

Embryogenèse somatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) - I - Induction de la callogénèse à partir d'organes de rejets de quelques cultivars

H. Saka, F. Abed, B. Amara, A. Kermiche

*INRAA, Laboratoire de Physiologie Végétale, CRP Mehdi Boualem BP 37, Baraki 16210,
Alger.*

Résumé - Différents explants provenant de rejets des cultivars de Deglet Nour, Takerboucht, Tazerzait, et Tinasseur sont mis en culture. L'induction de la callogénèse est étudiée sur le milieu de base MS(1962) modifié, additionné de huit différentes combinaisons hormonales: le 2,4-D (100, 37, 25, 12.5 mg/l), le picloram (2.5, 12.5 mg/l) et le dicamba (2.5, 12.5 mg/l) associés à de la IPA (1 ou 3 mg/l). Différents types de cals sont obtenus mais seuls les cals de structure nodulaire, plus ou moins friables et de couleur blanchâtre à brune sont embryogènes. Les milieux contenant le 2,4-D donnent des résultats homogènes quelque soit la concentration étudiée. L'utilisation du picloram ou du dicamba n'a pas permis une callogénèse plus groupée ni plus importante. Le temps de réponse à la callogénèse est dépendant du génotype et est de 6 mois au minimum. La germination des premiers embryons a lieu au bout de 24 semaines. Vingt deux pour cent des cultures initiées répondent et germent sur le milieu de germination.

palmier dattier / régénération / embryogenèse somatique / callogénèse / substances de croissance / germination

Abstract - Explants from Deglet Nour, Takerboucht, Tazerzait and Tinasseur offshoots are used. Induction of callogenesis is studied on modified MS(1962) supplemented with 8 growth regulators combinations: 2,4-D(100, 37, 25, 12.5 mg/l), picloram (2.5, 12.5 mg/l), dicamba (2.5, 12.5 mg/l) associated with 2IP (1 or 3 mg/l). Various calli types are obtained but only the nodular, more or less friable white or brown callus is embryogenous. The tested media with 2,4-D give homogenous response for all the concentrations used. Picloram and dicamba do not allow a higher percentage of embryogenesis. The callogenesis is genotype dependant and requires at least 6 months. The germination of somatic embryos occurs for twenty two percent of the cultures in the germination medium and requires at least 24 weeks.

date palm / regeneration / somatic embryogenesis / callogenesis / growth regulators / germination

INTRODUCTION

Le palmier dattier constitue le pilier de l'économie rurale des oasis. Le palmier dattier espèce hétérozygote, monocotylédone et dioïque est confronté à deux problèmes majeurs: l'âge avancé des palmiers qui limite le nombre de rejets disponibles et le Bayoud, maladie cryptogamique qui ne peut être enrayerée que par l'utilisation de cultivars résistants.

La culture «in vitro» de tissus se présente comme une alternative pour assurer la multiplication de génotypes d'élite et entrevoir l'amélioration de l'espèce par les biotechnologies. Ces deux dernières décennies, de nombreux travaux ont concerné la régénération par embryogenèse somatique du palmier dattier (Reynolds et Murashige, 1978; Tisserat, 1979; Mater, 1986; Daguin et Letouze, 1988; Scarnec, 1991). La néoformation nécessite une succession de deux milieux de culture: l'un permettant la production de cals embryogènes et l'autre la germination des embryons somatiques et leur développement en plants (Tisserat, 1984). Le milieu de base le plus souvent utilisé est le MS (Murashige et Skoog, 1962) modifié. La concentration de 2,4-D utilisée est importante (100 mg/l) car les milieux contiennent du charbon actif, connu pour adsorber les substances de croissance et particulièrement les auxines (George et Sherington, 1984). Dans le milieu germination, la concentration en auxines est diminuée ou supprimée. Seuls les bourgeons axillaires avec ébauches foliaires, les jeunes feuilles de taille inférieures à 1 cm et les fragments d'apex répondent à la callogenèse (Saka et Abed, 1989; Saka et al., 1992). Les organes prélevés sur des rejets de faible poids entre 400 g et 1,5 kg réagissent mieux que ceux prélevés sur de plus gros rejets (Saka et al., 1992).

L'objet de ce travail sur l'embryogenèse somatique du palmier dattier est de réduire le temps de réponse à

la callogenèse tout en obtenant un plus grand taux de cals embryogènes. Les efforts se sont concentrés sur l'utilisation du 2,4-D, du picloram et du dicamba. Le 2,4-D est connu comme étant une forte auxine pouvant générer des traits indésirables ou provoquer la perte du pouvoir de différenciation des cellules (Eapen et George, 1990; Fitch et Moore, 1990). Le picloram et le dicamba, auxines de synthèse, ont été utilisés avec succès sur différentes espèces et aucun effet adverse n'a été noté sur les plants régénérés (Omar et Novak, 1990; Kysley et Jacobsen, 1990).

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Différents explants de rejets de cultivars de Deglet Nour, Tinasseur, Takerboucht et Tazerzait sont mis en culture. Ces rejets n'excèdent pas 1,5 kg. Ils sont tout d'abord disséqués puis désinfectés selon un protocole mis au point au laboratoire. Les jeunes feuilles de 1 cm, les bourgeons apicaux et axillaires sont mis en culture. Un minimum de 2 rejets par milieu testé est utilisé.

Méthodes

Les mises en culture ont lieu entre mars et avril. Pour induire la callogenèse, un seul milieu de base, le MS (Murashige et Skoog, 1962) modifié est utilisé. L'effet du picloram et du dicamba est étudié à des concentrations de 2,5 et 12,5 mg/l associés à 1 mg/l de IPA et de 200 mg/l de charbon actif (respectivement P2,5; P12,5; D2,5; D12,5). Le 2,4-D est utilisé à des concentrations de 12,5, 25, 37,5 mg/l associé à 200 mg/l de charbon actif et 1 mg/l de IPA (respectivement P2,5; P12,5; D2,5; D12,5). La concentration de 100 mg/l de 2,4-D est associée à 3 mg/l de IPA et 3 g de charbon actif (M100), tel que préconisée par Reynolds et Murashige (1978). Le milieu de germination est

dépourvu de substances de croissance et à une concentration de saccharose plus élevée.

Les subcultures s'effectuent toutes les 5 semaines. Lorsque les cals sont initiés, la fréquence des repiquages est alors de 8 semaines. L'induction de la callogenèse a lieu à l'obscurité à une température de 28°C (+ou - 4°C). Durant la germination des embryons une photopériode de 16 heures avec une température de 28°C jour et 24°C nuit est appliquée.

L'étude histologique (effectuée au L.R.P.V. d'Angers) est réalisée sur les différents types de cals obtenus afin de définir les cals embryogènes et leur capacité de régénération. La technique d'inclusion et de coloration utilisée est celle décrite par Bagniol et al. (1992). La coloration au PAS permet de localiser les polysaccharides et le Naphthol Blue Black les protéines solubles ou de réserves.

RESULTATS

Dix à douze explants sont mis en culture par rejet. Les premières proliférations apparaissent 20 à 30 semaines après la mise en culture. Ces proliférations cellulaires apparaissent tout d'abord au niveau des marges des jeunes feuilles, à la base des bourgeons puis s'étendent à tout l'explant.

Quelque soit la variété et quelque soit le milieu testé, le temps de réponse à la callogenèse est d'au moins 6 mois après la mise en culture. Ainsi la Tinasseur (tableau I), cultivar qui répond relativement bien quelque soit le milieu de culture, nécessite 6 mois pour une généralisation de la callogenèse à tous les explants mis en culture. Un début de callogenèse apparaît au bout de 6 à 9 mois pour la Takerboucht (tableau II). Dans le cas de la Deglet Nour, 7 mois sont nécessaires pour l'induction de cals (tableau III).

Les milieux de cultures contenant du 2,4-D ont permis à la Tinasseur d'obtenir une callogenèse sur tous les explants. Sur les

milieux de culture contenant le picloram ou le dicamba, la callogenèse a lieu sur un nombre réduit d'explants (20%), étalée et très hétérogène pour un même milieu: Pour le milieu contenant 2,5mg /l de dicamba, un début de callogenèse est noté au bout de 9 mois pour un rejet alors que seulement 2% des explants callent en 6 mois pour le deuxième rejet. Concernant la Deglet Nour, la callogenèse se généralise au bout de 6 mois. Pour les milieux contenant le 2,4-D, la réponse est homogène (fig 1).

Telle que le montre la figure 2 différents types de cals sont obtenus. Le cal embryogène qui se caractérise par une structure granuleuse plus ou moins friable et de couleur blanchâtre à brunâtre présente une hyperhydricité marquée. Cette tendance à l'hyperhydricité n'est pas particulière à un milieu donné (tableaux I, II, III) et est réversible. Ces cals présentent des amas cellulaires regroupés en périphérie. Ces cellules sont vacuolisées avec un noyau dense et d'importantes réserves de protéines et de polysaccharides sont observées (fig.3A;3B). Les cals des différentes souches sont transférés sur milieu sans substance de croissance pour la germination des embryons après un maximum de 12 mois de culture sur le milieu d'induction. A ce stade, les coupes histologiques montrent des amas cellulaires, vacuolisées, avec des cellules en division, qui évoluent en une organisation cellulaire ou proembryons (fig. 3 A à C). Les cals d'aspect globulaire, très fibreux évoluent en racines. Ces cals sont observés sur la totalité des milieux testés et représentent 30 à 40 % des explants mis en culture.

Les premiers embryons somatiques apparaissent au bout de 6 mois après leur transfert (tableau IV). Environ 25 % des cals embryogènes devenus granuleux commencent à germer. Sur les 8 souches de Tinasseur en germination, deux souches germent effectivement. Pour la Deglet Nour, sur les 44 souches seulement 5 sont en début de germination. La Takerboucht

compte 9 souches dont 6 sont en germination. Quatre souches de Tazerzait sur les cinq germent.

Tableau I. Callogenèse sur les différents milieux utilisés pour la variété Tinasseur

<i>milieu</i>	<i>nbre explant</i>	<i>mois pour obtention cal*</i>	<i>nbre et % cal **</i>		<i>couleur cal ***</i>	<i>texture ****</i>
M12.5	11	6	26	100	beige	granuleux
M25	11	6	23	100	beige	granuleux
M37	18	6	28	100	beige	friable
D 2.5	72	9	3	4.6	brun	desséché
D12.5	31	9	15	50	brun	noduleux
P12.5	47	9	10	52.6	beige	noduleux

Tableau II. Callogenèse sur les différents milieux utilisés pour la variété Takerboucht

<i>milieu</i>	<i>nbre explant</i>	<i>mois pour obtention cal*</i>	<i>nbre et % cal **</i>		<i>couleur ****</i>	<i>cal texture ****</i>
M12.5	50	7	46	92.5	beige	vitreux
M25	42	7	31	73.8	beige	granuleux
M37	22	9	4	18.10	beige	vitreux
D 2.5	97	7	10	10.3	brun	vitreux
D12.5	182	10	80	43.3	brun	noduleux
P 2.5	passés	sur P12.5				
P12.5	146	7	35	58.2	beige	vitreux granuleux

Tableau III. Callogenèse sur les différents milieux utilisés pour la variété Deglet Nour

<i>milieu</i>	<i>nbre explant</i>	<i>mois pour obtention cal*</i>	<i>nbre et % cal **</i>		<i>couleur cal ***</i>	<i>texture ****</i>
M12.5	50	7	46	92.5	beige	vitreux
M25	42	7	31	73.8	beige	granuleux
M37	22	9	4	18.10	beige	vitreux
D 2.5	97	7	10	10.3	brun	vitreux
D12.5	182	10	80	43.3	brun	noduleux
P 2.5	passés	sur P12.5				
P12.5	146	7	35	58.2	beige	vitreux granuleux

*temps mis en culture **explants qui callent parmi les restants *** couleur des cals embryogenes **** texture des cals obtenus

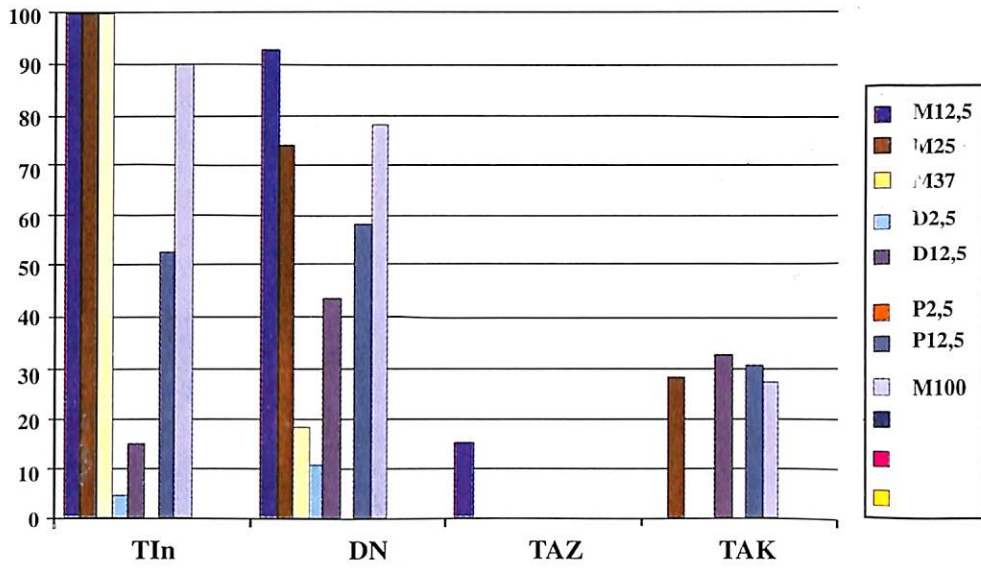


Fig 1. Callogénèse des cultivars en fonction des milieux utilisés (TIn = Tinasseur ; DN = Deglet Nour ; TAZ = Tazerzait ; TAK = Takerboucht).

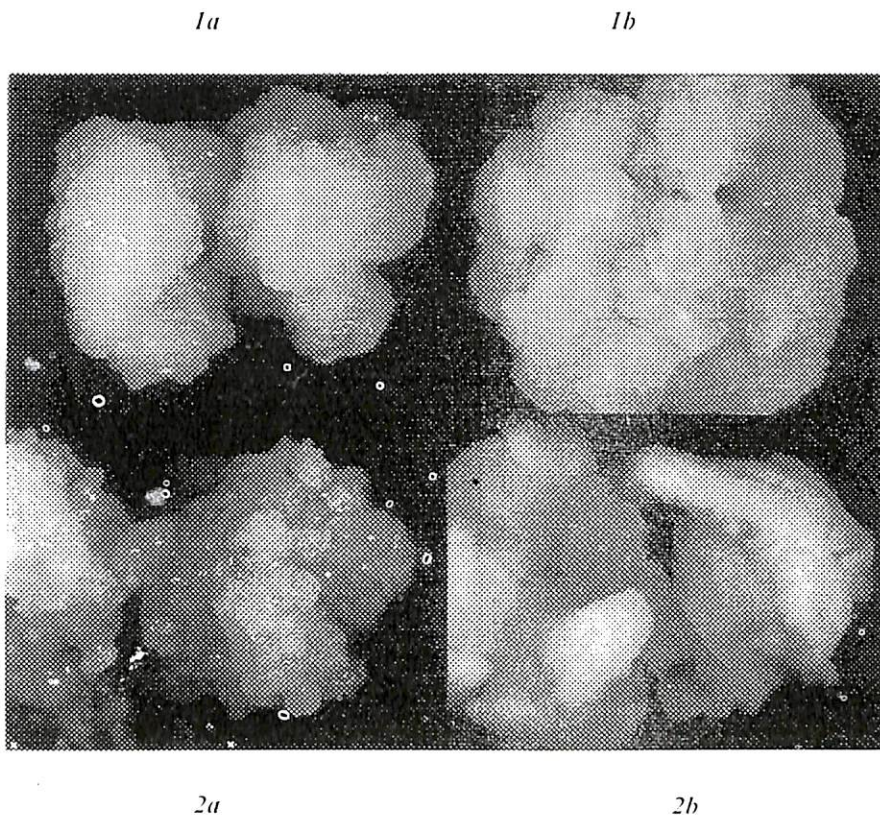


Fig 2. Types de cals obtenus et leur évolution - 1a cals embryogènes blancs, 1b évolution en structure nodulaires ; 2a cals embryogènes bruns et 2b germination de ces cals

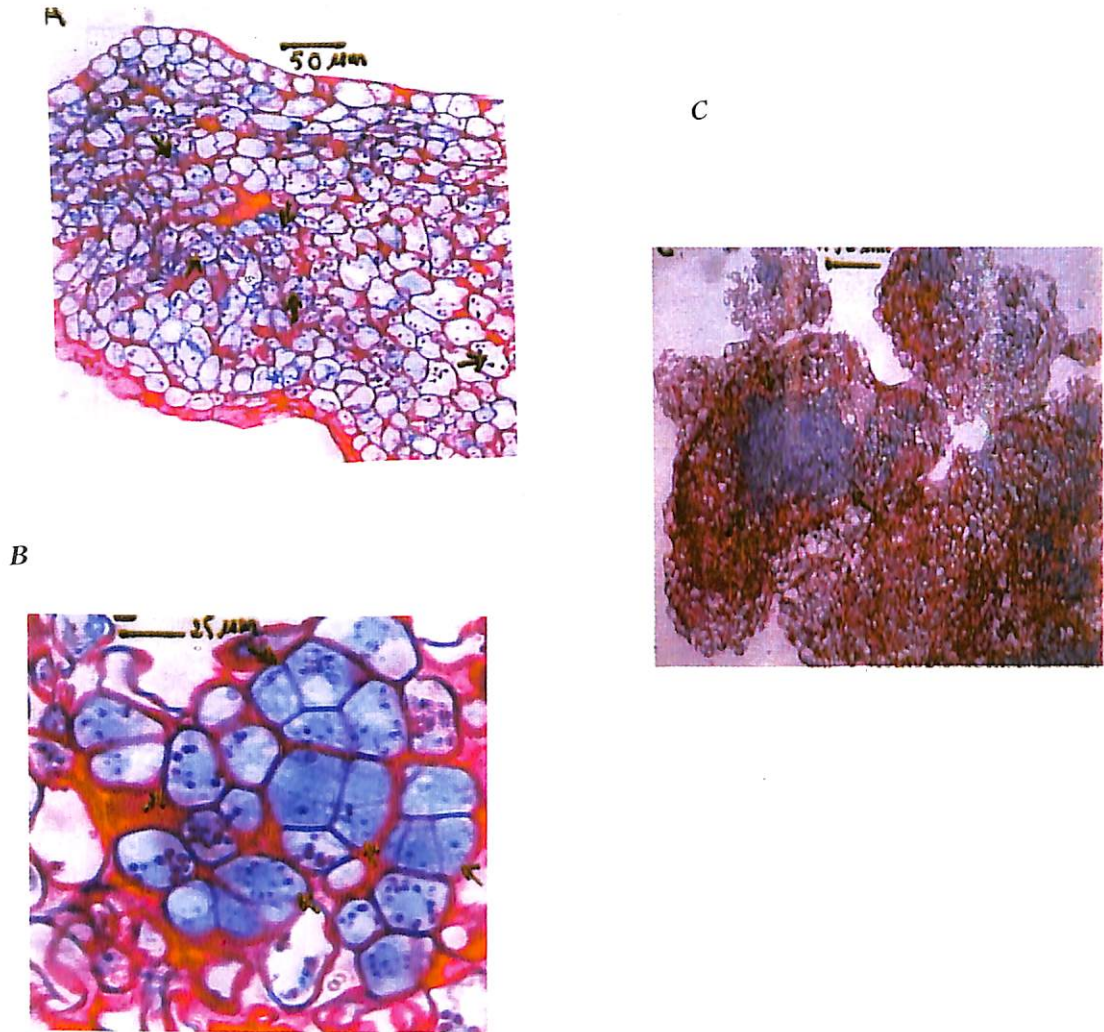


Fig 3. Coupes histologiques des cals embryogènes sur milieux induction et germination.

A- cal à structure nodulaires sur milieu induction. Cellules densément colorées et accumulation des protéines de réserves indiquée par les flèches ; B- Cal nodulaire en milieu germination. Les flèches indiquent les cellules en division, uniformément colorées et largement vacuolisées ; C- Cal nodulaire sur milieu germination après plusieurs subcultures. L'organisation en amas cellulaires sphériques indique la formation de proembryons.

DISCUSSION-CONCLUSION

La première étape de ce travail concerne l'obtention de cals embryogènes. La callogénèse est précédée par une augmentation du volume des explants. A ce stade, les explants présentent une hétérogénéité de réponse qui s'étale dans

le temps. Les explants qui réagissent ne produisent pas de cals en même temps. La variété Tinasseur répond le plus vite à la callogénèse et ce quelque soit le milieu utilisé. L'obtention du cal est longue et exige au minimum 6 mois pour l'initiation. Ceci est confirmé par différents auteurs. Quatre à dix semaines

pour les explants de type embryons (Tisserat, 1979), seize à vingt quatre semaines pour les bourgeons axillaires et le bourgeon apical (Sharma et al, 1986), vingt quatre semaines au minimum pour les fragments d'apex (Mater, 1986; Scarnec, 1991).

La réponse des explants est assez hétérogène. Pour une variété, un même type d'explant et un même milieu de culture, trois types de cals sont obtenus lors d'une même mise en culture. Ces trois types de cals diffèrent par leur coloration, leur texture et leur croissance. Seuls les cals de structure nodulaires de couleur blanche à brun sont embryogènes. L'étude histologique montre des zones méristématiques en différenciation. Les cellules présentent une accumulation importante en protéines de réserves et polysaccharides ainsi que des noyaux très denses. Le cal noduleux et fibreux qui évolue en racines s'observe sur tous les milieux étudiés.

Les différents milieux testés montrent que le 2,4-D, quelle que soit la concentration utilisée, induit un taux de callogénèse similaire. L'utilisation du picloram et du dicamba n'a pas permis une callogénèse plus groupée ni plus rapide, contrairement aux résultats des années précédentes (Saka et al, 1992). Cependant, le picloram à 12.5 mg/l a permis la formation de cal sur la totalité des explants d'un rejet de Deglet Nour. La Takerboucht réagit mieux avec le picloram et le dicamba et ce quelque soit la concentration utilisée. Il existe donc des différences variétales se traduisant par des réponses et temps de réponses différents et qui confirment divers travaux (George et Sherington, 1984; Bagniol et al., 1992; Sharma et al., 1984; Sharma et al., 1986).

En ce qui concerne la germination des embryons, celle-ci s'observe à partir de 6 mois après transfert sur milieu de germination. A ce stade, les coupes histologiques montrent les divisions cellulaires, une intense synthèse d'amidon

et l'accumulation de protéines de réserves. Ces cellules s'organisent en zone concentrique pour former les proembryons. Sur les 44 souches de Deglet Nour, seules 5 germent. Au bout de 12 mois, environ 45% germent. Ceci se rapproche des résultats obtenus (Tisserat, 1984) où les cals induits avaient des capacités génératrices de l'ordre de 20 %. Le fait de séjourner durant 12 mois sur milieux riches en auxines, les cals ont dû perdre leur potentiel embryogène. Ceci est en accord avec l'étude (Scarnec, 1991) qui indique qu'après 72 semaines, les souches de cals embryogènes de différentes variétés de palmier dattier ne produisent plus d'embryons par perte de leur potentiel embryogène.

Comme décrit par divers auteurs, (Tisserat, 1982; Sharma et al., 1984; Sharma et al., 1986), le processus de embryogenèse n'est pas synchrone au sein d'un même cal: des embryons à différents stades de développement coexistent sur un même cal. De plus, du cal secondaire se forme sur le milieu de germination même. Les différentes étapes du développement des embryons somatiques sont celles déjà décrites par plusieurs auteurs (Scarnec, 1991; Tisserat, 1984).

REFERENCES

- Bagniol S, Englmann F, Michaux Ferriere M (1992) Histocytological study of apices from in vitro plantlets of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) during a cryopreservation process. *Cryo. letters* 13, 405-412
- Daguin F, Letouze R (1988) Régénération du palmier dattier par embryogenèse somatique: Amélioration de l'efficacité par milieu liquide. *Fruit* 43 (3), 191-194
- Eapen G, George L (1990) Influence of phytohormones, aminoacids, growth supplements and antibiotics on somatic

- embryogenesis and plant differentiation in finger millet. *Plant cell, tissue and organ culture* 22 (3), 87-93
- Fitch MMM, Moore PH (1990) Comparison of 2,4-D and picloram for selection of long term totipotent green callus of sugar cane. *Plant cell, tissue and organ culture* 20 (3): 157-164
- George, Sherington (1984) Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. George and Sherington eds. Eastern Press. 386 p
- Kysley L, Jacobsen M (1990) Somatic embryogenesis from pea embryos and shoots apices. *Plant cell, tissue and organ culture* 20, 160-164
- Mater M (1986) In vitro propagation of date palm. *Date palm J* 4 (2). 137-152
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15, 473-497
- Omar MS, Novak FJ (1990) In vitro plant regeneration and ethylenesulfonate (EMS) uptake in somatic embryos of date palm. *Plant cell, tissue and organ culture* 20 (3), 185-190
- Reynolds J, Murashige T (1978) Assexual embryogenesis in callus cultures of palms. *IN VITRO* 15 (5), 383-387
- Saka H, Abed F (1989) Essai de l'embryogenèse somatique sur quelques variétés de palmier dattier. C.R. Séminaire «La culture in vitro du palmier dattier». Marrakech. FAO/PNUD 71-73
- Saka H, Yahiaoui N, Abed F (1992) La régénération «in vitro» du palmier dattier. Bilan d'activité 1989-1992. Contrat régional CEE, STD2 48p
- Scarnec A (1991) La régénération «in vitro» du palmier dattier par organogenèse et embryogenèse somatique. Thèse doctorat. Univ. d'Angers. 150p
- Sharma DR, Dawra S, Chowdry JB (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm through tissue culture. *Ind Jour of Exp Biology* 22, 596-598
- Sharma DR, Dawra S, Chowdry JB (1986) Regeneration of plantlets from somatic tissue culture of date palm. *Ind Jour of Ex. Biology* 24, 763-766
- Tisserat B (1979) Propagation of date palm «in vitro». *J ex bot* 30, 1275-1283
- Tisserat B (1982) Developpment of new tissue culture technology to aid in cultivation and crop improvement of date palm. in Proc. 1st Symp. on Date palm. King Faical Univ. Al Hassa, Saudi Arabia, 126-139
- Tisserat B (1984) Propagation of date palm by shoot tip cultures. *Hortscience* 19 (2), 230-231