

Régénération du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par embryogenèse somatique: amélioration de l'efficacité par passage en milieu liquide agité.

F. DAGUIN et R. LETOUZE*

REGENERATION OF DATE PALM (*PHOENIX DACTYLIFERA* L.) BY SOMATIC EMBRYOGENESIS : IMPROVED EFFECTIVENESS BY DIPPING IN A STIRRED LIQUID MEDIUM.

F. DAGUIN and R. LETOUZE.

Fruits, Mar. 1988, vol. 43, n° 3, p. 191-194.

ABSTRACT - A somatic embryogenesis process for regenerating date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is fully described. A phase in a stirred liquid medium is used for individualizing the embryos. The results obtained show that this phase needs to be long enough for the embryos to mature satisfactorily for their future development.

REGENERATION DU PALMIER DATTIER (*PHOENIX DACTYLIFERA* L.) PAR EMBRYOGENESE SOMATIQUE : AMELIORATION DE L'EFFICACITE PAR PASSAGE EN MILIEU LIQUIDE AGITE.

F. DAGUIN et R. LETOUZE.

Fruits, Mar. 1988, vol. 43, n° 3, p. 191-194.

RESUME - Une procédure d'embryogenèse somatique pour la régénération du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est décrite entièrement. Une étape en milieu liquide agité est utilisée pour l'individualisation des embryons. Les résultats obtenus indiquent que cette étape doit être assez longue pour permettre une maturation satisfaisante des embryons en vue de leur évolution.

INTRODUCTION

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L., Arécacées) appartient à une espèce très largement hétérozygote (MUNIER, 1973) et dioïque. De ces deux caractéristiques, il découle que la multiplication sexuée de cet arbre produit des plantes très hétérogènes et que les populations issues de semis sont composées pour moitié de plantes mâles et pour moitié de plantes femelles. Les plantes femelles qui constituent la majorité des plantations des palmeraies demeurent indiscernables jusqu'à leur floraison (MUNIER, 1973). Pour ces raisons, la multiplication des sujets intéressants est effectuée par voie végétative au moyen des rejets produits à la base du stipe. Ce mode de propagation s'avère très limité en raison du nombre restreint de rejets formés (BARRET, 1973 ; REUVENI et LILIE-KIPNIS, 1974) et se révèle insuffisant vis-à-vis d'une demande croissante en plants de qualité, en raison notamment des dégâts causés par la fusariose vasculaire du palmier dattier dans le Nord de l'Afrique (BRAC DE LA PERRIERE et DUBOST, 1987).

Régénérer facilement le palmier dattier par les techni-

ques de culture de tissus constitue donc un enjeu important pour l'espèce.

Au cours des dernières années, plusieurs auteurs ont décrit l'obtention de tissus embryogènes et la régénération d'embryons ou plantules (TISSERAT, 1979 ; MATER, 1986). Cependant, l'exploitation optimale du matériel en culture *in vitro* pour une régénération à grande échelle reste à réaliser (SHARMA, 1986).

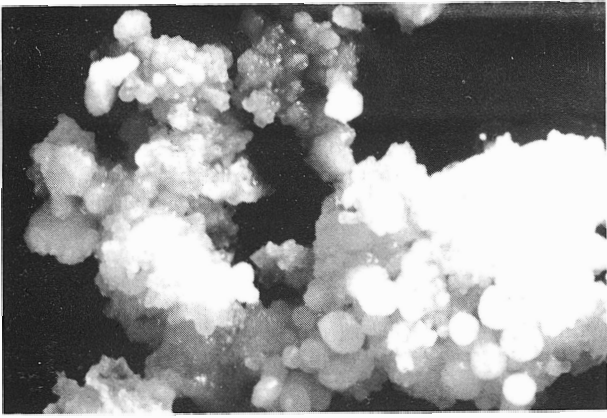
L'objectif de ce travail est d'améliorer l'efficacité du protocole de régénération par embryogenèse somatique afin que le transfert de la technique vers une production de masse du palmier dattier permette une meilleure maîtrise de l'ensemble des étapes mises en oeuvre.

MATERIEL ET METHODES

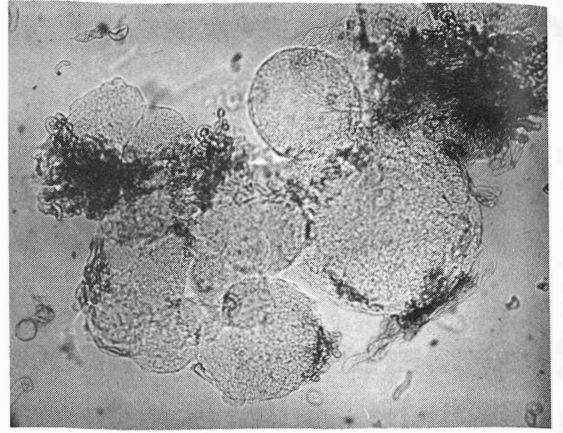
Matériel végétal.

Les expériences ont été réalisées sur cinq cultivars de palmier dattier Bou Feggous, Bou Skri, Halawy, Kadrawy et Medjool. Les souches utilisées ont été établies en culture *in vitro* au Laboratoire selon POULAIN *et al.* (1979).

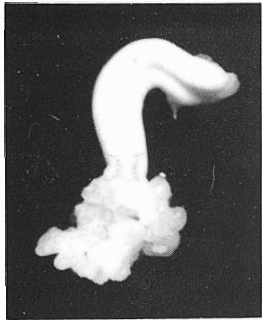
* - Laboratoire de Recherches de Physiologie végétale, 16 bld Lavoisier - 49000 ANGERS (France).



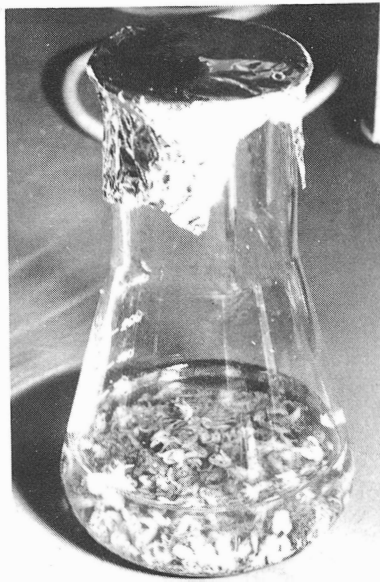
1



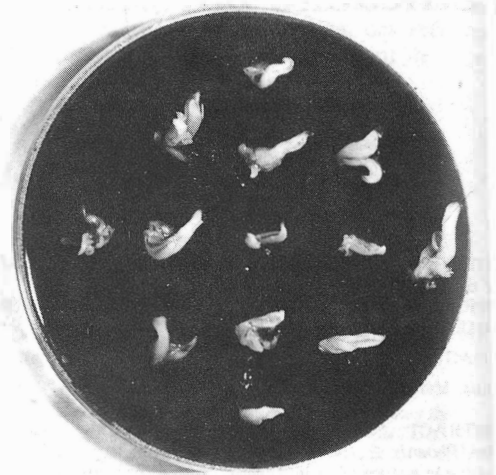
2



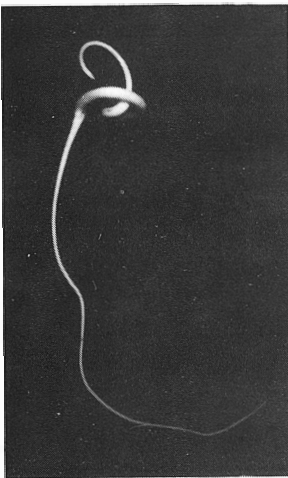
3



4



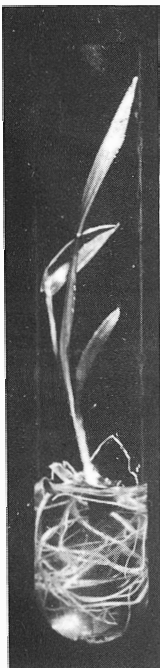
5



7



6



8



9

1 - Cal embryogène de palmier dattier.
 2 - Structure des cals à embryoides.
 3 - Développement polyembryonnaire avec un embryon en germination.
 4 - Embryons somatiques cultivés en suspension.
 5 - Germination des embryons somatiques transférés sur milieu gélosé.
 6 - Evolution des embryons somatiques en plantules.
 7 - Plantule avec racine.
 8 - Plantule régénérée, stade préacclimatation.
 9 - Vitroplants acclimatés en serre.

Formation de cals embryogènes.

L'initiation de cals embryogènes a été obtenue en cultivant sur milieu de TISSERAT *et al.* (1979), des explants provenant de mises en cultures selon la technique POULAIN *et al.* (1979) et entretenus au stade de multiplication. Le milieu de culture de TISSERAT *et al.*, dérive du milieu MS (*) (MURASHIGE et SKOOG, 1962) et contient : charbon actif, 3 g/l ; 2,4 D (*), 100 mg/l ; IPA (*), 3 mg/l ; saccharose, 30 g/l ; agar, 7 g/l. Les cals sont placés en éclaircissement diffus à photopériode de 15 h d'éclaircissement/9 heures d'obscurité et thermopériode 27°C durant le jour/24°C durant la nuit. Les subcultures sont effectuées à 50 jours d'intervalle.

Etablissement de culture en suspension.

Les cals obtenus sont transférés en milieu liquide dans des erlenmeyers de 250 ml. Le milieu est celui de MS au 1/2 avec : charbon actif, 3 g/l et saccharose, 30 g/l. Chaque erlenmeyer reçoit 100 ml de milieu et est inoculé avec 5 g de matériel végétal. Les cultures sont incubées sur un agitateur rotatif (100 rotations par minute). Les conditions d'éclaircissement et de température sont identiques à celles de l'étape de callogenèse.

Récupération des embryons.

A 30 jours d'intervalle, le contenu des erlenmeyers est filtré sur maille Ø 5 mm puis Ø 50 µm. Une partie des embryons de taille supérieure à 5 mm est gardée pour être placée en milieu de régénération. Le matériel embryonnaire de taille comprise entre 50 µm et 5 mm est remplacé en milieu liquide neuf à raison de 10 g par 100 ml.

Régénération de plantules.

Après passage en milieu liquide agité les embryons sont placés sur un premier milieu de régénération constitué des éléments MS au 1/2 et contenant 3 g/l de charbon actif, 30 g/l de saccharose et 7 g/l d'agar. Après 45 jours, les plantules sont transférées sur un second milieu MS, contenant les additifs suivants : charbon actif, 1 g/l ; adénine, 40 mg/l ; kinétine 5 mg/l ; benzylaminopurine, 2 mg/l ; acide naphthalène acétique, 0,5 mg/l ; acide naphthoxyacétique, 0,1 mg/l et saccharose 40 g/l. Les repiquages ultérieurs sur ce même milieu interviennent tous les 45 jours. Les conditions de température et de photopériode demeurent inchangées. L'énergie lumineuse est augmentée.

Résultat et discussion.

Les tissus de palmier dattier placés sur le milieu callogène à forte teneur en auxine continuent à former des organes différenciés. La formation de cal marginal n'a lieu qu'après une latence de 50 jours (variétés Bou Feggous, Halawy, Kadrawy) ou plus (Medjool, Barhé). A chaque

repiquage, les zones formant du cal ainsi que les parties tendres encore en croissance végétative sont isolées et re-placées sur milieu neuf. Après trois subcultures (Bou Feggous, Halawy, Kadrawy) ou plus (Medjool, Barhé) le cal devient beige et montre des structures granulaires de plus en plus nombreuses (photo 1). En cinquième et sixième subcultures, les cals sont constitués dans leur ensemble de nodules sphériques compacts multiples et d'un tissu matriciel lâche (photo 2). La nature proembryonnaire et la bipolarité de tels nodules ont été vérifiées selon MATER (1986).

Lorsque les proembryons sont prélevés et transférés sur un milieu de développement contenant très peu ou pas d'auxine comme dans le cas présent (milieu inspiré de TISSERAT, 1979), les nodules continuent à se multiplier. Dans le même temps, quelques proembryons s'allongent puis commencent à germer (photo 3). Il s'ensuit une large hétérogénéité du matériel végétal en régénération qui conduit à une exploitation insuffisante des proembryons (SHARMA, 1986).

Afin d'obtenir une meilleure homogénéité des différents stades d'évolution, nous avons appliqué au cas des embryons de palmier dattier une étape de culture en milieu liquide agité.

Ce passage en milieu liquide agité assure l'individualisation de tous les proembryons (ce qu'un transfert direct sur un milieu gélosé rend impossible) et permet d'obtenir une maturation du matériel embryonnaire satisfaisante en vue des étapes ultérieures de régénération. Des prélèvements effectués lors de chaque repiquage des suspensions embryonnaires nous ont permis de préciser l'évolution des embryons en fonction du temps de passage en milieu liquide (tableau 1).

Les embryons récupérés au cours des trois premiers mois de culture en milieu liquide ont montré l'aptitude à reformer des colonies de nodules, quelle que soit la variété considérée. D'une manière concomitante, un pourcentage élevé d'embryons n'a pas survécu au transfert sur milieu gélosé.

Cette durée de trois mois en milieu liquide s'est donc révélée insuffisante pour assurer la sortie de lots d'embryons somatiques matures, homogènes et viables. Par contre, les embryons récupérés après une période de cinq mois en milieu liquide agité ont montré une croissance individuelle dans près de 90 p. 100 des cas avec un taux de reprise supérieur à 95 p. 100. L'obtention de plantules individualisées se trouve ainsi optimisée. Cette méthodologie évite lors des repiquages ultérieurs la séparation de formations multiples à l'origine de blessures qui diminuent le rendement d'une façon appréciable.

A chaque transfert sur milieu neuf, l'extrémité des feuilles des plantules est sectionnée et les racines sont conservées à seulement un centimètre de longueur. Après quatre subcultures, les plantes présentent une morphologie compatible avec une acclimatation *post in vitro*. Le taux de reprise dans ces conditions est de 100 p. 100.

* - 2,4 D : acide dichlorophénoxyacétique.
MS : milieu de Murashige et Skoog
IPA : 6-isopentényl adénine.

TABLEAU 1.

Durée en milieu liquide agité	Aspect des embryons	Germination	Evolution
1 mois	Granules de 1 à 2 mm de diamètre. Quelques embryons très allongés avec racine	+ -	Reformation de cal noduleux. Développement en formations multiples de plantules
2 mois			
3 mois			
4 mois	Embryons de taille moyenne égale à 7 mm, allongés	+	Développement de plantules individuelles pour Halawy et Kadrawy
5 mois	Gaine ouverte avec feuille visible Taille supérieure à 8 mm, en moyenne	++	Développement rapide en plantules individuelles
6 mois			

CONCLUSION

Récemment, DAIKH et DEMARLY (1987) ont souligné l'importance de pouvoir maîtriser la régénération de palmier dattier par embryogenèse somatique et d'obtenir des semences artificielles. Le présent article montre que l'introduction d'une étape en milieu liquide agité constitue un progrès important, permettant un contrôle et une

maîtrise plus efficaces de la maturation et de l'isolement des embryons somatiques de palmier dattier. Ce travail conduit maintenant à rechercher une synchronisation parfaite du stade des embryons somatiques obtenus en vue d'homogénéiser leur développement ultérieur, que ce soit pour produire directement des vitroplants de qualité, des stades d'embryons à développement programmable dans le temps ou encore des semences artificielles.

BIBLIOGRAPHIE

- BARRET (H.C.). 1973.
Date breeding and improvement in North America.
Fruit Var. J., 27, 50-55.
- BRAC DE LA PERRIERE (R.A.) et DUBOST (T.). 1987.
La culture de palmier dattier en Algérie : un programme de recherche au service du développement.
P.H.M. - Rev. Hort., 273, 49-52.
- DAIKH (H.) et DEMARLY (Y.). 1987.
Résultats préliminaires sur l'obtention d'embryons somatiques et la réalisation de semences artificielles de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.).
Fruits, 42 (10), 593-596.
- MATER (A.A.). 1986.
In vitro propagation of *Phoenix dactylifera* L.
Date Palm J., 4, 137-152.
- MUNIER (P.). 1973.
Le palmier dattier.
Ed. Maisonneuve et Larose, Paris, 221 p.
- MURASHIGE (T.) et SKOOG (F.). 1962.
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., 15, 473-497.
- POULAIN (C.), RHISS (A.) et BEAUCHESNE (G.). 1979.
Multiplication végétative en culture *in vitro* du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.).
C.R. Acad. Agr. Paris, 11, 1151-1154.
- REUVENI (O.) et LILIEN-KIPNIS (H.). 1974.
Studies of the *in vitro* culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues and organs.
Volcani Institute Agricultural Research Pamphlet, 145, 1-40.
- SHARMA (D.R.), DEEPAK (S.) et CHOWDURY (J.B.). 1986.
Regeneration of plantlets from somatic tissues of the date palm *Phoenix dactylifera* L.
Indian J. Exp. Bot., 24, 763-766.
- TISSERAT (B.). 1979.
Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*.
J. Exp. Bot., 30, 1275-1283.
- TISSERAT (B.), FOSTER (G.) et DEMASON (D.). 1979.
Plantlet production *in vitro* form, *Phoenix dactylifera* L.
Date Growers' Inst. Rep., 54, 19-23.

REGENERATION DER DATTELPALME (*PHOENIX DACTYLIFERA* L.) IM WEGE DER SOMATISCHEN EMBRYOGENESE. STEIGERUNG DER EFFIZIENZ DURCH VERWENDUNG EINES BEWEGTEN FLÜSSIGSUBSTRATS.

F. DAGUIN und R. LETOUZE.
Fruits, Mar. 1988, vol. 43, n° 3, p. 191-194.

KURZFASSUNG - Ein Verfahren der somatischen Embryogenese zur Regeneration der Dattelpalme (*Phoenix dactylifera* L.) wird in allen Einzelheiten beschrieben. Zur Individualisierung der Embryone wird eine Etappe im bewegten Flüssigsubstrat ausgelegt. Die erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese Etappe lang genug angesetzt werden muss, damit die Embryone mit Blick auf ihre Entwicklung ausreichend heranreifen können.

REGENERACION DE LA PALMERA DATILERA (*PHOENIX DACTYLIFERA* L.) POR EMBRIOGENESIS SOMATICA : MEJORA DE LA EFICACIA POR PASO EN MEDIO LIQUIDO AGITADO.

F. DAGUIN y R. LETOUZE.
Fruits, Mar. 1988, vol. 43, n° 3, p. 191-194.

RESUMEN - Un procedimiento de embriogénesis somática para la regeneración de la palmera datilera (*Phoenix dactylifera* L.) se describe enteramente aquí. Una etapa en medio líquido agitado se utiliza para la individualización de los embriones. Los resultados obtenidos indican que esta etapa debe de ser bastante larga para permitir una maduración satisfactoria de los embriones con vistas a su evolución.

