

Résultats préliminaires sur l'obtention d'embryons somatiques et la réalisation de semences artificielles de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.).

H. DAIKH et Y. DEMARLY*

RESULTATS PRELIMINAIRES SUR L'OBTENTION D'EMBRYONS SOMATIQUES ET LA REALISATION DE SEMENCES ARTIFICIELLES DE PALMIER DATTIER (*PHOENIX DACTYLIFERA* L.).

H. DAIKH et Y. DEMARLY.

Fruits, Oct. 1987, vol. 42, n° 10, p.593-596

RESUME - Les embryons somatiques ont été obtenus à partir d'explants foliaires de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) var Deglet Nour.

Un choc hormonal s'est révélé propice à l'induction de cals embryogènes.

Les embryons somatiques de différentes tailles ont été enrobés par une pellicule d'alginate en vue de réaliser des semences artificielles.

Le palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L., est une monocotylédone dioïque. Sa multiplication, uniquement végétative, est effectuée à partir de rejets produits à la base des pieds femelles adultes. Or, le nombre de rejets par pied est faible comparativement à la longue vie du palmier dattier.

Des recherches ont donc été menées pour augmenter le taux de multiplication ; elles ont porté essentiellement sur la mise au point de la culture *in vitro* de bourgeons axillaires (El HENNAWY *et al.*, 1978 ; DRIRA, 1982 ; RHISS, 1980 ; SHARMA *et al.*, 1980).

Cependant, ces techniques destinées à la production de plantes conformes se révèlent longues et difficiles.

De plus, lors de l'installation de la culture, un grand nombre de bourgeons axillaires doit être sacrifié et un rejet ne possède généralement que deux à trois bourgeons dont le méristème est actif (TISSERAT, 1981).

L'embryogenèse somatique pourrait alors constituer une

méthode nouvelle d'obtention en grand nombre de plantes conformes. Appliquée aux jeunes feuilles issues de rejets, elle favoriserait l'amélioration de la production et l'obtention de plantes de sexe connu.

Cette note a pour objet d'exposer le principe d'une des méthodologies que nous venons de mettre au point et qui permet l'obtention d'embryons somatiques à partir d'explants foliaires puis leur enrobage dans le but de produire des semences artificielles (DEMARLY, 1987).

MATERIEL ET METHODES

Les graines issues de la variété Deglet-Nour algérienne sont désinfectées par une solution aqueuse d'hypochlorite de calcium à 8 p. 100 et placées sur un milieu gélosé (8 g/l d'Agar) de germination contenant les macro et les micro-éléments de MURASHIGUE et SKOOG (1962), les vitamines de MOREL (1951) et du fer EDTA (10^{-2} M).

Les explants foliaires sont prélevés sur des plantes âgées de 2 mois, coupés en fragments de 3 à 5 cm de longueur et cultivés dans un milieu liquide C₁ (tableau 1) contenant une concentration élevée en auxines (AIA et ANA) et

* - Laboratoire d'Amélioration des Plantes. Université de Paris Sud. Bat. 360 - 91405 ORSAY Cedex 05. France

MILIEUX DE BASE DE L'ENSEMBLE DES MILIEUX DE CULTURE.

- macro éléments de MURASHIGUE et SKOOG (1962).
- micro éléments de Y³ : micro éléments de EEWENS (1978) desquels l'iode de potassium est éliminé,
- méso inositol : 100 mg/l
- L-Glutamine : 100 mg/l
- L-Arginine : 100 mg/l
- L-Asparagine : 100 mg/l
- fer EDTA : 10⁻² M

TABLEAU 1 - Composition des différents milieux de culture.

| Composition des milieux | Différents milieux | | | |
|-------------------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| | C ₁ | C ₂ | C ₃ | Rg A.A |
| Vitamines | Morel | UM | UM | UM |
| Auxines mg/l | ANA : 50 AIA : 50 | ANA : 5 AIA : 5 2,4 D : 0,1 | ANA : 5 AIA : 5 | AIA : 1 ANA : 0,5 |
| Cytokinines mg/l | BAP 5 Kinétine 10 | BAP 0,5 Kinétine 1 | BAP 0,5 Kinétine 1 | Kinétine 1 |
| Gibbérelline mg/l | | | 1 | |

Abbréviation :

- ANA Acide α -naphtalène acétique
- AIA acide indole acétique
- BAP benzyl amino purine
- 2,4 D acide 2,4-dichlorophénoxy acétique

cytokinines (BAP et Kinétine).

Les cultures sont agitées pendant 3 jours à 80 tours/minute. Les explants foliaires sont alors placés sur un fragment de gaine cotylédonnaire et l'ensemble est transféré sur un milieu inducteur de callogenèse C₂ (tableau 1). Après 26 jours de culture, les explants foliaires sont repiqués sur le milieu solide C₃, contenant dix fois moins de substance de croissance que le milieu C₁ et auquel sont ajoutées de la gibberelline (1 mg/l) et de la gélose (8 g/l).

Les cals obtenus sur ce milieu sont transférés sur le milieu de régénération Rg A.A (tableau 1).

Le pH des différents milieux est ajusté à 7,5 avant autoclavage (115° pendant 20 minutes).

L'ensemble des cultures est effectué dans les conditions suivantes :

- température : 27°C \pm 1 le jour
25°C \pm 1 la nuit
- photopériode : 16 heures
- intensité lumineuse : 2500 lux

Les embryons somatiques isolés des cals sont inclus dans une solution contenant 2 p. 100 d'alginate de sodium ainsi que les macro-éléments de MURASHIGUE et SKOOG (1962), les micro éléments Y³ (1978), du fer chélaté EDTA (10⁻² M), les vitamines UM de UCHIMIYA et MURASHIGUE (1974) et 3 p. 100 de saccharose. Le pH est de 7,5.

La solution contenant les embryons ainsi enrobés est coagulée au goutte à goutte dans une solution de CaCl₂

(50 mM) selon la méthode déjà décrite par BRODILUS *et al.* (1982). ROSCOE *et al.* (1982), FOSTIER (1986) et déjà utilisée au Laboratoire d'Amélioration des Plantes d'Orsay sur les embryons somatiques de luzerne (MBOKA, communication personnelle) et de carotte (MALARD et VILLEGAS, communication personnelle).

Les embryons enrobés (photo 1) sont alors mis à germer sur du papier filtre stérile imbibé d'une solution de composition identique à la solution d'enrobage mais dépourvue d'Alginate.

De plus, des coupes histologiques ont été effectuées après fixation au Nawashine (KARPENTSCHENKO, 1972) et coloration au bleu alcian éosine en vue de définir le moment précis où l'enrobage peut être effectué, ceci en liaison avec le stade de développement cellulaire de l'embryon somatique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Obtention d'embryons somatiques.

Le milieu liquide utilisé qui contient de fortes concentrations en substances de croissance est déterminant pour l'induction de la callogenèse à partir de tissus différenciés. Les cals embryogènes ainsi induits sont de couleur beige et de consistance molle.

Les embryons somatiques apparaissent à partir de 25 à 30 jours de culture des cals.

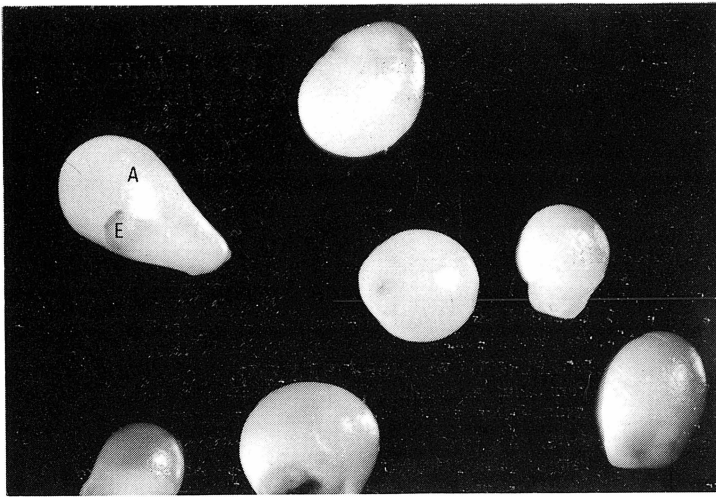


Photo 1 - Embryons somatiques enrobés.

A : goutte d'Alginate entourant l'embryon.

E : embryon somatique de palmier dattier.

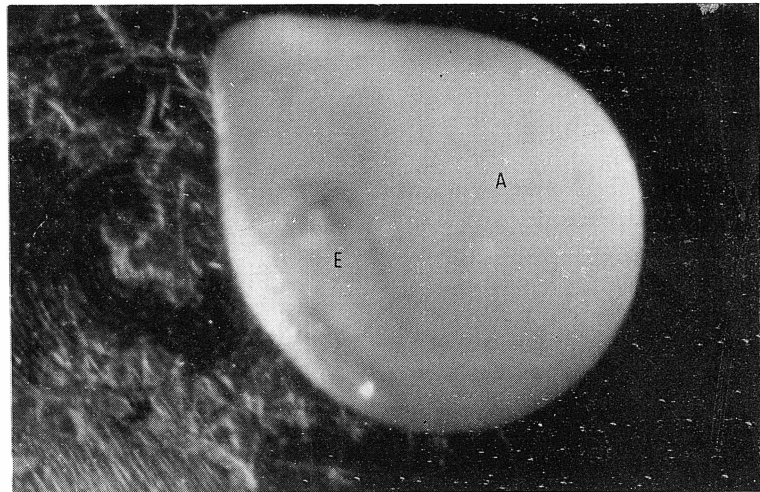


Photo 2 - Vue détaillée d'une graine artificielle de palmier-dattier.

Enrobage.

Nous avons enrobé 58 embryons somatiques de dattier dont la taille était comprise entre 0,2 et 0,9 cm. Ils constituent l'équivalent d'une semence ou d'une propagule artificielle.

Après transfert sur papier filtre, la germination a été observée après 4 à 6 jours.

Nous avons noté que seuls les embryons dont la taille est supérieure ou égale à 0,5 cm peuvent germer.

Les coupes histologiques ont permis d'observer que ces embryons possèdent un méristème apical différencié, l'ébauche de la première feuille est mise en place, les vaisseaux sont également formés.

Les embryons somatiques de taille plus petite sont constitués de cellules méristématiques en cours de différenciation. Leur enrobage implique un «sevrage» précoce qui perturbe leur développement ultérieur.

Le transfert des semences artificielles sur un milieu de culture identique mais additionné de 1 mg/l de gibbérelline et de 8 g/l d'Agar permet l'émergence de la gaine cotylédonnaire.

CONCLUSION

La maîtrise de l'embryogenèse somatique et, par suite, l'obtention de semences artificielles de palmier dattier revêt une grande importance économique pour les pays producteurs de dattes. Cette technique transposée aux feuilles matures issues de rejets se révèle intéressante car elle évitera le sacrifice des plantes causé par l'utilisation de bourgeons axillaires.

De plus, lors de l'enrobage, des fongicides peuvent être incorporés.

Les semences artificielles pourraient être créées à partir de la variété Takerboucht, seule variété résistante au Bayoud (causé par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*) existant actuellement en Algérie.

De ce fait, le repeuplement des palmeraies infestées, par cette méthode qui a un taux de multiplication élevé (en moyenne 20 embryons par cal), serait plus facile et plus rapide étant donné le nombre limité de rejets dont on peut disposer.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient M. BRANCHARD M. pour l'aide apportée lors de la rédaction de ce texte.

BIBLIOGRAPHIE

1. BRODELIUS (P.) et MOSBACH (K.). 1982.
Immobilized plant cells advances in applied.
Microbiology, 23, 11-190.
2. DEMARLY (Y.). 1987.
L'impact possible des biotechnologies sur les semences de l'an 2000.
I.A.A.
3. DRIDA (N.). 1983.
Multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par la culture *in vitro* de bourgeons axillaires et de jeunes feuilles qui en dérivent.
C.R. Acad. Sc. Paris, 296, 1077-1082.
4. EEWENS (C.J.). 1978.
Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera* L.) palms cultured *in vitro*.
Physiol. Plant, 42, 173-178.
5. EL HENNAWY (H.M.) et WALLY (Y.A.). 1978.
Date palm (*Phoenix dactylifera*) bud differentiation *in vitro*.
Egypt. J. Hort., 5, 81-82.
6. FOSTIER (M.P.). 1986.
Embryogenèse somatique et applications pharmaceutiques.
Thèse de Docteur en Pharmacie. Université Paris V. Faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques, 84.
7. KARPENTSCHENKO. 1927.
Hereditas, IX, 349.
8. MOREL (G.) et WETMORE (R.P.). 1951.
Fern callus tissue culture.
Amer. J. Bot., 38, 141-143.
9. RHISS (A.). 1980.
Palmier dattier. Multiplication végétative en culture *in vitro*.
Thèse Doctorat d'Université. Tunis, 160.
10. ROSCOE (J.P.) et OWSIANKA (A.M.). 1982.
Alginate : a reversible semi-solid medium for investigating cell transformation.
Br. J. Cancer, 46, 965, 11-156.
11. SHARMA, KUMARI et CHOWDHURY. 1980.
In vitro culture of female date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues.
Euphytica, 29, 169-174.
12. TISSERAT (B.). 1981.
Date palm tissue culture. Advances in agricultural technology.
A.A.T. western série n° 17, 1-15.
13. UCHIMIYA (H.) et MURASHIGUE (T.). 1974.
Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells.
Plant. Physiol., 54, 936-944.