

Article

Contrôle de la contamination des vitroplants de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)

Mohammed Mesnoua^{1*}, Reguia Zeguerrou¹, Souad Tahar Chaouch², Hafsa Chaaoui, Salwa Lahmadi², Mohamed Tahirine¹, Messaoud Roumani¹

¹ Division Phoeniculture, Biotechnologie et valorisation des produits et sous-produits du palmier dattier. Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides, Campus Universitaire, Université Mohamed Kheider, EL ALIA. BP n° 1682 R.P 07000 Biskra.

² Bioressources en Régions Arides. Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides, Campus Universitaire, Université Mohamed Kheider, EL ALIA. BP n° 1682 R.P 07000 Biskra.

* Correspondence: mohamesnoua@gmail.com

Résumé : La stérilisation des surfaces est une étape primordiale pour la mise en marche de la culture des tissus. La présente étude vise à optimiser le processus de stérilisation des surfaces pour une culture des tissus du palmier dattier d'une part, et de déterminer la nature des contaminants menaçant cette culture d'autre part. A cet effet, les explants (cœurs des rejets) ont été désinfectés par l'hypochlorite de sodium (NaOCl, 4,5%) ou le chlorure de mercure (HgCl₂, 0,2%) pendant six durées d'exposition différentes (15, 20, 25, 30, 35 et 40 min). La contamination microbienne et la survie des cultures en réponse aux traitements utilisés ont été également analysées. Les résultats obtenus ont montré que le NaOCl semble plus efficace que le HgCl₂ en termes de la durée. En effet, les meilleurs résultats (absence de contamination) ont été enregistrés avec le NaOCl à 35 min contre 40 min pour le HgCl₂. Toutefois, la survie des cultures n'a pas été influencée par les deux solutions. L'identification microbienne a montré que la flore fongique est dominante. Elle est composée essentiellement des espèces appartenant aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*. Finalement, vue le risque présenté lors de la manipulation par le chlorure de mercure sur la santé, la stérilisation par l'hypochlorite de sodium (4,5%) est recommandée lors la culture des tissus du palmier dattier.

Mots clés : Palmier dattier, micropropagation, stérilisation, l'hypochlorite de sodium, le chlorure du mercure.

Received : 28 April 2022
Accepted : 30 May 2022

Citation : Mesnoua M., Zeguerrou R., Tahar Chaouch S., Chaaoui H., Lahmadi S., Tahirine M., Roumani M. Contrôle de la contamination des vitroplants de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Journal Algérien des Régions Arides 2022, 14 (2): 81–87.

Publisher's Note : ASJP is an electronic publishing platform for Algerian scientific journals managed by CERIST, that is not responsible for the quality of content posted on ASJP.



Copyright : © 2022 by the CRSTRA. Algerian Journal of Arid Regions is licensed under a Creative Commons Attribution Non Commercial 4.0 (CC BY NC) license.

1. Introduction

Le palmier dattier est une plante d'intérêt écologique, économique et social majeur pour de nombreux pays de vastes territoires arides. En effet, le développement de la culture du palmier dattier contribue durablement contre l'insécurité alimentaire dans ces régions ou la désertification bat son plein [1,2].

Deux méthodes de propagation existent chez le palmier dattier (sexuée et asexuée). La propagation sexuée se fait par les semences (noyaux), néanmoins, cette méthode est limitée chez cette espèce, car elle aboutit à la ségrégation des caractères et la modification des descendances [3,4]. La propagation asexuée (végétative) par rejets (djebars) reste la technique pratiquée par les phoeniculteurs [5]. Toutefois, elle présente aussi des limites ; elle ne répond pas à la demande accrue en matériel végétal (en effet, le pied n'offre que 6 à 10 rejets durant sa vie), en outre, elle peut transmettre les maladies et des ravageurs du pied mère [3]. Pour franchir les problèmes de la propagation pour cette espèce et maintenir le matériel génétique, la micropropagation in vitro est la technique la plus efficace [3,6,7]. Cette technique permet une production rapide des plantules, génétiquement uniformes et exempte de maladies [3].

L'un des principaux objectifs des études de la culture de tissus est d'obtenir une grande fréquence de régénération des pousses, ce qui constitue aussi une condition préalable pour un système de transformation efficace. La santé de l'explant est le principal facteur déterminant la capacité de régénération. La viabilité, l'âge de l'explant et l'endroit à partir duquel l'explant est excisé sont aussi des facteurs très importants pour une haute fréquence de régénération des pousses. L'étape la plus importante de la culture des tissus est l'initiation de la culture, et plus particulièrement la désinfection des explants. Etant donné que les conditions *in vitro* fournissent aux microorganismes un milieu de croissance optimal [8–10]. La désinfection des explants constitue une étape décisive pour l'avancement des études de la culture des tissus. D'une part, la désinfection a pour but d'éliminer tous les micro-organismes qui peuvent facilement se développer dans les conditions *in vitro* ; d'autre part, il convient de garantir la viabilité de l'explant et la capacité de régénération connus pour être aussi affectées par la concentration du désinfectant et/ou la durée de la stérilisation [9].

Une large gamme de désinfectants, tels que l'éthanol, l'eau oxygénée, l'eau de brome, le chlorure du mercure, le nitrate d'argent, et les antibiotiques sont utilisés pour la désinfections [8,10,11]. Cependant l'hypochlorite de sodium et le chlorure de mercure restent les plus utilisés. Ils sont très efficaces contre tous les types de bactéries, champignons et virus. Ils détruisent les microbes par oxydation des molécules biologiques comme les protéines et les acides nucléiques [12].

L'objectif de cette étude est de comparer deux désinfectants largement utilisés au cours de la micropropagation des plantes, l'eau de javel (sous forme d'hypochlorite de sodium) et le chlorure du mercure pendant différents temps de stérilisation. Le deuxième objectif consiste à déterminer la nature des micro-organismes responsables de la contamination afin de résoudre le problème de contamination et/ou d'utiliser des antibiotiques spécifiques.

2. Matériels et Méthodes

Cette étude a été réalisée au laboratoire de culture des tissus du palmier dattier au Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides (CRSTRA). Le matériel végétal utilisé a été récolté au niveau de la palmeraie située à la station expérimentale des bio-ressources d'El Outaya. Il s'agit des rejets du cultivar Deglet Nour, âgés de 3 à 4 ans et pesant environs 10 à 15 kg.

Le milieu de culture utilisé est celui de MS [13], auquel sont ajoutés ; la glutamine (100 mg/l), le saccharose (30 g/l), le charbon actif (300 mg/l) et l'agar agar (8 g/l). Le milieu de culture a été autoclavé pendant 20 min à 121°C et 104 kPa et coulé dans des boîtes de pétrie sous la hotte sous des conditions stériles.

Les verreries utilisées dans cette étude ont été désinfectées par l'éthanol à 70%, les petits instruments ont été stérilisés par un stérilisateur électrique à bille. Toute la manipulation a été effectuée sous une hotte à flux laminaire et équipé d'une lampe UV.

Les rejets utilisés dans cette étude sont sains et dépourvue d'anomalies apparentes, ils ont été séparés du pied mère le jour même de la manipulation. Les palmes du rejet ont été ensuite coupées successivement jusqu'à l'obtention de la partie blanche de forme cylindrique de 10 cm de hauteur et 5cm de diamètre (cœur du rejet ou djommar) qui protège les feuilles primordiales et l'apex (Fig. 1). Le matériel végétal a été ensuite placé durant une heure dans une solution d'antioxydant contenant de l'acide ascorbique et l'acide citrique à raison 150 mg/l chacun, et ce pour inhiber l'effet de brunissement dû aux composés phénoliques selon la méthode décrite par Al-Khayri en (2007)

2.1. Stérilisation du matériel végétal

Les explants (cœurs des rejets) (Figure 1-E) ont été désinfectés en utilisant soit l'eau de javel commerciale (contenant 4,5% l'hypochlorite de sodium, NaOCl) ou le chlorure du mercure (HgCl₂, 0,2%). La durée de stérilisation a été réalisée pendant différents temps (15mn, 20mn, 25mn, 30mn, 35mn et 40 mn). A chaque solution ont été ajoutées quelques gouttes de tween 20. Les explants ont été ensuite retirés et immergés pendant 1

mn dans l'éthanol 70%, ensuite rincés trois fois avec de l'eau distillée stérile et ce pour éliminer les traces du désinfectant.

2.2. Mise en culture

Après stérilisation, l'apex, les bourgeons axillaires et les feuilles primordiales (**fig.1-H**) ont été coupés en petits morceaux de 3 à 4 mm et cultivés dans le milieu MS contenant différentes combinaisons entre la 6-Benzylaminopurine (BA) (0- 0,5-1-1,5 et 2 mg/l) et l'acide indole-3-butyric (IBA) (0-0,5 et 1 mg/l). Le pH a été ajusté à $5,6 \pm 0,2$. Un volume de 15 ml de milieu de culture a été coulé dans chaque boîte de pétri. Chaque boîte de Petrie a reçu 5 explants. Pour chaque traitement, trois boîtes de Petrie ont été utilisées. Les boîtes ont été ensuite incubées à l'obscurité à 25°C pendant une semaine. Le pourcentage de contamination a été calculé en comptant le nombre des explants contaminés par rapport au nombre total des explants cultivés.

Pour savoir si la contamination provient d'une mauvaise manipulation ou un autoclavage non complet, 12 boîtes de pétri remplies par le même milieu de culture ont été incubées sans culture et servir comme témoins.

2.3. Détermination de la contamination microbienne

La lecture a été réalisée chaque semaine, durant un mois, et le pourcentage de la contamination, le taux de survie des explants et la réponse au milieu de culture ont été notés.

Les explants présentant des contaminations ont été transférés de façon aseptique dans un milieu de culture PDA, en plaçant un explant sur chaque boîte de Petrie de 9 cm de diamètre. Les boîtes de Petrie ont été incubées jusqu'à 10 jours à 25 °C. L'identification des espèces fongique repose sur l'analyse de deux types de critères macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores...).

2.4. Analyse statistique

Chaque traitement a été effectué en trois répétitions. Les données ont été traitées par analyse de variance (ANOVA). Le teste de Newman-Keuls à comparaisons multiples a été effectué pour connaître la différence entre les différents traitements. Toutes les analyses statistiques sont réalisées avec Stat-Box 6.40.

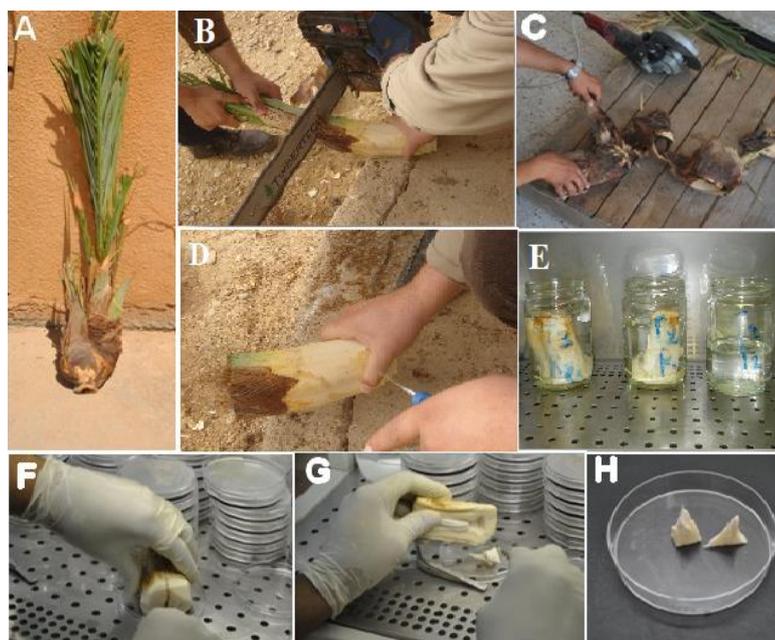


Figure 1 : Les différentes étapes pour l'isolation le cœur d'un rejet (Djommar), de (A) à (E) en passant d'un rejet complet, puis on coupe les palmes et les racines et les différent couches de tissus entourant le cœur progressivement, jusqu'à finalement l'apparition de la partie blanche et tendre ,cœur du rejet (E), c'est cette

3. Résultats

3.1. L'effet de la durée de stérilisation par le chlorure du mercure sur la contamination des explants du palmier dattier

Tout d'abord il faut mentionner que le témoin, composé des boîtes Petrie sans explants, n'a pas présenté aucune contamination (Tableau 1). Ce résultat indique que la contamination microbienne n'est pas d'origine manipulation, et que la durée d'autoclavage est optimale et a éliminé tout type de microorganisme présent dans le milieu de culture.

Les résultats présentés dans le (Tableau 1) ont montré que la contamination était totale (100 %) pour les explants traités pendant 15, 20 et 30 min par 0,2% de chlorure du mercure. Au-dessus de 30 min, le pourcentage de contamination a diminué significativement ($P < 0,05$) avec l'augmentation de la durée de trempage des explants dans ce stérilisant. Finalement, à 40 min, aucune contamination n'est enregistrée dans le milieu de culture ou sur les explants.

Tableau 1. Effet de la durée de stérilisation par le chlorure du mercure (0,2%) sur la contamination et la survie des explants du palmier dattier

Temps en min	% de contamination	Survie des explants
Témoin (Autoclave)	0 ± 0 d	
15	100 ± 0 a	ND
20	100 ± 0 a	ND
25	100 ± 0 a	ND
30	42 ± 33 b	Oui
35	17 ± 33 c	Oui
40	0 ± 0 d	Oui

ND : non déterminé

Les différentes lettres dans la même colonne indiquent une différence significative à 5% selon le test de Newman-Keuls. Les valeurs représentent la moyenne ± l'erreur standard (n=4).

3.2. L'effet de la durée de stérilisation par l'hypochlorite du sodium sur la contamination des explants du palmier dattier

La stérilisation par l'hypochlorite du sodium a présenté les mêmes tendances que celle de chlorure de mercure. Une diminution significative ($P < 0,05$) du pourcentage de la contamination a été enregistrée avec l'augmentation de la durée de trempage. Cependant, à la différence de chlorure de mercure, l'hypochlorite du sodium semble plus efficace en termes de durée d'exposition, où une contamination totale a été enregistrée seulement avec 15 min de trempage, et aucune contamination n'a été enregistrée à 35 min de trempage (Tableau 2).

Tableau 2. l'effet de la durée de stérilisation par l'hypochlorite du sodium (4,5%) sur la contamination et la survie des explants du palmier dattier

Temps en min	% de contamination	Survie des explants
15	100 ± 0 a	ND
20	83 ± 33 a	Oui
25	16 ± 33 b	Oui
30	16 ± 33 b	Oui
35	0 ± 0 b	Oui
40	0 ± 0 b	Oui

ND : non déterminé

Les différentes lettres dans la même colonne indiquent une différence significative à 5% selon le test de Newman-Keuls. Les valeurs représentent la moyenne ± l'erreur standard (n=4).

3.3. Détermination de la contamination microbienne

Après dix jours d'incubation à 25 C°, les résultats ont montré qu'il ya deux types de contaminants ; contaminants bactériens (CB) et contaminants fongiques (CF) (**Figure. 2**).

L'identification des contaminants fongique a montré que espèces trouvées appartenant principalement à trois genres ; *Aspergillus*, *Penicillium* et *Mucor*. En plus les mycéliums stériles, deux autres genres non identifiés ont pu se manifester sur le milieu de culture MS.

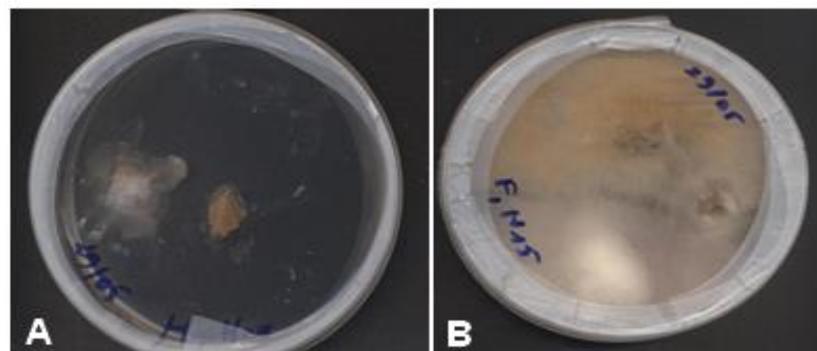


Figure 2. Type de contamination bactérienne (A) et fongique (B), observées après stérilisation par 0,2% du chlorure du mercure pendant 25 et 15 min respectivement.

4. Discussion

Les plantes qui poussent dans la nature présentent toujours de risques de contamination pour la culture *in vitro* ce qui impose une désinfection préalable avant la mise en culture [14]. En effet 3 à 15% de perte, peuvent être enregistrés, pendant chaque subculture au niveau des laboratoires de culture *in vitro*, commerciaux et scientifiques. Leifert et al., en (1989) ont rapporté que la majorité de ces pertes est généralement due à une contamination fongique et bactérienne ce qui justifie le recoure à la stérilisation pour la réduction de la contamination et par conséquent minimiser les pertes des explants [16]. D'autres

travaux montrent qu'en plus de l'agent désinfectant, les pertes enregistrées peuvent être dues aux types d'explants mis en culture, la période de prélèvement et l'intensité lumineuse [17].

Les moisissures sont les micro-organismes les plus communs et fréquemment détecté. La nuisibilité de ces contaminants est due à leur compétition avec les vitro-plants pour les éléments nutritifs ainsi que la production des métabolites phyto-toxique pour les explants [18].

La contamination dans les traitements avec l'hypochlorite de sodium et le chlorure de mercure est plus ou moins marquée selon la durée de stérilisation et la nature du désinfectant. Les résultats ont montré qu'avec l'augmentation de la durée de stérilisation, le pourcentage de contamination est diminué pour les deux désinfectants (Tab.02 et 03). Selon nos résultats, l'hypochlorite de sodium semble plus efficace que le chlorure de mercure en termes de durée. En effet, à 35 min l'hypochlorite de sodium empêche totalement la contamination, alors que le chlorure de mercure n'atteint ce pourcentage qu'à 40 min d'exposition. Notons que la durée de traitement de stérilisation n'affecte plus la survie des cultures. Nos résultats sont partiellement en accord avec les résultats de [19] où une meilleure stérilisation de lasora (*Cordia myxa* Roxb.) a été obtenue lorsque les explants traités avec HgCl₂ (0,1%) pendant 10 minutes, tandis que la culture aseptique maximale a été trouvée avec de l'hypochlorure de sodium à 1% après 21 minutes de traitement suivi d'éthanol à 70% pendant 30 secondes. Ceci peut s'expliquer par le fait que les besoins en stérilisation de surface sont différents et dépendent du type de tissu et de la nature et la taille des explants utilisés pour la propagation in vitro [8,9].

La procédure de la stérilisation des explants pour la culture des tissus du palmier dattier diffère largement d'un laboratoire à l'autre. Certains auteurs utilisent un seul désinfectant, soit l'hypochlorite de sodium [20], soit le chlorure de mercure [21]. Par contre El-Din et al en (2007) a combiné l'hypochlorite de sodium avec le chlorure de mercure. La dose et la durée d'exposition pour chaque désinfectant sont aussi différentes d'un auteur à l'autre. Cette différence est peut-être due à la procédure de stérilisation. En effet, El-Shiaty et al en (2004) en étudiant l'effet des acides aminés sur la calogènes, ils ont procédé à une double stérilisation, la première pour le cœur du rejet et la seconde pour les apex et feuilles primordiales.

Le chlorure mercurique est un stérilisant puissant, il agit contre les champignons et les bactéries, mais il tue souvent les explants. À de faibles concentrations (jusqu'à 0,2 %), c'est peut-être l'agent désinfectant le plus efficace pour les explants contenant des champignons d'origine tellurique et épiphytiques. C'est peut-être la raison pour laquelle certains auteurs préfèrent l'utiliser car l'hypochlorite de sodium à 0,2-1% est parfois inefficace contre certains champignons. Mais on est toujours plus sûr avec l'hypochlorite et on peut utiliser en toute sécurité 1,5 -2,5% ou même jusqu'à 4,5% (comme le cas de cette étude).

5. Conclusions

Le présent essai a permis de distinguer l'efficacité de deux stérilisants ; l'hypochlorite de sodium et le chlorure de mercure pour réduire la contamination des explants durant la culture in vitro de palmier dattier. Par conséquent, l'hypochlorite de sodium (NaOCl, 4,5%) a permis l'inhibition des contaminants durant 35 min de trempage, alors que le chlorure de mercure a atteint les mêmes résultats à 40 min. En prenant en compte que le chlorure de mercure reste un produit chimique avec des risques potentiels sur la santé humaine et l'environnement, même s'il est à très faible dose. Il convient de noter aussi que le recours à la stérilisation par l'hypochlorite de sodium présente un coût faible par rapport au chlorure de mercure.

References

1. Mesnoua M, Roumani M, Salem A. The effect of pollen storage temperatures on pollen viability, fruit set and fruit quality of six date palm cultivars. *Sci Hort* (Amsterdam). 2018 Jun 16; 236:279–83.
2. Bouguedoura N, Bennaceur M, Babahani S, Benziouche SE. Date palm status and perspective in Algeria. In: *Date Palm Genetic Resources and Utilization: Volume 1: Africa and the Americas*. 2015. p. 125–68.

3. Al-Khayri JM. Date palm phoenix dactylifera L. micropropagation. In: Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. 2007. p. 509–26.
4. Fki L, Bouaziz N, Kriaa W, Benjemaa-Masmoudi R, Gargouri-Bouzid R, Rival A, et al. Multiple bud cultures of “Barhee” date palm (*Phoenix dactylifera*) and physiological status of regenerated plants. *J Plant Physiol*. 2011;168(14):1694–700.
5. Chao CCT, Krueger RR. The date palm (*Phoenix dactylifera* L.): Overview of biology, uses, and cultivation. In: *HortScience*. 2007. p. 1077–82.
6. Zivdar S, Mousawi M, Alemzadeh Ansari N. Genetic stability in date palm micropropagation. *Asian J Plant Sci*. 2008;7(8):775–8.
7. Ferry M. Potential of Date Palm Micropropagation for Improving Small Farming Systems. *Date Palm Biotechnology*. 2011. 15–28 p.
8. Burgdorf RJ, Laing MD, Morris CD, Jamal-Ally SF. A procedure to evaluate the efficiency of surface sterilization methods in culture-independent fungal endophyte studies. *Brazilian J Microbiol*. 2014;45(3).
9. Bello OA, Esan EB, Obembe OO. Establishing surface sterilization protocol for nodal culture of *Solanecio bialfrae*. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2018.
10. Sivanesan I, Muthu M, Gopal J, Tasneem S, Kim DH, Oh JW. A fumigation-based surface sterilization approach for plant tissue culture. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(5).
11. Hesami M, Naderi R, Tohidfar M. Modeling and optimizing In vitro sterilization of chrysanthemum via multilayer perceptron-non-dominated sorting genetic algorithm-II (MLP-NSGAI). *Front Plant Sci*. 2019;10.
12. Hashim SN, Ghazali SZ, Sidik NJ, Chia-Chay T, Saleh A. Surface sterilization method for reducing contamination of *Clina-canthus nutans* nodal explants intended for in-vitro culture. *E3S Web Conf*. 2021;306.
13. Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* [Internet]. 1962 Jul 1 [cited 2022 Apr 19];15(3):473–97. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
14. Verma S, Yadav K, Singh N. Optimization of the Protocols for Surface Sterilization, Regeneration and Acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Am J Agric Environ Sci*. 2011;11(2).
15. Leifert C, Waites WM, Nicholas JR. Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. *J Appl Bacteriol*. 1989;67(4).
16. Srivastava N, Kamal B, Sharma V, Negi YK, Dobriyal a K, Gupta S. Standardization of Sterilization Protocol for Micropropagation of *Aconitum heterophyllum*- An Endangered Medicinal Herb. *Acad Areana*. 2010;2(6).
17. Hammerschlag FA, Bauchan GR, Scorza R. Factors influencing in vitro multiplication and rooting of peach cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 1987;8(3):235–42.
18. Leifert C, Morris CE, Waites WM. Ecology of Microbial Saprophytes and Pathogens in Tissue Culture and Field-Grown Plants: Reasons for Contamination Problems In Vitro. *CRC Crit Rev Plant Sci*. 1994;13(2).
19. Padhi M, Singh SP. Surface Sterilization for Reducing Microbial Contamination In Vitro Propagation of *Lasora* (*Cordia myxa* Roxb.) Using Nodal Segments. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2017;6(8).
20. Al-Khayri JM. Somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) improved by Coconut Water. *Biotechnology*. 2010;9(4).
21. Kumar N, Modi AR, Singh AS, Gajera BB, Patel AR, Patel MP, et al. Assessment of genetic fidelity of micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants by RAPD and ISSR markers assay. *Physiol Mol Biol Plants*. 2010;16(2).
22. El-Din Z, Amal FM, AbdEl-Rasoul M, Ibrahim IS, Aly AS, Sharaf Eldeen HAM. Micropropagation of some date palm cultivars: Changes of some chemical constituents related to embryogenesis. In: *Acta Horticulturae*. 2007.
23. El-Shiaty OH, El-Sharabasy SF, Abd El-Kareim AH. Effect of some amino acids and biotin on callus and proliferation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sewy cultivar [electronic resource]. No Title. *Arab J Biotechnol*. 2004 ;7(2) :265–72.