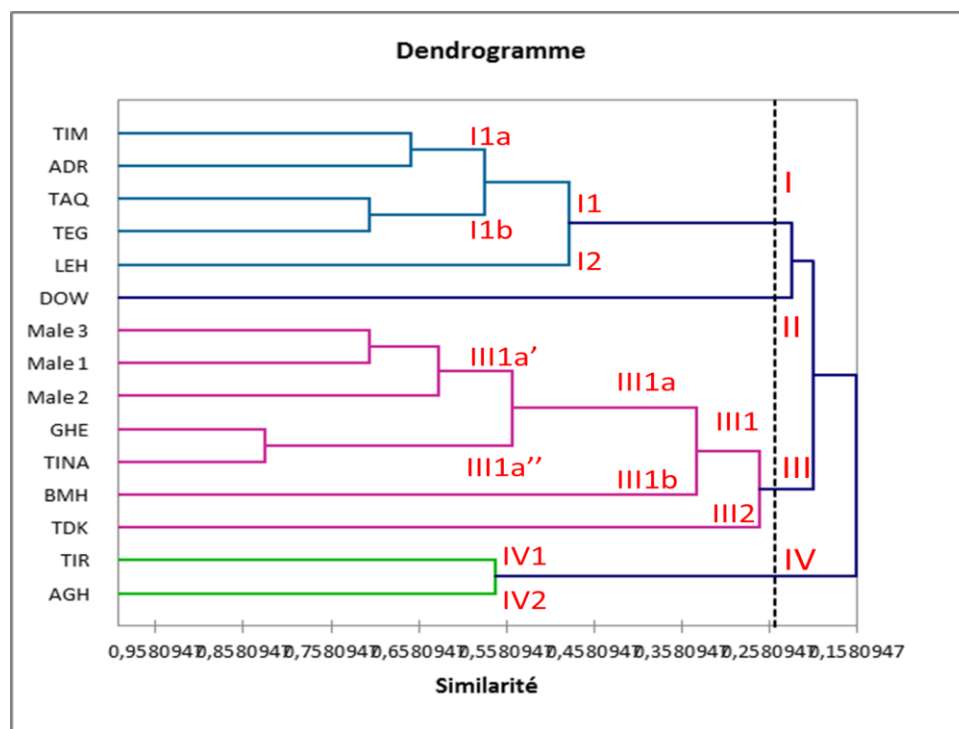


Figure 17 : Dendrogramme de similarité (utilisant la méthode UPGMA) basé sur les profile électrophorétique du marqueur SSR mPdCIR70 des 15 génotypes de palmiers dattiers

Chapitre III. Résultats et discussion

Tableau 6 : Matrice de similarité génétique pour le marqueur SSR mPdCIR70 basée sur le coefficient de Jaccard entre les différents génotypes étudiés.

| | ADR | BMH | AGH | TEG | TAQ | TIM | LEH | DOW | TDK | TIR | TINA | GHE | Male 1 | Male 2 | Male 3 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| ADR | 1 | 0,4000 | 0,2500 | 0,6667 | 0,5000 | 0,6667 | 0,5714 | 0,1667 | 0,2500 | 0,1000 | 0,2500 | 0,2222 | 0,3333 | 0,3333 | 0,4286 |
| BMH | 0,4000 | 1 | 0,4000 | 0,1667 | 0,1250 | 0,1667 | 0,3333 | 0,3333 | 0,1667 | 0,1429 | 0,4000 | 0,3333 | 0,2857 | 0,2857 | 0,4000 |
| AGH | 0,2500 | 0,4000 | 1 | 0,1111 | 0,0909 | 0,1111 | 0,2222 | 0,1667 | 0,1111 | 0,5714 | 0,2500 | 0,2222 | 0,2000 | 0,2000 | 0,2500 |
| TEG | 0,6667 | 0,1667 | 0,1111 | 1 | 0,7143 | 0,6667 | 0,3750 | 0,4000 | 0,2500 | 0,1000 | 0,1111 | 0,1000 | 0,2000 | 0,2000 | 0,2500 |
| TAQ | 0,5000 | 0,1250 | 0,0909 | 0,7143 | 1 | 0,5000 | 0,6250 | 0,2857 | 0,2000 | 0,0833 | 0,0909 | 0,0833 | 0,1667 | 0,1667 | 0,2000 |
| TIM | 0,6667 | 0,1667 | 0,1111 | 0,6667 | 0,5000 | 1 | 0,3750 | 0,1667 | 0,2500 | 0,1000 | 0,1111 | 0,1000 | 0,3333 | 0,2000 | 0,2500 |
| LEH | 0,5714 | 0,3333 | 0,2222 | 0,3750 | 0,6250 | 0,3750 | 1 | 0,1429 | 0,2222 | 0,0909 | 0,2222 | 0,2000 | 0,1818 | 0,1818 | 0,2222 |
| DOW | 0,1667 | 0,3333 | 0,1667 | 0,4000 | 0,2857 | 0,1667 | 0,1429 | 1 | 0,1667 | 0,1429 | 0,1667 | 0,1429 | 0,1250 | 0,1250 | 0,1667 |
| TDK | 0,2500 | 0,1667 | 0,1111 | 0,2500 | 0,2000 | 0,2500 | 0,2222 | 0,1667 | 1 | 0,1000 | 0,4286 | 0,3750 | 0,2000 | 0,2000 | 0,2500 |
| TIR | 0,1000 | 0,1429 | 0,5714 | 0,1000 | 0,0833 | 0,1000 | 0,0909 | 0,1429 | 0,1000 | 1 | 0,1000 | 0,2000 | 0,0833 | 0,1818 | 0,1000 |
| TINA | 0,2500 | 0,4000 | 0,2500 | 0,1111 | 0,0909 | 0,1111 | 0,2222 | 0,1667 | 0,4286 | 0,1000 | 1 | 0,8333 | 0,5000 | 0,5000 | 0,6667 |
| GHE | 0,2222 | 0,3333 | 0,2222 | 0,1000 | 0,0833 | 0,1000 | 0,2000 | 0,1429 | 0,3750 | 0,2000 | 0,8333 | 1 | 0,4444 | 0,6250 | 0,5714 |
| Male 1 | 0,3333 | 0,2857 | 0,2000 | 0,2000 | 0,1667 | 0,3333 | 0,1818 | 0,1250 | 0,2000 | 0,0833 | 0,5000 | 0,4444 | 1 | 0,5556 | 0,7143 |
| Male 2 | 0,3333 | 0,2857 | 0,2000 | 0,2000 | 0,1667 | 0,2000 | 0,1818 | 0,1250 | 0,2000 | 0,1818 | 0,5000 | 0,6250 | 0,5556 | 1 | 0,7143 |
| Male 3 | 0,4286 | 0,4000 | 0,2500 | 0,2500 | 0,2000 | 0,2500 | 0,2222 | 0,1667 | 0,2500 | 0,1000 | 0,6667 | 0,5714 | 0,7143 | 0,7143 | 1 |

À la distance 0,25, le dendrogramme montre que les génotypes étudiés se répartissent en 4 clusters majeurs. Le premier cluster est réparti en 2 sous cluster (I1 et I2) ($d = 0,12$), le premier sous cluster contient les génotypes TIM, ADR, TAQ et TEG qui sont liés au génotype LEH. Le cluster II contient un seul génotype, DOW qui est proche aux génotypes TIM, ADR, TAQ, TEG et LEH. Le troisième cluster (III) semble plus diversifié avec 2 sous cluster III1 et III2 ($d=0,27$), ce dernier présente un seul génotype : TDK. Le premier sous cluster III1 est lui-même réparti en sous cluster (III1a et III1b) ($d=0,340$) où III1b est composé d'un seul génotype BMH et III1a est lui-même subdivisé en deux sous clusters : III1a' et III1a'' composé des génotypes : MALE 1, MALE 2, MALE 3, GHE et TINA. D'après la matrice de similarité (Tableau 6), le coefficient le plus élevé pour ce groupe, est obtenu avec la combinaison de GHE et TINA (coef = 0,833). Le cluster IV est subdivisé en deux sous-clusters IV1 et IV2 composés des deux génotypes TIR et AGH.

L'analyse UPGMA a montré une structure génétique conservée pour les génotypes mâles et les génotypes femelles GHE et TINA. Ainsi, nous pouvons supposer, pour cette étude, que les pollinisateurs mâles pourraient être nommés comme le type femelle des deux cultivars. Ceci a été proposé par Chaouch Khouane et ses collaborateurs (2020) dans leur étude sur la diversité génétique des palmiers algériens.

Plusieurs rapports ont indiqué l'utilisation du locus mPdCIR70 dans l'étude du polymorphisme génétique chez le palmier dattier (Racchi *et al.*, 2014 ; Naeem *et al.*, 2018 ; Chaouch Khouane, 2020).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Conclusion

Le palmier dattier étant de nature dioïque, la discrimination sexuelle est cruciale au stade précoce des semis. Il est problématique pour les sélectionneurs du palmier dattier de discriminer le sexe des plantes sur le terrain en fonction des caractéristiques morphologiques. Il n'y a pas de différenciation claire des chromosomes basés sur le sexe chez le palmier dattier, bien que certaines études cytogénétiques aient suggéré des preuves de différenciation chromosomique (Naqvi *et al.*, 2021). La pollinisation croisée dans la nature a rendu difficile l'amélioration des cultures de palmiers dattiers. Par conséquent, le développement de marqueurs moléculaires fiables pour la détermination du sexe est important pour le succès du programme de sélection des palmiers dattiers.

En effet, Les méthodes moléculaires fournissent un outil précieux pour une bonne et facile identification du genre à n'importe quel stade de croissance et de développement. L'analyse de l'ADN peut identifier les individus qui diffèrent génétiquement dans la plupart des cas extrêmes par une seule paire de bases (Khosla et Kumari, 2015).

Plusieurs chercheurs ont développé des marqueurs microsatellites (SSR) liés au sexe et les ont identifiés comme marqueurs candidats dans la détermination du sexe, ce qui peut accélérer les études liées au déterminisme du sexe chez cette espèce. Par conséquent, des marqueurs microsatellites (SSR) ont été utilisés dans cette étude afin de nous fournir une variation suffisante pour distinguer les pollinisateurs mâles des plantes femelles chez des cultivars locaux de palmier dattier.

Par manque de temps, nous n'avons pu tester que 5 couples d'amorces sur 15 variétés de palmier dattier mâles et femelles. Après plusieurs essais de visualisation des ADN sur gel d'agarose, un essai de migration sur gel de polyacrylamide a été tenté pour une meilleure résolution des bandes. L'essai a malheureusement échoué (la cuve était non fonctionnelle).

Nos données attestent la possibilité d'utiliser le marqueur SSR mPdCIR70 comme descripteur, non du déterminisme du sexe, mais dans la diversité génétique et le contrôle des appellations d'origine du palmier dattier. En effet, nous avons trouvé la présence de variations génétiques entre génotypes de palmiers locaux. Ces variations génétiques des palmiers dattiers sont importantes pour les programmes d'amélioration et de conservation des cultures.

Conclusion et perspectives

En perspective, nos résultats pourraient être utilement complétés par :

Une incorporation d'un nombre accru d'accessions de plantes, avec une répartition géographique, et d'autres marqueurs SSR dans les études génétiques, afin d'offrir une portée plus large dans les futures études sur le sexe du palmier dattier pour le génotypage et pour établir des clés d'identification des cultivars, ainsi que l'identification des codes-barres pour les étiquettes et la certification d'origine.

Une mise au point de certaines méthodes fiables et rapides comme les marqueurs SSR et d'autres marqueurs moléculaires, pour sélectionner les caractères requis au stade juvénile chez toutes les plantes dioïques dans le but de différencier les mâles et les femelles.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adawy, S., Omar, M.A., and El-Itriby, H. 2015. Sex-Differentiation Based on Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) with 5S and 45S rDNA of Egyptian Date Palm Trees. *Int. J. Adv. Biotechnology and Research* **6**: 144–151.
- Adwa, A.A. 2021. Insectes de la couronne du palmier dattier dans la phoeniculture traditionnelle et nouvelle à Djibouti. Université de Montréal. Canada
- Ageez, a., and madboly, e. 2011. Identification of male specific molecular markers in date palm *sewi* cultivar. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology* **40**: 201–214. doi:[10.21608/ejgc.2011.10787](https://doi.org/10.21608/ejgc.2011.10787).
- Akkak, A., Scariot, V., Torello Marinoni, D., Boccacci, P., Beltramo, C., and Botta, R. 2009. Development and evaluation of microsatellite markers in *Phoenix dactylifera* L. and their transferability to other *Phoenix* species. *Biologia Plantarum* **53**: 164–166. doi:[10.1007/s10535-009-0026-y](https://doi.org/10.1007/s10535-009-0026-y).
- Al-Ani, B., Zaid, A., Shabana, H., and Emeritus. 2010. On the Status of Chromosomes of the Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Acta Horticulturae* 882. doi:[10.17660/ActaHortic.2010.882.28](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.882.28)
- Al-Dous, E.K., George, B., Al-Mahmoud, M.E., Al-Jaber, M.Y., Wang, H., Salameh, Y.M., Al-Azwani, E.K., Chaluvadi, S., Pontaroli, A.C., DeBarry, J., Arondel, V., Ohlrogge, J., Saie, I.J., Suliman-Elmeer, K.M., Bennetzen, J.L., Kruegger, R.R., and Malek, J.A. 2011. De novo genome sequencing and comparative genomics of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Nat Biotechnol* **29**(6): 521–527. doi:[10.1038/nbt.1860](https://doi.org/10.1038/nbt.1860).
- Allam, A., Djafri, K., Bergouia, M., Khemissat, E.-H., Tama, M., and Taleb, B. 2021. morphological and physicochemical characterisation of date palm cultivars from ghardaïa (southeast algeria). *jalse* **185**(1): 12–24. doi:[10.46909/journalalse-2021-002](https://doi.org/10.46909/journalalse-2021-002).
- Al-Mssallem, I.S., Hu, S., Zhang, X., Lin, Q., Liu, W., Tan, J., Yu, X., Liu, J., Pan, L., Zhang, T., Yin, Y., Xin, C., Wu, H., Zhang, G., Ba Abdullah, M.M., Huang, D., Fang, Y., Alnakhli, Y.O., Jia, S., Yin, A., Alhuzimi, E.M., Alsaihati, B.A., Al-Owayyed, S.A., Zhao, D., Zhang, S., Al-Otaibi, N.A., Sun, G., Majrashi, M.A., Li, F., Tala, Wang, J., Yun, Q., Alnassar, N.A., Wang, L., Yang, M., Al-Jelaify, R.F., Liu, K., Gao, S., Chen, K., Alkhaldi, S.R., Liu, G., Zhang, M., Guo, H., and Yu, J. 2013. Genome sequence of the date palm *Phoenix dactylifera* L. *Nat Commun* **4**(1): 2274. Nature Publishing Group. doi:[10.1038/ncomms3274](https://doi.org/10.1038/ncomms3274).
- Arabnezhad, H., Bahar, M., Mohammadi, H.R., and Latifian, M. 2012. Development, characterization and use of microsatellite markers for germplasm analysis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae* **134**: 150–156. doi:[10.1016/j.scienta.2011.11.032](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.11.032).
- Awan, F.S., Maryam, Jaskani, M.J., and Sadia, B. 2017. Gender Identification in Date Palm Using Molecular Markers. *In* Date Palm Biotechnology Protocols Volume II. *Edited by* J.M. Al-Khayri, S.M. Jain, and D.V. Johnson. Springer New York, New York, NY. pp. 209–225. doi:[10.1007/978-1-4939-7159-6_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7159-6_18).
- Barrow, S.C. 1998. A Monograph of *Phoenix* L. (Palmae: Coryphoideae). *Kew Bulletin* **53**(3): 513–575. [Springer, Royal Botanic Gardens, Kew]. doi:[10.2307/4110478](https://doi.org/10.2307/4110478).

Références bibliographiques

- Bedjaoui, H. 2019. Etude de la diversité génétique de quelques accessions de palmier dattier en Algérie moyennant les marqueurs de l'ADN de type SSR. Université Mohamed Kheider Biskra. Algérie.
- Bekheet, S.A., and Hanafy, M.S. 2011. Towards Sex Determination of Date Palm. *In* Date Palm Biotechnology. Edited by S.M. Jain, J.M. Al-Khayri, and D.V. Johnson. Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 551–566. doi:[10.1007/978-94-007-1318-5_26](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1318-5_26).
- Belaroussi, M.E.H. 2019. Etude de la production du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L. variété Deglet Nour : cas des régions de Oued Mya et Oued Righ. Université Kasdi Merbah – Ouargla. Algérie.
- Benkaidia, I. 2020. Détermination du sexe chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : approches cytogénétiques, biochimiques et moléculaires. Université Frères Mentouri 1. Constantine. Algérie.
- Benziouche, S. 2008. L'impact du PNDA* sur les mutations du système de production oasien dans le sud algérien. *Revue Régions Arides* 21:1321-1330
- Benziouche, S.E. 2017. L'agriculture biologique, un outil de développement de la filière dattes dans la région des Ziban en Algérie. *Cah. Agric.* 26(3): 35008. doi:[10.1051/cagri/2017025](https://doi.org/10.1051/cagri/2017025).
- Billotte, N., Marseillac, N., Brottier, P., Noyer, J.-L., Jacquemoud-Collet, J.-P., Moreau, C., Couvreur, T., Chevallier, M.-H., Pintaud, J.-C., and Risterucci, A.-M. 2004. Nuclear microsatellite markers for the date palm (*Phoenix dactylifera* L.): characterization and utility across the genus *Phoenix* and in other palm genera. *Mol Ecol Notes* 4(2): 256–258. doi:[10.1111/j.1471-8286.2004.00634.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00634.x).
- Bouguedoura, N., Bennaceur, M., Babahani, S., and Benziouche, S.E. 2015. Date Palm Status and Perspective in Algeria. *In* Date Palm Genetic Resources and Utilization. Edited by J.M. Al-Khayri, S.M. Jain, and D.V. Johnson. Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 125–168. doi:[10.1007/978-94-017-9694-1_4](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9694-1_4).
- Bouguedoura, N., Michaux-Ferrière, N., and Bompar, J.-L. 1990. Comportement *in vitro* de bourgeons axillaires de type indéterminé du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*). *Canadian Journal of Botany* 68: 2004–2009. doi:[10.1139/b90-262](https://doi.org/10.1139/b90-262)
- Bracale, M., Galli, M.G., Longo, C., Marziani Longo, G., Rossi, G., Soave, C., Campion, B., and Falavigna, A. 1990. understanding sex differentiation in *Asparagus officinalis* : genetical and physiological approaches'. *Acta Hort.* (271): 423–432. doi:[10.17660/ActaHortic.1990.271.60](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1990.271.60).
- Capote, T., Flowers, J.M., Hazzouri, K.M., Purugganan, M., and Amiri, K.M.A. 2021. The Genomics of Date Palms: Current Perspectives. *In* Annual Plant Reviews online, 1st edition. Edited by J.A. Roberts. Wiley. pp. 57–86. doi:[10.1002/9781119312994.apr0748](https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0748).
- Chaouch Khouane, A., Akkak, A., and Benbouza, H. 2020. Molecular identification of Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) "Deglet noor" pollinator through analysis of genetic diversity of Algerian male and female ecotypes using SSRs markers. *Scientia Horticulturae* 274: 109668. doi:[10.1016/j.scienta.2020.109668](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109668).

Références bibliographiques

- Charlesworth, D. 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* **88**(2): 94–101. Nature Publishing Group. doi:[10.1038/sj.hdy.6800016](https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800016).
- Cherif, E., Zehdi, S., Castillo, K., Chabrillange, N., Abdoukader, S., Pintaud, J., Santoni, S., Salhi-Hannachi, A., Glémin, S., and Aberlenc-Bertossi, F. 2013. Male-specific DNA markers provide genetic evidence of an XY chromosome system, a recombination arrest and allow the tracing of paternal lineages in date palm. *New Phytol* **197**(2): 409–415. doi:[10.1111/nph.12069](https://doi.org/10.1111/nph.12069).
- Dransfield, J. 2008. *Genera palmarum: The evolution and classification of palms*. Kew Publishing, Royal Botanical Gardens, Kew, UK.
- Elmeer, K., and Mattat, I. 2012. Marker-assisted sex differentiation in date palm using simple sequence repeats. *3 Biotech* **2**(3): 241–247. doi:[10.1007/s13205-012-0052-x](https://doi.org/10.1007/s13205-012-0052-x).
- Elmeer, K., Sarwath, H., Malek, J., Baum, M., and Hamwiah, A. 2011. New microsatellite markers for assessment of genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *3 Biotech* **1**(2): 91–97. doi:[10.1007/s13205-011-0010-z](https://doi.org/10.1007/s13205-011-0010-z).
- Fadlaoui, S. 2017. Application de la technique de modélisation de l'architecture du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) pour la caractérisation des cultivars. Université Mohamed Kheider Biskra. Algérie.
- Gros-Balthazard, M., Newton, C., S., I., Tengberg, M., Pintaud, J.-C., and Terral, J.-F. 2013. Origines et domestication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *Revue d'Ethnoécologie* **4**. doi:[10.4000/ethnoecologie.1524](https://doi.org/10.4000/ethnoecologie.1524).
- Hamzaoui, E., and Saadi, D. 2021. Etude de la diversité variétale de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) cultivé dans la région de Biskra. Université Mohamed Kheider Biskra.
- Hancock, J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. *In* *Microsatellites; evolution and applications* (ed. DB Goldstein & C. Schlotterer). p. 9.
- Hannachi, S. Benkhalifa A, Khtiri D, Brac de la Perriere R.A. 1998. Inventaire variétal de la palmeraie algérienne. Commissariat au Développement de l'agriculture des régions Sahariennes (CDARS) -Unité de Recherche sur les Zones Arides (URZA) de l'Université des Sciences et Technologie «Houari Boumedienne». République Algérienne. 223 p.
- Hannachi, S. 2012. Ressources génétiques du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) en Algérie : Analyse de la variabilité inter et intra des principaux cultivars. Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach. Alger. Algérie.
- Hazzouri, K.M., Gros-Balthazard, M., Flowers, J.M., Copetti, D., Lemansour, A., Lebrun, M., Masmoudi, K., Ferrand, S., Dhar, M.I., Fresquez, Z.A., Rosas, U., Zhang, J., Talag, J., Lee, S., Kudrna, D., Powell, R.F., Leitch, I.J., Krueger, R.R., Wing, R.A., Amiri, K.M.A., and Purugganan, M.D. 2019. Genome-wide association mapping of date palm fruit traits. *Nat Commun* **10**(1): 4680. doi:[10.1038/s41467-019-12604-9](https://doi.org/10.1038/s41467-019-12604-9).

Références bibliographiques

- Hussein, M.A. 2015. determination of sex-specific dna markers for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) 3. Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology **6**(7): 237–246. Mansoura University, Faculty of Agriculture. doi:[10.21608/jacb.2015.48402](https://doi.org/10.21608/jacb.2015.48402).
- Jagannadha Rao, P.V.K., Das, M., and Das, S.K. 2009. Changes in physical and thermo-physical properties of sugarcane, palmyra-palm and date-palm juices at different concentration of sugar. Journal of Food Engineering **90**(4): 559–566. doi:[10.1016/j.jfoodeng.2008.07.024](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.024)
- Jatt, T., Lee, M.-S., Rayburn, A.L., Jatoi, M.A., and Mirani, A.A. 2019. Determination of genome size variations among different date palm cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) by flow cytometry. 3 Biotech **9**(12): 457. doi:[10.1007/s13205-019-1987-y](https://doi.org/10.1007/s13205-019-1987-y).
- Johnson, D.V. 2011. Introduction: Date Palm Biotechnology from Theory to Practice. In Date Palm Biotechnology. Edited by S.M. Jain, J.M. Al-Khayri, and D.V. Johnson. Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 1–11. doi:[10.1007/978-94-007-1318-5_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1318-5_1).
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., and Dhawan, A.K. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. Euphytica **177**(3): 309–334. doi:[10.1007/s10681-010-0286-9](https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9).
- Khan, A.L., Al-Harrasi, A., Numan, M., AbdulKareem, N.M., Mabood, F., and Al-Rawahi, A. 2021. Spectroscopic and Molecular Methods to Differentiate Gender in Immature Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). Plants (Basel) **10**(3): 536. doi:[10.3390/plants10030536](https://doi.org/10.3390/plants10030536).
- Krueger, R.R. 2015. Date Palm Status and Perspective in the United States. In Date Palm Genetic Resources and Utilization: Volume 1: Africa and the Americas. Edited by J.M. Al-Khayri, S.M. Jain, and D.V. Johnson. Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 447–485. doi:[10.1007/978-94-017-9694-1_14](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9694-1_14).
- Kumari, A. 2015. Methods of sex determination in dioecious Angiospermous plants. Lakshya: Journal of Science and Management **1**: 1–9.
- Marks, G.E. 1975. The Giemsa-staining centromeres of *Nigella damascena*. J Cell Sci **18**(1): 19–25. doi:[10.1242/jcs.18.1.19](https://doi.org/10.1242/jcs.18.1.19).
- Maryam, Jaskani, M.J., Awan, F.S., Ahmad, S., and Khan, I.A. 2016. Development of molecular method for sex identification in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plantlets using novel sex-linked microsatellite markers. 3 Biotech **6**(1): 22. doi:[10.1007/s13205-015-0321-6](https://doi.org/10.1007/s13205-015-0321-6).
- Meraneh Daher, A. 2010. Détermination du sexe chez le palmier dattier: Approches histocytologiques et moléculaires. Université Montpellier II. Montpellier.
- Mimoun, A. 2014. Etude du développement et architecture racinaire de plantules de palmier dattier. Université Oran 1 - Ahmed Ben Bella. Algérie.
- Mourad, A., Alomari, D., Alqudah, A., Sallam, A., and Salem, K. 2019. Recent Advances in Wheat (*Triticum* spp.) Breeding. doi:[10.1007/978-3-030-23108-8_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23108-8_15).
- Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., and Baloch, F.S. 2018. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic

Références bibliographiques

- selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **32**(2): 261–285. Taylor & Francis. doi:[10.1080/13102818.2017.1400401](https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401).
- Naqvi, S.A., Shafqat, W., Haider, M.S., Awan, F.S., Khan, I.A., and Jaskani, M.J. 2021. Gender Determination of Date Palm. *In* The Date Palm Genome, Vol. 1: Phylogeny, Biodiversity and Mapping. *Edited by* J.M. Al-Khayri, S.M. Jain, and D.V. Johnson. Springer International Publishing, Cham. pp. 161–177. doi:[10.1007/978-3-030-73746-7_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-73746-7_7).
- Peyron, G. 2000. Cultiver le palmier-dattier. Editions Quae. 110 p.
- Pintaud, J., Zehdi, S., Couvreur, T., Barrow, S., Henderson, S., Aberlenc, F., Tregear, J., and Billotte, N. 2010. An evaluation of the taxonomy of the genus *Phoenix* (Arecaceae) using SSR markers, with emphasis on the identity of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In*: Seberg O, Petersen G, Barfod A, Davis J (Eds) *Taxonomy of Phoenix*. Diversity, phylogeny, and evolution in the Monocotyledons. Aarhus University Press, Denmark, 267–286.
- Pintaud, J.C., Ludeña, B., Aberlenc-Bertossi, F., Zehdi, S., Gros-Balthazard, M., Ivorra, S., Terral, J.F., Newton, C., Tengberg, M., Abdoukader, S., Daher, A., Nabil, M., Saro Hernández, I., González-Pérez, M.A., Sosa, P., and Santoni, S. 2013. Biogeography of the date palm (*Phoenix dactylifera* L., Arecaceae): insights on the origin and on the structure of modern diversity. *Acta horticulturae*. International Society for Horticultural Science. Available from doi:[10.17660/ActaHortic.2013.994.1](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.994.1).
- Racchi, M.L., Bove, A., Turchi, A., Bashir, G., Battaglia, M., and Camussi, A. 2014. Genetic characterization of Libyan date palm resources by microsatellite markers. *3 Biotech* **4**(1): 21–32. doi:[10.1007/s13205-013-0116-6](https://doi.org/10.1007/s13205-013-0116-6).
- Sabir, J.S.M., Abo-Aba, S., Bafeel, S., Zari, T.A., Edris, S., Shokry, A.M., Atef, A., Gadalla, N.O., Ramadan, A.M., Al-Kordy, M.A., El-Domyati, F.M., Jansen, R.K., and Bahieldin, A. 2014. Characterization of ten date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia using AFLP and ISSR markers. *Comptes Rendus Biologies* **337**(1): 6–18. doi:[10.1016/j.crvbi.2013.11.003](https://doi.org/10.1016/j.crvbi.2013.11.003).
- Sane, D. 2007. Régénération, à partir de suspensions cellulaires embryogènes, de cultivars de palmiers dattiers (*Phoenix dactylifera* L.) pour leur adaptation aux conditions édaphoclimatiques du Sahel. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Sénégal.
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**(6): 365–371. doi:[10.1007/s004120000089](https://doi.org/10.1007/s004120000089).
- Seghir, Z., and Ghenaim, M. 2020. Caractérisation morphologique de quelques cultivars du palmier dattier (*PhoenixDactylifera.L*) dans la région de Biskra. Université Mohamed Kheider Biskra. Algérie
- Siddiq, M., Aleid, S.M., and Kader, A.A. (n.d.). *Dates: Postharvest Science, Processing Technology and Health Benefits*. Wiley–Blackwell, Chichester, West Sussex. 335 p.
- Soliman A.S., Al Mayah A.R.A. 1978. Chromosome studies in date palm *Phoenix dactylifera* L. *Microscopica Acta*. **80**: 145-148

Références bibliographiques

- Tengberg, M. 2012. Beginnings and early history of date palm garden cultivation in the Middle East. *Journal of Arid Environments* **86**: 139–147. doi:[10.1016/j.jaridenv.2011.11.022](https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2011.11.022).
- Terral, J.-F., Newton, C., Ivorra, S., Gros-Balthazard, M., de Morais, C.T., Picq, S., Tengberg, M., and Pintaud, J.-C. 2012. Insights into the historical biogeography of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using geometric morphometry of modern and ancient seeds. *Journal of Biogeography* **39**(5): 929–941. doi:[10.1111/j.1365-2699.2011.02649.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02649.x).
- Wang, Y., Ihase, L.O., Htwe, Y.M., Shi, P., Zhang, D., Li, D., Emoghene, B.O., and Iserhienrhien, A. 2020. Development of sex-linked SSR marker in the genus *Phoenix* and validation in *P. dactylifera*. *Crop Sci.* **60**(5): 2452–2466. doi:[10.1002/csc2.20187](https://doi.org/10.1002/csc2.20187).
- Yahiaoui, L. 2016. Inductions morphogénétiques des Embryons et des Extrémités cotylédonaire du Palmier dattier (L.)Var. Deglet-Nour. Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou. Algérie.
- Zaid, A., Arias-Jimnez, E.J., and Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2002. Date palm cultivation. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 324 p
- Zango, O., Rey, H., Bakasso, Y., Lecoustre, R., Aberlenc, F., and Pintaud, J.-C. 2016. Local Practices and Knowledge Associated with Date Palm Cultivation in Southeastern Niger. *Agricultural Sciences* **7**(9): 586–603. Scientific Research Publishing. doi:[10.4236/as.2016.79056](https://doi.org/10.4236/as.2016.79056).
- Zehdi, S., Cherif, E., Moussouni, S., Gros-Balthazard, M., Naqvi, S., Ludeña, B., Castillo, K., Chabrillange, N., Nadia, B., Bennaceur, M., Si-Dehbi, F., Abdoukader, S., Daher, A., Terral, J.-F., Santoni, S., Ballardini, M., Mercuri, A., Ben Salah, M., Karim, K., and Aberlenc, F. 2015. Genetic structure of the date palm (*Phoenix dactylifera*) in the Old World reveals a strong differentiation between eastern and western populations. *Annals of Botany* **116**: 101–112. doi:[10.1093/aob/mcv068](https://doi.org/10.1093/aob/mcv068).
- Zhang, X., Tan, J., Yang, M., Yin, Y., Al-Mssallem, I.S., and Yu, J. 2011. Date Palm Genome Project at the Kingdom of Saudi Arabia. *In* Date Palm Biotechnology. Edited by S.M. Jain, J.M. Al-Khayri, and D.V. Johnson. Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 427–448. doi:[10.1007/978-94-007-1318-5_21](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1318-5_21).

Annexes

Annexe 1

Solution de lavage 1

| | Concentration finale | PM (g/mol) | 1 litre | 100ml | 50ml |
|--|-----------------------------|-------------------|----------------|--------------|-------------|
| Acétate de sodium | 200 mM | 82.03 | 16.46g | 1.6g | 0.8g |
| H2O distillé | | | 240ml | 24ml | 12ml |
| Dissoudre l'acétate de sodium avant d'ajouter l'éthanol | | | | | |
| Ethanol 100 % | 76 % | | 760ml | 76ml | 38ml |

Solution de lavage 2

| | Concentration finale | PM (g/mol) | 1 litre | 100ml | 50ml |
|---|-----------------------------|-------------------|----------------|--------------|-------------|
| Acétate d'ammonium | 10 mM | 77.08 | 0.8g | 0.08g | 0.04g |
| H2O distillé | | | 240ml | 24ml | 12ml |
| Dissoudre l'acétate d'ammonium avant d'ajouter l'éthanol | | | | | |
| Ethanol 100 % | 76 % | | 760ml | 76ml | 38ml |

TE (1X) pH 8

| | Concentration finale | PM (g/mol) | 1 litre | 500ml | 100ml |
|---------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------|--------------|--------------|
| Tris de base | 10 mM | 121.14 | 1.21g | 0.6g | 0.12g |
| Na₂EDTA | 1 mM | 372.24 | 0.38g | 0.19g | 0.04g |
| H₂O up | | | Qsp 1 litre | Qsp 500ml | Qsp 100ml |

TE (0.5X) pH 8

| | Concentration finale | 1 litre | 500ml | 100ml |
|--------------------------|-----------------------------|----------------|--------------|--------------|
| TE 1X | 0.1X | 100ml | 50ml | 10ml |
| H₂O up | | Qsp 1 litre | Qsp 500ml | Qsp 100ml |

Annexe 2**Résultats du dosage des extraits d'ADN au Nanodrop**

| Échantillon | [ADN] (µg/µl) | A260/A280 | A260/A230 |
|-------------|---------------|-----------|-----------|
| ADR1 | 28,5 | 1,84 | 0,98 |
| ADR2 | 71,7 | 1,82 | 0,81 |
| ADR3 | 31,4 | 1,98 | 0,55 |
| BMH1 | 82,8 | 1,9 | 0,9 |
| BMH2 | 65,6 | 1,93 | 0,71 |
| BMH3 | 57 | 1,92 | 0,77 |
| MALE1/1 | 21,1 | 1,95 | 0,54 |
| MALE1/2 | 21,8 | 1,72 | 0,73 |
| MALE1/3 | 67,2 | 1,85 | 0,74 |
| AGH1 | 29,3 | 1,93 | 0,6 |
| AGH2 | 4,1 | 2,39 | 0,8 |
| AGH3 | 30 | 1,91 | 0,55 |
| TEG1 | 28,3 | 1,87 | 0,51 |
| TEG2 | 26,5 | 1,86 | 0,63 |
| TEG3 | 51,9 | 1,66 | 0,45 |
| TAQ1 | 162,7 | 1,74 | 1,01 |
| TAQ2 | 41,8 | 1,81 | 0,78 |
| TAQ3 | 37,4 | 1,86 | 0,55 |
| TIM1 | 28,7 | 1,89 | 0,6 |
| TIM2 | 78,3 | 1,86 | 0,86 |
| TIM3 | 75,3 | 1,89 | 0,94 |
| LEH1 | 76,8 | 1,89 | 0,75 |
| LEH2 | 76,7 | 1,83 | 0,88 |
| LEH3 | 67,5 | 1,86 | 0,85 |
| DOW1 | 41,8 | 2,19 | 0,32 |
| DOW2 | 59,4 | 2,12 | 0,4 |

Annexes

| | | | |
|----------------|-------|------|------|
| DOW3 | 38,7 | 2,12 | 0,43 |
| MALE2/1 | 95,4 | 1,99 | 0,57 |
| MALE2/2 | 78,8 | 2,03 | 0,57 |
| MALE2/3 | 224,8 | 1,91 | 1,11 |
| TDK1 | 79,9 | 1,93 | 0,52 |
| TDK2 | 71,9 | 1,98 | 0,52 |
| TDK3 | 69,2 | 2,05 | 0,48 |
| TIR1 | 73,8 | 1,88 | 0,54 |
| TIR2 | 59,6 | 2,07 | 0,46 |
| TIR3 | 79,6 | 1,95 | 0,58 |
| MALE3/1 | 69,3 | 1,99 | 0,47 |
| MALE3/2 | 76,2 | 1,92 | 0,47 |
| MALE3/3 | 71,9 | 2,07 | 0,4 |
| TINA1 | 78,1 | 1,72 | 0,48 |
| TINA2 | 169,3 | 1,83 | 0,68 |
| TINA3 | 80,2 | 1,98 | 0,42 |
| GHE1 | 92,3 | 1,95 | 0,66 |
| GHE2 | 107,6 | 1,93 | 0,7 |
| GHE3 | 89,2 | 2,02 | 0,58 |

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : BENHAMADA Imen
BOUGHEDDAD Amina

Utilisation des marqueurs SSRs dans l'identification du sexe chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.).

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et Génomique Végétale

Résumé

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est espèce dioïque, caractérisée par des fleurs unisexuées situées sur des arbres mâles ou femelles séparés. La dioïcité a toujours été un problème dans la sélection des palmiers dattiers, car le sexe de la plante ne peut être connu qu'une fois qu'elle a atteint son stade de reproduction, qui prend 5 à 8 ans pour la première floraison. Par conséquent, l'identification précoce du sexe peut améliorer le succès de la reproduction et de l'amélioration génétique du palmier dattier. Les marqueurs microsatellites contenant des séquences simples répétées (SSR) sont un outil précieux pour l'analyse génétique. Dans la présente étude, 5 amorces microsatellites ont été utilisées sur 15 cultivars de palmiers dattier locaux. Seulement 3 paires d'amorces ont été amplifiées et leurs produits d'amplification ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les profils électrophorétiques obtenus des trois marqueurs SSR, n'ont pas montré de traits distinctifs entre les génotypes mâles et femelles. Notre étude a été donc réorientée vers une analyse de la diversité génétique des cultivars étudiés. Les résultats montrent que les différents génotypes présentent peu ou pas de polymorphisme avec les deux marqueurs SSR mPdCIR16, mPdCIR32. Cependant, un total de 18 allèles a été identifié avec le marqueur mPdCIR70 avec un taux de polymorphisme de 90%. L'analyse UPGMA qui a montré une structure génétique conservée pour les trois génotypes mâles et les deux génotypes femelles GHE et TINA, suggère que ces pollinisateurs mâles pourraient être nommés comme le type femelle de ces deux cultivars. Cette approche moléculaire a permis également, d'identifier le marqueur mPdCIR70 comme marqueur candidat dans l'analyse de la diversité génétique des palmiers dattiers.

Mots-clefs : Palmier dattier ; Microsatellites SSR ; Diversité génétique ; Extraction d'ADN ; Cultivars ; Sélection ; Pollinisateurs

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (GBBV) (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : BOUCHEMAL Karima (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : LOUALI Yamouna (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : HAMLAM Chourouk (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).