République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biologie Animale et Végétale

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Biologie et écologie des populations et des communautés.
Option : Interactions "plantes- environnement"

THEME

Action des radiations bleues sur le développement des embryons zygotiques du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) Cv. Takerboucht cultivés *in-vitro*

Présenté par M[r] **Djillali GHOBRINI**

Devant la commission d'examen ;

M[r] KELLOUCHE Abdellah.	Maître de conférences	UMMTO	Président
M[me] YAKOUB-BOUGDAL Saliha.	Maître de conférences	UMMTO	Rapporteur
M[me] ALI AHMED-SADOUDI Djamila.	Maître de conférences	UMMTO	Examinateur
M[r] KHELIFI Lakhdar.	Professeur	ENSA	Examinateur
M[me] SMAÏL-SAADOUN Nouria.	Maître de conférences	UMMTO	Examinateur

Année 2009/2010

Avant-propos

Ce que j’aime dans la recherche scientifique moderne,
c’est qu’elle est aujourd’hui ce qu’ont toujours été la haute mer,
la haute montagne, la grande forêt, le désert, ce qu’ont été
autrefois la guerre et l’exploration : l’occasion incessante
donnée à l’homme de faire face à l’imprévu.

R. P. Bruckberger

Remerciements

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Cytologie et Morphogenèse Végétale (CMV) de M^me^ **BOUGDAL-YAKOUB S.** (UMMTO).*

*Je tiens avant tout à exprimer ma profonde reconnaissance à M^me^ **BOUGDAL-YAKOUB S.,** docteur d'état es. Sciences et maître de conférences à la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'UMMTO, pour m'avoir accepté au Laboratoire de CMV et proposé ce sujet de mémoire. J'ai beaucoup appris au cours de ces années sous sa direction grâce à ses connaissances et à sa patience. Je lui exprime ma gratitude pour son aide à tout instant, pour avoir travaillé avec moi, pour l'interprétation de mes résultats et pour la rédaction de mon mémoire.*

*Je prie M^r^ **KELLOUCHE A.** de trouver ici l'expression de toute ma gratitude pour avoir accepté avec beaucoup d'amabilité de présider le jury.*

*J'adresse mes sincères remerciements à M^me^ **ALI AHMED-SADOUDI D.** qui a bien voulu examiner mon mémoire.*

*Je remercie également M^r^ **le Professeur KHELIFI L.** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Mes remerciements vont aussi à M^me^ **SMAÏL-SAADOUN N.** qui n'a pas hésité pour participer au jury de ce mémoire.*

J'ai une grande reconnaissance envers mes camarades de post-graduation qui m'ont encouragé durant toutes ces années.

*Mes remerciements s'adressent à Monsieur **SAGUENI M.** qui m'a fourni tout le matériel végétal ayant servi à la réalisation de ce travail, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.*

Merci aussi aux étudiants du laboratoire de cytologie qui ont contribué à l'ambiance de travail qui est très agréable.

*Je remercie plus particulièrement mes **parents** qui m'ont suivi, encouragé, et **financé mes études.***

Résumé

Des expériences conduites *in vitro* avec des embryons excisés de palmier dattier Cv. Takerboucht, variété résistante au bayoud, a apporté des améliorations à la technique de culture d'embryons matures. Ainsi, le taux et la vitesse de germination sont nettement améliorés. Les meilleurs taux de germination ont été enregistrés sur le milieu de base MS modifié par référence, respectivement, aux travaux réalisés sur le palmier dattier par RHISS (1980) (MSm_1) et YAKOUB-BOUGDAL (1984) (MSm_2). Ainsi, la culture des embryons, en position debout a entraîné des taux élevés de régénération de 100 % sur MSm_1 et de 91,67 % sur MSm_2, après 2 mois de culture. De plus, l'addition du saccharose a montré que les fortes concentrations (50 $g.l^{-1}$) assurent un bon aspect morphologique. Alors que l'addition de l'ANA à 1 $mg.l^{-1}$ parait être plus favorable à la production de plants.

Nous avons tenté un traitement en lumière bleue (P380), l'étude révèle l'effet bénéfique d'un court traitement aussi bien sur la réduction du temps moyen de germination que dans l'obtention de jeunes plants vigoureux. De plus, l'étude a mis en évidence l'effet rhizogène d'un traitement composite (bleue/blanche).

Les variations des teneurs en leucoanthocyanes reflètent les variations de sensibilité de l'embryon à la lumière. Les radiations bleues induisent très fortement la synthèse de ces composés durant seulement les deux premières semaines de culture (15,05 $mg.g^{-1}$ sur MSm_1 et 15,97 $mg.g^{-1}$ sur MSm_2) et, par la suite, les teneurs diminuent. Ces teneurs sont corrélées positivement au développement des embryons si le temps d'exposition à la lumière bleue ne dépasse pas une semaine.

Mots clés : *Phoenix dactylifera* L., embryon zygotique, radiation bleue, cryptochrome, leucoanthocyanes.

Abstract

Experiments conducted *in vitro* using excised embryos of date palm Cv. Takerboucht, have made improvements to the technique of culture of mature embryos. So, the rate and speed of germination were significantly improved: the best germination rates were recorded either on MS basal medium modified by reference, respectively, the work on the date palm by RHISS (1980) (MSm_1) and YAKOUB-BOUGDAL (1984) (MSm_2).

Thus, embryos grow with the size of 5 mm and standing have led to high rates of regeneration (100%) on MSm_1 (91, 67%) and on MSm_2, after 2 months of culture. Besides, the addition of sucrose at different concentrations shows that high concentrations (50 $g.l^{-1}$) provide a good morphological appearance. The addition of ANA at 1 $mg.l^{-1}$ appears most suitable for seedling production.

We tried a blue light treatment (P380), study reveals the beneficial effect of treatment during both the reduction of regeneration in the obtaining of vigorous seedlings. In addition, the study showed the effect of rooting treatment composite (blue/white).

Changes in levels leucoanthocyanes reflect variations in sensitivity of the embryo to light during the culture. The blue radiation induced strongly the synthesis of these compounds only during the first two weeks of culture (15.05 $mg.g^{-1}$ on MSm_1 and 15.97 $mg.g^{-1}$ on MSm_2), thereafter, levels decrease. There is a positive correlation between the levels of leucoanthocyanins and the development of embryos when the bleu-light treatment no exceeds one week.

Keywords: *Phoenix dactylifera* L., zygotic embryo, cryptochrom, blue radiation, leucoanthocyanins.

SOMMAIRE

INTRODUCTION ……... 01

1er partie : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Le genre *Phoenix* L. ……. 04

1- Caractéristiques générales ……..... 04

1.1- Classification et Phylogénie ……..... 04

2- Distribution et habitat …… 06

II- Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) ……. 06

1- Histoire et botanique ……..... 06

1.1- Développement du dattier …… 10

1.2 Stades de développement du fruit du palmier dattier ……... 12

2- Importance ……..... 14

3- Reproductions et génétiques ……..... 16

4- Ravageurs et maladies du Palmier dattier ……. 17

5- Multiplication du Palmier dattier …….. 18

5.1- Culture *in-vitro* du Palmier dattier …….. 19

5.2- Culture *in-vitro* d'embryons zygotique ……..... 21

III- Etude de quelques paramètres physiques favorisant le développement des embryons ……. 24

1- Lumière et photomorphogenèse ...……. 24

2- Photorécepteurs et photoperception de la lumière par la plante ……... 24

2.1- Les photorécepteurs ……..... 24

2.2- La photoperception des signaux lumineux par la plante ……. 26

2.3- Effets de la lumière bleue sur la morphogenèse ……..... 27

IV- Généralités sur les composés phénoliques ……. 28

1- Classification des polyphénols ……..... 29

2- Les anthocyanes ……..... 30

2.1- Structure ……..... 30

2.2- Localisation ……..... 30

2.3- Biosynthèse ……..... 31

2.4- Rôles des anthocyanes ……..... 31

2ème Partie : PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES …….. 33

1- Matériel végétal utilisé …….. 33

2- Méthodes expérimentales …….. 33

2.1- Techniques de la culture *in vitro* ……..... 33

2.1.1- Stérilisation du matériel végétal …… 33

2.1.2 - Facteurs de la germination et du développement ……. 35
2.1.2.1- Taille des embryons ……..... 35
2.1.2.2- Polarité des embryons ……. 35
2.1.2.3- Suppression de l'haustorium et de la gaine cotylédonaire ……..... 36
2.1.3- Influence des phytohormones sur la culture des embryons ……... 36
2.1.3.1- Milieux de culture utilisés ……... 36
2.1.3.2- Conditions de culture …….. 38
2.1.4- Traitements lumineux …… 40
2.1.5- Observation et mesures 40
2.1.6- Repiquage ……. 40
2.2- Techniques d'étude biochimique ……..... 41
2.2.1- Extraction et dosage des leucoanthocyanes ……. 41
3- Traitement de données …….. 42

3ème Partie : RESULTATS ET DISCUSSION

1- Morphologie de la graine mure du dattier *Phoenix dactylifera* L. Cv. Takerboucht ... 43
1.1- Avant la germination 43
1.2- Germination *in-vitro* des graines 43
1.2.1- Méthode de désinfection 43
1.2.2- Etapes morphologiques successives de la germination 45
1.2.3- Courbe de germination 47
2- Conditions de germination des embryons 48
2.1- Influence de la taille 48
2.2- Influence de la position 53
2.3- Influence de la suppression de l'haustorium et de la gaine cotylédonaire 56
3- Multiplication des embryons par culture *in vitro* 59
3.1- Description de la germination 59
3.2- Influence des milieux de culture 60
3.3- Influence des traitements lumineux 64
3.4- Dosage des teneurs en leucoanthocyanes 67
3.5- Germination des plantules en culture *in vitro* en présence d'hormones 70
3.5.1- Influence de la lumière blanche 70
3.5.1.1- Milieu MSm_1 70
3.5.1.2- Milieu MSm_2 73
3.5.2- Influence de la lumière bleue 75
3.5.2.1- Milieu MSm_1 75
3.5.1.2- Milieu MSm_2 77

3.5.2- Appréciation de l'action individuelle des hormones sur la germination des plantules en culture *in vitro* 82
3.5.2.1- Influence de la lumière blanche 82
3.5.2.1.1- Action des cytokinines 82
3.5.2.1.1.1- Sur le milieu MSm_1 82
3.5.2.1.1.2- Sur le milieu MSm_2 84
3.5.2.1.2- Action des auxines 86
3.5.2.1.2.1- Sur le milieu MSm_1 86
3.5.2.1.2.2- Sur le milieu MSm_2 88
3.5.2.2- Influence de la lumière bleue 90
3.5.2.2.1- Action des cytokinines 90
3.5.2.2.1.1- Sur le milieu MSm_1 90
3.5.2.2.1.2- Sur le milieu MSm_2 92
3.5.2.2.2- Action des auxines 94
3.5.2.2.2.1- Sur le milieu MSm_1 94
3.5.2.2.2.2- Sur le milieu MSm_2 96
3.5.3- Action des Combinaisons hormonales à base d'auxine et de cytokinine sur l'évolution des plantules en culture *in vitro* 101
3.5.3.1- Influence de la lumière blanche 101
3.5.3.1.1- Milieu MSm_1 101
3.5.3.1.2- Milieu MSm_2 103
3.5.3.2- Influence de la lumière bleue 105
3.5.3.2.1- Milieu MSm_1 105
3.5.3.2.2- Milieu MSm_2 107
CONCLUSION 111
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 115
ANNEXES

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Liste des espèces du genre *Phoenix* selon BARROW (1998).
Tableau II : Principaux pays producteurs de dattes (FAO STAT, 2005).
Tableau III : Principales classes de composés phénoliques (MACHEIX et *al*., 2005)
Tableau IV : Milieux de culture avec les différentes hormones utilisées en ($mg.l^{-1}$).
Tableau V: Germination des embryons du palmier dattier var. Takerboucht à différentes tailles.
Tableau VI : Influence de la position sur le pourcentage de contamination, de nécrose et de survie.
Tableau VII : Développement des embryons, avec ou sans haustorium, sur milieu MS (1962) (L'expérience a porté sur 36 échantillons).

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Distribution du Palmier dattier en Afrique du Nord et au Sud Ouest Asiatique (WRIGLEY, 1995).
Figure 2 : Distribution naturelle des formes sauvages du Palmier dattier (ZOHARY et HOPF, 2000).
Figure 3 : Caractéristiques morphologiques du Palmier dattier d'après (OZENDA, 2004).
Figure 4 : Inflorescences du Palmier dattier (CHAO et KRUEGER, 2007)
Figure 5 : Représentation schématique de la plantule logée dans la graine en coupe sagittale d'après (PFITZER, 1855 *in* GATIN, 1912).
Figure 6 : Représentation schématique des éophylles (GATIN, 1912).
Figure 7 : Stades de développement du fruit de la datte selon MUNIER (1973).
Figure 8 : Les trois stades de développement d'embryon somatique (SGHAIER et *al*., 2008).
Figure 9 : Spectre d'absorption du phytochrome extrait de plantules étiolées d'avoine (HAYWARD, 1984).
Figure 10 : Spectre d'absorption de la flavine (MOHR et SHROPSHIRE, 1983).
Figure 11 : Fonctions des différents récepteurs de la lumière bleue dans le développement de la plante chez *Arabidopsis* (LIN, 2000).
Figure 12 : Diversité des systèmes de perception de la lumière et influence sur quelque processus intervenant dans le développement des plantules (FURUYA et SHAFER, 1996).
Figure 13 : Structure de l'anthocyanidine (HARBORNE, 1963).
Figure 14 : Schéma de la voie de biosynthèse des flavonoïdes (WINKEL- SHIRLEY, 2002).
Figure 15 : Position géographique de la station d'étude (Institut National de Géographie, 1965).
Figure 16 : Technique de suppression de l'haustorium et de la gaine cotylédonaire des germination *in vitro* du palmier dattier Cv. Tk. en condition d'asepsie.

Figure 17 : Technique d'extraction des embryons du palmier dattier en condition d'asepsie selon YAKOUB-BOUGDAL (1984).
Figure 18 : Organigramme du dosage des leucoanthocyanes (CALERO, 1989).
Figure 19 : Vues ventrale (a) et dorsale (b) de la graine sèche. (Gr x 1).
Figure 20 : Coupes, longitudinale (a) et transversale (b) de la graine sèche (Gr x 1).
Figure 21 : Observation de la jeune plante à l'état sec (G x 25).
Figure 22 : Pourcentages des contaminations, nécroses et de la réactivité des embryons de palmier dattier Cv. TK.
Figure 23 : Les étapes morphologiques de la germination du palmier dattier variété Takerboucht.
Figure 24 : Evolution des pourcentages de germination cumulés en fonction du temps (jours).
Figure 25 : Effet de la taille sur la germination des plantules du palmier dattier Cv. Tk.
Figure 26 : Développement des embryons de palmier dattier Cv. Tk, de 3 mm, cultivés sur le milieu MS (1962).
Figure 27 : Développement des embryons de palmier dattier Cv. Tk, de 5 mm, en position debout, cultivés sur le milieu MS (1962).
Figure 28 : Effet de la position sur la germination des plantules du palmier dattier Cv. Tk.
Figure 29 : Développement des embryons de palmier dattier Cv. Tk, cultivés à plat sur le milieu de base MS (1962).
Figure 30 : Influence de la suppression de l'haustorium et de la gaine cotylédonaire sur le développement des embryons de palmier dattier Cv. Takerboucht.
Figure 31 : Développement des jeunes plants de palmier dattier Cv. Tk, cultivés sur le milieu de base MS (1962) après 4 mois de culture.
Figure 32 : Description de la germination *in vitro* d'embryons excisés de la variété Takerboucht cultivés sur le milieu de MS (1962).
Figure 33 : Effet des milieux testés sur la germination des plantules du palmier dattier Cv. Tk
Figure 34 : Comportement des jeunes plantes du palmier dattier Cv. TK., à 2 mois de culture sur les milieux. (**a :** DKW ; **b :** GA ; **c :** MSm_1 ; **d :** MSm_2)
Figure 35 : Influence de la lumière sur la germination des embryons de palmier dattier Cv. Tk (résultats obtenus après 1 mois de culture).
Figure 36 : Effet de la lumière sur la reconstitution de plants entiers à partir de plantules excisés du palmier dattier Cv. Tk. (résultats obtenus après 1 mois de culture).

1- Plantes cultivées sous un éclairement de quatre semaines de lumière blanche (a : culture sur MSm_1, b : culture sur MSm_2).
2- Plantes cultivées sous un éclairement d'une semaine de lumière bleue suivi de 3 semaines de lumière blanche (c : culture sur MSm_1, d : culture sur MSm_2).
3- Plantes cultivées sous un éclairement de deux semaines de lumière bleue suivi de deux semaines de lumière blanche, (e : culture sur MSm_1, f : culture sur MSm_2).

4- Plantes cultivées sous un éclairement de trois semaines de lumière bleue suivi d'une semaines de lumière blanche, (g : culture sur MSm_1, h : culture sur MSm_2).
5- Plantes cultivées sous un éclairement de quatre semaines de lumière bleue, (i : culture sur MSm_1, j : culture sur MSm_2).

Figure 37 : Evolution des teneurs en leucoanthocyanes dans les embryons en culture sur MSm_1 exposés à la lumière blanche et bleue en fonction du temps.

Figure 38 : Evolution des teneurs en leucoanthocyanes dans les embryons en culture sur MSm_2 exposés à la lumière blanche et bleue en fonction du temps.

Figure 39 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose en fonction du temps (semaines) (sous la lumière blanche).

Figure 40 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose en fonction du temps (semaines) (sous la lumière blanche).

Figure 41 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière blanche.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose.

Figure 42 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose en fonction du temps (semaines) (sous la lumière blanche).

Figure 43 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose en fonction du temps (semaines) (sous la lumière blanche).

Figure 44 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière blanche.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose.

Figure 45 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose en fonction du temps (semaines) (sous la lumière bleue).

Figure 46 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose en fonction du temps (semaines) (sous la lumière bleue).

Figure 47 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière bleue.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose.

Figure 48 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose en fonction du temps (semaines) (sous la lumière bleue).

Figure 49 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose en fonction du temps (semaines) (sous la lumière bleue).

Figure 50 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière bleue.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose.

Figure 51: Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière blanche).

Figure 52: Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière blanche).

Figure 53 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière blanche.

a : Gonflement important de la plantule après 3 jours de culture.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$).

c : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$).

Figure 54 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière blanche).

Figure 55 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière blanche).

Figure 56 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière blanche.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$).

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$).

Figure 57 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière blanche).

Figure 58 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière blanche).

Figure 59 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière blanche.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$).

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$).

Figure 60 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière blanche).

Figure 61 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière blanche).

Figure 62 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière blanche.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$).

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$).

Figure 63 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière bleue).

Figure 64 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière bleue).

Figure 65 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière bleue.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$).

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$).

Figure 66 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière bleue).

Figure 67 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière bleue).

Figure 68 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière bleue.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$).

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$).

Figure 69 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière bleue).

Figure 70 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière bleue).

Figure 71 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière bleue.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$).

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$).

Figure 72 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière bleue).

Figure 73 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière bleue).

Figure 74 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière bleue.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$).

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$).

Figure 75 : Formation de racines sur la gaine cotylédonaire, sur les milieux MSm_1 et MSm_2 additionnés de 30 $g.l^{-1}$ ou 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, sous la lumière bleue :

1- Milieu sans hormones ; 2- BAP à 0,1 et 10 $mg.l^{-1}$; 3- ANA à 1 $mg.l^{-1}$; 4- AIA à 0,1 $mg.l^{-1}$; 5- Observation des stades de développement de la racine sur la gaine cotylédonaire (racine secondaire obtenue en présence d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$)). (G x 20).

Figure 76 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière blanche).

Figure 77 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière blanche).

Figure 78 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière blanche.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$).

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$).

Figure 79 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière blanche).

Figure 80 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière blanche).

Figure 81 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière blanche.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$).

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$).

Figure 82 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière bleue).

Figure 83 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière bleue).

Figure 84 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière bleue

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$).

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$).

Figure 85 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière bleue).

Figure 86 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps (sous la lumière bleue).

Figure 87 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière bleue

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 m $g.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$).

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$).

LISTE DES ABREVIATIONS

2.4 D : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

AIA : Acide indole acétique.

ANA : acide naphtalèn acétique.

BAP : Benzyle aminopurine.

***Ca* (*ClO*)$_2$** : Hypochlorite de calcium.

cry : Cryptochrome.

ddl : Degré de liberté.

Do : Densité optique.

ES : Embryon somatique

EZ : Embryon zygotique

F.A.O. : Organisation des nations unies pour l'alimentation.

Foa : *Fusarium oxysporum* f. *sp. albedinis*

***HgCl*$_2$** : Chlorure mercurique

MAC : méristème apical caulinaire

MS : Murashige et Skoog.

MSm$_1$: Murashige et Skoog modifié par RHISS (1980).

MSm$_2$: Murashige et Skoog modifié par YAKOUB-BOUGDAL (1984).

mvs : matière végétale sèche.

NaClO : Hypochlorite de sodium

P: *Phoenix*

phot : Phytotropines.

phy : Phytochrome.

Pr : Phytochrome rouge clair (forme inactive du phytochrome)

Pfr : Phytochrome rouge sombre (forme active du phytochrome).

RC : rouge clair.

RS : rouge sombre.

Tk: Takerboucht.

Introduction

INTRODUCTION

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une Monocot dioïque de la famille des *Arecaceae* (APG II, 2003), caractérisée par des feuilles pennées (BARROW, 1998).

Le Palmier dattier est une des plantes d'importance socio-économique majeure dans les pays du maghreb. Il est représenté par, environ 120 millions d'arbres, répartis essentiellement (2/3) au Proche Orient et en Afrique du Nord (JARADAT et ZAID, 2004), et constituent une source de vie non négligeable. De plus les palmeraies créent un microclimat qui permet d'associer d'autres cultures sous-jacentes telles des cultures maraîchères, des céréales et des arbres fruitiers.

En Algérie, on compte environ seize millions de Palmiers dattier (TIRICHINE et *al*., 2005 *in* DJILLALI, 2008), représentés par plus de 800 cultivars (HANNACHI et *al*., 1998). Cependant, plus de 3 millions de palmiers ont été détruits par une fusariose vasculaire appelée Bayoud causée par le *Fusarium oxysporum* f. sp. albedinis (BOUNAGA et DJERBI, 1990). Cette maladie a occasionné des dégâts importants dans les palmeraies de l'Ouest et du centre, où seule la variété nommée Takerboucht est déclarée résistante à ce champignon, et risque de s'étendre à d'autres pays mettant en danger la phoeniciculture à l'échelle mondiale (EL HADRAMI, 1995). De plus, le rajeunissement des palmeraies devient une nécessité actuelle pour faire face à d'autres problèmes tels la sécheresse et l'ensablement. Aussi, la culture monovariétale pratiquée dans les nouvelles plantations, peut se traduire, à moyen et à long terme, par la perte de certaines variétés et têtes de clones.

A l'heure actuelle et face aux contraintes posées par les moyens de lutte traditionnelle, un vaste programme de recherche à l'échelle nationale est entrepris, ainsi il existe plusieurs thèmes de recherche qui reposent sur deux axes principaux (ANJARNE et *al*., 2005 *in* DJILLALI, 2008):

1. la sélection de variétés, de clones résistants et la bonne qualité dattière sont réalisées par le biais des prospections dans les palmeraies bayoudées et des croisements dirigés.

2. le développement et la maîtrise des techniques de micropropagation pour la multiplication du Palmier dattier à grande échelle, permettront la sauvegarde d'un certain nombre de cultivars menacés de disparition, ainsi que le repeuplement des palmeraies par des variétés sélectionnées.

Actuellement, la demande nationale en plants et en vitroplants est loin d'être satisfaite (INRA, 2002), suite aux difficultés de la multiplication du Palmier dattier aussi bien par voie traditionnelle que par les techniques de multiplication *in-vitro*. Ces dernières se heurtent à différents problèmes dont le plus important est le brunissement des tissus, des milieux,

qui causent des pertes considérables en matériel végétal, en plus de la lenteur dans la réponse des tissus (BAAZIZ et BENDIAB, 1994).

Deux méthodes de régénération du palmier dattier par culture '*in-vitro*' existent : l'organogenèse et l'embryogenèse somatique. Ces dernières sont régies par les substances contenues dans le milieu ainsi que par les capacités morphogènes de l'explant d'origine (AL-KHAYRI, 2007). Bien que les plants de palmier soient multipliés commercialement par voie végétative, la multiplication par semis reste toujours importante en fournissant des sujets utiles dans le cas des programmes d'amélioration génétique ayant pour objectif la création de nouvelles variétés (MONNIER, 1995).

Les facteurs physiques de l'environnement, à savoir la température et la lumière jouent un rôle prépondérant dans les processus fondamentaux pour le développement des plantes (germination, croissance, floraison …), ainsi que dans le raccourcissement des cycles, l'induction et l'exaltation morphogène (YAKOUB-BOUGDAL, 1987, 2005).

Les réponses morphogénétiques à la lumière résultent des mécanismes de la photomorphogenèse qui se définit comme la régulation (ou le contrôle) de la croissance et du développement des plantes (SMITH, 2000). Ces réponses sont induites grâce à des photorécepteurs qui réceptionnent le signal lumineux. Chaque radiation du spectre de la lumière blanche est perçue par une famille de photorécepteurs spécifiques. Ainsi, les phytochromes sont responsables de la photoperception des radiations rouges alors que les cryptochromes et les phytotropines sont responsables de la photoperception des radiations bleues (SUETSUGU et WADA, 2003). Les photorécepteurs convertissent le signal lumineux en signal biochimique induisant différentes réponses dont la synthèse d'anthocyanes (FURUYA et SCHAFER, 1996).

En réponse à un stress lumineux, les composés phénoliques sont accumulés dans les différents tissus de la plante. Les anthocyanes interviennent en première ligne pour contrer les effets néfastes de ce stress. Ces pigments appartiennent à la classe des flavonoïdes, classe importante de composés phénoliques, vu leur rôle majeur dans différentes fonctions de la plante (SUZUKI et *al*., 2007).

Des traitements lumineux ont déjà été appliqués avec succès dans la culture *in vitro* du palmier dattier ; sur des semis, de jeunes plantes de la variété Deglet nour, YAKOUB-BOUGDAL (1984) a montré l'effet rhizogène du rouge sombre sur des méristèmes caulinaires prélevés sur des plantules âgés de deux mois. Par la suite, CALERO (1989) a mis en évidence l'effet positif de l'éclairement rouge clair sur l'induction de l'embryogenèse somatique, sur des nervures de la gaine cotylédonaire.

L'objectif de nos recherches est de montrer l'importance des facteurs liés à la lumière pour le bon développement et la production rapide de jeunes plantes de palmier dattier variété Takerboucht.

Parallèlement aux recherches effectuées par YAKOUB-BOUGDAL (1984), nous avons recherché l'effet des radiations bleues sur l'organogenèse des embryons.

De même une analyse quantitative sur la teneur en leucoanthocyanes, précurseur des anthocyanes, a été réalisée, dont la synthèse est régulée par le cryptochrome des embryons (FURUYA et SHAFER, 1996).

Notre choix a porté sur ces radiations car elles sont actives sur diverses chaînes de biosynthèse, permettant de distinguer l'action du cryptochrome de celles des autres photorécepteurs. De plus, ces radiations sont présentes dans la lumière blanche artificielle qui éclaire nos cultures.

Nos recherches ont d'abord consisté dans une première partie à caractériser le matériel d'étude ; la plantule à l'état sec avant l'imbibition et au cours de la germination de la graine, ce qui nous permettra une parfaite connaissance du matériel que l'on se propose d'étudier.

La seconde partie est consacrée à la détermination des meilleures conditions de germination et à l'étude du comportement en culture *in vitro* de plantules soumises à l'influence des milieux de culture et de traitements lumineux.

Dans une troisième partie, nous avons cherché à montrer l'évolution de la sensibilité d'embryons de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) Cv. Takerboucht aux radiations bleues par l'étude quantitative de leur teneur en leucoanthocyanes, précurseurs des anthocyanes. Ce qui nous permettra de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre la synthèse de ces derniers et le développement des embryons.

La dernière partie porte sur l'analyse de l'effet d'un traitement composite (bleue/blanche) et de divers régulateurs de croissance sur le développement des plantules.

Au terme de ce travail, une conclusion générale récapitulera les différentes observations auxquelles nous avons abouti.

Synthèse bibliographique

Le genre *Phoenix* figure parmi les récoltes les plus antiques de l'homme (NIXON, 1951; POPENOE, 1973; ZOHARY et SPIEGEL-ROY, 1975; AMER, 1994; ZOHARY et HOPF, 2000; EL HADRAMI et EL HADRAMI, 2009). En effet, des sculptures et peintures trouvées en Mésopotamie, Egypte, Libye et au Tassili datant de 6000 à 4500 ans avant J. C. attestent que la culture du dattier était déjà pratiquée (BOUNAGA, 1991; AMER, 1994; BARROW, 1998; ZOHARY et HOPF, 2000; EL HADRAMI et EL HADRAMI, 2009).

I- LE GENRE *PHOENIX* L.

1- Caractéristiques générales

1.1- Classification et Phylogénie

La position taxonomique du genre *Phoenix* et des genres alliés de la tribu des *Phoeniceae* a longtemps été controversée. Aux cours des anciennes classifications des palmiers, ils ont été placés dans les *Palmae* : *Phoenicoïdeae* (MOORE, 1973). Plus tard, ils ont été le plus souvent, inclus dans les *Arecaceae* : *Coryphoideae* (UHL et DRANSFIELD, 1987). Récemment, les études moléculaires ont favorisé une division en un plus grand nombre de petites familles monophylétiques (DUVALL *et al*., 1993a, b; CHASE *et al*., 1995; 2000).

Dans les taxonomies les plus récentes et les plus élaborées des monocotylédones, le genre *Phoenix* et ses proches ont été identifiés en tant que familles distinctes. La hiérarchie suivante a été adoptée par GOVAERTS et DRANSFIELD (2005) :

- Règne : Plantea.
- Sous règne : Tracheobionta.
- Embranchement : Spermatophyta.
- Sous embranchement : Magnoliophyta.
- Classe : Monocots.
- Sous classe : Commelinids.
- Ordre : Arecales.
- Famille : Arecaceae.
- Sous famille : Coryphoideae.
- Tribu : *Phoeniceae*.
- Genre : *Phoenix*.

Cependant, d'autres classifications ont leurs partisans et sont encore utilisées dans certains écrits (TAKHTAJAN, 1997; SPICHIGER et *al*., 2002).

La famille des Arecaceae est la plus importante des monocots. actuellement, elle compte 190 genres et 2364 espèces (GOVAERTS et DRANSFIELD 2005). La tribu des *Phoeniceae* ne comporte qu'un seul genre : *Phoenix*. Sur les 109 taxons de *Phoenix* décrits,

(CHEVALIER, 1952; MOOR, 1963; UHL et DRANSFIELD, 1987) retiennent 12 à 19 espèces toutes anciennes, dont 12 semblent parfaitement distinctes (CORNER, 1966).

Récemment, des études moléculaires ont eu pour conséquence des données dépendantes sur l'histoire évolutive du genre (BARROW, 1999), ce qui a donné comme résultat des classifications mieux élaborées avec des groupes nécessairement plus petits. Ainsi sur les douze espèces retenues par MOOR (1963), BARROW (1998) a réduit deux espèces au rang de synonyme, il a inclut une nouvelle espèce de l'île Andaman, ainsi que deux variétés de *P. loureiri* et considère la présente liste incomplète (**tab. I**).

Un recensement récent dénombre 13 espèces dans le genre *Phoenix* (BARROW, 1998; 1999; ZOHARY et HOPF, 2000), dont une espèce en Algérie (MAIRE, 1959; QUEZEL et SANTA, 1962; OZENDA, 2004) et 33 noms synonymes des espèces existantes (BARROW, 1998).

Tableau I : Liste des espèces du genre *Phoenix* selon BARROW (1998)*.

Espèces	Noms communs	Distribution
Phoenix acaulis L.	Palmier nain (Dwarf)	Le Nord de l'Inde et le Népal.
P. andamanensis L.		Iles Andamans
P. caespitosa L.		Somalie, Djibouti et le Sud de la péninsule arabique (Arabie Saoudite et le Yémen).
P. canariensis L.	Palmier des Canaries	Iles Canaries et le Cap Vert.
P. dactylifera L.	Palmier dattier	Les pays de la rive Méditerranéenne, l'Afrique, une partie de l'Asie ; existe en Amérique du Nord et en Australie.
P. loureiri var. *loureiri* *P. loureiri* var. *humilis*		L'Inde, l'Indochine, le Sud de la Chine, Le Taiwan et même aux Philippines.
P. paludosa L.	Palmier Juliana	Les pays du Bengale, l'île Andaman et Nicobar, de l'Indochine jusqu'à la péninsule Malaisienne et le Nord de Sumatra.
P. pusilla L.		Le Sri Lanka, le Tamoul et l'Inde.
P. reclinata L.	Palmier nain (Dwarf)	Régions tropicales et subtropicales Africaine, le Nord et le Sud Ouest de Madagascar et les îles Comores
P. roebelenii L.		Le Nord du Laos, le Vietnam, le Sud de la Chine et les rives du fleuve Mékong.
P. rupicola L.		L'Ouest du Bengale en Inde.
P. sylvestris L.	Palmier à sucre	L'Inde et le Pakistan.
P. theophrasti L.	Dattier sauvage	La Crète et le Sud de la Turquie.

* La liste s'est faite sur les bases de données morphologiques, anatomiques, écologiques et moléculaires.

2- Distribution et habitat

Dans l'ancien monde, le genre *Phoenix* est distribué dans la région holarctique, des îles Canaries à l'Ouest jusqu'à Hong Kong à l'Est, traversant les régions tropicales et subtropicales africaines, le bassin méditerranéen, la péninsule Arabique, jusqu'au subcontinent Indien et Indochinois (BARROW, 1998).

L'évolution du genre a été accompagnée d'une diversification écologique, la majorité des espèces se développent dans des endroits plutôt arides secs et ensoleillés, et dans des climats modérément humides (BOUNAGA, 1991). Elles requièrent toutes, une constante humidité au niveau des racines (MOORE et UHL, 1973; BARROW, 1999). Cependant les espèces *Phoenix* se sont adaptées à différentes niches écologiques, allant des bordures de mer jusqu'aux hautes montagnes, des points culminant à plus de 2000 m d'altitude. De même les milieux salin et alcalin sont tolérés par quelques espèces (BARROW, 1998). Les espèces *Phoenix* provenant de ces habitats divers, présentent une diversité parallèle, dans leurs rythmes de développement et de croissance (TOMLINSON, 1990).

II- Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)

1- Histoire et botanique

Le palmier dattier est la troisième espèce de la famille des *Arecaceae* après *Cocos nucifera* L. (Cocotier) et *Elaeis guineensis* Jacq. (Palmier à huile). Ils constituent les premiers fruits domestiqués dans l'ancien monde avec l'olivier et le figuier (ZOHARY et SPEIGEL-ROY, 1975; WRIGLEY, 1995). Il est cultivé pour ses fruits, mais aussi comme arbre d'ornementation. Sur le plan économique, la datte est l'élément le plus important, il ne demeure pas moins que les feuilles sont utilisées par les habitants locaux.

Traditionnellement, le palmier dattier est cultivé dans les zones arides du Sud de la Méditerranée et dans la partie Sud du moyen Orient. Une aire qui s'étend du Sud de l'Iran à l'Est jusqu'à la côte atlantique à l'Ouest (WRIGLEY, 1995) (fig. 1). D'autres régions manifestent une grande diversité variétale, comme le Nord Ouest de l'Inde et le Pakistan, qui sont des régions secondaires (MALIK, 1984). Cependant, le palmier dattier a été introduit dans différentes régions pour des besoins commerciaux (QACIF et *al*., 2007).

La culture de la datte et sa consommation datent des temps les plus anciens (ZOHARY et HOPF, 1988). Par conséquent, l'ancêtre sauvage du dattier ou même la région exacte de sa domestication reste encore incertaine (CORNER, 1966). Alors que certains auteurs considéraient *P. sylvestris* comme étant les vrais ancêtres du palmier dattier (HAMILTON, 1827 *in* BARROW, 1998), très récemment, une similitude remarquable de l'espèce sauvage de Crète *P. theophrasti* au dattier a été détectée. Ce qui dénote ce taxon comme un autre candidat au rang d'ancêtre sauvage du dattier (BARROW, 1998; ZOHARY et HOPF, 2000).

Selon ZOHARY et HOPF (1993), l'ancêtre sauvage du dattier (s'il existe encore ou ses proches) devrait se développer partout sur la frange méridionale chaude et sèche du proche Orient, sur le Nord Est du Sahara et le Nord du désert d'Arabie (fig. 2). Actuellement, BARROW (1999), place la région arabo-Iranienne comme centre d'origine de *Phoenix dactylifera* L.

Selon OZENDA (2004), les dattiers sont arborescents et ligneux ayant pour caractéristiques communes:

- Un port en buisson, jamais monocaule sauf en culture.
- Arbre à tronc (appelé stipe) de 10 à 30 m, non ramifié mais émettant à sa base des rejets. La base du tronc porte de nombreuses racines adventives.
- Les feuilles longues de plusieurs mètres, ont un limbe divisé en deux rangées de folioles étroites, pliées en long suivant leur nervure, raides et piquantes au sommet. Les folioles inférieures de chaque feuille sont transformées en épines (fig. 3a).
- L'arbre est dioïque; les pieds mâles fleurissent en général, à partir de la troisième année et les pieds femelles vers 5 ou 6 ans.
- Les fleurs sont groupées en une inflorescence très fournie (fig. 3b), pouvant contenir plusieurs dizaines de milliers de fleurs enfermées dans une grande bractée, appelée spathe avant la floraison. Sur le plan morphologique les inflorescences males diffèrent des inflorescences femelles (fig. 4).
    - Les fleurs mâles (fig. 3c) comportent six pièces périanthaires et six étamines.
    - Les fleurs femelles (fig. 3d) comportent six pièces périanthaires et un ovaire fait de trois carpelles distincts, un seul carpelle se développe et donne une baie ovoïde qui est la datte.

A noter que les palmiers dattiers ne fleurissent que lorsque la température dépasse 18 °C et ne donnent des dattes que lorsque cette dernière excède 25 °C (ZAID et DE WET, 2002). Aussi, les fleurs mâles ont une odeur caractéristique, alors que les fleurs femelles sont inodores (AMMAR, 1978; VANDERCOOK et *al*., 1980).

- La datte comporte

1. Extérieurement, un tégument cireux ou exocarpe.
2. Une partie charnue et comestible, très riche en sucre, qui représente le mésocarpe.
3. Un tégument interne blanc et fibreux, l'endocarpe, directement appliqué sur la graine (fig. 3f).

- La graine improprement appelée noyau, souvent allongée, de taille et de forme différentes, est une masse ovoïde très dure, portant un sillon longitudinal. Elle possède un albumen (endosperme) dur, corné (90 % de mannanes) et renferme un embryon dorsal (2 à 3 mm). Parfois le fruit se développe sans fécondation, il est alors de petite taille et peu charnu.

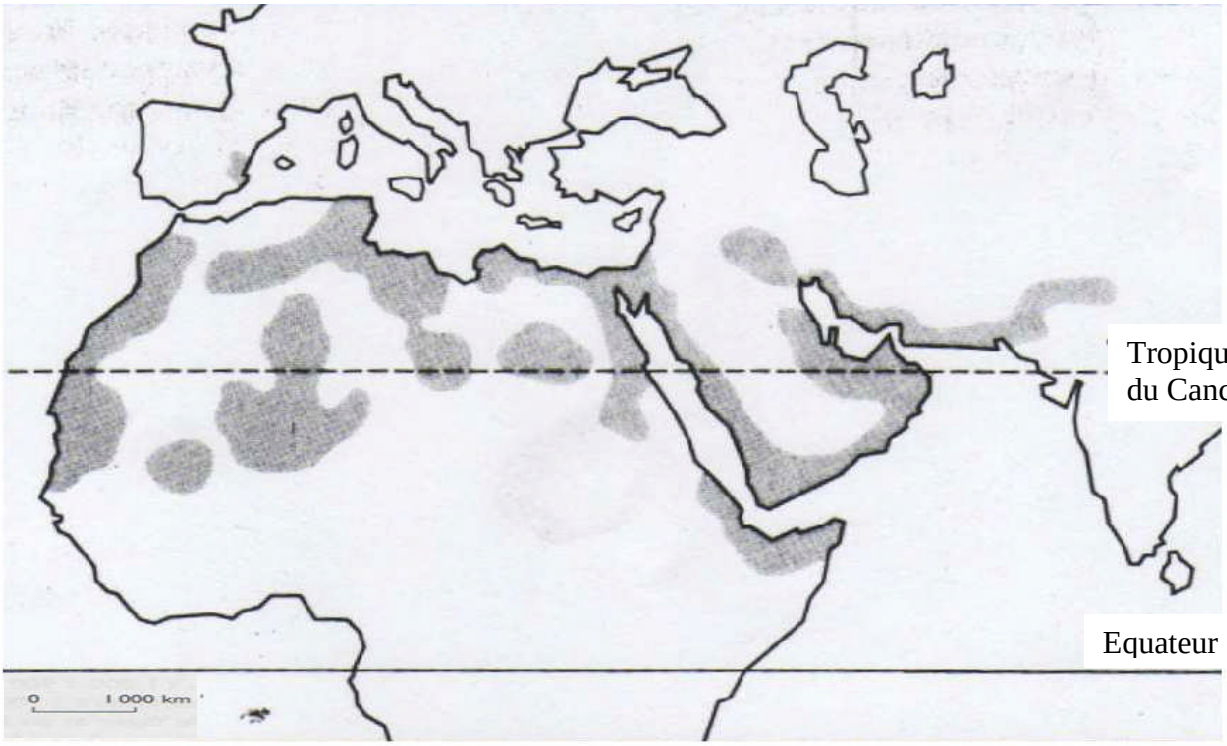


Figure 1: Distribution du Palmier dattier en Afrique du Nord et au Sud Ouest Asiatique (WRIGLEY, 1995).

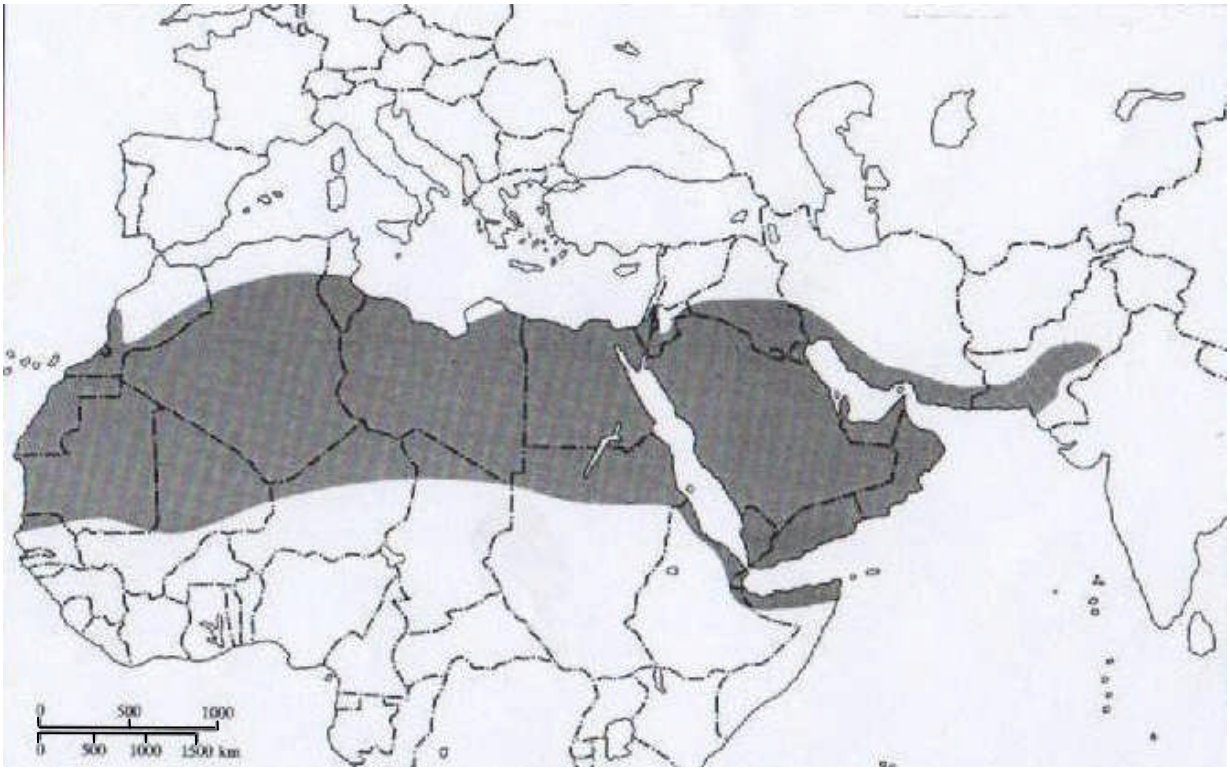
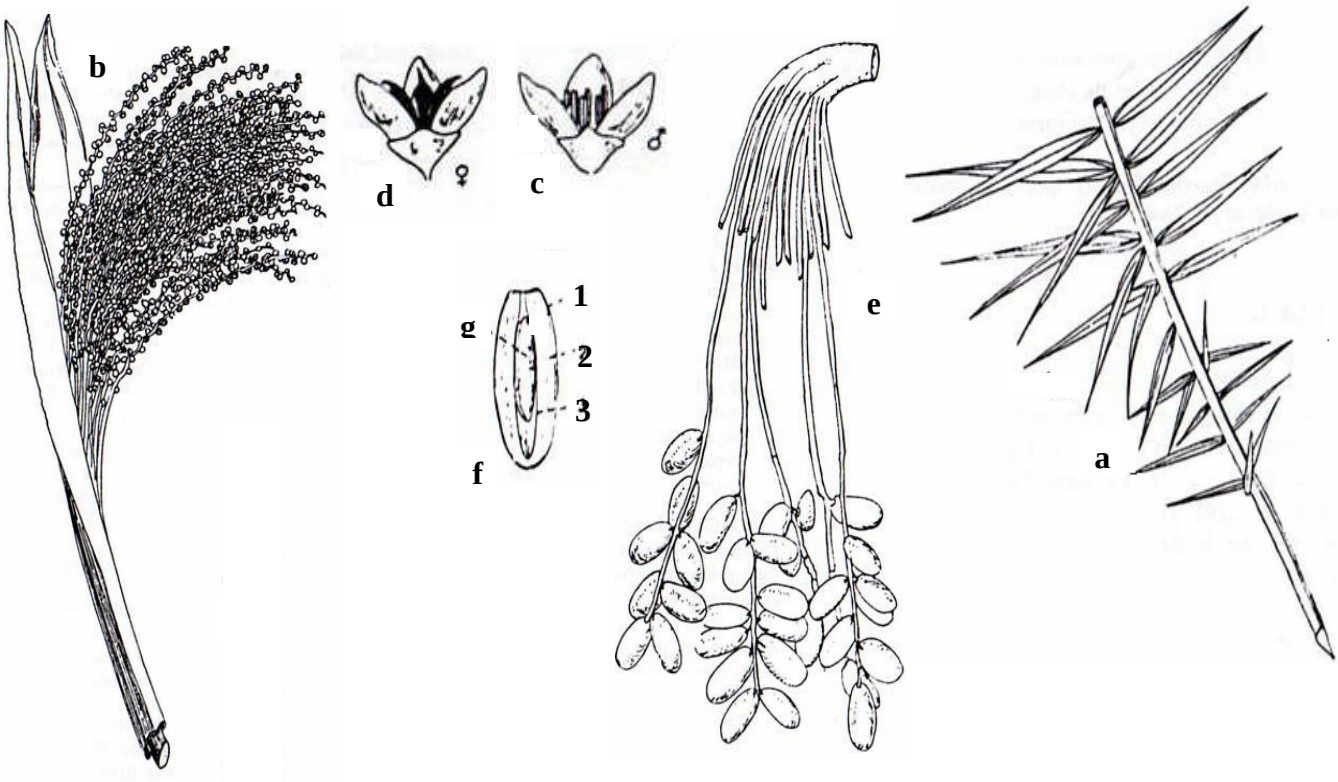


Figure 2 : Distribution naturelle des formes sauvages du Palmier dattier (ZOHARY et HOPF, 2000).



a : feuille ; b : inflorescence ; c : fleur mâle ; d : fleur femelle ; e : régime ;
f :(g : graine.) ; 1- exocarpe, 2- mésocarpe, 3- endocarpe

Figure 3 : Caractéristiques morphologiques du Palmier dattier d'après OZENDA (2004).

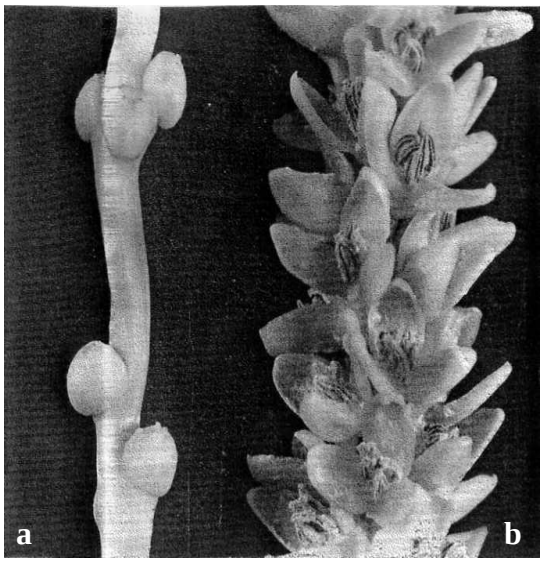


Figure 4 : Inflorescences du Palmier dattier (CHAO et KRUEGER, 2007)
a : femelle ; b : male.

1.1- Développement du Palmier dattier

Selon BOUNAGA (1991) il est possible de distinguer cinq phases de développement dans la croissance du palmier :

Phase 1 : la graine

Elle provient du développement d'un ovule anatrope, avec un micropyle au voisinage du hile (à l'extrémité du raphé), cependant, le micropyle durant la phase de maturation, migre loin du hile (GINIEIS, 1957). Ainsi à maturité, l'embryon vient se localiser au milieu de la graine (GATIN, 1912). L'embryon mûr est limité à un cotylédon, où loge la plantule (MALPIGHI, 1671 *in* GATIN, 1992), formée d'une radicule et d'une gemmule sur le même axe (GATIN, 1912; GINIEIS, 1957) (fig. 5).

Selon ODETOLA (1987), il ne semble pas exister de dormance, chez les graines du Palmier dattier qui, à température ambiante peuvent, être viables et garder leur capacité germinative durant 5 à 6 ans (WRIGLEY, 1995). Cependant, ABERLENC-BERTOSSI et *al*. (2006) ont rapporté que les semences du Palmier dattier sont dites orthodoxes pouvant être conservées pendant environ 15 ans à température ambiante.

Phase 2 : phase germinative

Les graines en conditions favorables de 30 °C jusqu'à 38 °C, peuvent germer 28 à 40 jours après leur imbibition.

GATIN (1912) précise l'implication de deux phases au cours de la germination :

(1) phase de préparation qui marque la fin de la maturation de l'embryon (différenciation de la gemmule et de la radicule). Durant cette phase, on assiste à un allongement de la partie, au dessus de la gemmule, donnant naissance au pétiole cotylédonaire. L'autre extrémité restant dans la graine est de forme globulaire (limbe cotylédonaire) qui assure la digestion de l'albumen.

(2) Phase de germination proprement dite, qui débute par l'arrêt de l'allongement du pétiole cotylédonaire, la gemmule et la radicule s'accroissent et s'échappent à l'extérieur.

TILLICH (1995, 2000) qualifie ce mode de germination de "*remote non ligular germination*" ou "remotive tubulée", germination hypogée sans ligule, qui exprime l'éloignement du collet de la graine lors de l'allongement du pétiole cotylédonaire.

Phase 3 : construction de la plante

Appelée aussi phase d'établissement ("*establishment phase*"), au niveau de laquelle la plante devient autotrophe et son système vasculaire doit se construire.

Sur la partie caulinaire : on observe une série de feuilles distiques, juvéniles : les éophylles. Leur forme varie progressivement (fig. 6) : initialement lancéolées à limbe entier mais pliées (fig. 6A), elles se découpent en feuilles à limbe parapenné (fig. 6B), puis penné à insertion spiralée.

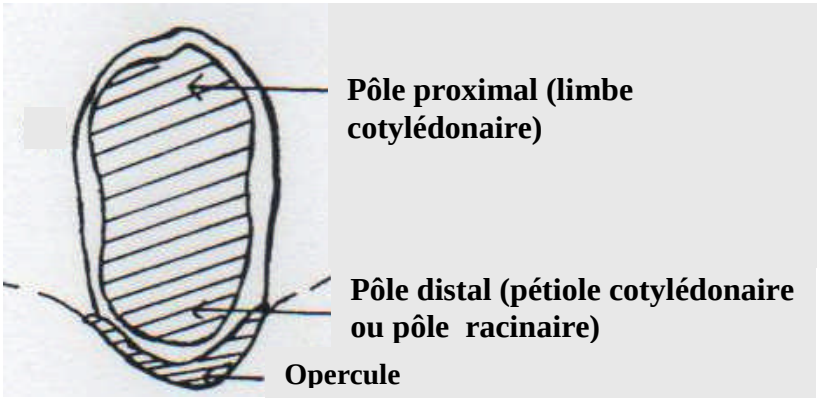


Figure 5 : Représentation schématique de la plantule logée dans la graine en coupe sagittale d'après PFITZER (1855 *in* GATIN, 1912)

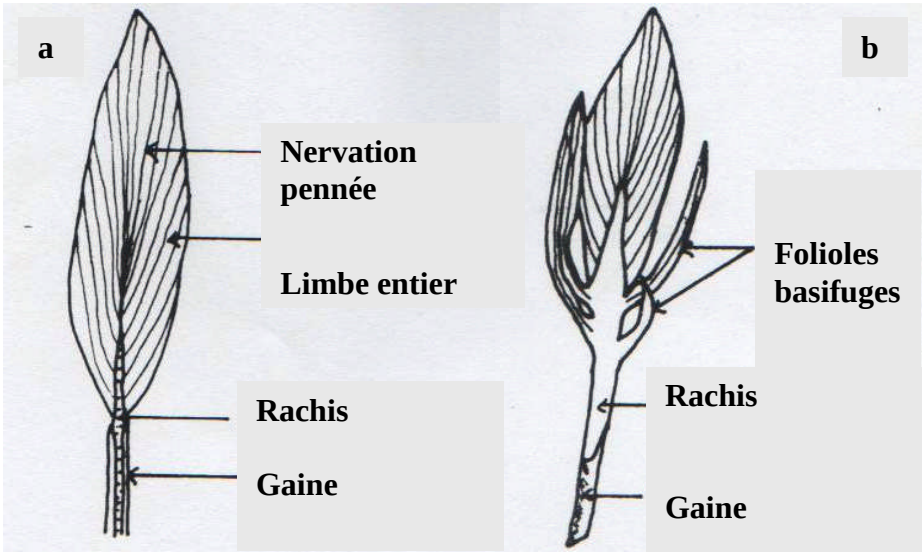


Figure 6 : Représentation schématique des éophylles (GATIN,1912)
a : feuille juvénile ; b : feuille semi-juvénile

Sur la partie racinaire : la radicule et ses ramifications sont relayées par l'apparition de racines secondaires, à la base du nœud cotylédonaire. On parle à ce niveau du type fasciculé. Elles sont toujours adventives et d'origines endogènes. Leur diamètre augmente progressivement. Elles servent à la fois de fixation et de système d'absorption (BELARBI-HALLI et *al*., 1983, 1984).

Phase 4 : la phase adulte végétative

Le dattier va construire son tronc ou stipe et acquérir son "port de palmier" par une extension continue de l'axe végétatif. Durant cette phase, il accumule des réserves et produit essentiellement des feuilles ainsi que des rejets à la base du tronc.

Phase 5 : la phase adulte reproductive

A ce stade le Palmier dattier commence à produire des inflorescences. Etant dioïque, ce n'est qu'à ce stade, que l'on peut reconnaître son sexe, issu de semis (les quatre stades précédents apparaissent identiques chez les pieds mâles et femelles). C'est à partir de cette phase que le Palmier dattier rentre en production.

1.2 Stades de développement du fruit du palmier dattier

Dans les régions où le Palmier dattier occupe une place importante dans l'économie du pays, une terminologie permet de suivre l'évolution de la datte. Chaque stade correspondant à une appellation particulière. Ainsi on distingue 4 stades (fig. 7), qui sont basés selon trois critères : la couleur, l'aspect et la consistance du fruit (FAYADH et AL-SHOWIMAN, 1990).

Les termes utilisés sont en arabe, ils correspondent à une nomenclature internationale adoptée par de nombreux auteurs, largement employés dans tous les pays phoenicicoles.

Avant le premier stade, entre la 4^{è} et la 5^{è} semaine, après fécondation, la datte est dite *'altalaa'*, elle est de teinte blanche verdâtre.

Stade 1 *: 'Kimri'*, appelé aussi 'green stage',

C'est le stade le plus long dans la croissance et le développement de la datte, il peut durer de 9 à 14 semaines selon le cultivar. La datte est de consistance dure, de couleur vert pomme et impropre à la consommation ; ce stade est caractérisé par deux phases ;

- 1^{èr} phase ; la datte présente les caractéristiques suivantes :
  - augmentation rapide de la taille et du poids.
  - accumulation à un rythme de plus en plus élevé des teneurs en eau, sucres totaux et tanins.
- 2^{è} phase ; caractérisée par une :
  - diminution du rythme de croissance de la taille et du poids.
  - réduction de l'accumulation des sucres totaux, des tanins et des teneurs en eau par rapport à la 1^{èr} phase.

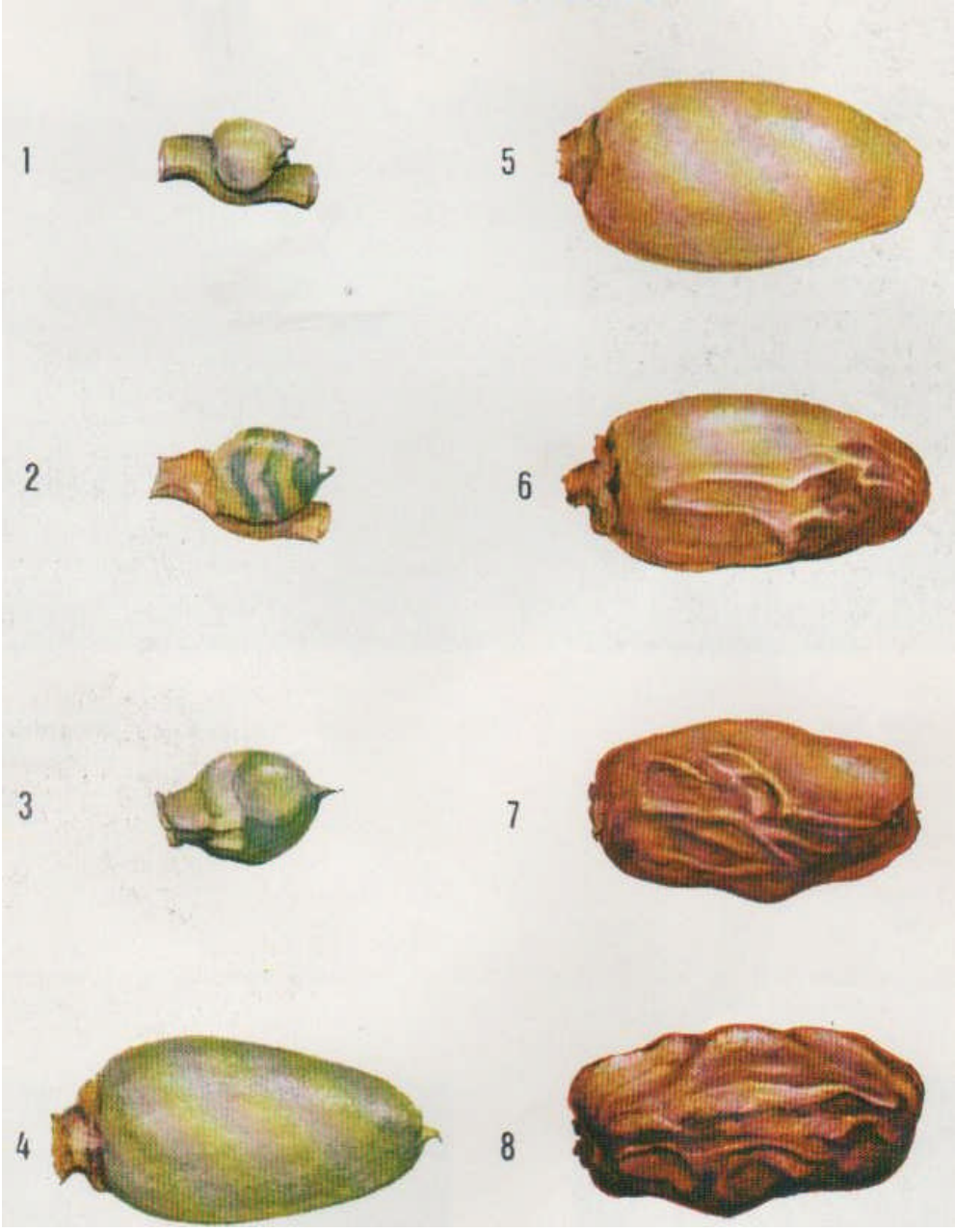


Figure 7 : Stades de développement du fruit de la datte selon MUNIER (1973)
1-2- *'altalaa'* ; 3-4- *'Kimri'* ; 5-6- *'Khalal'* ; 7- *'Rutab'* ; 8- *'Tamr'*.

***Stade 2** : 'Khalal'* appelé aussi 'colour stage'

La durée de se stade est de 3 à 5 semaines, la première manifestation est perçue par le changement de couleur de la datte, qui vire du vert vif au jaune, rose ou au rouge suivant les cultivars. A la fin du stade, la datte atteint sa maturité physiologique. Son poids et sa taille sont à leur maximum et la couleur de la graine vire du blanc vers le marron.

L'accumulation des sucres totaux se poursuit et les teneurs en eau commencent à diminuer (environ 50-85 %). On note qu'à ce stade les dattes sont récoltées pour la consommation dans certaines régions (DOWSON et ATEN, 1962; GLASNER et *al*., 2002).

***Stade 3** : 'Rutab'* appelé aussi 'soft ripe stage'

La durée totale varie de 2 à 4 semaines, la datte commence à se ramollir, à changer de couleur, qui devient brune ou noire. Elle perd peu à peu sa turgescence en raison de la diminution de sa teneur en eau (30 à 45 %) et de la transformation en sucres de l'amidon. Ce dernier est contenu dans les cellules constituant la pulpe, avec une perte progressive de poids (10 % à la fin du stade). Ces dattes non mûres (saveur âpre due aux tanins) sont malgré tout consommées et commercialisées dans certains pays phoenicicoles.

***Stade 4** : 'Tamr'*

C'est le stade de la maturité commerciale, où les pertes en eau sont maximales, la datte conserve entre 25 % à 10 % d'humidité, parfois moins perdant ainsi 35 % de son poids. Les tanins migrent vers les cellules situées à la périphérie du mésocarpe et se fixent sous forme insoluble.

Les dattes parthénocarpiques n'évoluent pas en général jusqu'au stade 'Tamr' et ne dépassent pas celui de *'Khalal'*.

À ce stade, le poids et la taille de la datte varient en moyenne, respectivement, entre 2 à 60 g, et de 2 à 11 cm respectivement. Ces mensurations dépendent essentiellement du type de cultivar ainsi que des conditions de culture (WRIGLEY, 1995).

2- Importance

De tout temps, le Palmier dattier a eu une place privilégiée dans l'existence et le développement des oasis, ce qui s'explique par un ensemble de raisons :

Le palmier dattier est particulièrement bien adapté aux zones arides et semi arides, qui se caractérisent par une faible pluviométrie et de fortes températures allant de - 5 jusqu'à 50 °C (espèce thermophile et héliophile) (WRIGLEY, 1995; CHAO et KRUEGER, 2007). La température de croissance optimale se situe entre 12,7 et 27,5 °C (ZAID et DE WET, 2002).

Aussi le palmier dattier est un arbre très productif, les rendements moyens peuvent aller, de 100 à 200 kg/ arbre et par an. Certains pieds peuvent produire des taux très élevés atteignant parfois les 400 à 600 kg/ arbre et par an (AMER, 1994). Ces estimations varient

suivant les cultivars, l'âge de l'arbre et les conditions environnementales et culturales des pieds mères (ZAID et *al*., 2002).

D'après JARADAT et ZAID (2004), il y aurait plus de 120 millions de palmier dattier de par le monde, répartis essentiellement avec 2/3 au Proche Orient et en Afrique du Nord, ce qui explique la grande diversité variétale dans ces régions. La production mondiale de dattes est passée de 1 809.091 tonnes en 1962 à 6 924.975 tonnes en 2005 (FAO, 2006). Les pays producteurs les plus importants sont mentionnés dans le tableau II.

Tableau II : Principaux pays producteurs de dattes (FAO STAT, 2005)

Pays	Production en 2005 (tonnes)
1. Egypte	1 170.000
2. L'Arabie Saoudite	900.000
3. Iran	880.000
4. Emirats Arabes Unies	760.000
5. Pakistan	625.000
6. Algérie	516.293

Bien qu'une partie de la production mondiale de la datte soit autoconsommée (WRIGLEY, 1995; LOUTFI et EL HADRAMI, 2004), il existe un grand marché d'exportation estimé à 512.829 tonnes (FAOSTAT, 2004). L'Inde et le Pakistan sont les plus grands importateurs de dattes (FAOSTAT, 2004).

En Algérie le nombre de palmiers dattiers est de l'ordre de 11 millions pour une superficie de plus de 100.000 ha, soit 21,4 % des plantations fruitières (Anonyme, 2002).

La production annuelle en 2005 était évaluée à plus de 516.293 tonnes, toutes variétés confondues, dont 230.000 tonnes ont été destinées à l'exportation, principalement la variété Deglet-Nour qui représente à elle seule plus de 2,43 millions de pieds, soit 47 % du patrimoine national (Anonyme, 2006).

Selon AL-SHAHIB et MARSHALL (2003), l'importance de la datte dans la nutrition humaine, réside dans sa composition riche en carbohydrates entre 72 à 88 % de sucres réducteurs. Les dattes sont considérées comme les fruits les plus riches en éléments minéraux (Fe^{2+}, K^{+}, Ca^{2+}, Cl^{-}, Cu^{2+}, Mg^{2+} etc.…).

De plus, la pulpe de datte contient des vitamines en quantités variables avec les types de dattes et leur provenance. En général, elle contient des caroténoïdes et des vitamines du groupe A, B et B_2, et elle est la source de 16 acides aminés (VANDERCOOK et *al*., 1980; AHMED et *al*., 1995).

Au delà de sa valeur commerciale et nutritionnelle, la datte joue un rôle important dans le régime alimentaire et la vie communautaire à travers les oasis. Aussi, le palmier constitue l'élément fondamental de l'écosystème oasien, car il assure une certaine stabilité aux populations des oasis, en freinant l'avancée du désert, tout en créant un milieu typique favorable à la pratique d'autres cultures sous-jacentes (arboricoles, céréalières, maraîchères….), garantissant ainsi une certaine autonomie économique du milieu oasien (EL HADRAMI et EL HADRAMI, 2009).

3- Reproduction et génétique

Le Palmier dattier est une espèce dioïque à reproduction allogame, où les inflorescences mâles et femelles se développent sur des pieds distincts, ce qui a mené vers une variation morphologique et génétique considérable, telle qu'il semble impossible d'obtenir par semis deux plants identiques (NIXON et CARPENTER, 1978; VANDERCOOK et *al*., 1980). Cependant, récemment SUDHERSAN et ABO EL-NIL (1999) ont recensé des clones hermaphrodites, où des pieds mâles ont développé des inflorescences femelles.

NEMEC (1910), rapporte que le nombre de chromosomes chez le dattier est de 2n = 2X = 28, cependant, des variations du nombre chromosomique entre les variétés mais aussi au sein d'une même variété ont été rapportées (exemple : 2n = 2X = 36 (BEAL, 1937), 2n = 2X = 32 ou 2n = 2X = 28 (AL SALIH et AL RAWI, 1987; AL SALIH et *al*., 1987; IBRAHIM et *al*., 1998), 2n = 2X = 26 (LOTFI, 1999). A noter que de récentes études cytologiques laissent supposer qu'il existe des chromosomes sexuels chez le dattier (SILJAK-YAKOVLEV et *al*., 1996). De même que, les gènes femelles sont homozygotes (ZOHARY et HOPF, 2000).

Dans toutes les régions où la culture du dattier est très anciennement pratiquée, les cultivars sont très nombreux. D'après AL-AFFIFI et AL-BADAWI (1998), quelques 1500 cultivars auraient été recensés à travers le monde. Alors que BASHAH (1996) avance le chiffre de 5000 cultivars. Chaque cultivar dériverait d'une seule et unique graine sélectionnée, clonée et multipliée par voie végétative (WRIGLEY, 1995). En Algérie, selon HANNACHI et *al*. (1998), l'agriculture de subsistance ancienne a donné naissance à plus de 800 cultivars de Palmier dattier sélectionnés localement à partir de semis, en fonction de leur qualité (dattes précoces ou tardives etc..).

La double sélection humaine et naturelle a mené vers le développement et l'apparition des différents cultivars. Cependant, la domestication n'a pas porté atteinte au degré de ploïdie des cultivars recensés (ZOHARY et HOPF, 2000; AL KHAYRI, 2007). Des différences au niveau de la qualité et la phénologie des fruits ont permis de distinguer ce que l'on appelle communément 'variétés' (BOUNAGA, 1991; WRIGLEY, 1995; BARROW, 1998). Ces variétés sont divisées en trois groupes suivant leur consistance qui, peut être dure, molle ou

très molle, d'où leur répartition selon cette caractéristique dans trois catégories suivantes (MUNIER, 1973; WRIGLEY, 1995; CHAO et KRUEGER, 2007) :

- Dattes sèches, de consistance dure : Degla-Beïda, Mech degla,
- Dattes demi-molles : Deglet-Nour,
- Dattes molles : Takerboucht.

4- Ravageurs et maladies du Palmier dattier

Les pathologies du Palmier dattier sont nombreuses et causées par plusieurs groupes de champignons et d'insectes. Cependant, la nature et/ou même l'agressivité (virulence) des attaques sont fonction du type de cultivars, la région de culture, ainsi que des conditions édapho-climatiques et des pratiques culturales (CARPENTER et ELMER, 1978; HOWARD et *al*., 2001; ZAID et *al*., 2002). Ces maladies entraînent soit la mort du palmier, soit des symptômes particuliers avec une baisse ou une perte totale de la production (BOUNAGA et DJERBI, 1990).

Selon BELGUEDJ et SALHI (2006), les principaux ravageurs de la datte dans les palmeraies algériennes sont le Boufaroua (*Oligonychus afrasiaticus* Mc. Gr), la cochenille (*Parlatoria blanchardi* Targe) Sem ou Djereb, le Doud ou vers de la datte (*Myeloïs ceratoniae* Zell).

Cependant, ces dernières décennies, la culture du dattier est retrouvée menacée par plusieurs autres ravageurs et maladies qui ne sont pas encore signalés et dont certains occasionnent des dégâts énormes (GLASNER et *al*., 2002). Il s'agit surtout du charançon rouge ou indien (*Rynchophorus ferrugineus* Olivier) 'Red weevil', le papillon *Paysandisia archon* (Lépidoptère), le jaunissement mortel 'Lethal yellowing' dû à un mycoplasme, la cochenille verte 'Date Green Soft Scale Insect' (*Asterolcanium phoenicis*) et la maladie des feuilles cassantes 'Britlle leaf disease' dont l'agent causal n'est pas encore identifié (GLASNER et *al*., 2002; SEDRA, 2006).

Divers moyens de lutte ont été pratiqués afin de protéger et d'assurer le développement du palmier dattier : des pratiques culturales aux techniques de lutte biologique (telle que l'utilisation des pièges à phéromones), chimique ou intégrée (HOWARD et *al*., 2001), ainsi que l'utilisation de variétés résistantes, selon MESSIAEN et *al*. (1991) c'est le moyen de lutte le moins astreignant, le plus économique et le moins polluant.

Le Bayoud est incontestablement la maladie la plus destructive du palmier dattier, elle menace véritablement tous les pays producteurs de dattes. Elle est causée par un champignon du sol *Fusarium oxysporum* f. *sp. albedinis* (MAIRE et KILLIAN, 1930) et elle est propre aux pays du Maghreb (Maroc, Algérie et la Mauritanie) (BENKHALIFA, 2006; SEDRA,

2006). Aujourd'hui, il représente l'un des principaux facteurs limitant la survie du dattier (EL MODAFAR et EL BOUSTANI, 2002).

En Algérie, le Bayoud aurait décimé trois millions d'arbres, incluant surtout les variétés et les cultivars vigoureux, productifs et commerciaux (SEDRA, 2006), et touché 34 communes de plantations de dattier dans le Sud Ouest et le M'Zab (BENKHALIFA, 2006).

Face à cette menace, la lutte repose essentiellement sur des mesures prophylactiques car aucun moyen de lutte curative n'a été trouvé à nos jours (BOUNAGA et DJERBI, 1990; ZAID et *al*., 2002).

Actuellement, la voie de la lutte génétique apparaît comme seul moyen de lutte, pratique et prometteuse. Elle est basée sur la recherche de cultivars résistants, provenant soit des prospections soit de croisements dirigés, ou bien des populations naturelles issues de graines : les « khalts », testés dans les zones infestées (LOUVET et TOUTAIN, 1973; DJERBI, 1988; BENKHALIFA, 2006; SEDRA, 2006).

En plus des parasites et des maladies, le palmier dattier est sujet à divers problèmes qui entravent son développement et son extension. JARADAT (2001) considère les sécheresses prolongées, la salinisation des sols et des nappes, l'ensablement des palmeraies, l'âge des pieds, l'érosion génétique et le Bayoud comme étant, des contraintes majeures pour la phoeniciculture de demain.

5- Multiplication du Palmier dattier

Traditionnellement le Palmier dattier est multiplié par semis ou par voie végétative via la plantation de rejets.

La multiplication par graines, bien qu'elle offre l'intérêt du maintien d'un certain brassage génétique, peut être à l'origine de génotypes de qualité et/ ou adapté à des contextes écologiques particuliers (FERRY et *al*., 1991). Elle s'avère moins intéressante et économiquement non rentable du fait de l'hétérozygotie. En effet, le semis de noyaux conduit à une descendance composée potentiellement de 50 % de femelles et 50 % de mâles (non productifs), et où chaque plante est différente, ce qui entraîne le développement de plantations désordonnées (EL HADRAMI, 1995). Par ailleurs la différenciation sexuelle n'est possible qu'après (8 à 10 ans) (NIXON et CARPENTER, 1978; BOUNAGA, 1991; LOUTFI et EL HADRAMI, 2004).

Par contre, la multiplication végétative, qui consiste à la mise en culture de rejets (djebars, surgeons) sélectionnés pour leurs qualités agronomiques et économiques, est un mode intéressant du point de vue génétique. Il reproduit intégralement les caractéristiques du sexe, aptitude et qualité des fruits (BOUNAGA, 1991), et entre en fructification 3 à 5 ans après plantation (BOUNAGA, 1991; WRIGLEY, 1995). Cette technique est loin d'être efficace

pour contrer la grande vitesse de destruction de la fusariose et pour faire face aux besoins de réhabilitation et modernisation de la phoeniciculture. La technique est lente, le nombre de rejets par pied est limité. Ils sont produits durant les 10 à 15 première années de la vie de l'arbre) (ZAID et TISSERAT, 1983; BOUNAGA, 1991; DJERBI, 1991; FERRY et *al*., 1991; AL-KHAYRI, 2007). Cette technique représente également une voie de propagation rapide du Foa, agent causal de la maladie du bayoud, particulièrement dans les zones atteintes (EL HADRAMI, 1995).

A l'heure actuelle et face aux contraintes posées par les techniques de multiplication classique, la multiplication rapide du Palmier dattier par les techniques de la culture '*in-vitro*' constitue l'unique voie, pouvant apporter une solution dans un délai raisonnable. De plus, cette technique permet la production de vitroplants indemnes de *Fusarium* permettant ainsi d'éviter la dispersion de la maladie (BOUNAGA, 1991; DJERBI, 1991).

5.1- Culture *in-vitro* du palmier dattier

De nombreux travaux ont été entrepris dans le domaine de la multiplication végétative par culture *in-vitro.* Ils ont aboutit à l'heure actuelle à la mise au point de techniques, permettant l'obtention rapide de vitroplants en grand nombre, ce qui a donné lieu aux travaux de plusieurs chercheurs (TISSERAT, 1984; BENBADIS, 1992; OMAR et *al*., 1992).

Les succès dans ce domaine ont débuté en 1977 par la mise en germination, en conditions aseptiques des graines (AMMAR et BENBADIS, 1977) et la formation de cals sur des explants de seedlings (EEUWENS, 1978). Par la suite, les chercheurs ont montré la possibilité d'obtenir des cultures organogènes à partir de plusieurs types d'explants, avec la culture, d'embryons immatures (REYNOLDS et MURASHIGE, 1979), d'embryons matures (REUVENI et , 1979; YAKOUB-BOUGDAL, 1984,1987 et 2005 ZAID et TISSERAT, 1984), de fragments de feuilles (TISSERAT, 1979; FKI et *al*., 2003), ou d'inflorescences (DRIRA, 1985; YAKOUB-BOUGDAL, 1987; LOUTFI, 1998; FKI et *al*., 2003), ainsi que des fragments de feuilles issus de plantules régénérées par le biais de l'*in-vitro* (SUDHERSAN et *al*., 1993 *in* SGHAIER et *al*., 2008). Cependant, les explants les plus utilisés sont essentiellement pris à la base des feuilles, du bourgeon terminal et des bougeons axillaires des jeunes feuilles issus des cœurs de rejet (TISSERAT, 1984).

Il existe deux méthodes de régénération du palmier dattier par culture '*in-vitro*' ; l'organogenèse et l'embryogenèse somatique. Ces deux techniques sont régies par les substances contenues dans le milieu ainsi que par les capacités morphogènes de l'explant d'origine (AL-KHAYRI, 2007).

La technique d'organogenèse, qui ne nécessite pas forcément le passage par une phase de callogenèse (organogenèse directe), est décrite comme une technique permettant l'obtention

de copies conformes (EL HADRAMI, 1995). Cependant selon EL HADRAMI (1991) cette technique se heurte à quelques obstacles parmi lesquels :

- la lenteur dans la réactivité des explants.
- les contaminations endophytiques.
- les coefficients de multiplication faibles et aléatoires chez certains cultivars.
- le brunissement des tissus et des milieux.
- l'enracinement précoce des bourgeons et la vitrification des tissus.
- les pertes enregistrées lors de l'acclimatation.

La micropropagation via l'embryogenèse somatique (production d'embryons sans avoir recours au croisement) est l'une des voies les plus prometteuses pour la micropropagation du palmier dattier. Elle ouvre l'accès à des techniques d'amélioration génétique telles que la sélection *in-vitro* (à partir de suspensions cellulaires à capacité embryogène) et la transformation génétique (par la voie biolistique la plus appropriée pour les monocots). Cette méthode est largement appliquée et avec succès sur plusieurs espèces cultivées (SHAH et *al*., 2000 *in* SGHAIER et *al*., 2008). Chez le dattier, des protocoles d'établissement de suspensions embryogènes, à partir de cals ont été mis au point, ce qui a permis de produire des embryons somatiques avec un développement relativement synchrone (FKI et *al*., 2003). Cependant l'inconvénient majeur de cette méthode est le passage par une phase de callogenèse, source de variation somaclonale (MERKLE et *al*., 1990 et OSUGA et *al*., 1999 *in* SGHAIER et *al*., 2008). Néanmoins, LOUTFI et EL HADRAMI (2004) ont signalé que certaines plantules dérivant d'embryons somatique *in-vitro*, ont été acclimatées, et les fruits produits étaient conformes aux cultivars d'origine.

Bien que la production d'embryons somatiques est un processus bien établi pour le palmier dattier (AL-KHAYRI, 2007), il existe toujours des possibilités pour l'améliorer, par exemple, un certain nombre d'approches biochimiques ont été mises au point, afin de pouvoir reconnaître les cals embryogènes des cals non embryogènes (BAAZIZ et *al*., 1994; EL HADRAMI et BAAZIZ, 1995). D'autres méthodes ont vu le jour, il s'agit de techniques permettant de déterminer le nombre de chromosomes ou l'analyse quantitative d'ADN par cytophotométrie (YAKOUB-BOUGDAL, 1987; FKI et *al*., 2003).

Les embryons somatiques sont morphologiquement et anatomiquement similaires aux embryons zygotiques. Ils se développent à partir d'une seule ou d'un amas de cellules et présentent une bipolarité dès les premières divisions (MARQUIS, 1998 *in* DJILLALI, 2008). Malgré leurs points communs, les embryons somatiques (ES) diffèrent des embryons zygotiques (EZ), par l'absence de tégument et de réserves importantes qui sont nécessaires pour la survie et la germination des embryons (BROWNFIELD et *al*., 2007 *in* SGHAIER et *al*., 2008). Cela explique le fait que les plantules issues de la germination d'embryons

somatiques sont moins vigoureuses que celles issues de graines (ROBERTS et *al*., 1990; SGHAIER et *al*., 2008).

Selon SGHAIER et *al*. (2008), la maturation des embryons somatiques passe par trois stades de développement (fig.8). Les mécanismes ont fait l'objet de peu de travaux. Cependant, récemment de plus en plus de connaissances ont été acquises concernant la physiologie des embryons somatiques, il en ressort une différence des teneurs protéiques entre embryons zygotiques et embryons somatiques, ce qui peut nous renseigner sur les méthodes à entreprendre pour améliorer la culture des embryons somatiques.

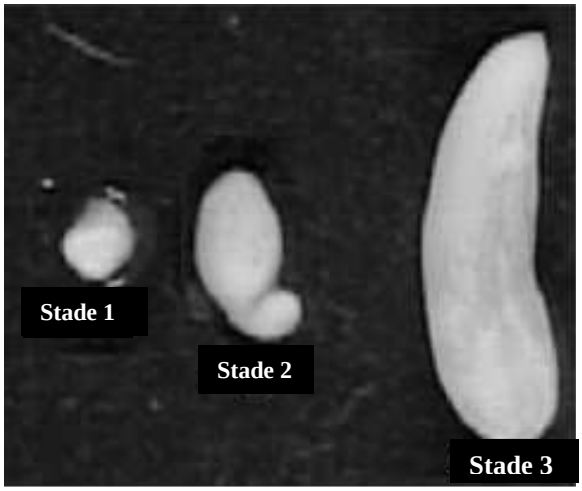


Figure 8 : Les trois stades de développement d'un embryon somatique. (SGHAIER et *al*., 2008).
stade 1 : embryon ovoïde ; stade 2 : allongement de l'embryon ; stade 3 : embryon structuré

5.2- Culture *in-vitro* des embryons zygotiques

L'obtention de jeunes pousses par culture *in-vitro* d'embryons isolés est une méthode permettant de raccourcir le cycle de reproduction sexué et d'aboutir rapidement à la multiplication végétative efficace. Dans ce domaine, il a été démontré que les tissus embryonnaires présentent une grande prolifération, par rapport aux fragments cotylédonaires prélevés sur les jeunes plantules (MOREL, 1956 *in* STITI, 1992).

Les recherches ont démarré avec la première publication en 1974 de REUVENI et *al*. qui annonçaient l'obtention de cals à partir d'embryons entiers, mis en culture en présence d'ANA et de Kinétine. Pour ces mêmes chercheurs, il semblerait que les cellules de la gaine cotylédonaire sont impliquées dans la naissance de cals et qu'ils sont du type méristématique, dotées d'un fort pouvoir de division et réagissant rapidement à un apport auxinique.

Dès 1975, en travaillant sur la variété Deglet-Nour, les chercheurs sont arrivés à constituer des plants, en partant de la gaine cotylédonaire prélevée sur des plants, issus de germination en culture *in-vitr*o. Le milieu est celui de MS additionné de lait de coco, 5 % de saccharose, d'AIA 1 $mg.l^{-1}$, KIN 0.1 $mg.l^{-1}$; de BAP 0.1 $mg.l^{-1}$ et d'ANA 1 $mg.l^{-1}$. Pour cette dernière

combinaison, des inflorescences sont observées sur certaines plantules (AMMAR et BENBADIS, 1977). Pour cette même variété la position des inflorescences peut être terminale conformément au modèle architectural de TOMLINSON (1990) ou latérale conformément à celui de CORNER (1966). Ces résultats ont été rapportés par YAKOUB-BOUGDAL (1987) avec la condition : MSm_2, additionné de la combinaison BAP 10 $mg.l^{-1}$ + d'AIA (0.1 $mg.l^{-1}$).

C'est en (1977), qu'on assiste à la mise au point d'une technique permettant la multiplication végétative *in-vitro* du palmier dattier à partir de la phase juvénile. AMMAR et BENBADIS (1977) ont utilisé des embryons extraits de graines mises à germer (pétiole cotylédonaire de 3 mm) et ont obtenu des plantules. De même que BEAUCHESNE *in* AMMAR et BENBADIS (1977) est le premier à obtenir des vitroplants de palmier dattier par voie organogène.

EEUWENS (1978), réussit l'enracinement de fragments prélevés de la base des feuilles de plants issus de semis, mais sans aucune régénération de bourgeons. A cette même période AMMAR, en réalisant la culture de fragments d'embryons obtenus par une section sagittale, aboutit au fait que les méristèmes sont en mesure d'opérer un processus de régulation conduisant à deux plantules jumelles, à croissance limitée.

D'autre part, RENOYLDS et MURASHIGE (1979) réussissent la formation de proembryons et de plants sur cals issus de culture d'embryons (TISSERAT, 1979).

Les résultats de RHISS (1980) à partir de la phase juvénile de la variété Bou Faggous se résument ainsi :

1- pétiole et limbe foliaire présentent une grande capacité de régénération. Deux groupes de substances de croissance stimulent l'organogenèse, AIA, AIB, 2,4-D. Lorsqu'ils s'associés à la KIN, ils stimulent la callogenèse. L'ANA seule, l'AIB ou l'AIA associés à la KIN stimulent le bourgeonnement.
2- les tissus du Palmier sont sensibles aux substances de croissance, ainsi elles doivent être utilisées à de faibles doses 0.1 $mg.l^{-1}$ à 1 $mg.l^{-1}$.
3- par ailleurs, le choc physique à savoir le transfert de l'obscurité à la lumière, et inversement, favorise la transformation d'organes.

Vers 1983 AMMAR et ses collaborateurs, en entreprenant la culture d'embryons excisés et de fragments de jeunes plants, issus de semis de la variété Deglet nour, montrent que les variations de réponses par comparaison au développement sur milieu sans hormones semblent liées à la nature de l'auxine utilisée en association avec la BAP.

En 1984, YAKOUB-BOUGDAL révèle l'effet rhizogène d'un traitement au rouge sombre sur des méristèmes caulinaires prélevés sur des plantules âgées de deux mois.

Un an plus tard, TISSERAT confirme la nécessité de la présence d'une auxine accompagnée d'une cytokinine dans un milieu de culture.

A partir de 1989, ZAID réalise la culture d'embryons extraits de graines mûres sur un milieu contenant du picloram. Il produit des embryons somatiques.

CALERO en 1989, a mis en évidence l'effet positif de l'éclairement rouge clair sur l'induction de l'embryogenèse somatique sur des tissus de la gaine cotylédonaire, cultivés sur le milieu de SCHENK et HILDEBRANDT (1972), avec du 2.4-D 1 $mg.l^{-1}$ et de la BAP 0.1 $mg.l^{-1}$. Par contre, l'application d'un éclairement bleue inhibe cette induction.

Les derniers travaux concernant la multiplication par semis du palmier dattier, traitent de l'utilisation d'embryons zygotiques dans l'établissement de suspensions embryogènes à partir de cals (SAKA, 2001). Aussi, selon cet auteur, la callogenèse est indifféremment obtenue sur le milieu contenant du 2-4 D de l'ANA, de la BAP, ou une combinaison auxine-cytokinine.

Ainsi, la culture d'embryons zygotiques est importante sur le plan théorique, parce qu'elle permet de préciser la physiologie de nutrition des espèces (MONNIER, 1995).

D'après ces quelques recherches sur la culture de méristèmes et d'embryons excisés, on observe des réponses variables, dues d'une part, au stade de développement utilisé (phase juvénile issue de semis) d'autre part aux différents effecteurs, comme les facteurs trophiques (sels minéraux, source de carbone), hormonaux endogènes et exogènes.

Les facteurs physiques de l'environnement, comme la température et la lumière interviennent aussi. L'utilisation de plantules pour des études préliminaires, constitue un matériel de choix pour les chercheurs.

III- Etude de quelques paramètres physiques favorisant le développement des embryons

La conversion énergétique réalisée, par la photosynthèse des organes chlorophylliens est un mécanisme fondamental pour la croissance et le développement des plantes. Cependant les plantes ont non seulement développé ces mécanismes de conversion mais également des systèmes multiples d'information sur leurs conditions d'éclairement (BALLARE *et al.*, 1987; MAZLIAK, 1999).

1- Lumière et photomorphogenèse

La composition spectrale, la direction et la périodicité du rayonnement, constituent des signaux caractéristiques de l'éclairement perçus par la plante. La modification de ces signaux, peut provoquer diverses réponses morphogénétiques, qui permettent d'adapter la croissance de la plante aux variations des conditions lumineuses (SMITH, 2000).

La durée du jour agit sur les mécanismes de floraison ainsi que la reprise de végétation printanière de certains arbres (photopériodisme). La direction de la lumière détermine la direction de la croissance (phototropisme) et/ou l'orientation de certains organes au cours de la journée (héliotropisme) (MAZLIAK, 1999; HELLER et *al*., 2000; FRANKLIN, 2009). Aussi certaines radiations modifient plus particulièrement la morphogenèse et l'architecture des plantes (COMBES, 2002).

Les réponses morphogénétiques à la lumière résultent des mécanismes de la photomorphogenèse qui se définit comme la régulation (ou le contrôle) de la croissance et du développement des plantes, indépendamment de la photosynthèse, de la périodicité et de la direction du flux lumineux (SMITH et HOLMES, 1984 *in* COMBES, 2002).

Ces réponses dépendent de la composition spectrale de la lumière et sont plus particulièrement induites, par certaines radiations qui agissent comme des signaux. Leur perception, par la plante n'implique pas de conversion énergétique notable et les réponses induites résultent de la transduction de ce signal, sur le fonctionnement de la plante et non d'une modification de sa disponibilité en énergie (AHMAD, 1999).

2- Photorécepteurs et photoperception de la lumière par la plante

2.1- Les photorécepteurs

La plante traduit un ensemble complexe de signaux, émis par une lumière, d'une longueur d'onde donnée, en un signal biochimique à travers des photorécepteurs. Actuellement, au moins deux grandes familles de photorécepteurs ont été décrits et se définissent par les longueurs d'ondes auxquelles ils sont sensibles : les phytochromes qui perçoivent plus particulièrement le rayonnement dans les gammes spectrales rouge clair, rouge sombre et les cryptochromes qui perçoivent le rayonnement dans la gamme Ultra Violet A et Bleue (UVA-

BL). Ces différents photorécepteurs agissaient de façon concertée et en interaction (MULEO et MORINI, 2008).

Ces photorécepteurs sont des chromoprotéines qui associent une structure protéique (apoprotéine) et un noyau chromophore. L'absorption de la lumière, par le chromophore induit un changement chimique ou conformationnel de l'apoprotéine du récepteur, qui est transmis en aval, à des molécules de signal (AHMAD, 1999).

Les premières études de photobiologie chez les végétaux, ont porté sur un photorécepteur, les phytochromes, qui furent les premiers photorécepteurs identifiés et sont les mieux caractérisés. Ces pigments agissent comme " un interrupteur ", synthétisés dans le noir, leur chromophore présente deux isomères géométriques, de propriétés d'absorption un peu différentes, qui donnent deux formes de phytochrome Pr et Pfr interconvertibles l'une en l'autre (FANKHAUSER, 2002; NABORS, 2008). Chaque forme absorbe le rayonnement, dans une gamme de longueur d'onde, qui s'étend entre 300 et 800 nm environ (Fig. 9). L'absorption est maximale dans le rouge clair (RC) autour de 660 nm pour le Pr, et dans le rouge sombre (RS) autour de 730 nm pour le Pfr. Les spectres d'absorption présentent aussi un pic moins important dans le bleu, à 380 nm pour le Pr et 410 nm pour le Pfr.

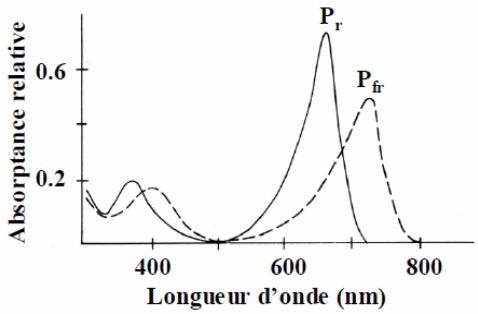
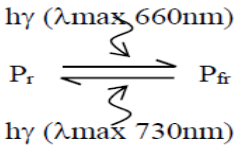


Figure 9 : Spectre d'absorption du phytochrome extrait de plantules étiolées d'avoine (HAYWARD, 1984).

Lorsque la forme Pr absorbe le rayonnement, elle se transforme sous l'autre forme Pfr et inversement selon l'équation simplifiée



Cet état d'équilibre entre Pr et Pfr est déterminé par la composition spectrale du rayonnement entre 300 et 800 nm. Le Pfr est la forme biologiquement active (SMITH, 1982) et son action est fonction de sa concentration relative à l'équilibre (photoéquilibre) déterminé par les flux de photons RC et RS (HAYWARD, 1984).

Les cryptochromes n'ont été caractérisés que tardivement, d'où le nom de cryptochrome du grec *krupto chroma* signifie « couleur cachée » (LIN, 2000). Par rapport au phytochrome, les cryptochromes ont été moins étudiés et l'identification de la nature du chromophore est très récemment confirmée (ZEIGER, 1990; MAZLIAK, 1999). Ce chromophore est une flavine dont le spectre d'absorption est présenté sur la figure 10. Des études récentes ont permis d'identifier trois photorécepteurs de cette famille : le cryptochrome 1 (cry1), le cryptochrome 2 (cry2) et les phytotropines (phot1 et phot2).

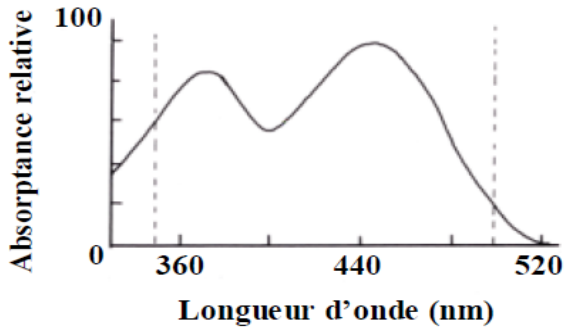


Figure 10 : Spectre d'absorption de la flavine (MOHR et SHROPSHIRE, 1983)

L'absorption dépend de la longueur d'onde dans la gamme UVA-Bleu (300-550 nm), avec deux pics relativement peu marqués autour de 370 et 450 nm. Les cryptochromes agissent comme des compteurs de photons, et sont peu sensibles à la longueur d'onde dans cette gamme. Selon PARKS et *al*. (2001), le photorécepteur cry1 serait stable à la lumière et agirait sous l'effet de hautes radiations bleues alors que le cry2 serait, quant à lui photolabile et agirait sous l'effet de faibles radiations bleues.

2.2- La photoperception des signaux lumineux par la plante

Tous les organismes chlorophylliens présentent des phytochromes et des cryptochromes. La photoperception correspond à l'activation de ces photorécepteurs par la lumière. La localisation des photorécepteurs, a surtout été étudiée et analysée à l'échelle intracellulaire, et dans une moindre mesure, à l'échelle des tissus (MAZLIAK, 1999).

Quelques travaux ont montré la présence des phytochromes et des cryptochromes dans toute la plante (PRATT, 1994; REDDY et SHARMA, 1998; BRIGGS et HUALA, 1999). Leurs concentrations sont plus fortes dans les zones méristematiques (divisions cellulaires et croissance actives) et dans certains organes de réserve (sans croissance active) (SUETSUGU et WADA, 2003). Ces parties de la plante sont assez rarement exposées directement à la lumière. La détermination du flux radiatif, reçu au niveau des photorécepteurs, reste inconnue même si des gradients de lumière au sein d'organes végétaux (feuille ou tige) ont été quelquefois mesurés (VOGELMANN et HAN, 2000).

Des approches plus intégrées à l'échelle de la plante, ont montré que les réponses morphogénétiques ne résultaient pas de l'éclairement reçu par l'ensemble de la plante mais par certains organes ou parties d'organes. Ces zones qui perçoivent le signal, constituent des sites apparents dont la détermination est importante pour caractériser le rayonnement actif. En particulier, la perception de la lumière dans la direction horizontale, par certains organes érigés (les tiges par exemple) jouent un rôle très important, dans la perception des plantes voisines (BALLARE *et al*., 1987).

2.3- Effets de la lumière bleue sur la morphogenèse

Les travaux sur l'implication et les mécanismes d'action des phytochromes et des cryptochromes sont très nombreux, et concernent essentiellement des réponses moléculaires ou physiologiques (KENDRICK et KRONENBERG, 1994).

Des situations physiologiques, fort différentes, rencontrés dans les premiers stades de développement illustrent bien le fait que, pour un processus donné, plusieurs photorécepteurs de la même famille ou non, peuvent être impliqués.

Ainsi, à la lumière bleue (390-500 nm) et l'ultra violet A (UV-A ; 320-390 nm) plusieurs réponses physiologiques chez la plante sont induites (BRIGGS et CHRISTIE, 2002). Ces réponses comprennent l'inhibition de l'élongation de l'hypocotyle, la régulation de la floraison, le phototropisme, l'ouverture des stomates, le fonctionnement des horloges biologiques circadiennes et la régulation de certains gènes (LIN, 2000) (fig. 11).

Selon FURUYA et SHAFER (1996), la synthèse d'anthocyanes est régulée par le cryptochrome de la plante. Aussi l'interaction entre phytochrome et cryptochromes, peut être aussi à l'origine de cette réponse. En effet, lors de l'expression du gène codant pour la chalcone synthase, enzyme clé de la voie de biosynthèse des flavonoïdes et conduisant notamment à la production d'anthocyanes (fig. 12), le phytochrome interagit avec le cryptochrome.

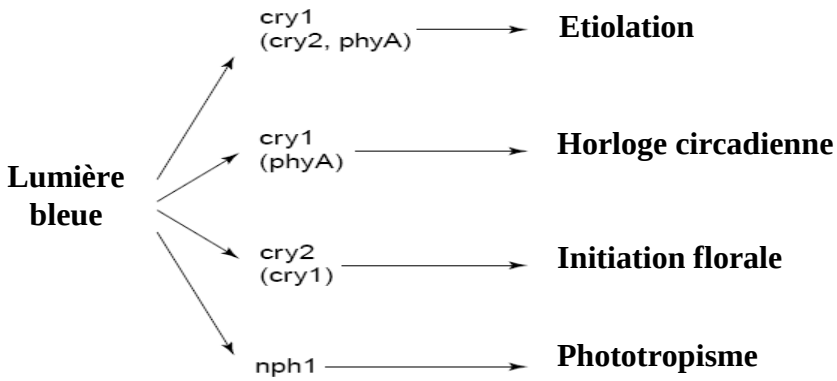


Figure 11 : Fonctions des différents récepteurs de la lumière bleue dans le développement de la plante chez *Arabidopsis*. Les récepteurs mis entre parenthèse ont un rôle mineur ou non confirmé dans le processus (LIN, 2000).
(cry1 = cryptochrome 1 ; cry2 : cryptochrome 2 ; PhyA = phytochrome A ; nph1: phytotropines 1.)

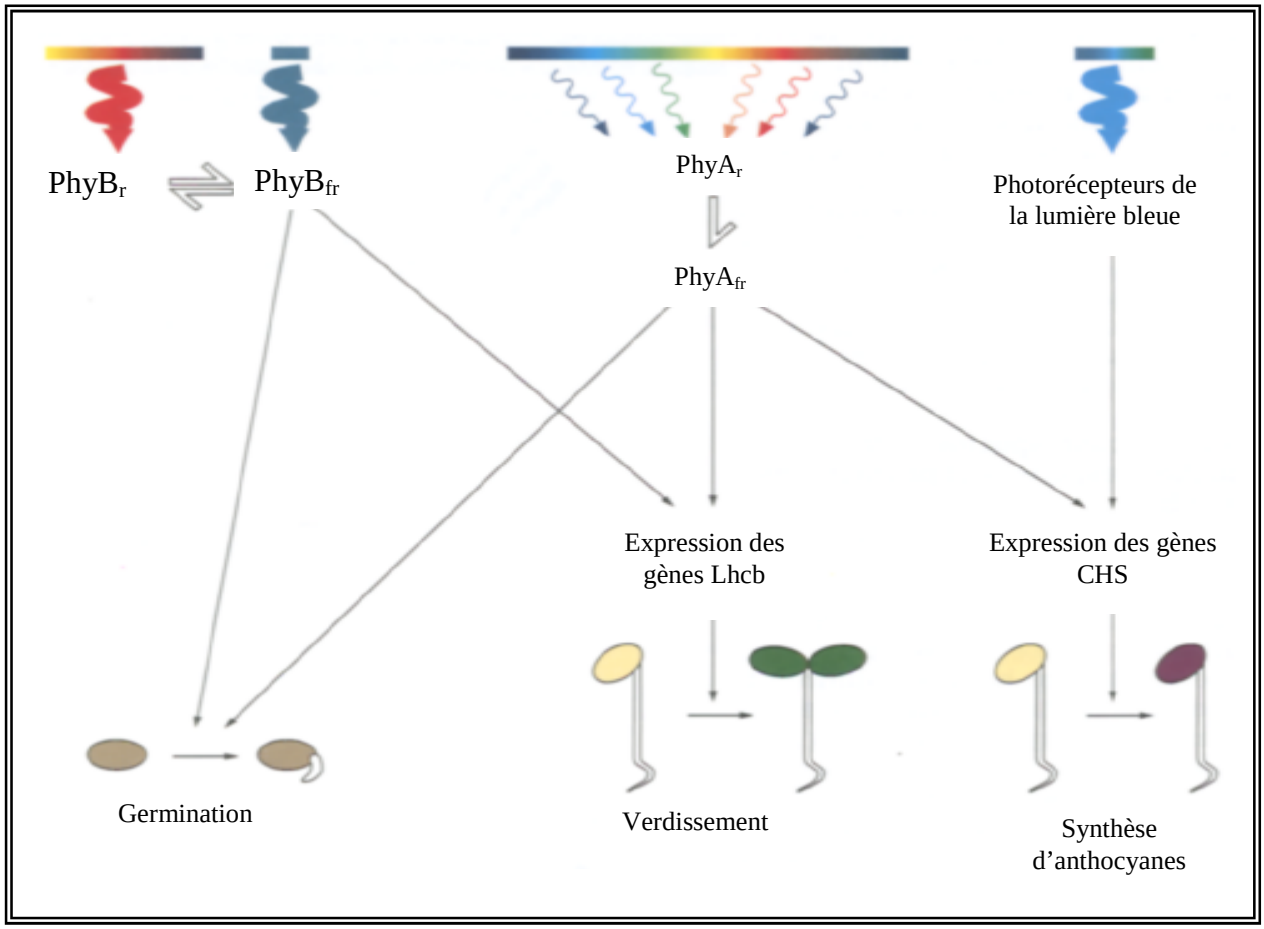


Figure 12 : Diversité des systèmes de perception de la lumière et influence sur quelques processus intervenant dans le développement des plantules (FURUYA et SHAFER, 1996).
(PhyA$_r$, PhyA$_{fr}$, PhyB$_r$ et PhyB$_{fr}$ correspondent, pour chaque phytochrome aux formes absorbant le rouge ou le rouge sombre ; Lhcb : protéine se fixant aux chlorophylles et CHS. chalcone synthase)

.

IV- Généralités sur les composés phénoliques

Les métabolites secondaires existent chez tous les végétaux, mais leur nature chimique diffère selon les taxons. On estime que chaque végétal produit au moins, certaines de ces molécules que l'on classe, en trois catégories principales selon leur structure : les alcaloïdes, les terpénoïdes et les polyphénols. (BRUNETON, 1999).

Les polyphénols également dénommés composés phénoliques, sont présents chez toutes les plantes vasculaires (GUIGNARD, 2000). Ils constituent un groupe important, avec plus de 8000 structures phénoliques, présents dans tous les organes de la plante (des racines jusqu'aux fruits) (BETA et *al.*, 2005). Ils résultent biogénétiquement de deux voies de synthèses principales : la voie du shikimate et celle de l'acétate (LUGASI et *al.*, 2003).

1- Classification des polyphénols

Les substances phénoliques sont définies par un noyau benzoïque, auquel sont directement liés un ou plusieurs radical (aux), hydroxylé(s), libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (BRUNETON, 1999; VERCAUTERN et *al*., 1998). Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénols, à des composés hautement polymérisés comme les tanins.

Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénols, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols. Les plus importants sont: les acides phénols, les flavonoïdes et les tanins (tab. III).

Tableau III : Principales classes de composés phénoliques (MACHEIX et *al*., 2005)

Squelette carboné	**Classe**	**Exemple**	**Origine (exemple)**
C_6	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C_6-C_1	Acides hydroxybenzoïques	*p*-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C_6-C_3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, férulique Scopolétine	Pomme de terre, pomme Citrus
C_6-C_4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C_6-C_2-C_6	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C_6-C_3-C_6	Flavonoïdes • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoides	 Quercétine Cyanidine Catéchine Naringénine Daidzéine	 Fruits, légumes Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
$(C_6$-$C_3)_2$	Lignanes	Pinorésinol	Pin
$(C_6$-$C_3)_n$	Lignines		Bois, noyau des fruits
$(C_{15})_n$	Tanins		Raisin, kaki

Notre étude a porté uniquement sur les anthocyanes, donc nous ne décrirons que cette sous classe de composés phénoliques.

2- Les anthocyanes

Les anthocyanes (en grec *anthos* signifie fleur, *kyanos* signifie bleu) sont les pigments des plantes, les plus importants, visibles à l'œil nu (KONG et *al*., 2003). Ils regroupent principalement les pigments responsables de la plupart des couleurs rouge, violette et bleue chez les fleurs (DELA et *al*., 2003). Ce sont des composés phénoliques solubles dans l'eau, qui forment une partie du très répandu groupe de flavonoïdes au niveau des plantes (OREN-SHAMIR, 2009).

2.1- Structure

Basée sur plusieurs publications récentes, plus de 400 anthocyanines existent dans la nature. La différence entre chaque anthocyanine dépend du nombre de groupements hydroxyles, de la nature et du nombre de sucre lié à la molécule. Elle dépend aussi de la position de cette liaison, de la nature et du nombre de l'acide aromatique ou aliphatique lié au sucre dans la molécule (KONG et *al*., 2003). Les anthocyanes possèdent un squelette en C6-C3-C6. Sur le plan structural, les anthocyanes sont des glycosides de polyhydroxy / méthoxy qui dérivent des sels du 2-phényl benzopyrilium (flavilium). A ce jour, seules 18 structures d'anthocyanidines ont été rapportées et il n'y a que 6 d'entre elles qui connaissent une large distribution et qui sont communes aux végétaux supérieurs (fig. 13) (MANETAS, 2006).

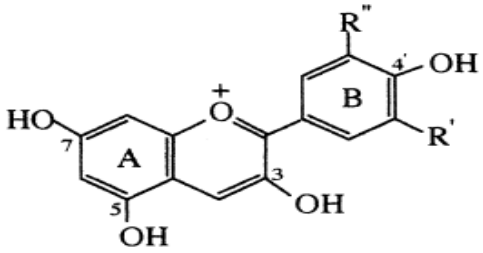


Figure 13 : Structure de l'anthocyanidine (HARBORNE, 1963).
Les six anthocyanidines les plus répandues sont :
pélargonidine : R'=H, R''=H ; cyanidin : R'=OH, R''=H ;
péonidine : R'=OMe, R''=H ; delphinidine : R'=OH, R''=OH ;
pétunidine : R'= OMe, R''=OH ; et malvidine R'=OMe, R''=OMe.

Comme nous pouvons le constater, le terme « anthocyanes » a une valeur générale désignant soit les formes naturelles glycosylées, soit la molécule non glycosylée. La partie phénolique seule, est désignée sous le nom d'anthocyanidine, alors que l'hétéroside (molécule phénolique + sucre associé) prend celui d'anthocyanine (MACHEIX et *al*., 2005).

2.2- Localisation

Ces pigments s'accumulent dans les vacuoles, leur stabilité et leurs nuances dépendent des conditions intravacuolaires comme le pH, la co-pigmentation grâce, à la cœxistence avec les flavonoïdes incolores, et la formation de complexes avec l'ion métal. Les anthocyanes sont

principalement localisés au niveau des épidermes, mais ils sont aussi présents dans la chair des fruits et dans les organes de stockage comme chez la patate douce (OREN-SHAMIR, 2009).

2.3- Biosynthèse

Comme les anthocyanes appartiennent à la classe des flavonoïdes, l'origine biosynthétique des anthocyanes est commune avec celle des autres classes. Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique mixte. Chacune des deux voies (celle de l'acétate et celle de l'acide shikimique) conduisent, dans la molécule du flavonoïde final, à la formation d'un cycle benzénique plus ou moins hydroxylé. Ils constituent une classe de phénylpropanoïde ; cette voie métabolique débute par la synthèse de la chalcone dans une réaction contrôlée par la chalcone synthase CHS, elle va des falvanones et flavonols (produit de l'action de la chalcone isomérase (CHI)) et des flavanes (produits de l'activité de la dihydroflavonol réductase (DFR)). Elle se termine par la synthèse des anthocyanidines et des proanthocyanidines (LORENC-KUKULA et *al*., 2007). En plus des enzymes citées ci-dessus, le métabolisme des flavonoïdes met en jeu d'autres enzymes qui sont spécifiques (fig. 14).

2.4- Rôles des anthocyanes

- Fonction des anthocyanes

La fonction majeure des anthocyanines, est leur capacité à transmettre une couleur aux plantes, ou aux produits des plantes où ils se trouvent. Ils jouent un rôle défini dans l'attraction des animaux pour la pollinisation et la dispersion des graines, et de là, ils ont une valeur considérable, dans la co-évolution des interactions plante-animal. Ils peuvent agir comme antioxydant, agent antibactérien, et ont aussi un rôle dans la résistance aux insectes (KONG et *al*., 2003). Les anthocyanes protègent les plantes des UV, en réduisant les effets de la lumière de forte intensité par absorption (HARBORNE, 2000). En plus des différentes fonctions chez la plante, les anthocyanines ont plusieurs autres utilités. Par exemple, leur importante fonction dans le déclin cognitif et le dysfonctionnement nerveux (KONG et *al*., 2003).

- Activité biologique des anthocyanes

Les anthocyanes possèdent aussi des propriétés pharmacologiques, utilisées par les humains à des fins thérapeutiques telles qu'une activité anti-inflammatoire, anti-œdème, anti-tumorale, anti-oxydante, anti-mutagène, et anti-diabète (KONG et *al*., 2003).

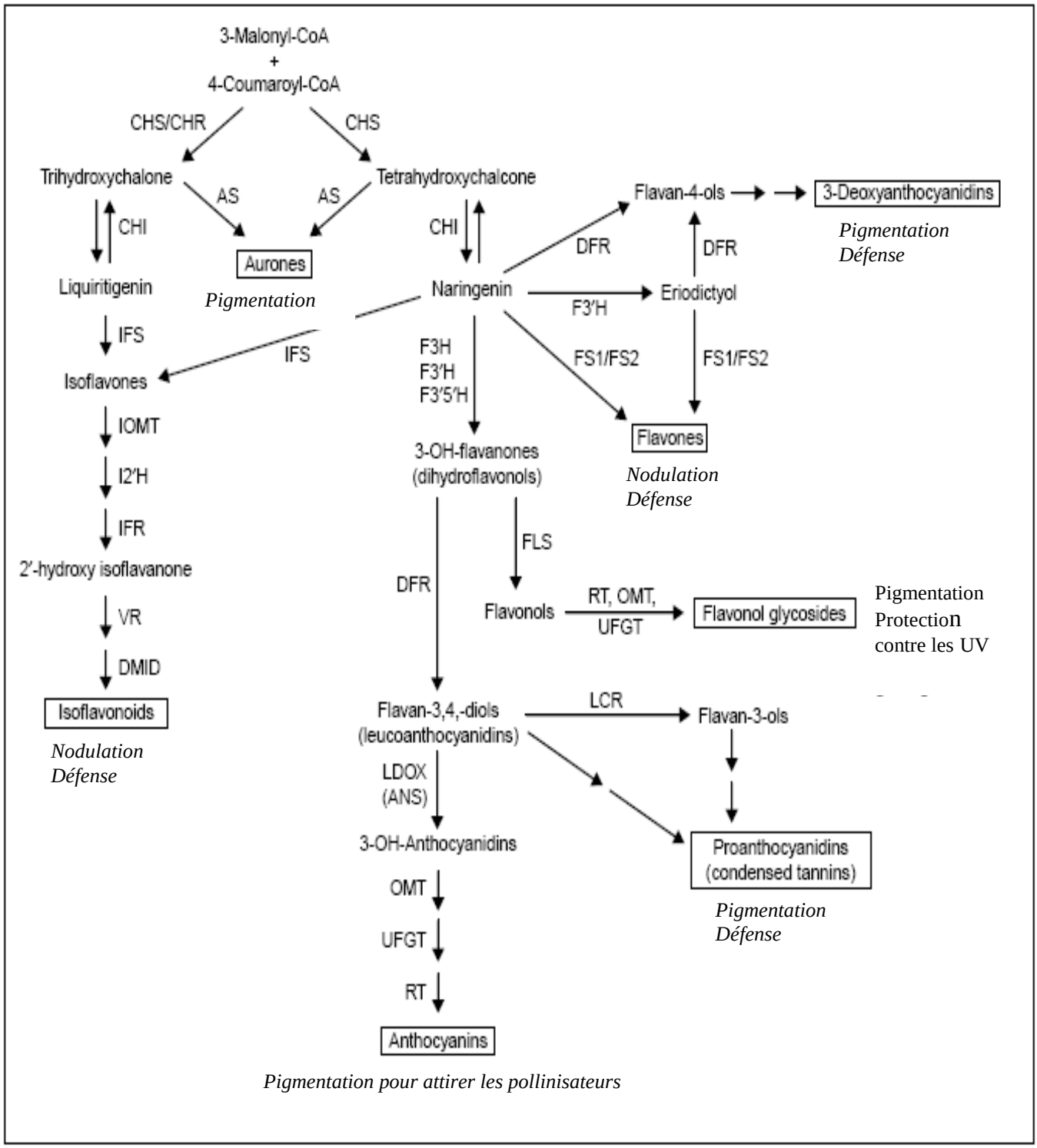


Figure 14 : Schéma de la voie de biosynthèse des flavonoïdes (WINKEL- SHIRLEY, 2002)

Abréviations: ANS : anthocyanidine synthase; AS : aureusidine synthase; C4H : cinnamate-4-hydroxylase;CHR : chalcone réductase; DFR : dihydroflavonol 4-reductase; DMID :7,2'-dihydroxy, 4'-méthoxyisoflavanol déhydratase; F3H : flavanone3-hydroxylase; F3'H : flavonoïde 3'hydroxylase; F3'5'H : flavonoide 3'5'hydroxylase; FSI/FS2 : flavone synthase; I2'H : isoflavone 2'-hydroxylase; IFR : isoflavone réductase; IFS : isoflavone synthase;IOMT : isoflavone *O*-méthyltransferase; LCR : leucoanthocyanidin réductase; LDOX : leucoanthocyanidin dioxygenase; OMT,*O*-méthyltransferase; PAL : phénylalanine ammonia-lyase; RT : rhamnosyl transférase; UFGT : UDP flavonoid glucosyl transférase; VR : vestitone réductase.

Les noms des classes des produits finaux des flavonoïdes sont encadrés. Quelques unes des fonctions connues des composés de chaque classe sont indiquées en italique.

Materiel et méthodes

Matériel et méthodes

1- Matériel végétal utilisé

Les graines utilisées proviennent de fruits de la variété TAKERBOUCHT, variété reconnue résistante au Bayoud (RAHMANIA, 1982; BOUNAGA, 1991).

Notre échantillonnage a été réalisé dans une palmeraie, située à environ 74 km au Nord Est du chef lieu de In Salah, dans la commune de Foggaret ez Zoua (fig. 15) (récolte de 2007-2008). Après la localisation du site, nous avons choisi un sujet au centre des peuplements au hasard, sur lequel nous avons prélevé deux régimes. Ce procédé d'échantillonnage avait pour objectif la maîtrise des facteurs, ayant une influence sur la réponse physiologique de la plante réduisant, ainsi au maximum les risques d'hétérogénéité des graines utilisées.

Au cours de notre expérimentation, nous avons utilisé des plantules, extraites de graines de même taille, mises à germer en conditions aseptiques, à une température de (30 ± 2) °C pour activer la germination (BOUNAGA, 1991), maintenues à l'obscurité jusqu'à l'émergence du pétiole cotylédonaire (vers le 3è jour) (RABECHAULT, 1967; YAKOUB-BOUGDAL, 1987 et 2005).

Nous avons effectué deux types de prélèvements :

- des embryons au 6 è jour de germination ;
- des embryons au 10 è jour de germination.

2- Méthodes expérimentales

Notre expérimentation a mis en œuvre les techniques de la culture *in vitro*, complétées par un dosage des variations des teneurs en leucoanthocyanes des embryons en culture, afin de suivre l'évolution de la sensibilité des embryons à la lumière.

2.1- Techniques de la culture *in vitro*

Les plantules utilisées sont cultivées, selon la technique classique préconisée par GAUTHERET (1959), pour les tissus végétaux.

2.1.1- Stérilisation du matériel végétal

Divers produits de stérilisation ont été utilisés, à savoir : l'hypochlorite de sodium $(NaClO)_2$ et l'hypochlorite de calcium $Ca\ (ClO)_2$ à la concentration 90 $g.l^{-1}$ et le chlorure mercurique ($HgCl_2$) à 0,1 $g.l^{-1}$. Le temps de stérilisation et de lavage sont les mêmes pour les trois produits.

La méthode de stérilisation adoptée, avec l'hypochlorite de calcium est la suivante :

Les graines sont mises à tremper pendant 24 h, puis nettoyées par grattage de l'endocarpe, et rincées abondamment. Les graines séchées sont prêtes à l'emploi.

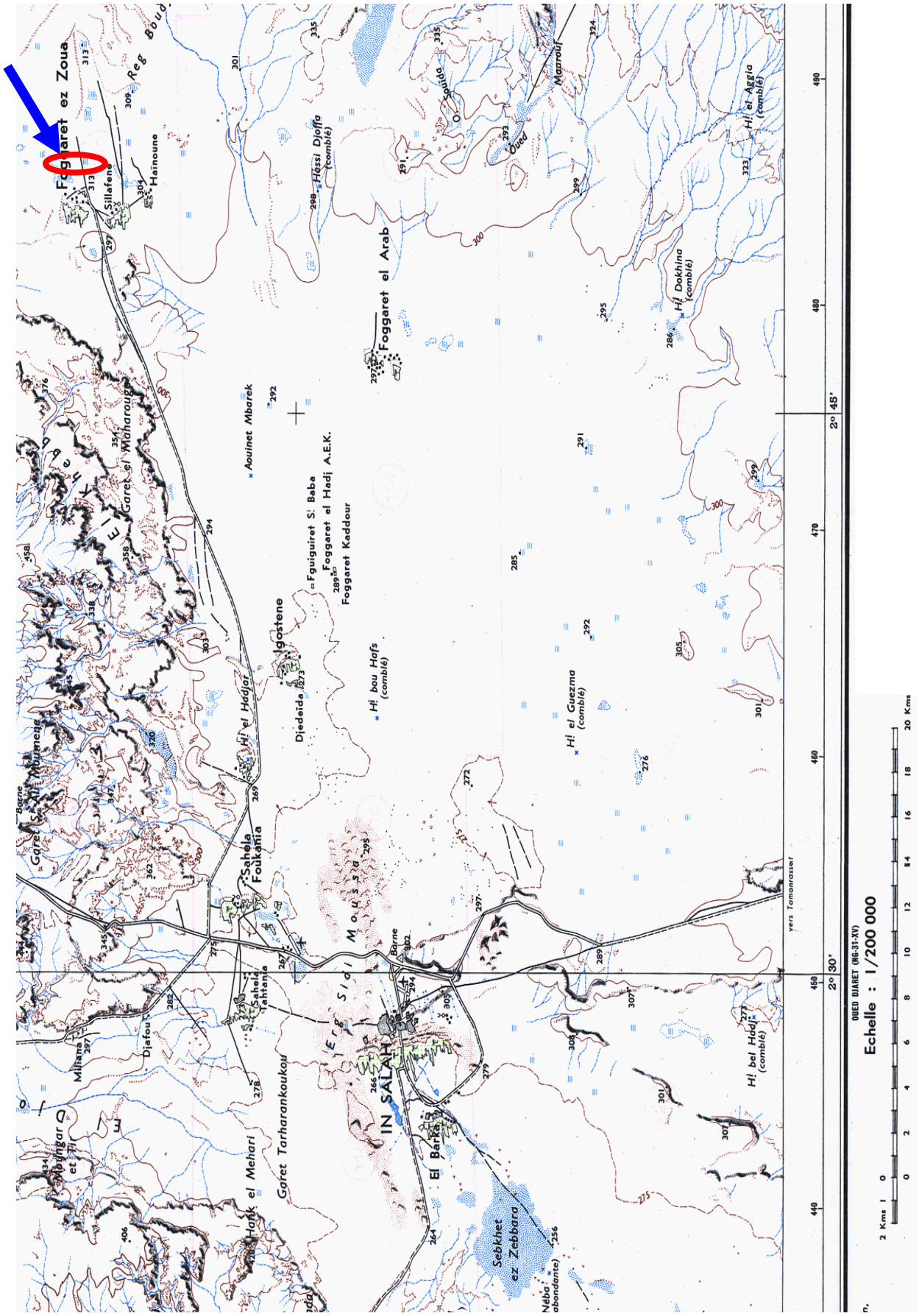


Figure 15 : Position géographique de la station d'étude (Institut National de Géographie, 1965)

La stérilisation est obtenue par passage rapide (5 s) dans de l'alcool éthylique à 96°, les graines sont trempées dans une solution d'hypochlorite de calcium : $Ca\ (ClO)_2$ préconisée par WILSON (1915), durant 60 mn. Cette solution est obtenue en diluant 90 g d'hypochlorite de calcium dans un litre d'eau distillée et filtrée après 10 mn de contact. Les graines sont ensuite rincées dans trois bains d'eau distillée stérile.

Par la suite, les graines sont transférées aseptiquement dans des tubes en verre, contenant de l'eau distillée stérile avec du benomyl 10 $mg.l^{-1}$ (ZRYD, 1988) et placées à l'obscurité dans des enceintes de culture à une température de (30 ± 2) °C.

Après 3 à 9 jours d'incubation, nous observons un soulèvement de l'opercule sous la pression du pétiole cotylédonaire.

2.1.2 - Facteurs de la germination et du développement

Afin de pouvoir déterminer les paramètres importants pour une bonne mise en germination, des essais préliminaires ont été effectués. A cet effet, les embryons ont été cultivés sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962), considéré comme étant le plus adéquat à la culture des embryons du Palmier dattier, meilleur développement et une survie plus longue, préconisé par REUVENI et *al*. (1972); REUVENI et KIPNIS (1974); AMMAR (1978); RHISS (1980); YAKOUB-BOUGDAL (1984, 1987); YAKOUB-BOUGDAL (2005), contenant 30 $g.l^{-1}$ de saccharose et solidifié par de l'agar à 7 $g.l^{-1}$. Chacun de nos essais, contient de 24 à 36 échantillons, et placés en chambre de culture sous une photopériode de 16 h de lumière, 8 h d'obscurité, avec une intensité lumineuse de 5100 Lux dispensée, par des tubes Osram L58W/840 et des températures diurnes et nocturnes respectives de 28 et 26 ± 2 °C.

2.1.2.1- Taille des embryons

La taille de l'embryon mis en culture présente une grande importance. En effet, plus l'embryon est grand, plus les équilibres endogènes seront déterminants (AUGE, 1989).

Le but recherché par ce test est la détermination de la taille, idéale, des embryons pour une meilleure germination. Pour cela, des embryons ont été extraits à 3 mm et d'autres ont été pris à 5 mm.

La taille déterminée nous permettra de retenir un seuil, considéré indispensable dans nos conditions expérimentales.

2.1.2.2- Polarité des embryons

La mise en culture des embryons en position debout (le limbe cotylédonaire et/ou pétiole cotylédonaire dans le milieu) et en position à plat sur le milieu (limbe cotylédonaire en contact partiel avec le milieu), nous permet de mettre en évidence la polarité de l'embryon, ainsi que le rôle du limbe cotylédonaire dans la réactivation de la germination.

2.1.2.3- Suppression de l'haustorium et de la gaine cotylédonaire

L'étude de l'influence de la suppression de l'haustorium et de la gaine cotylédonaire sur le développement des embryons a été réalisée selon le protocole décrit par ASSY BAH et *al*. (1989), légèrement modifié, sur les embryons zygotiques du cocotier (*Cocos nucifera* L.). Les embryons entiers ont été placés sur le milieu de culture jusqu'à l'apparition d'une gemmule de 2 à 4 cm. L'haustorium a alors été supprimé en coupant au niveau de l'étranglement qui sépare le pétiole cotylédonaire de l'haustorium puis nous enlevons la gaine cotylédonaire (fig.16).

Pour mettre en évidence l'influence de la suppression de l'haustorium sur le développement, nous avons mis en culture des jeunes plantes pourvues et dépourvues d'haustorium.

2.1.3- Influence des phytohormones sur la culture des embryons

2.1.3.1- Milieux de culture utilisés

Nous avons utilisé le milieu de culture préconisé par MURASHIGE et SKOOG (1962) (MS). Ce milieu est légèrement modifié par référence, respectivement, aux travaux réalisés sur le palmier dattier par RHISS (1980) (MSm_1), YAKOUB-BOUGDAL (1984) (MSm_2). Les macroéléments de DRIVER et KUNIYOKI (1984) (DKW) sont associés aux microéléments de MS et le milieu de GAMBORG (GA) (Annexe 1). Nous avons effectué ces essais afin de déterminer la concentration optimale en éléments minéraux, nécessaires à une bonne régénération des embryons zygotiques cv. Takerboucht.

Deux milieux ont été retenus, additionnés de diverses substances de croissance, seules ou en combinaison. Les concentrations sont mentionnées dans le tableau IV.

Tableau IV : Milieux de culture avec les différentes hormones utilisées en ($mg.l^{-1}$).

	MURASHIGE et SKOOG modifié (MSm_1)		MURASHIGE et SKOOG modifié (MSm_2)	Saccharose ($g.l^{-1}$)
Auxines (A)	ANA	1	1	30
	AIA	0,1	0,1	50
Cytokinine (B)	BAP	0,1	0,1	30
		10	10	50
(A) + (B)	BAP 0,1 et ANA 1 (1)		BAP 0,1 et ANA 1	30
	BAP 10 et AIA 0,1 (2)		BAP 10 et AIA 0,1	50

(1) concentration choisie pour l'obtention d'une inflorescence (AMMAR et BENBADIS, 1977).

(2) concentration choisie pour l'obtention d'une inflorescence (YAKOUB-BOUGDAL, 1987).

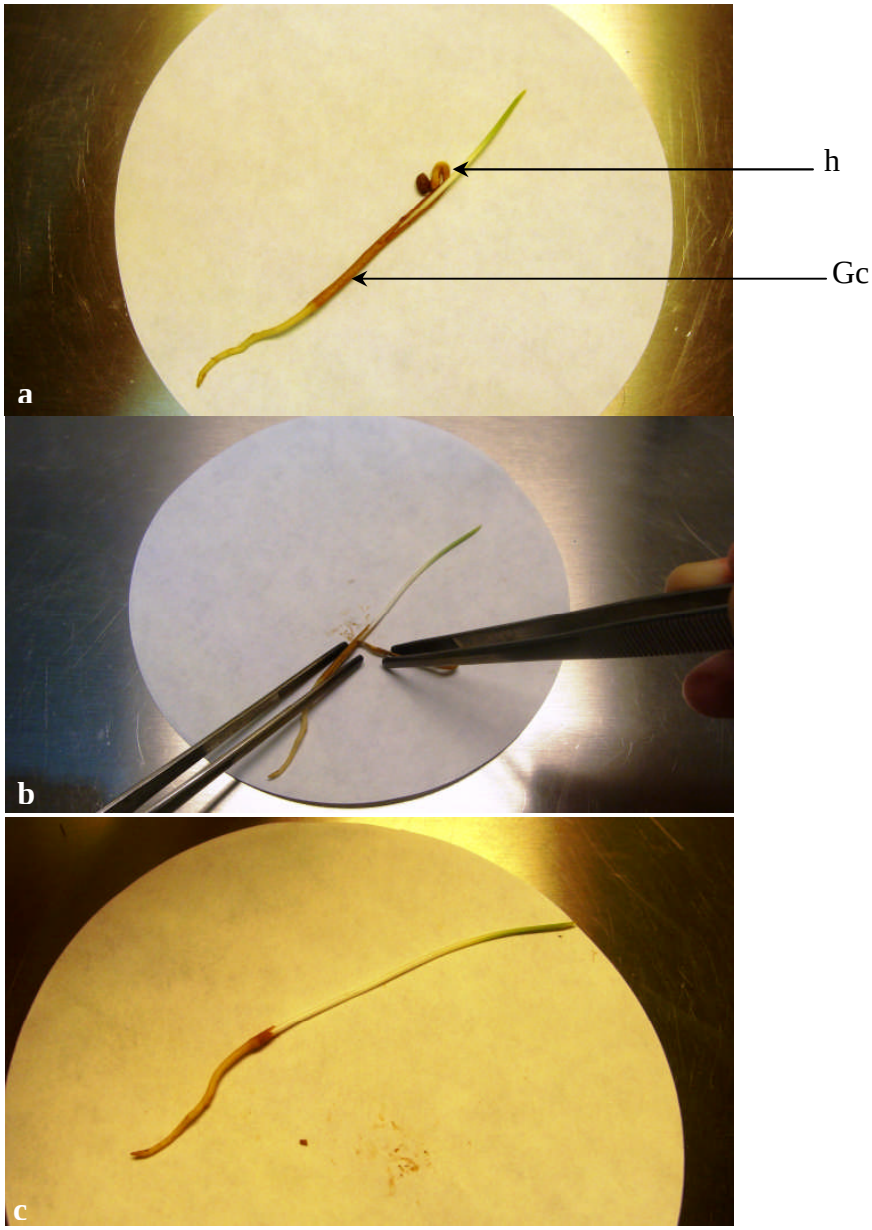


Figure 16 : Technique de suppression de l'haustorium et de la gaine cotylédonaire des germination *in vitro* du palmier dattier Cv. Takerboucht en conditions d'asepsie.
a- Jeune plante avec haustorium (h).
b- Suppression de l'haustorium (h) et de la gaine cotylédonaire (Gc).
c- Jeune plante sans haustorium.

Dans tous les milieux, nous avons ajouté des vitamines, de l'agar (Duchefa) à 7 ‰ (voir Annexe 1) et des quantités différentes de saccharose, associées à chaque balance hormonale (voir tableau IV). Le pH est ajusté à 5,7 ± 0,1 par KOH (1N) avant l'autoclavage. Deux méthodes de stérilisation ont été utilisées. La technique de tyndallisation a été satisfaisante. Elle a donné une meilleure vitesse de croissance, ce qui laisserait supposer d'après MONNIER (1976), qu'il s'agirait d'une conservation des propriétés nutritives du milieu.

2.1.3.2- Conditions de culture

Sous une hotte à flux laminaire horizontal (fig. 17a), les plantules sont prélevées des germinations stériles, aseptiquement, mesurant environ 3 et 5 mm, suivant la technique d'extraction mise au point par YAKOUB-BOUGDAL (1984).

Les graines sont maintenues à l'aide de deux pinces préalablement stérilisées, autoclavées à 120 °C durant 30 mn puis flambées après passage à l'alcool. L'une sert d'étau, l'autre par une torsion dirigée vers l'extérieur, coupe la graine en son milieu ; soit la plantule tombe seule, puis est récupérée dans une boite de Pétri stérile, soit elle reste logée sur l'autre moitié de la graine, dans ce cas on l'expulse délicatement. Cette opération est réalisée dans un espace stérile. (fig.17c).

Cette technique doit s'opérer autour de la région operculaire, les embryons libérés sont ensemencés sur des milieux stérilisés, aux conditions précitées, dans des tubes à essais. Ces derniers sont scellés et placés à l'obscurité dans une enceinte climatisée durant 24 heures, pour les milieux sans hormones, et 48 heures pour les milieux avec hormones, à une température de (28 ± 2) °C. Chacun des lots de cette expérimentation, sera placé sous des conditions de lumière différentes (traitements lumineux), chacun de ces lots est constitué de 24 à 36 embryons.

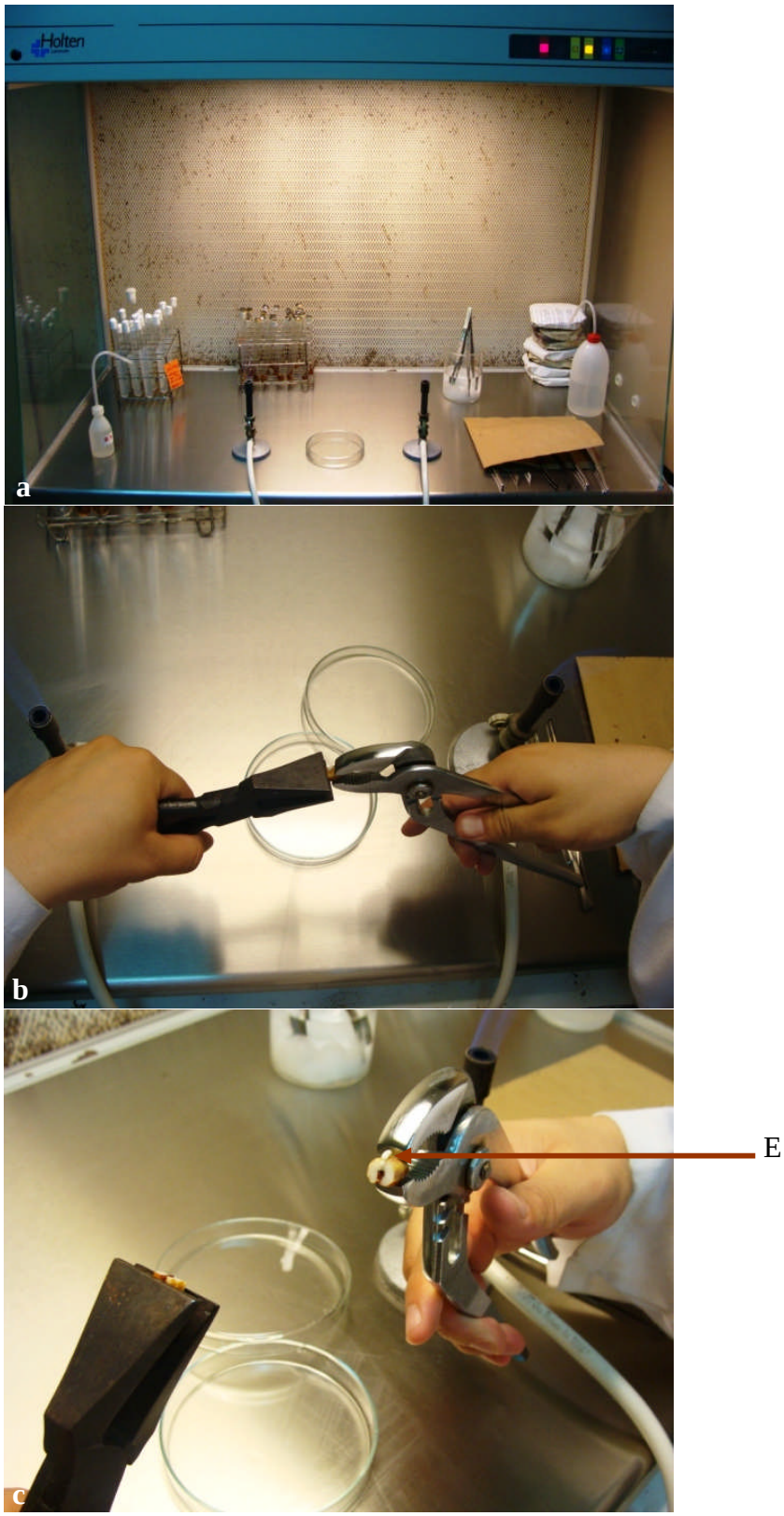


Figure 17 : Technique d'extraction des embryons du palmier dattier en condition d'asepsie selon YAKOUB-BOUGDAL (1984).

a- Disposition des instruments et du matériel dans la hotte à flux laminaire horizontal.
b- Mode opératoire.
c- Embryon (E) logé dans la graine.

2.1.4- Traitements lumineux

Dans notre étude, nous avons utilisé un certain nombre de traitements lumineux dans le but de trouver l'éclairement favorable au meilleur développement des embryons zygotiques du palmier dattier Cv. Takerboucht.

Les essais ont été conduits sur les deux milieux de base préalablement choisis, contenant 30 $g.l^{-1}$ de saccharose et solidifiés avec de l'agar à 7 $g.l^{-1}$. Les embryons mis en culture reçoivent des lumières bleue ou blanche selon les séquences suivantes :

- Condition 1 : 1 mois de lumière blanche (témoin),
- Condition 2 : 1 semaine de lumière bleue puis 3 semaines de lumière blanche,
- Condition 3 : 2 semaines de lumière bleue puis 2 semaines de lumière blanche,
- Condition 4 : 3 semaines de lumière bleue puis 1 semaine de lumière blanche,
- Condition 5 : 1 mois de lumière bleue.

La lumière bleue est produite par des tubes TL Philips dont le pic principal est de : (420 ± 12) nm; et une énergie incidente égale à 0,4 $w.m^{-2}$. La lumière blanche est produite par des tubes Osram blanc brillant, avec un pic principal de l'ordre de : (650 ± 40) nm, et une énergie incidente égale à 0,2 $w.m^{-2}$. Les lumières bleue et blanche (0,2 $w.m^{-2}$) ont une énergie quantique à peu près égale. La photopériode est toujours de 16 h de lumière et de 8 h d'obscurité (jour long), la température est maintenue à (28 ± 2) °C le jour et (26 ± 2) °C la nuit.

En plus d'un témoin à la lumière blanche, le traitement composite : une semaine de bleue suivie d'une exposition à la lumière blanche a été choisie ; le développement des embryons a été suivie sur les deux milieux MSm_1 et MSm_2 additionnés d'hormones de croissance (**tab**. **IV**).

Deux répétitions ont été réalisées par condition de milieu et traitements lumineux.

2.1.5- Observations et mesures

Le suivi de l'expérimentation consiste à observer des embryons et leur évolution durant toutes les phases de développement, et un bilan est réalisé au bout de deux mois de culture, afin de rapporter :

- Les taux de contaminations.
- Les taux de nécroses.
- Le pourcentage d'embryons initiant des racines.
- Le pourcentage d'embryons initiant des feuilles.
- Le pourcentage d'embryons ayant régénéré des plants entiers.

2.1.6- Repiquage

Les plantules mises en culture, sont soumises à des repiquages fréquents pour réduire l'émission des substances phénoliques, qui empêchent une prolifération rapide. Les

repiquages ont lieu tous les deux mois, les jeunes plantes sont prélevées aseptiquement et ensemencées sur un milieu semi solide à 4 $g.l^{-1}$ d'agar, jusqu'à la reconstitution d'une plante entière.

2.2- Techniques d'étude biochimique

2.2.1- Extraction et dosage des leucoanthocyanes

Le but de cette caractérisation a été d'extraire et de quantifier les leucoanthocyanes contenus dans les embryons mis en culture, sur les milieux MSm_1 et MSm_2, exposés à la lumière blanche, et bleue.

Selon CALERO (1989), les variations des teneurs en leucoanthocyanes reflètent les variations de sensibilité de l'embryon à la lumière pendant la culture. Nous avons donc cherché à montrer l'évolution de la sensibilité des explants à la lumière, par la mesure de leur teneur en leucoanthocyanes.

La méthode d'extraction utilisée est celle développée par LEBRETON et *al*. (1967) avec quelques modifications, portant sur la quantité de matériel végétal, par rapport au volume de l'extraction (fig. 18) (CALERO, 1989).

Les embryons sont extraits du milieu de culture et sont mis à sécher à l'air libre et à l'obscurité sur du papier filtre dans des boites de Pétri. Afin d'analyser les leucoanthocyanes, présents dans les embryons mis en culture, nous avons prélevé, une masse de 0,1 g de tissu sec, broyée au mortier dans 5 ml d'une solution contenant 4 volumes de méthanol pour un volume de HCl Normapur. Après centrifugation (10 mn à 6000 t/mn), le surnageant est porté à ébullition. L'absorption est lue à 530 nm sur un spectrophotomètre BECKMAN DU series 500. Pour mesurer le rendement en leucoanthocyanes dans les embryons, trois répétitions ont été effectuées.

Le même dosage a été effectué sur des embryons hydratés de 5 mm de long n'ayant été soumis à aucune condition de lumière et de milieu, ce qui constitue le point de départ de nos expériences.

La teneur en leucoanthocyanes est exprimé en mg/g de cyanidine et calculée par la formule suivante :

$$\mathbf{T\ (mg/g)} = \frac{\eta \times Do}{\varepsilon} \times \frac{M.V}{p.d}$$

Do : Densité optique des anthocyanes.
$\eta = 6$: Facteur correctif qui tient compte des rendements de la transformation des leucoanthocyanes et qui est d'environ 17 %.
ε : Coefficient d'absorption molaire de la cyanidine en milieu acide à 530 nm = 34700.
M : Masse molaire de la procyanidine 306 g.
V : Volume de la phase aqueuse mesuré après l'hydrolyse.
D : facteur de dilution.
p : poids sec du matériel végétal = 0.1 g.

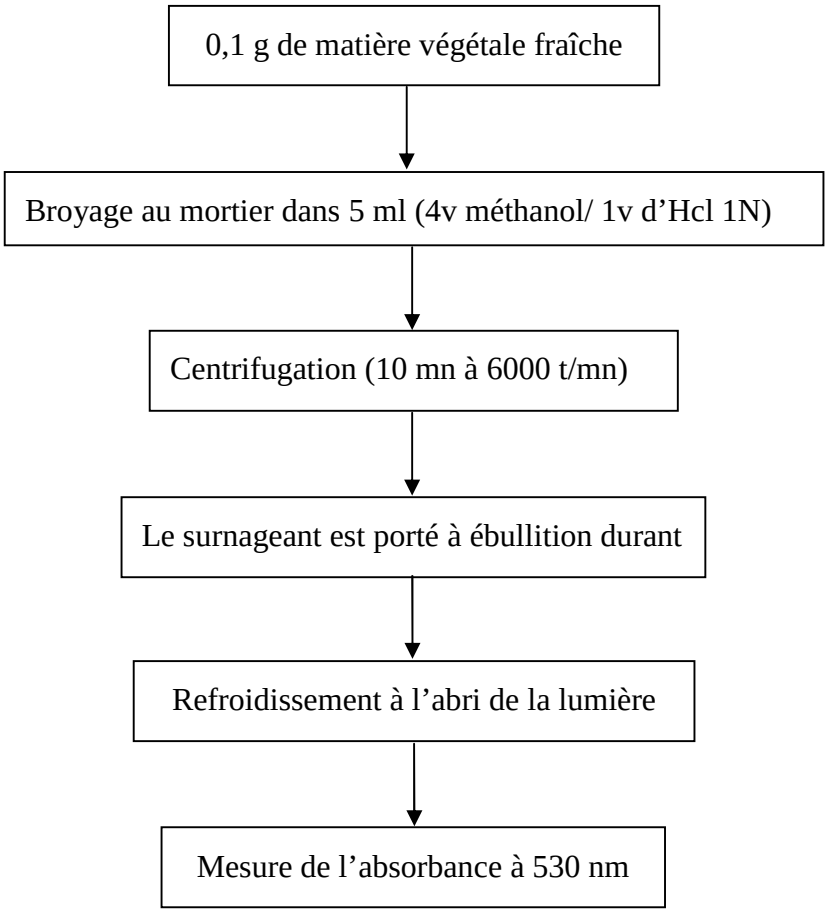


Figure 18 : Organigramme du dosage des leucoanthocyanes (CALERO, 1989).

3- Traitement de données

L'analyse statistique a été effectuée en utilisant le logiciel STAT BOX (6.4), Un dispositif complètement aléatoire a été adopté et 24 à 36 embryons ont été utilisés par traitement. Après analyse de la variance, le test de NEWMAN & KEULS est effectué lorsque le tableau de l'analyse de la variance au seuil de 5 %, révèle des différences significatives, ce qui permet de dégager des groupes homogènes (DAGNELIE, 1980).

L'analyse statistique sera représentée par l'estimation des résultats moyens, obtenus sur le test de stérilisation, les pourcentages de germination hydroponique, l'effet de la taille, de la position, de la composition minérale du milieu de culture et des traitements lumineux et hormonaux sur le développement des embryons excisés du Palmier dattier Cv. Takerboucht.

De même qu'une analyse de la variance a été effectuée, pour la teneur moyenne en leucoanthocyanes, synthétisés dans les embryons cultivés *in vitro*. Le but de cette analyse est de déterminer l'effet des traitements lumineux et de la composition des milieux de culture sur la synthèse de leucoanthocyanes, au sein d'embryons zygotiques de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) Cv Takerboucht.

Résultats et discussion

1- Morphologie de la graine mûre du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. Cv. Takerboucht

Nos recherches ont porté sur du matériel juvénile, pour observer les modalités de la germination.

1.1- Avant la germination

Une étude morphologique de la jeune plante à l'état quiescent, constitue le point de départ de nos expériences. Cette première approche nous permettra une meilleure connaissance du matériel utilisé.

La plantule est contenue dans une graine, qui elle-même, est protégée d'une membrane très fine : l'endocarpe uni à la graine; un mésocarpe charnu et fibreux, et à l'extérieur un épicarpe fin. Cet ensemble décrit de l'intérieur vers l'extérieur constitue le fruit du dattier : la datte, qui est une baie monosperme. La graine est constituée d'un albumen dur, corné, parcouru par des plis de téguments ou par des restes de nucelle. Elle est de forme oblongue, de couleur beige et possède un sillon ventral ou raphé (fig. 19a), ce qui signifie que la graine provient d'un ovule renversé. Dorsalement, on observe une petite saillie entourée d'un sillon annulaire qui nous indique l'emplacement de la plantule (fig.19b).

Les coupes longitudinales et transversales montrent que la graine est protégée d'un tégument, entourant l'albumen, qui constitue les réserves de la graine (fig. 20).

La plantule est extraite pour pouvoir apprécier sa forme, et sa taille. Les observations sont réalisées à la loupe binoculaire (fig. 21).

Avant réhydratation l'organisation que l'on observe est extrêmement sommaire. La figure 21a montre une plantule logée dans la graine. L'extraction de la plantule nous donne des dimensions précises (fig. 21b).

1.2- Germination *in-vitro* des graines

1.2.1- Méthode de désinfection

Les résultats obtenus (fig. 22), montrent que le taux de contamination dépend de la nature et la concentration de l'agent désinfectant. Ainsi, l'utilisation de l'hypochlorite de sodium *NaClO* et de l'hypochlorite de calcium $Ca(ClO)_2$ à la dose de 90 $g.l^{-1}$ et le chlorure mercurique $HgCl_2$ à la dose 0,1 $g.l^{-1}$ pour la désinfection des graines, a révélé des taux de contamination très faibles, le maximum enregistré est de 15,29 % avec du $Ca(ClO)_2$. Par conséquent, l'utilisation de ces trois stérilisants, aux concentrations et aux temps indiqués, donne les meilleurs résultats pour la stérilisation des graines de palmier dattier Cv. Tk. L'analyse de la variance (Annexe 2) montre une différence hautement significative entre les trois stérilisants utilisés (P= 0,006). Le test de NEWMAN et KEULS, au seuil de signification de 5 %, classe les trois agents désinfectants en deux groupes homogènes (Annexe 3).

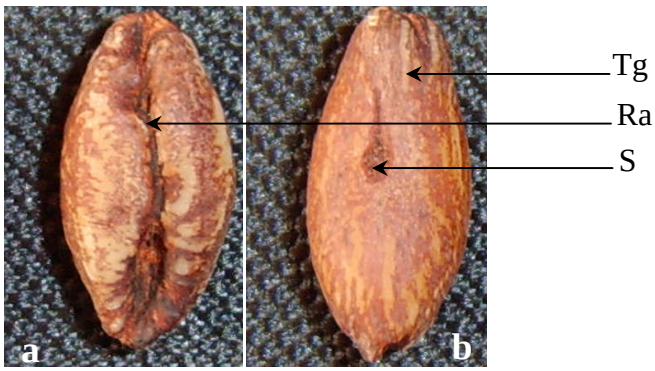


Figure 19 : Vues ventrale (a) et dorsale (b) de la graine sèche.
(Tg : tégument de la graine, Ra : raphé, S : saillie).
(G x 1)

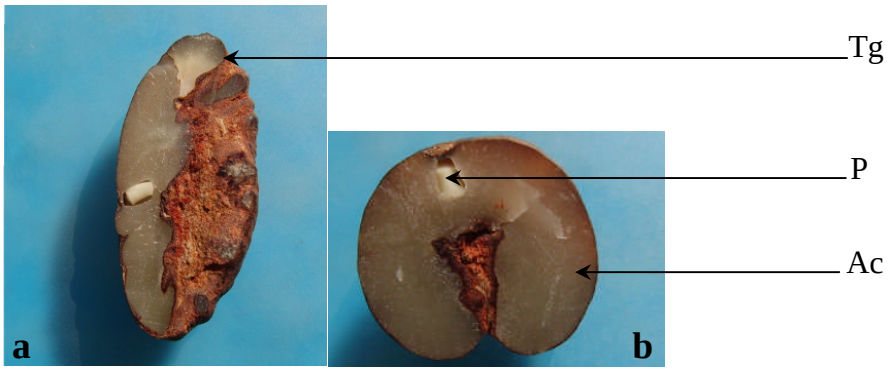


Figure 20 : Coupes, longitudinale (a) et transversale (b) de la graine sèche.
(Tg : tégument, Ac : albumen corné, P : plantule.)
(G x 1)

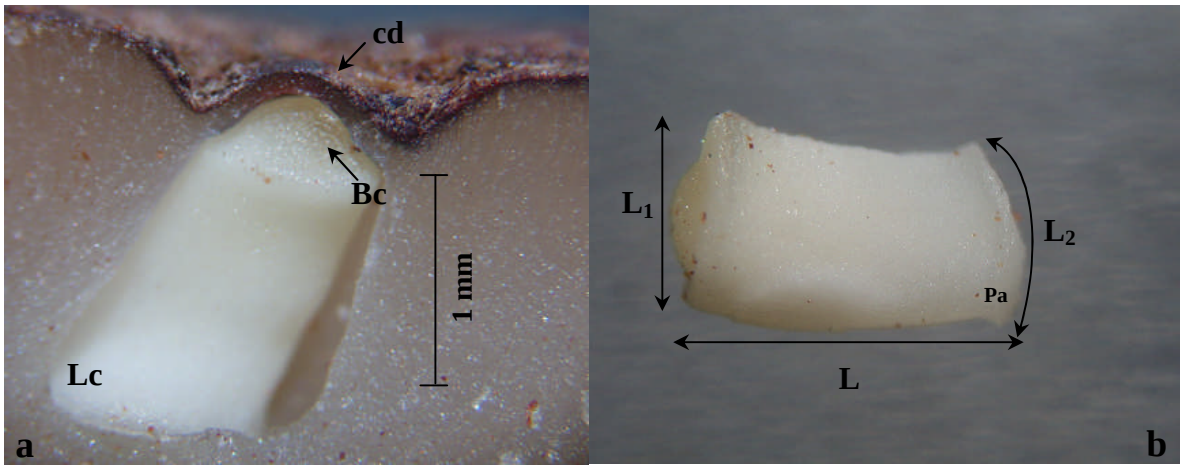


Figure 21 : Observation de la jeune plante à l'état sec.
a : Plantule logée dans une graine coupée longitudinalement.
b : Plantule excisée.
(Cd : côté dorsal de la graine sèche; Bc : bourrelet cotylédonaire contenant l'embryon; Lc : limbe cotylédonaire; Pa : papilles dans le limbe cotylédonaire).
L = 1880 μm; L_1 = 960 μm; L_2 = 880 μm.
(G x 25)

Aussi, nous avons noté une légère différence, concernant le temps de latence et le temps moyen de germination (Annexe 4) qui sont plus intéressants lorsqu'il s'agit du *NaClO*. De ce fait, nous avons opté pour l'utilisation de l'hypochlorite de sodium pour la germination des graines de la variété Takerboucht.

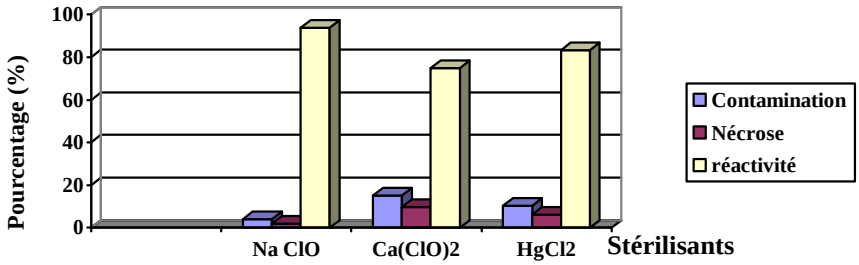


Figure 22 : Pourcentages des contaminations, nécroses et de la réactivité des embryons de palmier dattier Cv. TK.

1.2.2- Etapes morphologiques successives de la germination

Les premières études relatives à la germination des palmiers, date du début du XVI^{ème} siècle, avec les travaux de CAMERARIUS (1588). Suivent les travaux de MARTIUS (1823-1850); MICHEELS (1889); GATIN (1912); MOORE et UHL (1973); UHL et DRANSFIELD (1987); TOMLINSON (1990); TILLICH (1995, 2000). GATIN en 1912 a réalisé une étude complète sur la morphologie de la germination illustrée par des planches d'une grande exactitude.

Notre but est de suivre les différentes étapes de la germination des graines jusqu'à 1 mois (fig. 23). Rappelons que les tests effectués montrent que les graines fraîchement récoltées germent plus rapidement que celles qui ont subi une post maturation au sec.

La période entre le 1er et le 3^{è} jour correspond à l'hydratation de la semence (1ère étape de la germination, antérieure à l'étape de germination *sensu stricto*) (fig. 23a). Cette étape est caractérisée par une prise d'eau rapide. Selon COME (1970), l'absorption se fait d'abord par capillarité, puis la pression osmotique provoque un appel d'eau dans les cellules vivantes. Cette opération favorise l'accomplissement de la germination (HAMLAT, 1995). L'extraction des embryons à partir de graines sèches, s'est avéré être une opération très délicate et très difficile, à cause de la forte adhésion à l'endosperme. Par conséquent, une réhydratation de la graine rend possible l'extraction des embryons sans altérer leur viabilité (YAKOUB-BOUGDAL, 1987; 2005).

La 1ère manifestation de la germination, est un léger soulèvement de l'opercule, qui intervient au bout de 3 à 4 jours après l'imbibition. Ce soulèvement entraîne la sortie d'un bourrelet conique, de 1 mm de long, résultant de la seule élongation de la zone du pétiole cotylédonaire. Vers le 5^{è} jour le pétiole cotylédonaire atteint une longueur de 2 mm

(fig. 23b). Le pétiole cotylédonaire poursuit son allongement au 7è et au 10è jour, il mesure environ 5 mm, entraînant la plantule en dehors de la graine. Sa croissance se poursuit avec une augmentation du diamètre au niveau de la gaine (fig. 23c). GATIN (1912) et YAKOUB-BOUGDAL (1984) décrivent l'allongement comme étant un accroissement des cellules, cependant AMMAR (1978) attribue cela au phénomène de mérèse. Le phénomène d'auxèse se poursuit (fig. 23d, e). Au 21 è jour, la radicule apparaît à la base de la gaine cotylédonaire (fig. 23f). Au-delà d'un mois, des racines latérales se différencient et la gaine cotylédonaire laisse émerger la première feuille (fig. 23h).

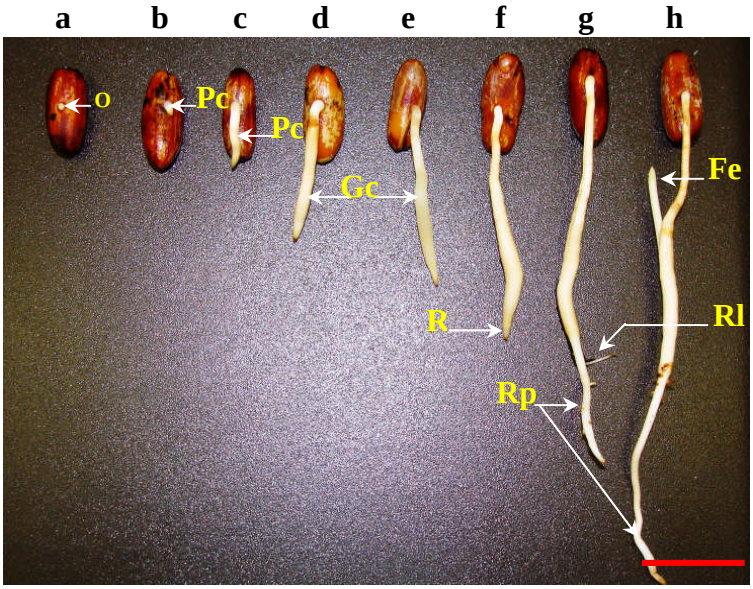


Figure 23 : Les étapes morphologiques de la germination du palmier dattier variété Takerboucht

a : soulèvement de l'opercule (O), après 3 à 4 jours.

b : vers le 5è jour de la germination, sortie du pétiole cotylédonaire (Pc).

c : 10èm jour de la germination, allongement du pétiole cotylédonaire (Pc).

d et e : allongement du pétiole cotylédonaire (Pc) et épaississement de la gaine cotylédonaire (Gc)

f : apparition de la radicule (R).

g : allongement de la racine principale (Rp) et apparition de racines latérales (Rl).

h : formation d'une jeune plante avec une première feuille engainante (Fe).

Ainsi, il convient de signaler que l'analyse de l'aspect morphologique du palmier dattier Cv. Tk nous permet de connaître les différentes étapes de développement de cette espèce.

1.2.3- Courbe de germination

La courbe de germination permet de décrire le déroulement de la vitesse de germination d'un lot de 96 graines, placé à l'obscurité à une température moyenne de (30 ± 2) °C. Ce test a été répété 30 fois pour les besoins de culture.

La figure 24 représente les résultats obtenus pour un test de germination portant sur 96 graines.

La courbe (fig. 24) correspond au type théorique, à germination regroupée dont le pourcentage de germination maximal (capacité de germination) est de 93.75 %.

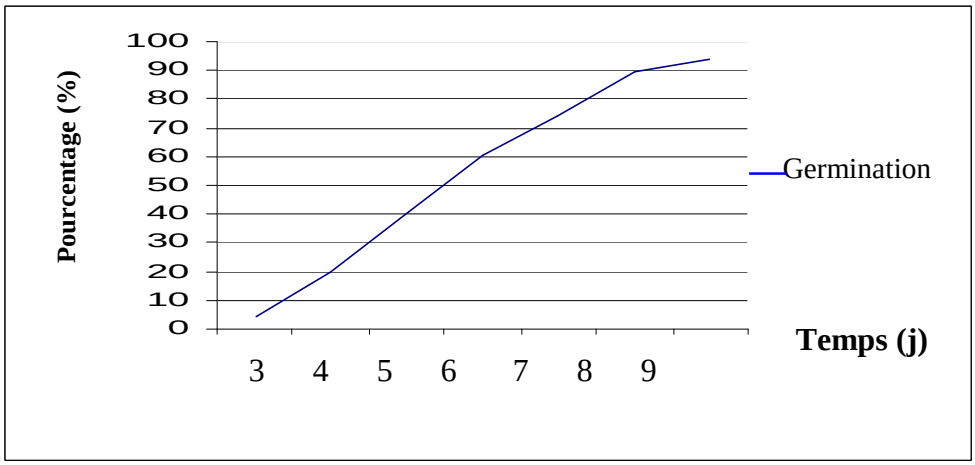


Figure 24 : Evolution des pourcentages de germination cumulés en fonction du temps (j)

La courbe de germination montre qu'aucune graine n'a germé au cours des 3 premiers jours, cette période est le temps de latence, qui exprime la durée nécessaire à la germination d'une seule semence du lot. Selon MAZLIAK (1999), cette période correspond à la prise d'eau et à l'imbibition de la graine. Entre le 3 è et le 6 è jour le pourcentage de germination augmente pour atteindre un pourcentage voisin de 45 %, cela indique que la moitié des graines du lot a germé. Entre le 6è et le 8è jour, le taux de germination est de 48.95 %, il représente le pourcentage maximal de germination, qui est atteint rapidement (47 graines germent en 3 jours). Au 9è jour la courbe augmente lentement pour atteindre son maximum (93.75 %).

Nous avons une certaine homogénéité du lot à savoir que la plupart des graines ont germé.

2- Conditions de germination des embryons

Afin de pouvoir provoquer la régénération d'un nombre maximum de plants, et pour un intérêt physiologique, il est nécessaire d'étudier d'autres facteurs qui ont un impact sur le développement des plantules, cultivées *in vitro*.

2.1- Influence de la taille

L'influence de la taille va déterminer le comportement des embryons en culture.

Le tableau (V) résume les pourcentages de contamination, de nécrose et de survie obtenus sur 24 échantillons.

Tableau V: Germination des embryons du palmier dattier var. Takerboucht à différentes tailles.

Tailles des embryons (mm)	3	5
(%) de contamination	0 %	4.17 %
(%) de nécrose	29.17 %	4.17 %
(%) de survie	70.83 %	91.67 %

Les résultats obtenus montrent que le taux de survie est plus important pour les embryons de 5 mm (91.67 %) que pour ceux de 3 mm. Au contraire les pourcentages de nécroses sont plus marqués, lorsqu'il s'agit des embryons de 3 mm avec un taux de 29.17 %.

La figure 25 illustre les résultats de germination obtenus après 2 mois de culture.

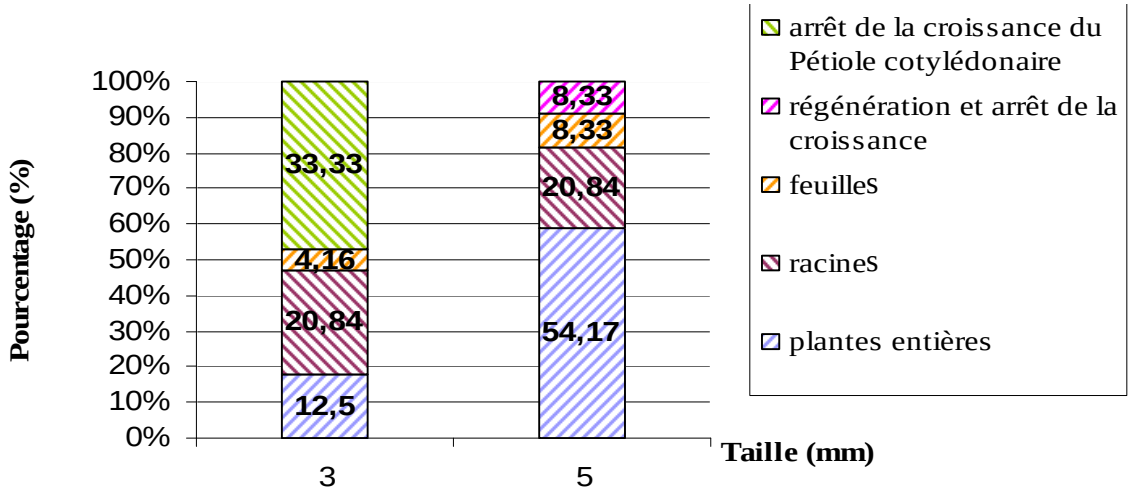


Figure 25 : Effet de la taille sur la germination des plantules du palmier dattier Cv. Tk.

La comparaison des résultats obtenus a fait ressortir que la capacité de germination des embryons est proportionnelle à leur taille. En effet 25 % des embryons de 3 mm présentent des plants entiers et 54.17 % pour ceux pris à 5 mm. On remarque aussi que la réactivité des plantules a été retardée lorsqu'il s'agit d'embryons à 3 mm, où nous observons l'arrêt de croissance du pétiole cotylédonaire après 2 mois de culture avec un pourcentage de 33.33 %. L'analyse de la variance des résultats obtenus montre que le facteur taille agit significativement sur la régénération de plants entiers (P = 0,02) (Annexe 5). Les groupes homogènes sont consignés dans l'Annexe 6.

Les figures (26 et 27), nous montrent que les mêmes développements morphologiques sont observés au niveau des embryons de 3 mm et de 5 mm. Ainsi, ces embryons se sont développés sur le milieu de base (MS), ceci est dû au faits que les deux plantules ont atteint un stade de développement physiologique qui leur permet de germer sur un milieu de culture de synthèse. Selon CHAMPAGNAT et *al*. (1969), l'embryon séparé du reste de la graine peut, s'il est parvenu à un stade de développement suffisant, être viable et se développer sur un milieu de culture artificiel.

Cependant, le temps de réactivité ainsi que la capacité de germination sont moins importants lorsqu'il s'agit d'embryons à 3 mm. Aussi l'importance de la taille apparaît, au niveau du développement des embryons de 3 mm (fig. 26c), qui sont moins vigoureux par rapport à ceux de 5 mm (fig. 27d) après 2 mois de culture. Ainsi, l'optimisation de la réponse des embryons de 5 mm peut être attribuée aux hormones endogènes, qui sont en quantité plus élevée chez les embryons de 5 que ceux de 3 mm. Ce qui est confirmé par les travaux de YAKOUB-BOUGDAL (2005), qui en travaillant sur les embryons zygotiques du palmier dattier Cv. Deglet-Nour, signale, l'existence d'une différence au niveau de l'organisation du méristème caulinaire des embryons. L'étude cytologique du MAC (méristème apical caulinaire) des embryons de 3 mm montre un primordium foliaire alors que celui de 5 mm montre deux ébauches foliaires. Par conséquent, l'état physiologique est bien avancé pour les embryons de 5 mm, ce qui explique leur bon développement sur le milieu de culture. Cela rejoint les conclusions de AUGE (1989) : en culture *in vitro*, il existe une taille minimum qui correspond au dôme méristématique accompagné de deux primordia foliaires. En dessous de cette taille, la survie des explants, quelque soit leur nature, est très difficile et les échecs sont très nombreux.

Par ailleurs MONNIER (1995), signale que la taille des embryons est importante pour la croissance ou l'orientation, soit vers une organogenèse ou une embryogenèse. Ces observations ont été confirmées par les travaux de EL HADRAMI (1995), qui a constaté que les embryons les moins développés, sont un matériel de choix et conduisent à de meilleurs résultats lorsqu'il s'agit d'obtenir précisément des embryons somatiques chez le palmier dattier. De plus le potentiel embryogène de celui-ci est fonction de son stade de développement. En effet, les embryons les moins développés (1 mm) conduisent à de

meilleurs résultats que ceux plus développés (2-3 mm). Des résultats similaires ont été signalés par BARWALE et *al*. (1986), TETU et *al*. (1987) chez le soja et par MAHESWARAN et WILLIAMS (1986) chez *Brassica campestris*.

De même, les taux élevés de nécroses avec un faible taux de reprise des embryons de 3 mm (12,5 %) peuvent être attribués selon MONNIER (1995), à certaines concentrations des différents éléments composants le milieu MS (1962), qui peuvent être toxiques pour ces embryons de petite taille. En effet, le développement et la croissance des embryons cultivés *in vitro* est sous la dépendance de la composition des milieux, en sels minéraux et en composés organiques (AUGE et *al*., 1989; MONNIER, 1995). Il est donc possible que certains éléments du MS tel que : $KNO_{3,}$ NH_4 et le NO_3 par leur forte concentration devenant toxiques, réduisent la survie des embryons.

De ce fait, et pour nos objectifs expérimentaux, nous pouvons retenir la taille de 5 mm, pour la germination des plantules du palmier dattier Cv. Tk., car elle influe aussi bien sur le temps de réactivité que sur la capacité de germination.

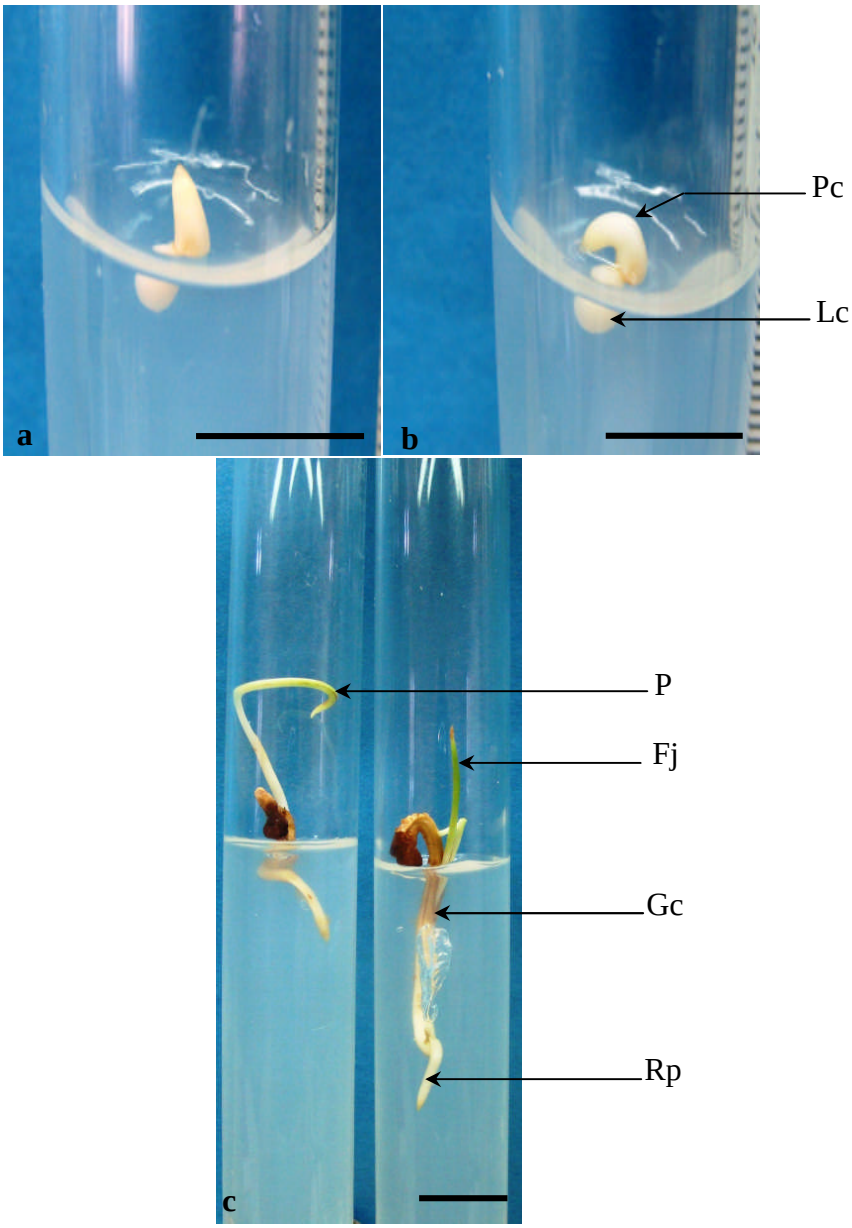


Figure 26 : Développement des embryons de palmier dattier Cv. Tk, de 3 mm, cultivés sur le milieu MS (1962).

a : Stade initial.

b : Embryon dont le Pétiole cotylédonaire pointe vers le milieu, après 3 jours de culture.

c : Développement de la partie caulinaire et racinaire chez les jeunes plantes après 8 semaines de culture

(Fj : feuille juvénile ; P : plumule ; Gc : gaine cotylédonaire ; Lc : limbe cotylédonaire ; Pc : pétiole cotylédonaire ; Rp : racine principale).

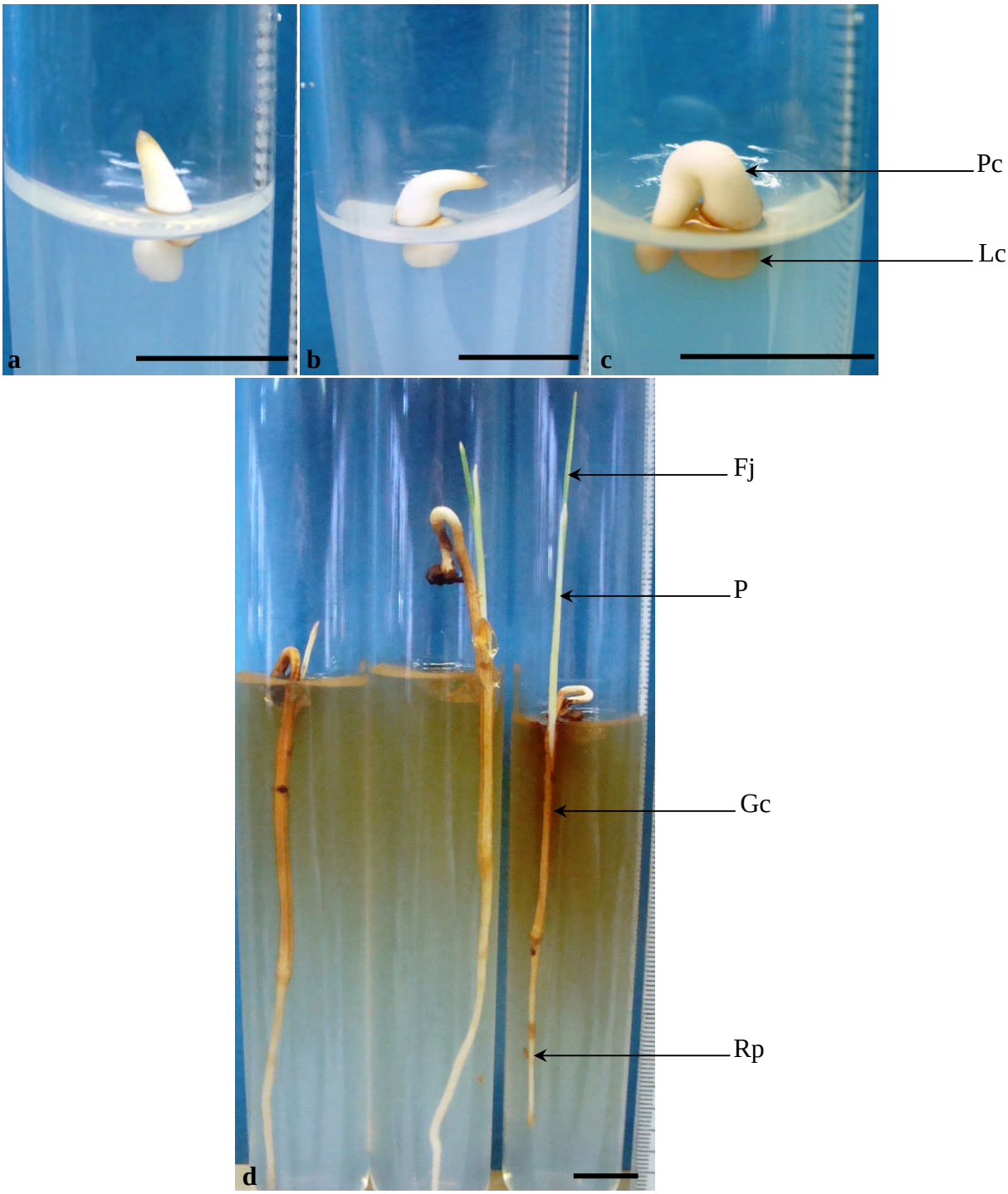


Figure 27 : Développement des embryons de palmier dattier Cv. Tk, de 5 mm, en position debout, cultivés sur le milieu MS (1962)

a : Stade initial, longueur de l'embryon : 5 mm.

b : Embryon dont le Pétiole cotylédonaire pointe vers le milieu. Après 24 h de culture.

c : Pétiole et Limbe cotylédonaire augmentent de volume avec la pénétration du Pc dans le milieu. après 2 jours de culture

d : Jeune plantes après 8 semaines de culture, apparition de la feuille juvénile.

(Fj : feuille juvénile ; P : plumule ; Gc : gaine cotylédonaire ; Lc : limbe cotylédonaire ; Pc : pétiole cotylédonaire ; Rp : racine principale).

2.2- Influence de la position

Dans le but de mettre en évidence la polarité de l'embryon nous avons ensemencé des embryons en position debout [(1)] et en position couchée.

Les embryons en position debout présentent une réactivité plus importante que les embryons en position couchée. Le tableau (VI) et la figure (28) résument les résultats obtenus après 2 mois de culture.

Tableau VI : Influence de la position sur le pourcentage de contamination, de nécrose et de survie.

Position des embryons	à plat	debout
% de contamination	25 %	4,17 %
% de nécrose	25 %	4,17 %
% de survie	50 %	91,67 %

L'analyse des résultats du tableau (VI) montre que les embryons germent aussi bien à plat sur le milieu qu'en position debout. Il en ressort, que le respect de la polarité chez les embryons du palmier dattier Cv. Tk., n'est pas une condition sine et qua non pour la germination, ce qui est confirmé par les observations faites par YAKOUB-BOUGDAL (1987) sur la Cv. Deglet nour. Cependant, les embryons en position debout présentent une germination plus homogène que ceux posés à plat sur le milieu (fig. 28).

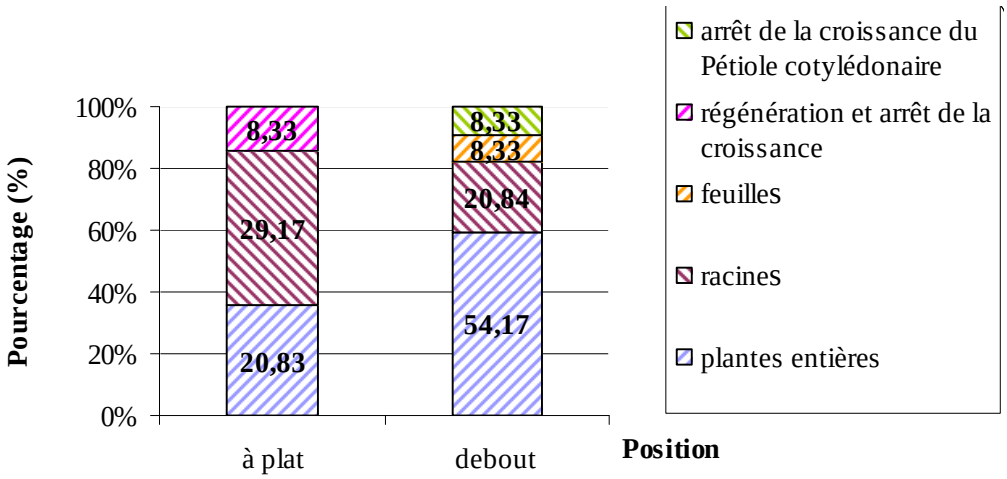


Figure 28 : Effet de la position sur la germination des plantules du palmier dattier Cv. Tk.

Les observations faites sur la germination des plantules (fig. 28) montrent que les taux de régénération les plus élevés sont enregistrés pour les embryons en position debout avec un taux de 54.17 %. Ce taux est beaucoup plus élevé que pour les embryons posés à plat sur le milieu où le taux est de 20.83 %. Ainsi, les résultats ont mis en évidence l'effet positif de la position debout sur la réactivité des embryons cultivés sur le milieu MS (1962), ce qui à

(1) la position debout Pc dans le milieu ne stimule pas le développement des embryons dans nos conditions.

permis de réduire le temps d'expression des embryons et d'améliorer les pourcentage de germination.

La comparaison des résultats obtenus sur les figures 27 et 29 montre qu'en position debout, le pétiole cotylédonaire tend à se courber et à se diriger vers le milieu de culture après 24 h (fig. 27b), en outre, les jeunes plantes sont de grandes tailles et avec un bon aspect morphologique (fig. 27c). Contrairement aux embryons cultivés en position couchée ou un retard de 2 jours dans la réactivité et enregistrés, aussi, les plantes à la fin de la durée de l'expérimentation sont peu développées (fig. 29c). De plus, ils ont conduit à la formation d'un nombre élevé de racines 29.17 % sans développement de la partie caulinaire.

L'analyse de la variance a fait apparaître une différence significative (P = 0,02) entre les deux positions pour le cultivar Tk (Annexe 7). Le test de NEWMAN et KEULS, au seuil de 5 %, classe les deux positions dans deux groupes homogènes. Le groupe A comprend la position debout avec une moyenne de 54 % de plants régénérés. Le groupe B correspond à la position des embryons à plat sur le milieu avec une moyenne de 12,65 % de plants régénérés.

L'avantage des embryons en position debout peut s'expliquer par le fait du rôle que joue le limbe cotylédonaire au niveau de l'embryon. En effet, le limbe cotylédonaire assure la digestion de l'albumen lors de la germination hydroponique (GATIN, 1912). Ainsi, sur un milieu de culture, l'embryon posé à plat, se retrouve en contact partiel avec le milieu. En position debout, par contre, il a plus de contact avec la solution nutritive ce qui peut expliquer en partie la vitesse de la germination élevée. Aussi, le bon développement des feuilles issues des plantules revient en plus au fait du recourbement des embryons, qui par ce mouvement facilitent la fente du pétiole et par conséquent l'émergence de la plumule.

Selon ODETOLA (1987) les graines de dattier ne présentent pas de dormance, alors que leur capacité de germination peut être atténuée par le temps qui sépare leur récolte, de leur ensemencement (RHISS, 1980). De ce fait, en comparant nos résultats avec ceux obtenus par STITI (1992) sur des germinations du palmier dattier Cv. Takerboucht, dans les mêmes conditions (position, milieu et photopériode), on remarque que le taux de survie (91.67 %) est bien plus supérieur à celui obtenu par STITI (58.3 %). Ceci revient au fait que les graines utilisées au cours de notre expérimentation sont fraîchement récoltées (récolte 2007/2008). Cette différence est appuyée par les résultats de la germination des graines en *in-vitro* (germination hydroponique). En effet, nous remarquons que le temps de latence ainsi que la vitesse de germination sont différents ; respectivement, 3 et 6 jours dans notre expérimentation, 7 et 14 jours au cours de l'expérimentation de STITI (1992).

Parallèlement aux embryons du palmier dattier, selon HAMLAT (1995), ceux de l'olivier var. Chemlal, cultivés en position debout donnent un meilleur résultat par rapport à ceux cultivés à plat.

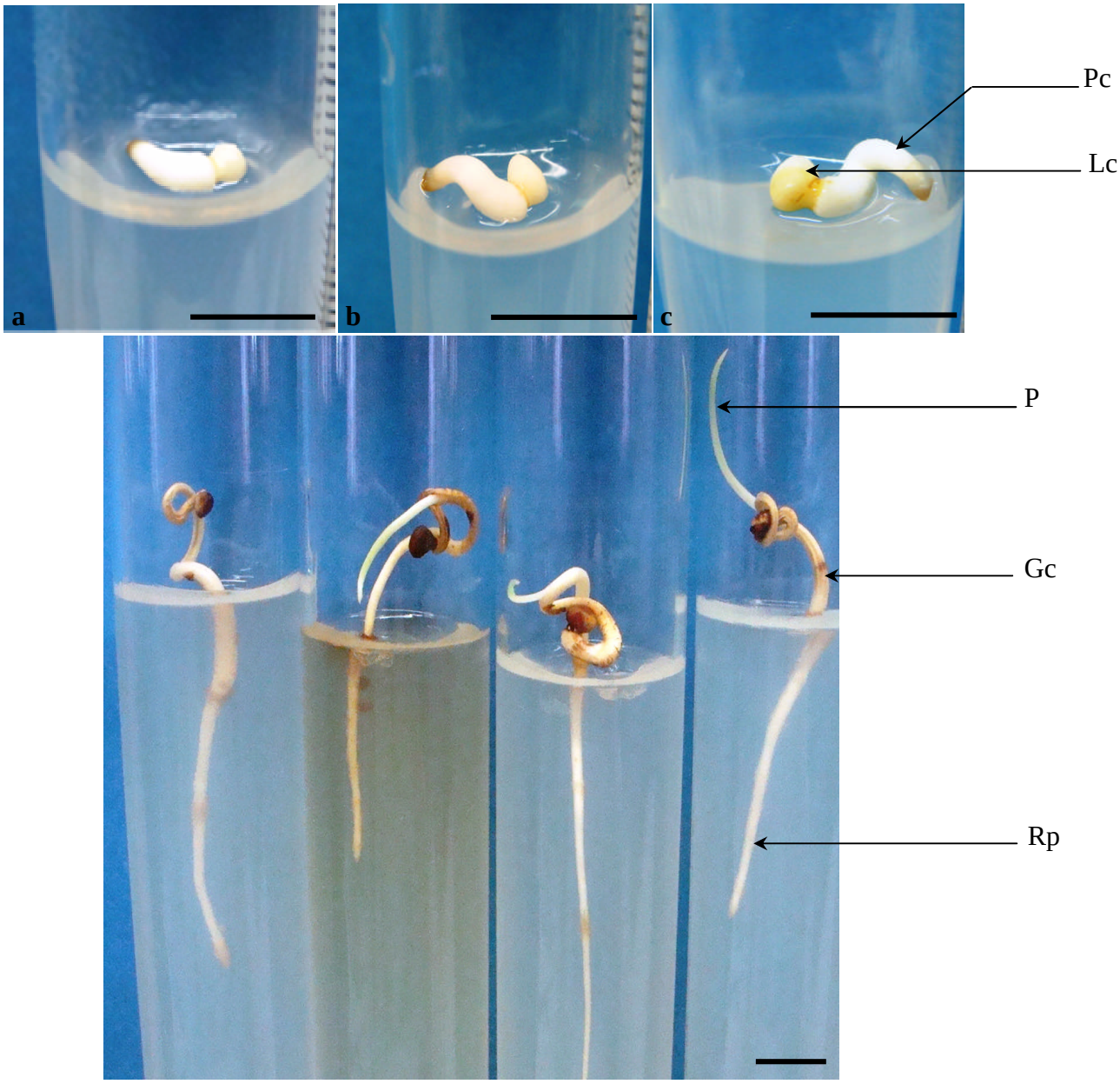


Figure 29 : Développement des embryons de palmier dattier Cv. Tk, cultivés à plat sur le milieu de base MS (1962)

a : Stade initial

b : Embryons dont le pétiole cotylédonaire (Pc) point dans le milieu. Après 2 jours de culture.

c : Le Limbe cotylédonaire (Lc) s'élargit à la base après 3 jours de culture

d : Jeunes plantes à 8 semaines de culture, constituées de plumules (P) et d'une racine principale (Rp).

HAMLAT (1995) attribue le bon développement des embryons de l'olivier, au fait du respect de la polarité, au contraire les embryons du pommier présentent une meilleure germination en position couchée (COME, 1970).

Par conséquent, La position debout des embryons sur le milieu, a non seulement eu un effet favorable sur la croissance, mais influe aussi sur le temps d'expression des plantules (temps moyen de germination). Ainsi, nous pouvons retenir cette position, pour la germination des plantules du palmier dattier Cv. Tk.

2.3- Influence de la suppression de l'haustorium et de la gaine cotylédonaire

L'étude de la suppression de l'haustorium et de la gaine sur le développement des embryons, montre que les embryons ayant une plumule de 2 à 4 cm présentent un taux de mortalité équivalent à celui des embryons entiers au même stade de développement.

Après 4 mois de culture, le développement des jeunes plantes pourvues de l'haustorium a abouti à 75 %, par rapport à 66 % de jeunes plantes, sans haustorium et sans la gaine cotylédonaire qui se sont développées (Tab. VII) et (Fig. 30).

Tableau VII : Développement des embryons, avec ou sans haustorium, sur le milieu MS (1962). (L'expérience a porté sur 36 échantillons).

Matériel	Embryons avec haustorium	Embryons sans haustorium
Etat de développement	Plumule 2 à 4 cm.	Plumule 2 à 4 cm.
Taux de mortalité à 1 mois	0 %	0 %
Nombre de plantules ayant une racine et une feuille à 4 mois	75 %	66 %

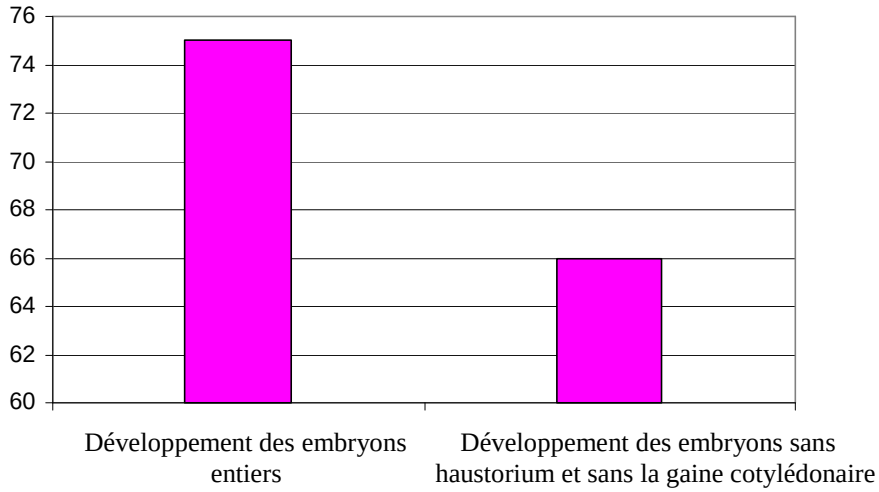


Figure 30 : Influence de la suppression de l'haustorium et de la gaine cotylédonaire sur le développement des embryons de palmier dattier Cv. Takerboucht.

Les résultats montrent que les jeunes plantes avec une gemmule de 2 à 4 cm se sont développées sur le milieu MS malgré l'ablation de leur haustorium et la suppression de la gaine cotylédonaire. En outre, après 4 mois de culture, le nombre de jeunes plantes ayant une feuille étalée (24/36) (fig. 31a) n'a pas été significativement différent de celui qui est observé chez les jeunes plants entiers (27/36) (fig. 31b) (P = 0,6) (Annexe 9). Cependant, le taux de brunissement des milieux était très important pour ces derniers. Cela peut s'expliquer par le fait que l'haustorium et la gaine cotylédonaire tendent à se séparer du reste de la jeune plante au fur est à mesure que cette dernière devient autotrophe.

Ainsi, le brunissement de l'haustorium et de la gaine cotylédonaire provoquent un retard dans le développement des jeunes plants, suite à l'émission de phénols dans le milieu. Il a été donc nécessaire d'effectuer des repiquages plus fréquents au lot des jeunes plantes entières afin de réduire la quantité de polyphénols présente dans le milieu.

Nos résultats corroborent ceux de ASSY BAH (1989), sur le cocotier, cet auteur a rapporté que la suppression de l'haustorium des jeunes plantes, au stade gemmule 2 à 4 cm, n'avait pas inhibé le développement foliaire mais, au contraire, avait permis le développement simultané et régulier du système foliaire et radiculaire.

Aussi, ASSY BAH (1989), a remarqué que l'ablation de l'haustorium, chez les jeunes plants de cocotier, confère à ces derniers, la capacité de bien se développer en conditions naturelles de culture, avec un taux de survie de 92 %, comparativement aux embryons qui ont gardé l'haustorium où le taux était de 49 % durant les premières étapes de l'acclimatation.

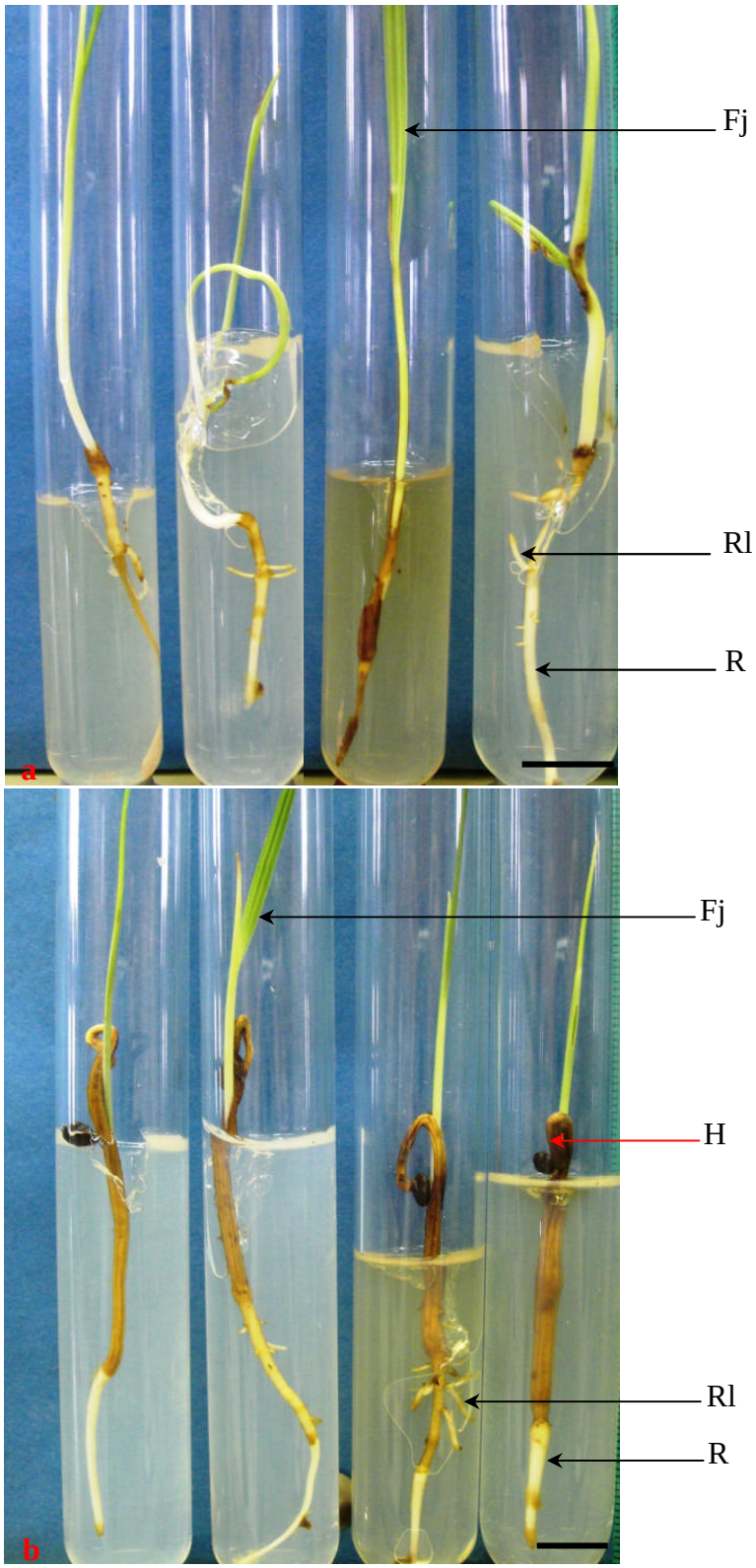


Figure 31 : Développement des jeunes plants de palmier dattier Cv. Tk, cultivés sur le milieu de base MS (1962) après 4 mois de culture. (Fj : feuille juvénile; R : racine; Rl : racines latérales).

a : Jeunes plantes sans haustorium (H) et sans gaine cotylédonaire (le développement de la partie caulinaire est important, avec l'apparition de feuilles juvéniles).

b : Jeunes plants entiers (le brunissement apparaît, on note aussi l'apparition de feuille juvénile)

3- Multiplication des embryons par culture *in vitro*

Après avoir étudié dans un premier temps les conditions pour une meilleure germination, nous allons aborder dans un premier lieu les résultats de la culture *in-vitro* sous l'effet d'un traitement de lumière bleue afin de déterminer l'éclairement le plus favorable et quantifier les teneurs en leucoanthocyanes des embryons en culture. En dernier lieu, nous donnerons les résultats de l'influence des phytohormones associées à un traitement en lumière bleue sur la germination.

3.1- Description de la germination

Pour mieux saisir la manifestation morphologique de la germination *in vitro*, nous donnons les principales étapes de cette évolution.

En réunissant toutes les conditions adéquates à la culture des embryons, le comportement de la plantule excisée de la graine après réhydratation et mise en culture sur milieu MS (1962) se traduit par (fig. 32) :

- Stade I : Augmentation en volume de l'embryon et cela suite à l'absorption d'eau, des sels minéraux et d'éléments nutritifs présents dans le milieu, avec un léger recourbement du pétiole cotylédonaire à la fin du stade.
- Stade II : Courbure et allongement de l'embryon au niveau du pétiole cotylédonaire, qui pointe vers le milieu et transformation de son limbe cotylédonaire en boule donnant à l'embryon l'aspect de « clou de girofle » après trois jours de culture.
- Stade III : Apparition de la plumule, la 1ère feuille engainant, les suivantes sont du type juvénile.
- Stade IV : Apparition de la radicule (racine principale) sur laquelle, se développent des racines latérales.

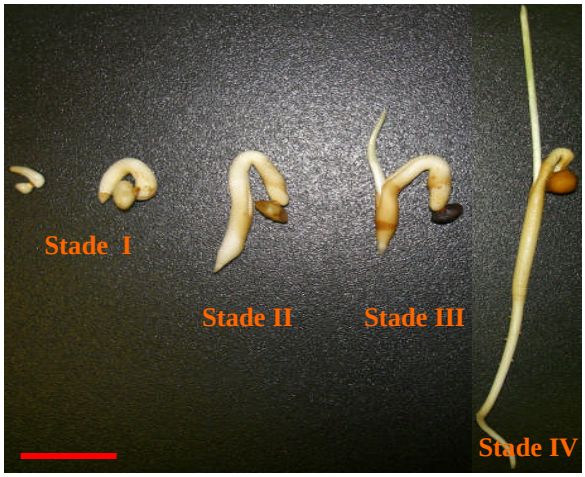


Figure 32 : Description de la germination *in vitro* d'embryons excisés de la variété Takerboucht cultivés sur le milieu de MS (1962).

Nous constatons conformément aux observations décrites par RABECHAULT (1962) sur le palmier à huile, YAKOUB-BOUGDAL (1987, 2005) sur le palmier dattier Cv. Deglet Nour, qu'il y a d'abord l'apparition de la feuille puis la racine se forme ultérieurement.

3.2- Influence des milieux de culture

L'analyse des résultats (fig. 33) montre que les embryons mis en culture germent aussi bien sur le milieu MS, les MS modifiés (MSm_1 et MSm_2), DKW et GA. Par contre, les pourcentages d'obtention de plants entiers sont nettement supérieurs sur les milieux MSm_1 et MSm_2 respectivement de 100 % et de 91,67 %. Cependant, les essais réalisés dans ce cas n'affichent aucune différence significative entre ces deux milieux (Annexe 11). Néanmoins, les embryons développés sur le MSm_2 ont un aspect qualitatif meilleur (fig. 34).

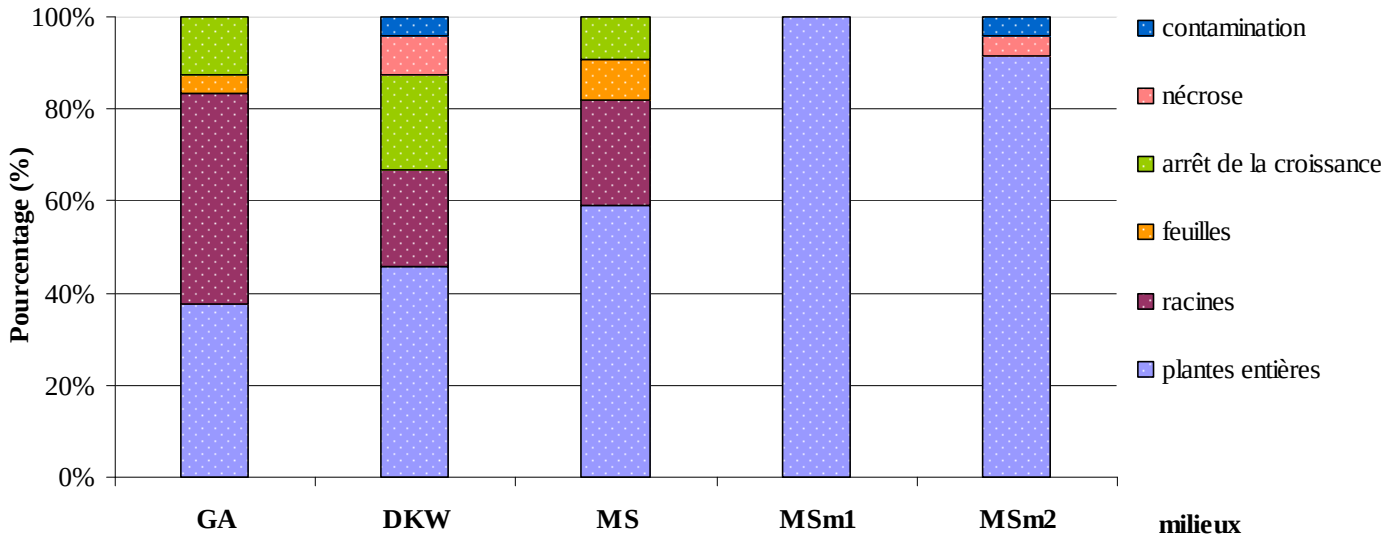


Figure 33 : Effet des milieux testés sur la germination des plantules du palmier dattier Cv. Tk

L'étude révèle aussi, que les mêmes développements morphologiques sont observés au niveau des 5 milieux témoins, sauf que la nature et la durée des réponses sont différentes :

Effectivement, la comparaison entre la réactivité des embryons sur les milieux MS, DKW, et GA montre que seules quelques plantules se sont différenciées sur milieu MS (54.17 %) et avec un degré moindre sur les milieux DKW et GA avec des taux respectifs de 45.83 % et de 37.5 %.

Sur la solution de macroélément de DKW, on note une réponse rapide par rapport au MS et GA (apparition de la 1ère racine, après 18 jours de culture). L'effet bénéfique de cette solution minérale est dû peut-être à sa concentration ionique qui est faible en KNO_3 et à sa richesse en d'autres constituants, qui ne sont pas présents, ou en quantité moindre, dans les solution MS et GA particulièrement le K_2SO_4, $Ca(NO_3)_2$ $4H_2O$ (BAGHDADI, 2007).

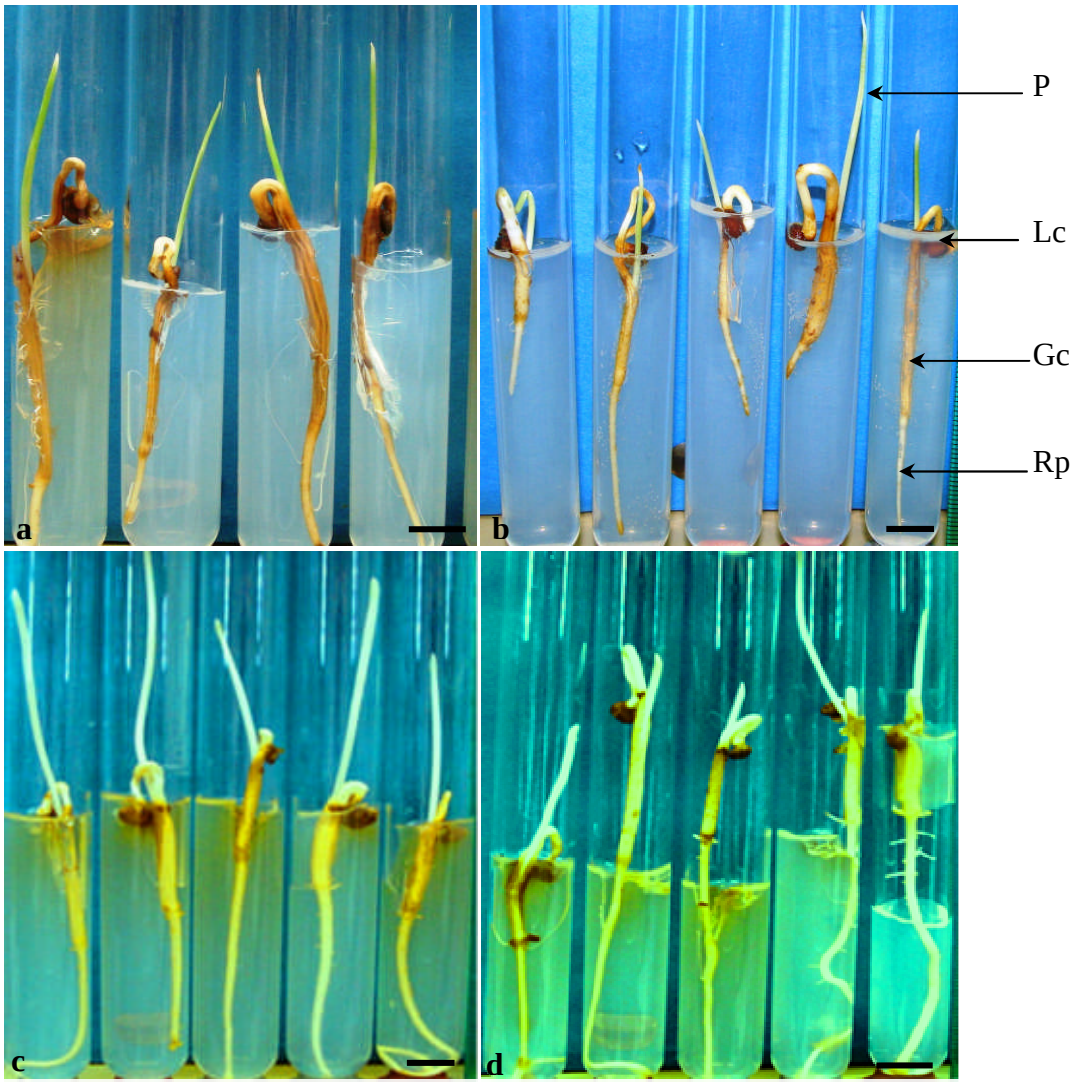


Figure 34 : Comportement des jeunes plantes du palmier dattier Cv. TK., à 2 mois de culture sur les milieux.
a : DKW (les plants présentent des racines courtes),
b : GA (les plants sont chétif),
c : MSm_1 (plants constitués de plumules à limbe plus large et d'une racine principale),
d : MSm_2 (apparition de racines latérales).
(P : plumule, Lc : limbe cotylédonaire, Gc : gaine cotylédonaire, Rl : racine latérale, Rp : racine principale).

Progressivement le développement est meilleur sur le milieu MS, où la réactivité des embryons était plus longue (apparition de la 1ère feuille après 21 jours de culture), ce développement est peut être dû à la richesse du MS en ions NH_4NO_3 dont le rôle permet la différenciation des embryons (MONNIER, 1976 et 1995). Nos résultats infirment ceux obtenus par BAGHDADI (2007) sur le pistachier (*Pistacia vera* L. et *Pistacia atlantica* Desf). La réactivité des embryons ensemencés dans le MS a révélé un taux faible. Par contre la solution de macroéléments de DRIVER et KUNIYUKI (1984) (DKW) à un taux de germination de 90 %. BAGHDADI (2007) indique que la réactivité des embryons a été entravée par la concentration de certains éléments composant le MS, qui ont été toxiques lors des premiers stades de développement des embryons du pistachier.

Aussi la comparaison de la composition minérale du Gamborg, DKW avec celle de MS, montre qu'il y a là une absence ou présence à de faibles concentrations d'éléments essentiels pour le développement convenable des embryons sans albumen. Cette comparaison est confirmée par l'étude de MONNIER (1995) sur l'influence de chaque élément du MS sur la croissance des embryons de *Capsella bursa-pastoris* :

- L'absence de la glutamine dans le milieu GA qui exalte la croissance des embryons en fait un facteur limitant.
- l'élément phosphore qui est déterminant dans la constitution des tissus et de la croissance, ainsi que le Mg SO_4 $7H_2O$ du MS et du DKW, nécessaires aux besoins des embryons sont à des taux inférieurs dans le milieu GA.
- Egalement la concentration en oligo-éléments déterminante pour la croissance est dans le GA inférieure à celle du MS et DKW.

Selon MONNIER (1995), le fer et le calcium influent particulièrement sur le taux de survie et la réactivité des embryons en culture. Le Ca^{2+} est un antioxydant intervenant positivement sur la survie, en jouant un rôle fondamental dans la perméabilité. Le calcium empêche la pénétration des éléments devenant toxiques, suite à leur accumulation dans les tissus. Selon ce même auteur, l'augmentation de la concentration de calcium, permet d'élever le taux de survie, même si les quantités sont supérieures à celles contenues dans le MS, cela confirme nos résultats de culture. Aussi, la solution minérale DKW contient deux fois plus de calcium que le MS. Cet élément est complètement absent dans le milieu GA, ce qui peut expliquer le faible pourcentage de réactivité des embryons cultivés sur le milieu de Gamborg.

En outre, sur les milieux MS et GA, nous avons noter deux types de réponses : développement du méristème apical caulinaire (MAC) avec une rhizogenèse. Le deuxième type de réponse correspond au développement du méristème racinaire (MAR) qui inhibe la caulogénèse. Ces mêmes observations dans les mêmes conditions ont été signalées par RABECHAULT (1976) sur le palmier à huile, AMMAR (1978) sur le palmier dattier (Cv. Deglet nour) et STITI (1992) sur le palmier dattier (Cv. Takerboucht). Ce qui corrobore les

observations de DAVID (1972) sur le pin maritime, selon lequel les solutions minérales riches en azote nitrique, ont un effet caulogène et favoriseraient la formation de bourgeons.

De ce fait, il est clair que les sels minéraux déterminent le développement des embryons et que par conséquent, les milieux GA et DKW ne semblent pas convenir à la culture d'embryons du palmier dattier (var. Takerboucht).

Les plantules des milieux MSm_1, MSm_2 et MS par leurs différentes réponses enregistrées présentent un comportement hétérogène dont les résultats se résument ainsi :

- Pour les milieux MSm_1 et MSm_2, les plants présentent un développement équilibré entre la partie foliaire et la partie racinaire, de plus les temps moyens de germination sont réduits de moitié par rapport au MS, où les plants possèdent un système foliaire plus développé que le système racinaire.
- En ce qui concerne le MSm_1 et le MSm_2, la présence de l'adénine et la biotine sur MSm_1 et l'augmentation de la concentration en fer sur MSm_2, a modifié le comportement des embryons. Peut être y a-t-il là une confirmation d'une part pour MSm_1 de l'action bénéfique, simultanée, de l'adénine et la biotine sur l'allongement des plumules et l'obtention de plants vigoureux. D'autre part, pour MSm_2 de l'action des fortes concentrations en fer sur le bon développement du système racinaire avec l'apparition de racines latérales. Nos résultats confirment ceux obtenus par RHISS (1980) et YAKOUB-BOUGDAL (1984, 1987 et 2005).

Il arrive, parfois, que l'haustorium verdisse à la lumière, ce qui nous amènerait à penser à l'existence d'une certaine similitude avec quelques caractéristiques structurales de la feuille. Cette même observation a été rapportée par RABECHAULT (1976).

A cela, nous avons constaté pour certaines plantules une diminution de la teneur des feuilles en chlorophylle et dans quelques cas un aspect vitreux, plus ou moins translucide de celles-ci. Cette chlorose peut être induite conformément au cas observé par MONNIER (1978) au niveau de la culture d'embryons du coco nain, à la richesse du MS en sels particulièrement le nitrate d'ammonium, qui semble être l'un des facteurs activateurs de la vitrification.

Cette étape de notre expérimentation, par comparaison au processus de germination hydroponique, nous a permis de savoir que la plantule réhydratée, *in situ* en absence de ses réserves naturelles (albumen), peut se développer normalement en plants, par substitution d'un milieu minéral adéquat, additionné d'une source de carbone et que la réussite de ce développement dépend étroitement de la qualité, et de la quantité des éléments nutritifs qui entrent dans la composition du milieu exogène.

3.3- Influence des traitements lumineux

Dans cette étude, nous avons utilisé des traitements lumineux dans le but de trouver l'éclairement favorable au bon développement des embryons zygotiques du palmier dattier Cv. Takerboucht.

Les essais conduits sur les deux milieux MSm_1 et MSm_2 donnent les résultats de la figure 35.

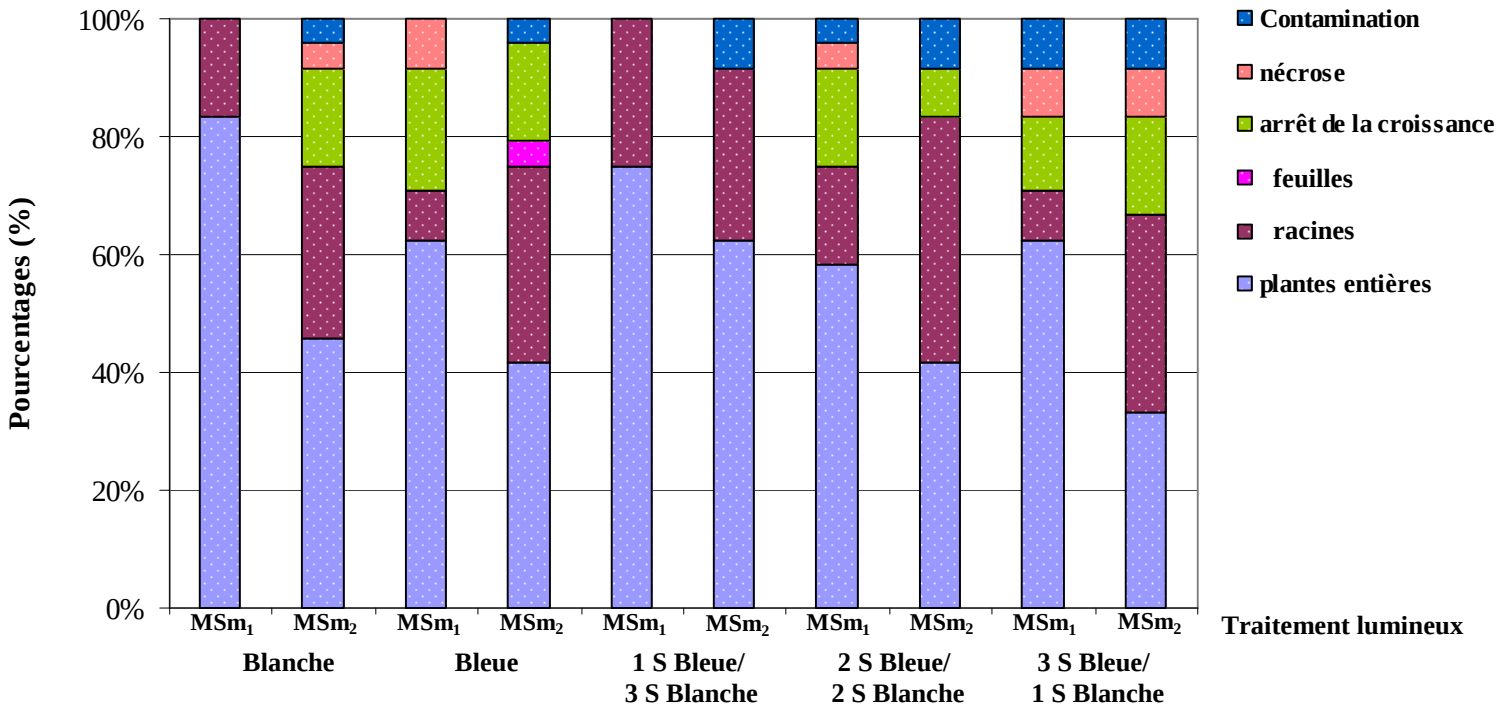


Figure 35 : Influence de la lumière sur la germination des embryons de palmier dattier Cv. Tk (résultats obtenus après 1 mois de culture).

Après un mois de culture, les résultats montrent qu'il existe des différences entre les taux de régénération des embryons, sur un même milieu, en fonction du traitement appliqué. Cette différence varie suivant que les plantules sont soumises à la lumière blanche, aux radiations bleues, ou à un traitement composite (radiations bleues puis un transfert sous lumière blanche). Nous remarquons aussi que le taux le plus élevé est enregistré sur le milieu MSm_1 sous lumière blanche 83.33 %. Alors que le taux le plus faible se retrouve sur MSm_2 sous l'effet d'un traitement prolongé en lumière bleue (3 semaines) avec un taux de 33.33 %. L'analyse de la variance des résultats obtenus, montre que le facteur lumière agit significativement sur la régénération de plants entiers (P = 0,01) (Annexe 12). Les groupes homogènes sont consignés dans l'Annexe 13.

L'action stimulatrice de la lumière sur le développement des plantules en culture *in vitro* est évidente. En effet, la lumière influe aussi bien sur le taux de régénération, sur le développement ainsi que sur le bourgeonnement des embryons. Ces résultats sont en accord avec la constatation exprimée par d'autres chercheurs notamment RHISS (1980) et YAKOUB-BOUGDAL (1984).

Les plantules ayant séjourné sous la lumière blanche, présentent un développement harmonieux avec une capacité de germination moyenne. En effet, sur MSm_1 les jeunes plantes montrent des racines longues avec des feuilles, légèrement chlorophylliennes (fig. 36a). Sur MSm_2, les plantes présentent en plus de la racine principale des racines latérales (fig. 36b).

les embryons qui ont reçu un éclairement bleu d'une semaine suivi de lumière blanche, présentent les même réponses que ceux exposés à la lumière blanche sauf que les plantules ayant été exposés à une semaine de radiations bleues montrent en plus une vigueur et un développement mieux ordonné avec des racines plus épaisses sur MSm_1 (fig. 36c), alors qu'elles sont plus fines avec la formation de racines latérales sur MSm_2 (fig. 36d), de même qu'un développement plus marqué d'une partie aérienne feuillée constituée de plumule plus longue (fig. 36c et d).

Par contre pour les plantules qui ont reçu un éclairement bleu de plus d'une semaine (2 semaines et 3 semaines) suivi d'une exposition à la lumière blanche et celles qui ont reçu un éclairement bleu tout au long de la durée de l'expérience, nous avons constaté que les temps mis à l'apparition des racines sont variables. Ainsi, il semble qu'après un éclairement bleu d'une durée supérieure à une semaine, le développement des embryons est ralenti et à la fin de l'expérimentation (1 mois), les embryons apparaissent avec des racines plus courtes tandis que la partie aérienne est légèrement développée (fig. 36e, f, g, h, i et j). Ce qui confirme que la durée d'exposition aux radiations bleues est déterminante pour le développement des embryons. Ce qui corrobore les observations de LIN (2000) chez *Arabidopsis*, selon lequel une exposition longue aux radiations bleues inhibe le développement.

Nous avons donc choisi de réaliser les cultures sous un traitement composite (1 semaine de lumière bleue suivi d'une photopériode sous lumière blanche continue) en plus d'un témoin à la lumière blanche pour toutes les expériences visant à obtenir le plus grand nombre de plants viables régénérés à partir d'embryons.

Figure 36 : Effet de la lumière sur la reconstitution de plants entiers à partir de plantules excisés du palmier dattier Cv. Tk. (résultats obtenus après 1 mois de culture).

1- Plantes cultivées sous un éclairement de quatre semaines de lumière blanche (a : culture sur MSm_1, b : culture sur MSm_2).

2- Plantes cultivées sous un éclairement d'une semaine de lumière bleue suivi de 3 semaines de lumière blanche (c : culture sur MSm_1, d : culture sur MSm_2).

3- Plantes cultivées sous un éclairement de deux semaines de lumière bleue suivi de deux semaines de lumière blanche, (e : culture sur MSm_1, f : culture sur MSm_2).

4- Plantes cultivées sous un éclairement de trois semaines de lumière bleue suivi d'une semaines de lumière blanche, (g : culture sur MSm_1, h : culture sur MSm_2).

5- Plantes cultivées sous un éclairement de quatre semaines de lumière bleue, (i : culture sur MSm_1, j : culture sur MSm_2).

a
b
c
d
e
f
g
h
i
j

3.4- Dosage des teneurs en leucoanthocyanes

Les variations des teneurs en leucoanthocyanes reflètent les variations de sensibilité de l'embryon à la lumière pendant la culture. Nous avons donc cherché à montrer l'évolution de la sensibilité des embryons à la lumière par la mesure de leur teneur en leucoanthocyanes (CALERO, 1989).

Les résultats du dosage des leucoanthocyanes, dans les embryons de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) Cv. Takerboucht, sont donnés et illustrés par les figures 37 et 38. Les graphiques représentent les variations des teneurs en leucoanthocyanes, exprimés en ($mg.g^{-1}$) ou en (‰) de matière végétale sèche en fonction du temps (semaine), au niveau des embryons cultivés sur MSm_1 et MSm_2, exposés à la lumière blanche et bleue.

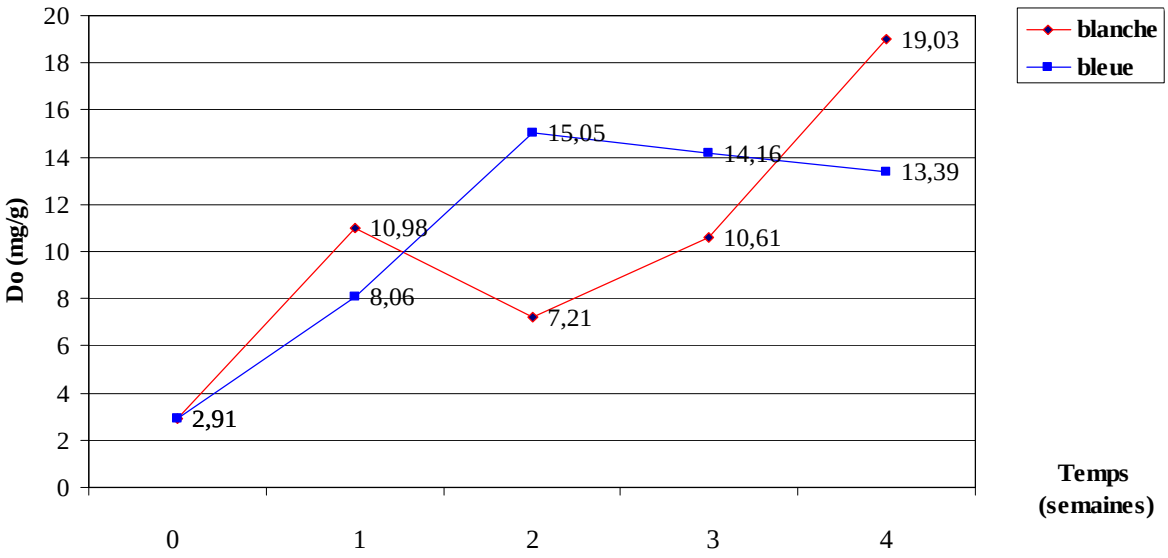


Figure 37 : Evolution des teneurs en leucoanthocyanes dans les embryons en culture sur MSm_1 exposés à la lumière blanche et bleue en fonction du temps.

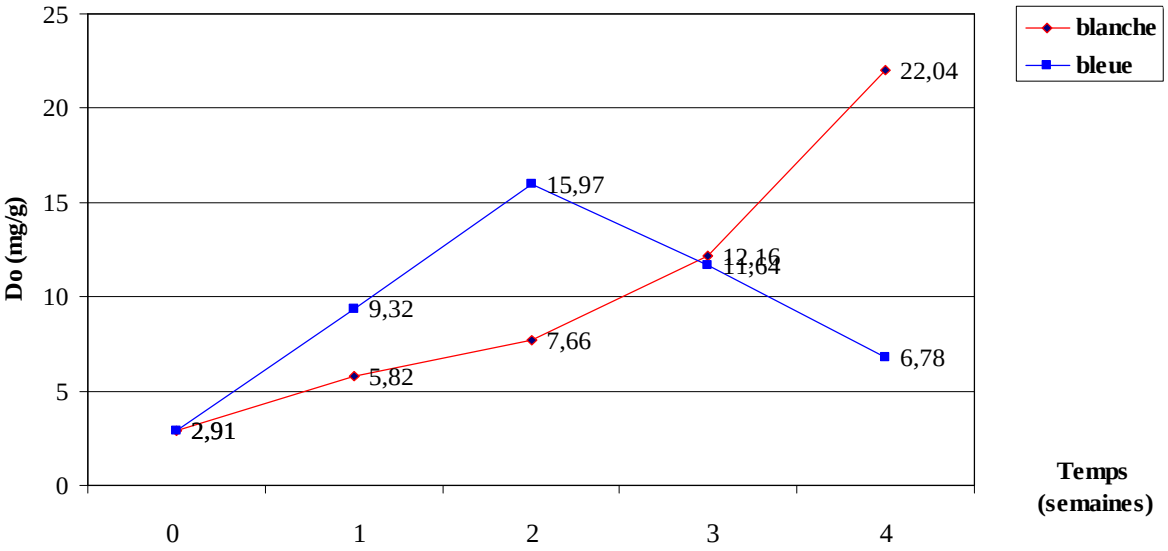


Figure 38 : Evolution des teneurs en leucoanthocyanes dans les embryons en culture sur MSm_2 exposés à la lumière blanche et bleue en fonction du temps.

A partir des résultats obtenus lors de notre expérimentation nous remarquons que :

- Les embryons hydratés présentent une concentration de 2,91 $mg.g^{-1}$ en leucoanthocyanes. Ces composés sont donc synthétisés au niveau de ces embryons en l'absence de la lumière et de l'influence du milieu.
- Sous l'effet de la lumière blanche, les courbes représentées sur les figures 37 et 38 suivent le même tracé et révèlent que les teneurs en leucoanthocyanes varient en fonction du temps. Les embryons cultivés sur le milieu de culture de base MSm_1, durant 4 semaines, présentent des concentrations qui augmentent jusqu'à atteindre la valeur de 19,03 mg/g à la $4^{ème}$ semaine. Chez les embryons cultivés sur le milieu de base MSm_2 la concentration maximale atteinte au bout de la $4^{ème}$ semaine est de 22,04 mg/g.
- A la lumière bleue, les teneurs les plus élevées sont obtenues à la $2^{ème}$ semaine. Ainsi les deux courbes représentées sur les figures 37 et 38 ont une allure similaire : les concentrations vont de 2,91 $mg.g^{-1}$, atteignent respectivement 15,05 mg g^{-1} et 15,97 mg g^{-1} à la deuxième semaine de culture sur MSm_1 et MSm_2 pour diminuer jusqu'à 13,39 mg g^{-1} et 6,78 mg g^{-1} respectivement sur MSm_1 et MSm_2.

L'analyse de la variance montre des différences hautement significatives pour le facteur lumière en fonction du temps ($P = 0.001$), alors qu'elle montre une différence non significative pour le facteur milieu ($P = 0.5$) (Annexe 14). Les groupes homogènes sont consignés dans l'Annexe 15.

Nos résultats montrent que les variations des teneurs en leucoanthocyanes varient en fonction des conditions de culture, à savoir : le milieu, la qualité et l'intensité de la lumière. Ces résultats concordent avec les travaux de OREN-SHAMIR (2009) sur les variations des teneurs en leucoanthocyanes durant le développement des plantes.

Nos résultats ont mis en évidence l'action de la lumière sur la synthèse des leucoanthocyanes chez les embryons de palmier dattier. Ainsi, les embryons mis en culture sont sensibles à la lumière, résultats rapportés par CALERO (1989) sur les embryons de palmier dattier variété Deglet-Nour.

Après deux semaines de culture sur les milieux MSm_1 et MSm_2, l'action des radiations bleues induit de fortes concentrations (15,05 mg g^{-1} pour MSm_1 et 15,97 mg g^{-1} pour MSm_2), deux fois supérieures à celles induites par de la lumière blanche (7,21 mg/g pour MSm_1 et 7,66 mg/g pour MSm_2). Ces résultats rejoignent les observations faites par CALERO (1989) et CHALKER-SCOTT (1999) qui ont démontré que les concentrations en leucoanthocyanes sont plus élevées en lumière bleue qu'en lumière blanche. Ces résultats peuvent s'expliquer par le rôle des photorécepteurs de la lumière bleue (les cryptochromes) qui sont responsables entre autre de la synthèse d'anthocyanes (FURUYA et SHAFER, 1996).

En effet, dès la première semaine, les teneurs en leucoanthocyanes augmentent de façon progressive et plus significative sous l'effet de la lumière bleue. Cette réponse est due à

l'activation des cryptochromes par le biais de ces radiations. En fonction du temps, les teneurs augmentent, pour atteindre leur maximum, après deux semaines de culture. L'activation progressive des photorécepteurs se retrouvent, saturés après deux semaines de culture ce qui a conduit à une synthèse élevée de leucoanthocyanes durant cette période (MULEO et MORINI, 2008).

Contrairement à nos attentes, les teneurs en leucoanthocyanes diminuent, à partir de deux semaines de culture, sous l'effet des radiations bleues. L'intensité et le temps d'exposition des cryptochromes aux radiations provoquent l'usure des surfaces photosensibles et voient leur efficacité diminuer (PARKS et *al.*, 2001). De plus, selon HELLER et *al*. (2000), deux types de cryptochromes (cry1 et cry2) sont régulés par les radiations bleues : sous l'effet de ces radiations, la teneur en cry2 diminue très fortement alors que celle de cry1 ne varie pas. De ce fait, la diminution des teneurs en leucoanthocyanes à partir de la deuxième semaine de culture, serait due à la diminution du nombre et à l'altération des photorécepteurs de la lumière bleue.

L'action de la lumière blanche présente une différence hautement significative ($P = 0.001$), par rapport aux radiations bleues en fonction du temps. Le suivi des teneurs en leucoanthocyanes, sous l'effet de la lumière blanche montre que cette dernière augmente en fonction du temps. Le spectre de la lumière blanche comprend, entre autres, les radiations rouges et les radiations bleues en faible intensité. Ainsi, elle agit aussi sur les phytochromes. Selon les travaux de CALERO (1989), la lumière blanche présente un effet intermédiaire entre l'action des radiations bleues et celle des radiations rouges concernant la synthèse des leucoanthocyanes. En effet, le cryptochrome n'est actif que durant les deux premières semaines, alors que le phytochrome, le devient dès le début de la $3^{ème}$ semaine. L'activité des cryptochromes durant les deux premières semaines, n'a pas induit la synthèse de grandes quantités de leucoanthocyanes. Cela est dû à la faible intensité des radiations bleues contenues dans la lumière blanche, étant insuffisante pour la saturation de tous les cryptochromes.

L'effet du milieu ne présente pas de différences significatives ($P = 0.5$). Cependant, la synthèse des leucoanthocyanes peut être affectée par la composition du milieu de culture. En effet, certains éléments nutritionnels peuvent être limitants. L'azote, en situation non limitante, permettant la disponibilité de l'ensemble des acides aminés en quantité élevée et leur intégration dans les protéines, est alors possible. Par contre, si l'azote devient limitant (ce qui survient en culture *in vitro* après quelques jours de culture, sur milieu non renouvelé comme dans nos conditions), la synthèse protéique est ralentie, la phénylalanine et la tyrosine sont alors orientées vers le métabolisme secondaire (MACHEIX et *al.*, 2005). Ainsi, l'embryon se retrouvant dans un état de stress, suite à l'appauvrissement du milieu de culture, et voit sa teneur en leucoanthocyanes augmenter.

3.5- Germination des plantules en culture *in vitro* en présence d'hormones

Dans un premier temps nous avons utilisé séparément des activateurs de croissance à des concentrations respectives pour l'AIA et l'ANA égales à 0,1 mg.l^{-1} et 1 mg.l^{-1} associées respectivement à 50 g.l^{-1} et 30 g.l^{-1} de saccharose, et pour la BAP égales à 0,1 et 10 mg.l^{-1} associées respectivement à 30 g.l^{-1} et 50 g.l^{-1} de saccharose, afin d'apprécier l'action de chacun de ces régulateurs de croissance à différentes doses.

Ensuite nous avons réalisé les combinaisons suivantes :

- (BAP = 0,1 mg.l^{-1}) + (ANA = 1 mg.l^{-1}) additionnée à 30 g.l^{-1}.
- (BAP = 10 mg.l^{-1})+ (AIA = 0,1 mg.l^{-1}) additionnée à 50 g.l^{-1}.

Elles nous ont permis de mettre au point une technique de production rapide de jeunes plants de palmiers issus de semis. Les milieux retenus pour ces expériences sont le MSm_1 et MSm_2.

Rappelons que cette expérimentation est réalisée sous deux conditions de lumières différentes (blanche et un traitement composite 1 semaine de bleue/ 7 semaines de blanche).

Au cours de notre expérience nous avons utilisé deux concentrations de sucre 30 et 50 g.l^{-1}. Il était donc nécessaire d'apprécier l'action de chaque concentration sur le développement des embryons sous l'influence des deux traitements lumineux sur les milieux de bases (MSm_1 et MSm_2).

3.5.1- Influence de la lumière blanche

3.5.1.1- Milieu MSm_1

Au cours de cette étape, nous avons mis en culture des embryons sur MSm_1, en présence de deux concentrations de saccharose.

Les figures 39 et 40 donnent les résultats obtenus après deux mois de culture à 30 g.l^{-1} et à 50 g.l^{-1} de saccharose.

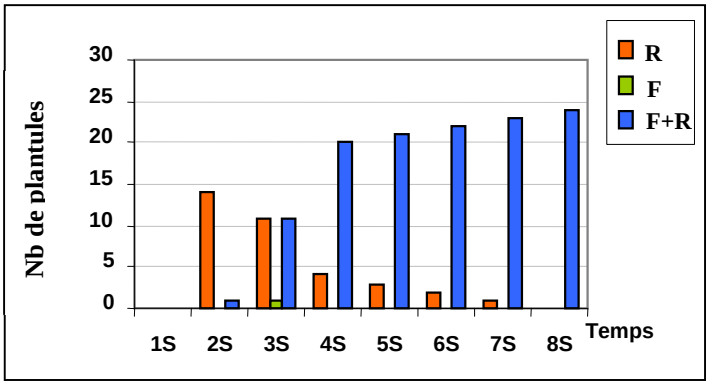


Figure 39 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 g.l^{-1} de saccharose en fonction du temps (semaines).

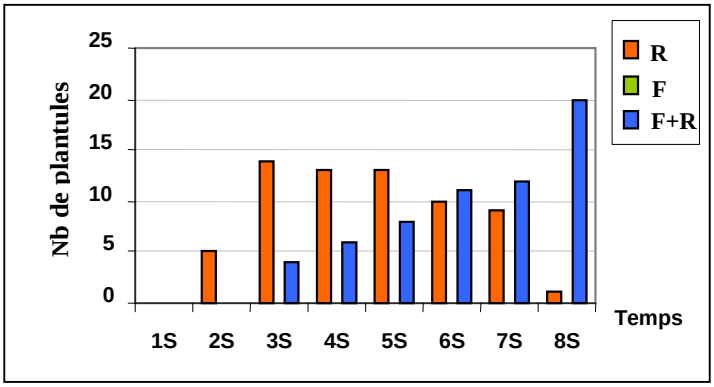


Figure 40 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 g.l^{-1} de saccharose en fonction du temps (semaines).

Pour 24 échantillons :

- à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose nous avons 100 % de survie.
- à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose nous avons 8,33 % de contaminations et 4,16 % de nécroses.

Les observations faites sur les embryons sont telles qu'après deux mois de culture :

- à 30 $g.l^{-1}$, le pourcentage de jeunes plantes présentant une racine et une feuille est de 100 % (fig. 41a).
- à 50 $g.l^{-1}$, le pourcentage de jeunes plantes présentant seulement une racine est de 4,16 %, alors que le pourcentage de plants régénérés est de 83,33 % (fig. 41b).

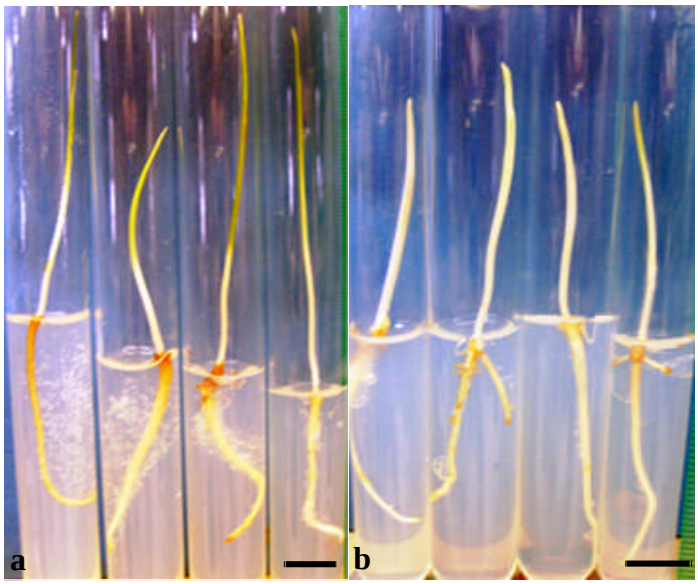


Figure 41 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière blanche.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose ; plantules ayant donné naissance à des racines principales ; accompagnées du développement du bourgeon préexistant.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose ; obtention de feuilles blanches (non chlorophylliennes) pourvues de racines principales.

3.5.1.2- Milieu MSm_2

Au cours de cette étape, nous avons mis en culture des embryons sur MSm_2, en présence de deux concentrations de saccharose.

Les figures 42 et 43 résument les résultats obtenus après deux mois de culture à 30 $g.l^{-1}$ et à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose.

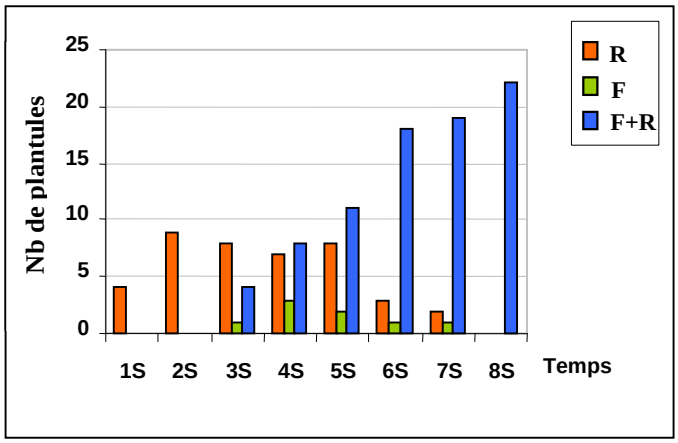


Figure 42 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose en fonction du temps (semaines).

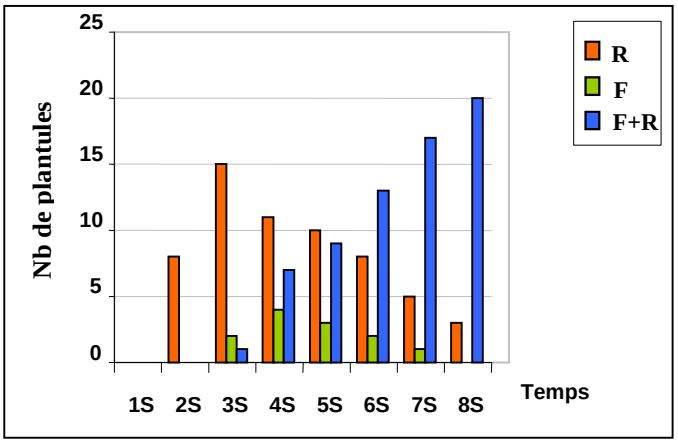


Figure 43 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose en fonction du temps (semaines).

Pour 24 échantillons :

- à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, nous avons 4,16 % de contaminations et 4,16 % de nécroses
- à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, nous avons 4,16 % de contaminations

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

Après deux mois de culture

- à 30 $g.l^{-1}$, nous notons la formation de jeunes plantes avec un taux de 91,66 % (fig. 44a).
- à 50 $g.l^{-1}$, le pourcentage de jeunes plantes présentant une racine seule est de 12,5 %, alors que le pourcentage de jeunes plantes présentant une racine et une feuille est de 83,33 % (fig. 44b).

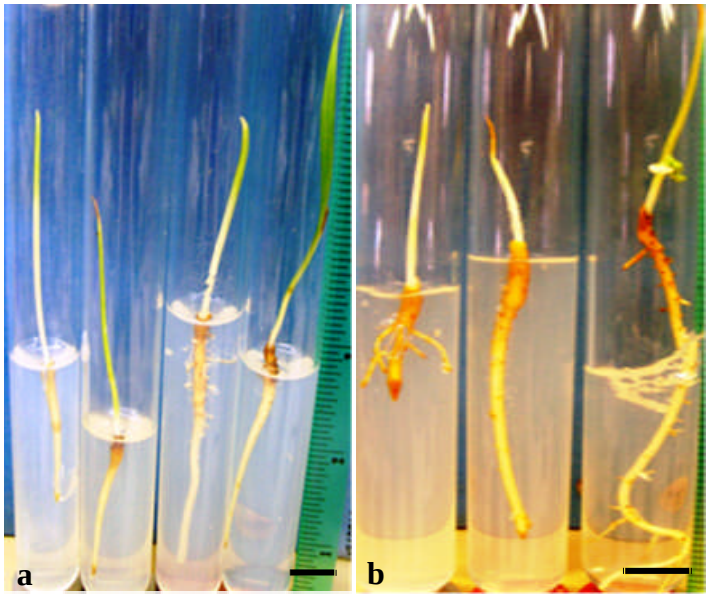


Figure 44 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière blanche.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose ; apparition de feuilles juvéniles.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose ; développement de racines épaisses, pourvues de racines latérales

3.5.2- Influence de la lumière bleue

3.5.2.1- Milieu MSm_1

Au cours de cette étape, nous avons mis en culture des embryons sur MSm_1, en présence de deux concentrations de saccharose.

Les figures 45 et 46 résument les résultats obtenus après deux mois de culture à 30 $g.l^{-1}$ et à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose.

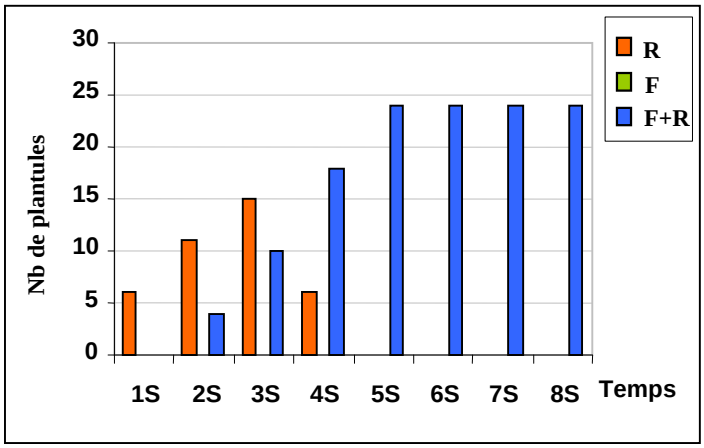


Figure 45 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose en fonction du temps (semaines)

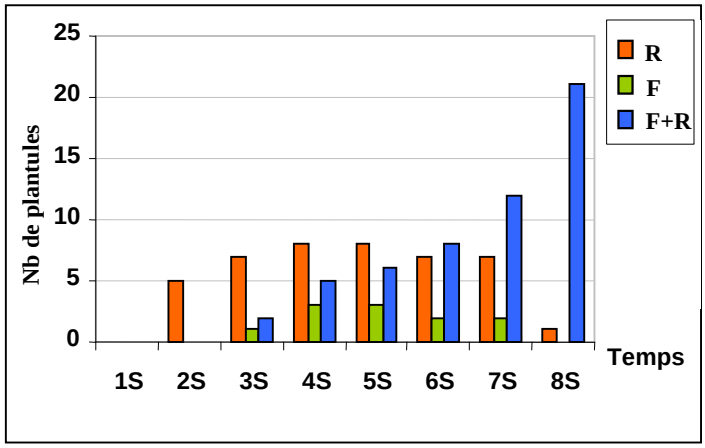


Figure 46 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose en fonction du temps (semaines).

Pour 24 échantillons :

- à 30 $g.l^{-1}$ du saccharose nous avons 100 % de survie.
- à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose nous avons 8,33 % de nécroses.

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

- à 30 $g.l^{-1}$, nous notons la régénération de toutes les jeunes plantes (100%), après 5 semaines de culture (fig. 47a).
- à 50 $g.l^{-1}$, les observations à la fin de la culture donnent un taux de 87,5 % de plants régénérés (fig. 47b).

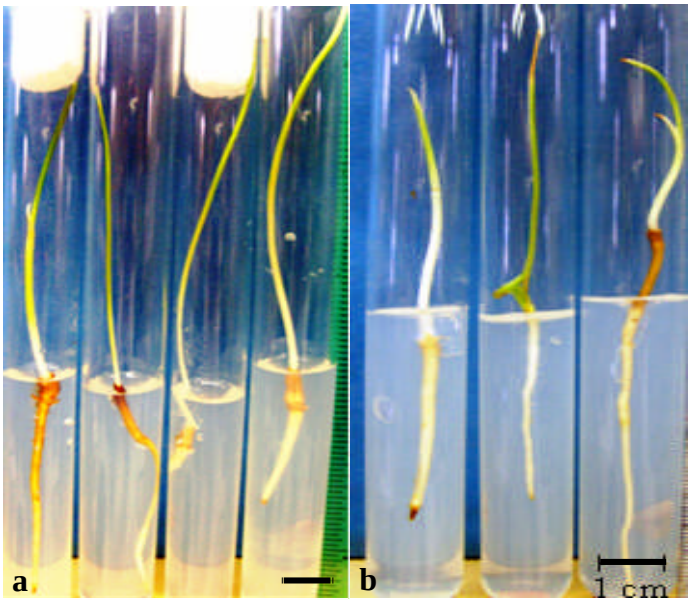


Figure 47 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière bleue

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose ; les plantes sont de grande taille (présence de racines courtes, et des feuilles juvéniles bien développées)

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose ; plantes à racines principales et apparition de feuilles juvéniles.

3.5.1.2- Milieu MSm_2

Au cours de cette étape, les embryons sont mis en culture sur MSm_2, en présence de deux concentrations du saccharose 30 $g.l^{-1}$ et 50 $g.l^{-1}$. Les figures 48 et 49 résument les résultats obtenus après deux mois de culture.

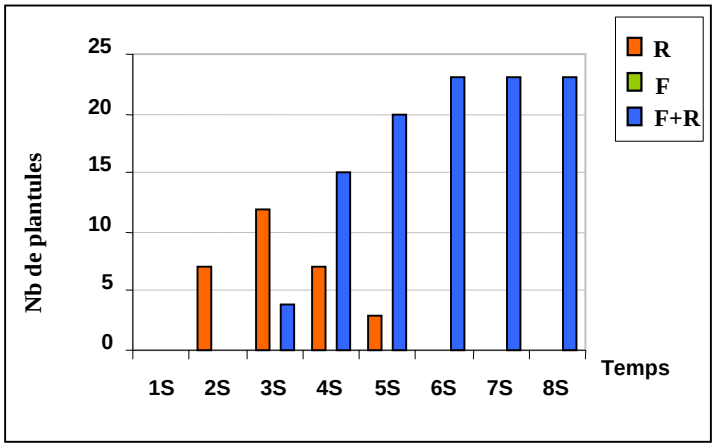


Figure 48 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose en fonction du temps (semaines).

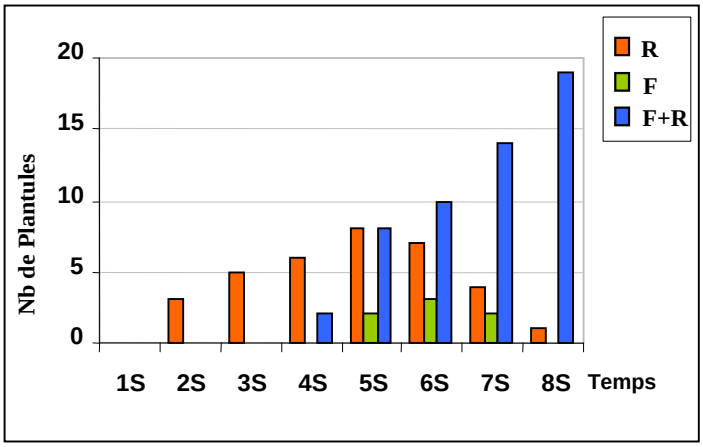


Figure 49 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose en fonction du temps (semaines).

Pour 24 échantillons :

- à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose nous avons 4,16 % de contaminations
- à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose nous avons 16,66 % de contaminations

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

- à 30 $g.l^{-1}$, le maximum de régénération est atteint après 6 semaines de culture, avec un taux de 95,83 % de plants régénérés (fig. 50a).
- à 50 $g.l^{-1}$, nous observons l'augmentation de régénération de jeunes plantes (feuilles et racines) ou le maximum est atteint, après 8 semaines de culture, avec un taux de 79,16 % (fig. 50b).

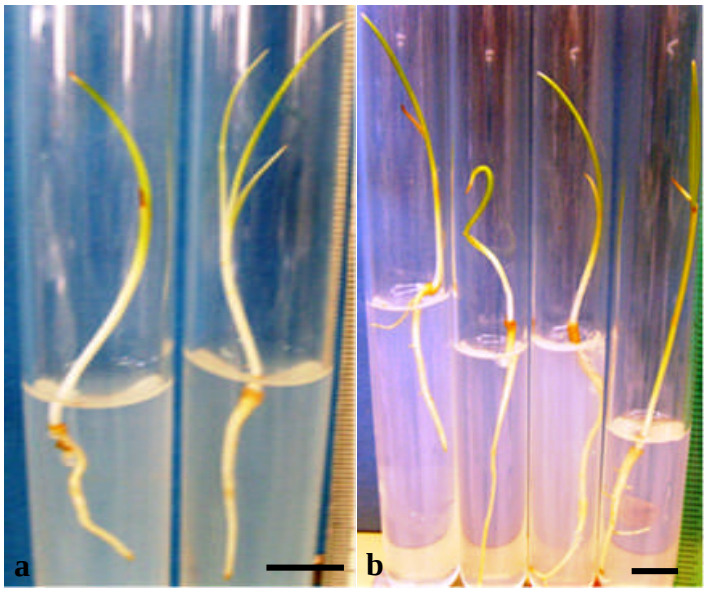


Figure 50 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière bleue

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose ; plantule ayant donnée naissance à deux feuilles juvéniles.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose ; jeunes plantes constituées de racines principales et de feuilles juvéniles.

Sous la lumière blanche, les observations faites sur les figures 39 et 40 montrent que la réactivité des embryons (apparition des racines), sur milieu MSm_1, se produit après 2 semaines de culture, pour les deux concentrations de saccharose. Cependant, la réactivité est plus marquée lorsqu'il s'agit d'embryons cultivés à la concentration de 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, avec un taux d'enracinement de 58,33 % contre 20,33 % à la concentration de 50 $g.l^{-1}$. Aussi l'apparition des feuilles se réalise progressivement sur MSm_1. Cette dernière dépend de la concentration du saccharose.

Ainsi, l'analyse des résultats a montré des différences dans le bourgeonnement, pour les deux concentrations de saccharose. Le bourgeonnement à la concentration de 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, survient après 3 semaines de culture, sur des embryons ayant régénéré des racines en début de culture avec un taux de 45,83 %. Ce qui signifie que la moitié des plantules a générée des jeunes plantes. Cette régénération est progressive, le maximum est atteint après 8 semaines de culture avec 100 % de plants régénérés.

Par contre à la concentration de 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, nous remarquons que l'apparition des feuilles est retardée. Les observations montrent que le taux de 45,83 % de plants régénérés est atteint à la 6^{eme} semaine, et après 8 semaines de culture, le taux de 83,33 % reste inférieur, comparé aux embryons cultivés à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose.

Sur le milieu MSm_2, des observations similaires sur le temps de réactivation et des pourcentages de régénération sont rapportées. Cependant le temps de réactivité des plantules est moins long que celui enregistré sur le milieu MSm_1. En effet, ce dernier est d'une semaine à la concentration de 30 $g.l^{-1}$ de saccharose avec un pourcentage de réactivité de l'ordre de 16,66 % et de deux semaines à la concentration de 50 $g.l^{-1}$ de saccharose avec 33,33 % de racines formées. Aussi, la régénération de jeunes plantes est homogène pour les deux concentrations. Le maximum de régénération est atteint après 8 semaines de culture, avec un taux de 95,83 % à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose et 79,17 % à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose.

Sous la lumière bleue, sur le milieu MSm_1, le temps de la réactivité des embryons est d'une semaine à la concentration de 30 $g.l^{-1}$ (25 %) (fig. 45), alors qu'à la concentration de 50 $g.l^{-1}$, il est de 20,83 % après deux semaines de culture (fig. 46). L'analyse des résultats montre que le temps moyen de la germination est vite atteint à la concentration de 30 $g.l^{-1}$. Ainsi, à la $5^{éme}$ semaine de culture, la régénération est de 100 % de plantes régénérées, alors qu'elle est de 8 semaines à la concentration de 50 $g.l^{-1}$ avec un taux de 87,5 %.

Sur le milieu MSm_2, les résultats montrent que le temps moyen de la germination est de 6 semaines à la concentration de 30 $g.l^{-1}$ (95,83 %) (fig. 48), alors qu'il est de 8 semaines à la concentration de 50 $g.l^{-1}$ de saccharose (79,16 %) (fig. 49).

Nos observations sur le développement des embryons de palmier dattier variété Takerboucht sous l'influence de deux milieux de base MSm_1 et MSm_2, additionnés à deux concentrations de saccharose (30 et 50 $g.l^{-1}$), sous l'effet de deux lumières, font ressortir que

la concentration de 30 $g.l^{-1}$ de saccharose est beaucoup plus favorable à l'organogenèse des embryons, isolés de palmier dattier cv. Takerboucht : temps de réactivité plus court et pourcentage de plantes régénérées élevé (100 % sur MSm_1 et 95,83 % sur MSm_2). En outre, elles assurent un bon aspect morphologique. En revanche, les fortes doses (50 $g.l^{-1}$) ralentissent nettement la réactivité des vitroplants. Cependant, des plants plus vigoureux avec un développement homogène, ont été obtenus en présence de 50 $g.l^{-1}$ de saccharose. Reste que le nombre de jeunes plantes régénérées à 30 $g.l^{-1}$ n'a pas été significativement différent de celui qui est observé chez les jeunes plantes régénérées à 50 $g.l^{-1}$ (P = 0,4) (Annexe 16). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par THOMAS (1980) chez *Pinus sylvestris* et BENMAHIOUL (2009) sur *Pistacia vera* L. Ces chercheurs signalent que le saccharose intervient sur les équilibres de croissance et sur la localisation des mitoses. Ils précisent que les fortes concentrations de saccharose, établissant de hautes pressions osmotiques, peuvent réduire le transport de l'eau et des nutriments de la racine vers la partie aérienne.

Cela contredit, d'une part, les observations de RIJVEN (1952) sur *Capsella bursa pastoris*, pour lequel, la survie et la croissance des embryons sont stimulées par des concentrations de saccharose égales à 120 $g.l^{-1}$. D'après RIJVEN (1952), les fortes doses en sucre inhiberaient l'élongation cellulaire, mais permettraient la poursuite de la division cellulaire et la différenciation. De l'autre, ceux de RHISS (1980), selon lequel la présence d'une bonne source de carbone s'avère importante pour le bon développement des embryons isolés de palmier dattier, il précise que l'association biotine et saccharose à la concentration de 50 $g.l^{-1}$ sont à l'origine de l'obtention de plants entiers avec un pourcentage de 100 % chez la variété Bou-Feggous.

Il apparaît donc, qu'une étude sur l'influence de diverses concentrations de saccharose est nécessaire, pour déterminer l'optimum pour chaque espèce (MONNIER, 1995).

Nos résultats sur le palmier dattier, sont différents de ceux obtenus par AMMAR et BENBADIS (1977), sur la variété Déglet-Nour et ceux de STITI (1992) sur la variété Takerboucht, ces auteurs préconisent des concentrations élevées de saccharose pour l'amélioration du taux de survie et de la croissance des embryons, respectivement 80 $g.l^{-1}$ et 50 $g.l^{-1}$, à noté que leurs taux de survie sont inférieurs à nos résultats, pour les deux concentrations de saccharose.

Par contre, nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par AL KHATEEB (2008), qui a montré que les faibles concentrations en sucre favorisent le bourgeonnement et l'enracinement des vitroplants de palmier dattier, alors que les fortes concentrations induisent un brunissement et le desséchement des vitroplants, ainsi qu'une diminution du taux de bourgeonnement.

Les embryons soumis à un traitement bref de lumière bleue, additionné de 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, ont montré un temps moyen de germination très faible, par rapport à ceux cultivés en lumière blanche. Aussi le développement des embryons avec les deux concentrations, a

montré que la lumière bleue favorise un développement homogène, de la partie racinaire et caulinaire donnant des vitroplants vigoureux. Toute fois, l'analyse de la variance montre que ces taux ne varient pas de façon significative (P = 0,8) (Annexe 16).

Ceci, s'explique par le rôle attribué à ce type de radiations, sur le comportement des plantules. En effet, la lumière bleue est perçue au niveau de la plante par des cryptochromes dans le rôle est de convertir le signal lumineux en un signal biochimique, induisant différentes réponses morphologiques (LIN, 2000).

Il est bien connu que la lumière rouge –via le phytochrome- agit sur la morphogenèse en contrôlant la synthèse ou l'activité de nombreuse enzymes et particulier celle de la β-fructosidase (ZOUAGHI et *al*., 1979 *in* BLANC et *al*., 1986). Cependant, peu de recherches concernant le rôle des radiations bleues sur la croissance et le développement ont été effectué. Néanmoins, Selon COMBES (2002), il semble être analogue à ceux des radiations rouges.

Des études sur l'effet positif des radiations rouges sur l'induction et le développement des embryons de palmier dattier var. Deglet Nour ont été signalées. Les résultats sont tels que YAKOUB-BOUGDAL (1984) a mis en évidence l'effet positif, d'un traitement bref en rouge sombre sur l'induction de la rhizogenèse, sur des méristèmes caulinaires prélevés de jeunes germinations. Plus tard, CALERO (1989) a rapporté l'effet d'un traitement en radiations rouges claires, sur la formation des embryons somatiques issus des nervures de la gaine cotylédonaire des plantules du palmier dattier.

Dans le même contexte, BLANC et *al*. (1986) ont montré l'action des radiations rouges sur la survie et la tubérisation de germes de pomme de terre cultivés *in vitro*.

Il résulte de cette expérience, que l'effet d'un bref éclairement en lumière bleue permet de réduire le temps d'expression, avec des embryons plus vigoureux par rapport aux embryons, soumis à l'effet de la lumière blanche seule. Ce qui rejoint les résultats de GAUTIER et *al*., (2001) sur le trèfle blanc, ou ils ont démontré qu'un court traitement en lumière bleue influe aussi bien sur l'élongation des tige que sur le bourgeonnement. Ce qui confirme les résultats du test sur l'influence de la lumière.

3.5.2- Appréciation de l'action individuelle des hormones sur la germination des plantules en culture *in vitro*

3.5.2.1- Influence de la lumière blanche

3.5.2.1.1- Action des cytokinines

3.5.2.1.1.1- Sur le milieu MSm_1

Les figures 51 et 52 résument les résultats obtenus, après deux mois de culture sur MSm_1, à 30 $g.l^{-1}$ et 50 $g.l^{-1}$ de saccharose additionnés respectivement à la BAP 0,1 $mg.l^{-1}$ et 10 $mg.l^{-1}$.

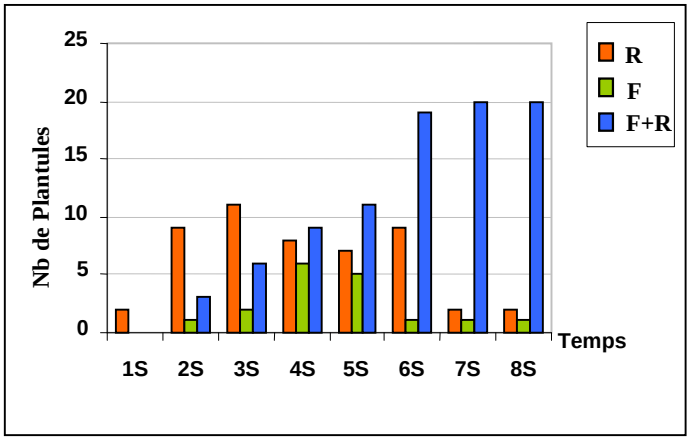


Figure 51: Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps

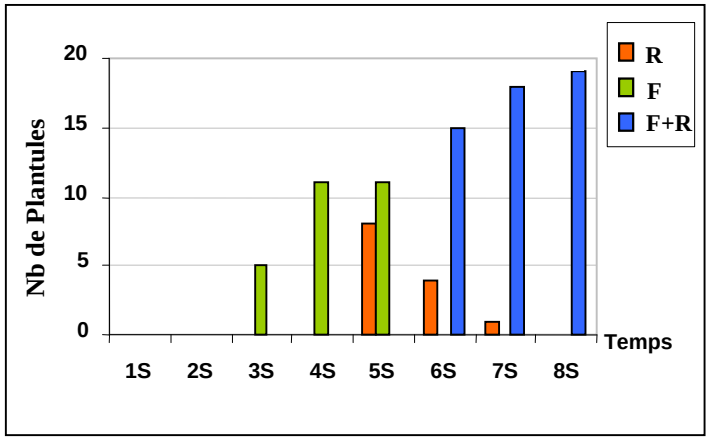


Figure 52: Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

Pour 24 échantillons :

- à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, nous avons 4,16 % de nécroses.
- à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, nous avons 16,66 % de contaminations et 4,16 % de nécroses.

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

Après 3 jours de culture, nous notons un gonflement important des embryons, en présence de la BAP (0,1 $mg.l^{-1}$ et 10 $mg.l^{-1}$) (fig. 53a).

Au 2^{éme} mois ;

- à 30 $g.l^{-1}$, le taux de régénération est de 83,33 % plants (fig. 53b), cependant 8,33 % de plants présentent seulement des racines et 4,16 % n'ont développé que des feuilles.
- à 50 $g.l^{-1}$, les jeunes plantes sont à système racinaire réduit, le taux de régénération et de 79,16 % (fig. 53c).

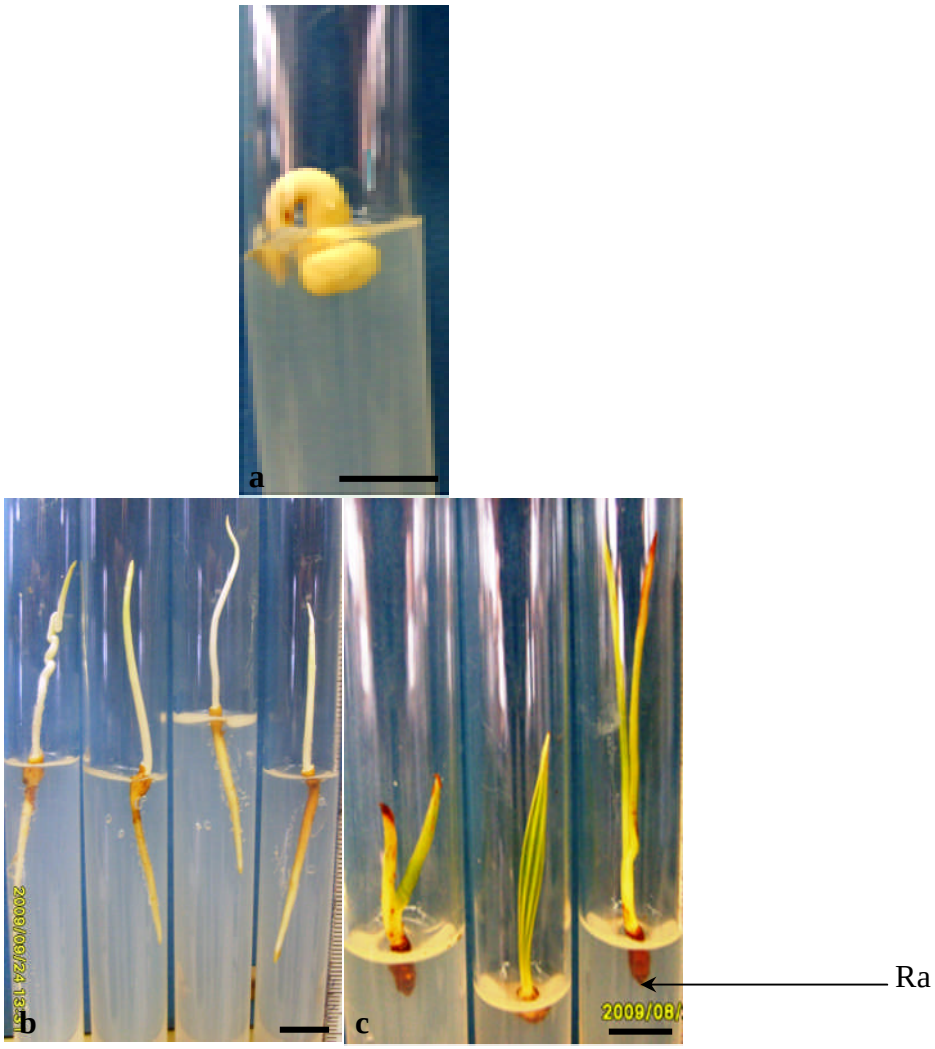


Figure 53 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière blanche

a : Gonflement important de la plantule après 3 jours de culture, le même résultat est observé en présence de la BAP à 0,1 et 10 $mg.l^{-1}$, quelle soit appliquée seule ou en association avec une auxine, sur MSm_1 et MSm_2 additionné à 30 ou 50 $g.l^{-1}$ de saccharose.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) ; plantules ayant donné naissance à des feuilles engainantes blanches et des racines principales.

c : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$) ; développement important de la partie caulinaire constituée de feuilles juvéniles à limbe plus ou moins large, la partie racinaire est formée de racines atrophiées (Ra).

3.5.2.1.1.2- Sur le milieu MSm_2

Les figures 54 et 55 résument les résultats obtenus, après deux mois de culture sur MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ et 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné respectivement de la BAP 0,1 $mg.l^{-1}$ et 10 $mg.l^{-1}$

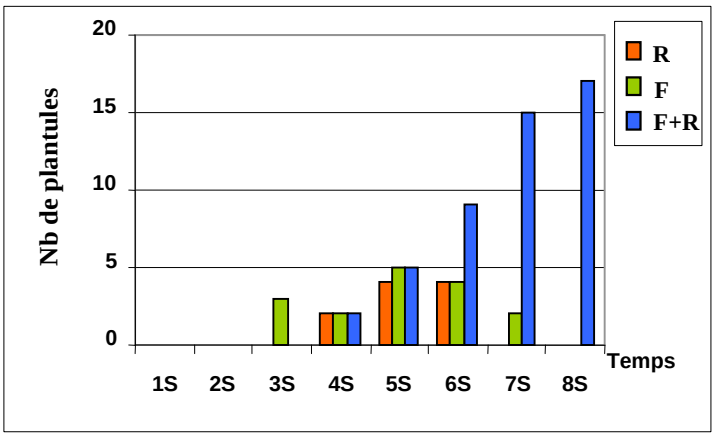


Figure 54 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

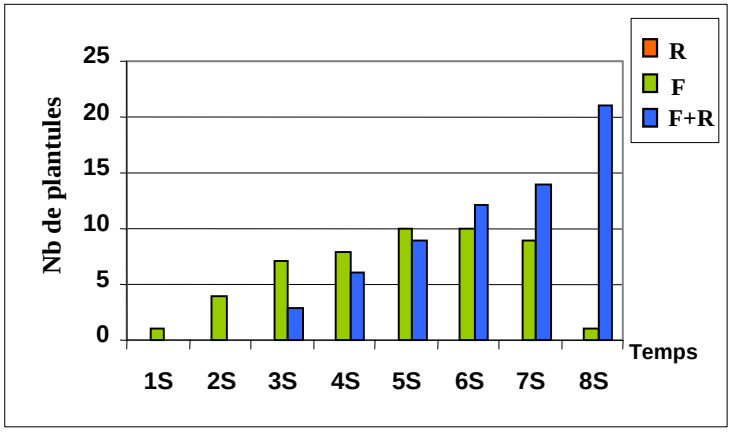


Figure 55 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

Pour 24 échantillons :

- à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, nous avons 12,5 % de contaminations et 16,66 % de nécroses.
- à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, nous avons 4,16 % de nécroses.

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

- Un gonflement important des embryons après 3 jours de culture, pour les deux concentrations de saccharose (50 et 30) $g.l^{-1}$ (fig. 53a).

Au 2^{éme} mois,

- à 30 $g.l^{-1}$, le taux de régénération (formation des jeunes plantes) est de 70,83 % (fig. 56a).
- à 50 $g.l^{-1}$, les plantes présentent des racines réduites, le pourcentage de régénération est de 87,5 % (fig. 56b), alors que 4,16 % de plants n'ont développé que des feuilles.

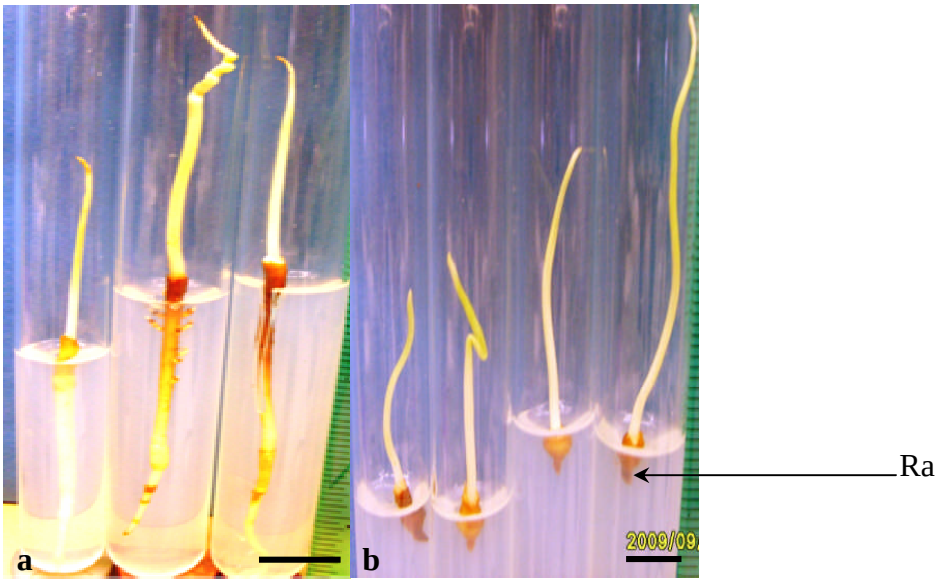


Figure 56 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière blanche

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) ; plantules ayant donnée naissance à des feuilles engainantes blanches et des racines principales comprenant des racines latérales.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$) ; les plantes sont constituées de plumules, plus ou moins chlorophylliennes, présentant, à leur base, un système racinaire atrophié (Ra).

3.5.2.1.2- Action des auxines

3.5.2.1.2.1- Sur le milieu MSm_1

Les figures 57 et 58 résument les résultats obtenus, après deux mois de culture sur MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ et 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné respectivement d'ANA 1 $mg.l^{-1}$ et d'AIA 0,1 $mg.l^{-1}$.

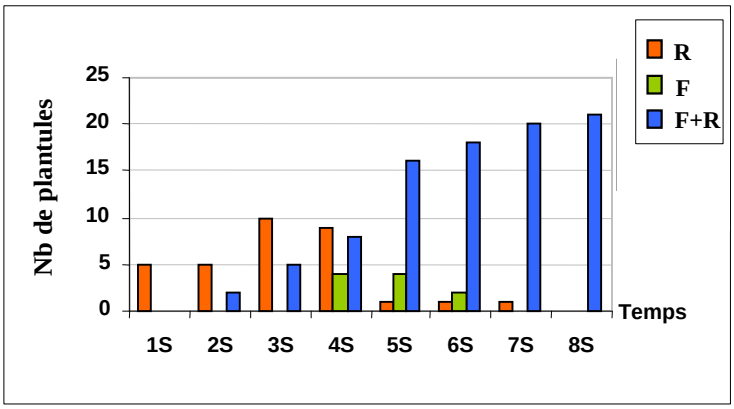


Figure 57 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

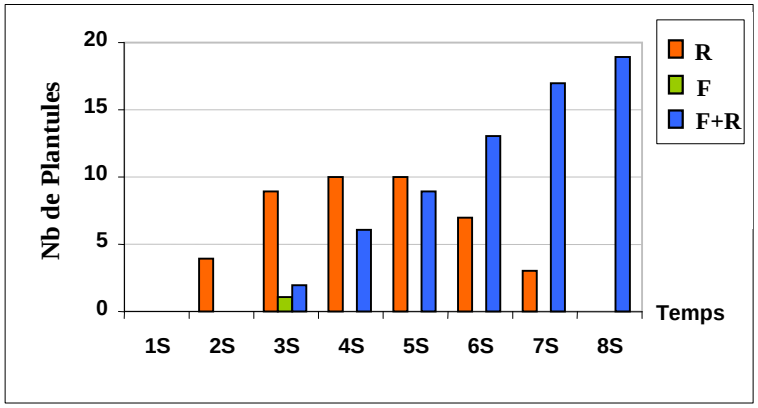


Figure 58 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

Pour 24 échantillons :

- à 30 $g.l^{-1}$, nous avons 12,5 % de contaminations
- à 50 $g.l^{-1}$, nous avons 4,16 % de contaminations et 16,33 % de nécroses.

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

Au 2ème mois, régénération de jeunes plantes avec des taux de 79,16 % à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose (fig. 59a) et 87,5 % à 50 $g.l^{-1}$ (fig. 59b).

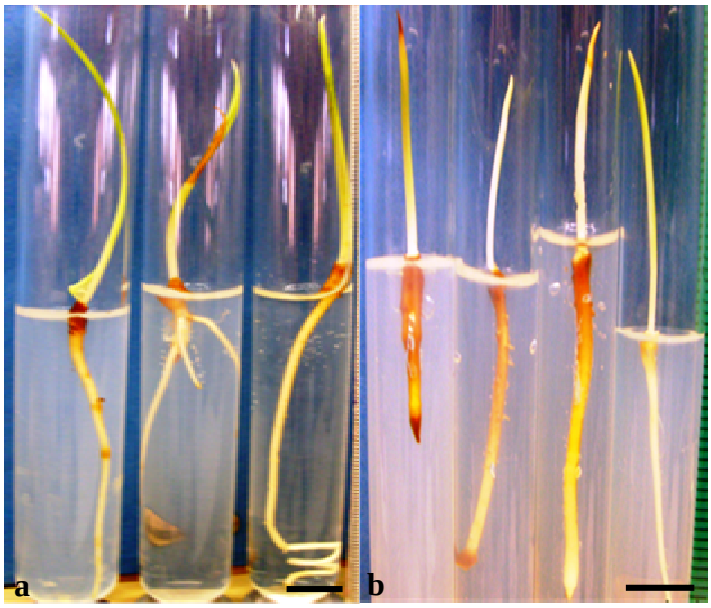


Figure 59 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière blanche

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) ; les plantes sont de grande taille, avec un système racinaire formé de racines longues, accompagnées du développement des bourgeons.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) ; les plantes sont constituées de racines et de feuilles engainantes.

3.5.2.1.2.2- Sur le milieu MSm_2

Les figures 60 et 61 résument les résultats obtenus, après deux mois de culture sur MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ et 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné respectivement d'ANA 1 $mg.l^{-1}$ et d'AIA 0,1 $mg.l^{-1}$.

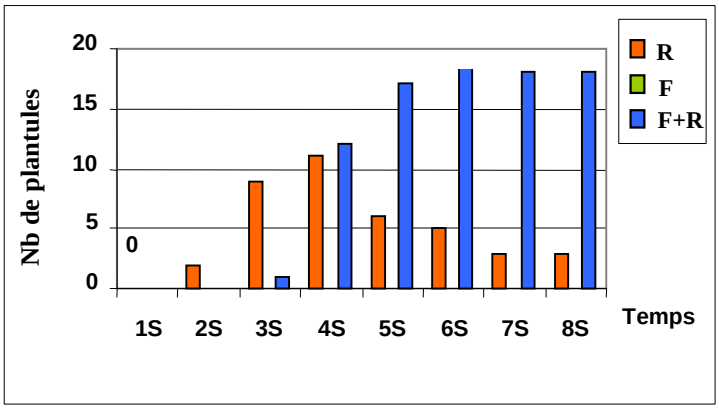


Figure 60 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

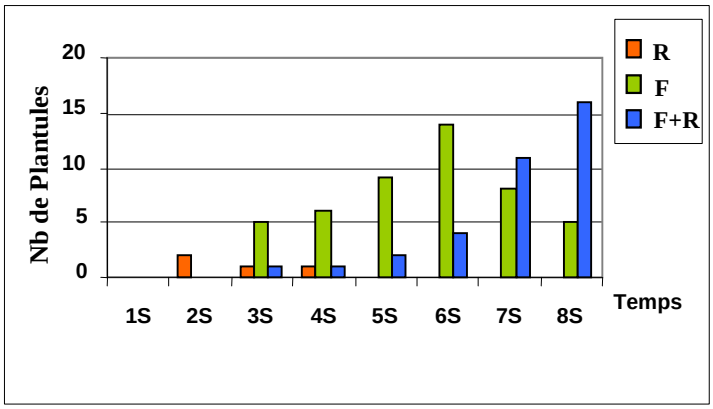


Figure 61 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

Pour 24 échantillons :

Nous avons 4,16 % de nécroses et 8,33 % de contamination,s sur les deux concentrations de saccharose (50 $g.l^{-1}$ et 30 $g.l^{-1}$).

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

Au 2^{éme} mois,

- à 30 $g.l^{-1}$, le pourcentage de plants présentant une racine seule est de 12,5 %. Le pourcentage d'embryons ayant régénéré de jeunes plantes est de 75 % (fig. 62a).
- à 50 $g.l^{-1}$, le pourcentage de plants qui présentent seulement des feuilles est de 20,83 %. Le pourcentage de plantes régénérées est de 66,66 % (fig. 62b).

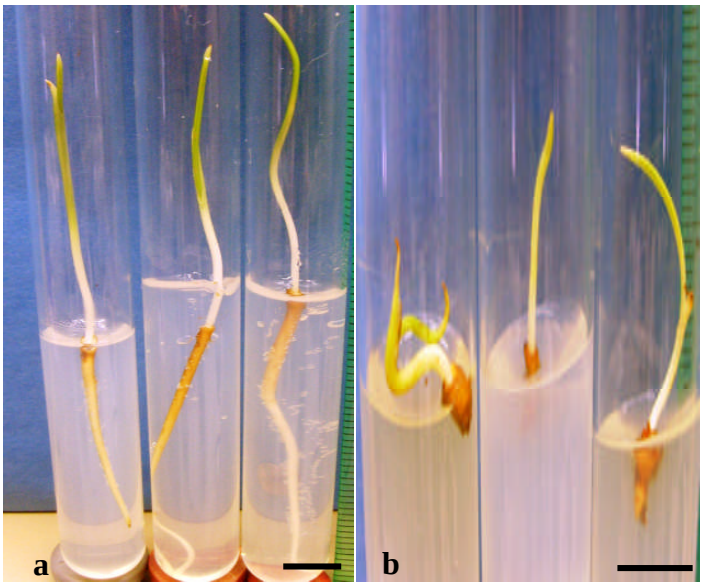


Figure 62 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière blanche

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) ; les plantes sont de grande taille, formées de feuilles juvéniles et de racines pivotantes.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) ; les plantes sont à système racinaire réduit.

3.5.2.2- Influence de la lumière bleue

3.5.2.2.1- Action des cytokinines

3.5.2.2.1.1- Sur le milieu MSm_1

Les figures 63 et 64 résument les résultats obtenus, après deux mois de culture sur MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ et 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné respectivement de la BAP 0,1 $mg.l^{-1}$ et 10 $mg.l^{-1}$

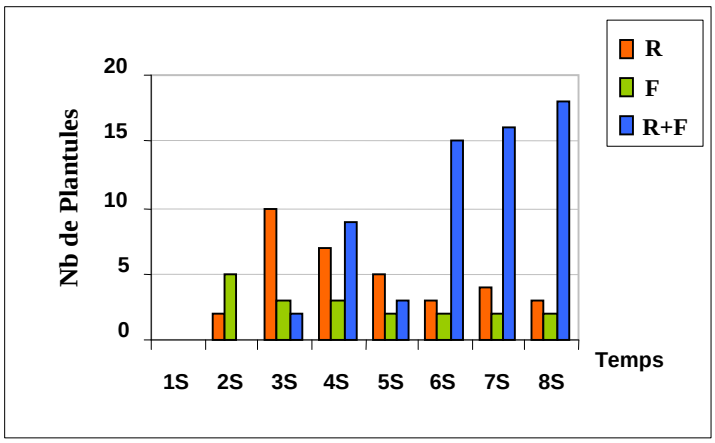


Figure 63 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

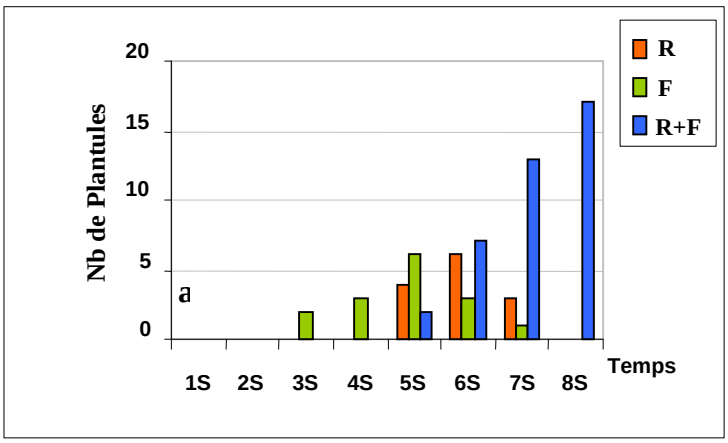


Figure 64 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

Pour 24 échantillons :

- à 30 $g.l^{-1}$, nous avons 4,16 % de contaminations.
- à 50 $g.l^{-1}$, nous avons 16,66 % de contaminations et 12,5 % de nécroses.

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

Au 2^{éme} mois ;

- à 30 $g.l^{-1}$, le pourcentage de plants, présentant des racines seulement est de 12,5 % et le pourcentage de plants présentant des feuilles seulement est de 8,33 %. Le pourcentage de plantules ayant développé une racine et une feuille est de 75 % (fig. 65a).
- à 50 $g.l^{-1}$, le pourcentage de régénération de jeunes plantes est de 79,16 % (fig. 65b). Reste que les plants sont à système racinaire réduit.

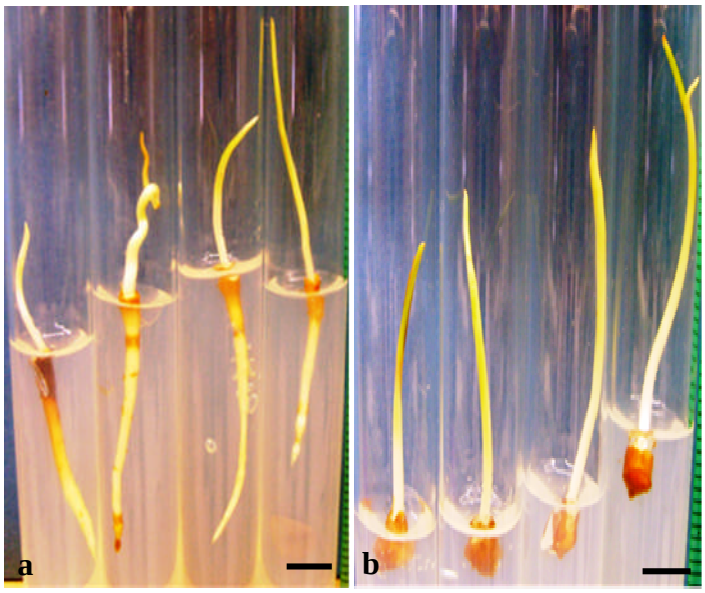


Figure 65 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière bleue

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) ; les plantes sont de taille moyenne à feuilles engainantes.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$) ; les plantes sont constituées d'une partie caulinaire chlorophyllienne à feuille engainante et d'un système racinaire réduit.

3.5.2.2.1.2- Sur le milieu MSm_2

Les figures 66 et 67 résument les résultats obtenus, après deux mois de culture sur MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ et 50 $g.l^{-1}$ de saccharose additionné respectivement de BAP à 0,1 $mg.l^{-1}$ et 10 $mg.l^{-1}$.

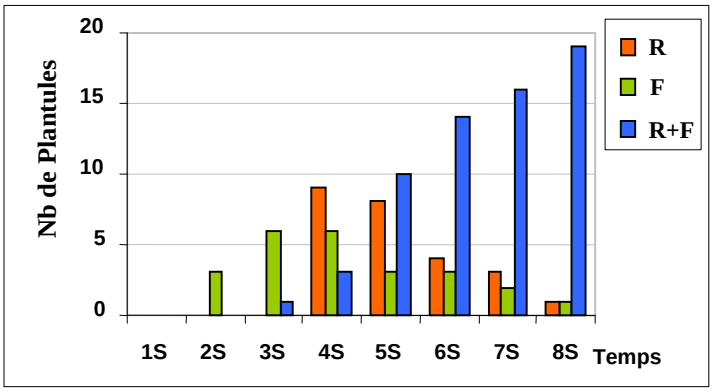


Figure 66 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

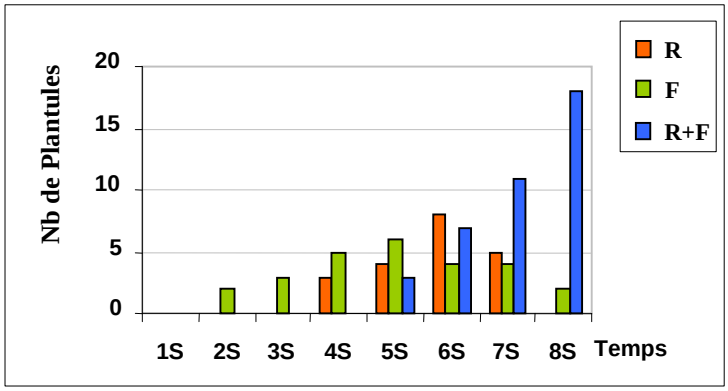


Figure 67 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

Pour 24 échantillons :

- à 30 $g.l^{-1}$, nous avons 12,5 % de contaminations et 16,66 % de nécroses.
- à 50 $g.l^{-1}$, nous avons 4,16 % de nécroses.

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

Au 2^{éme} mois,

- à 30 $g.l^{-1}$, le pourcentage de plantes pourvues de feuilles ou de racines uniquement diminue alors que le nombre de jeunes plantes présentant des feuilles et des racines augmente et atteint un taux de 70,83 % (fig. 68a).
- à 50 $g.l^{-1}$, le pourcentage de plants présentant des feuilles uniquement est de 4 ,16 %. Régénération de jeunes plantes avec induction de racines courtes à un taux de 87,5 % (fig. 68b).

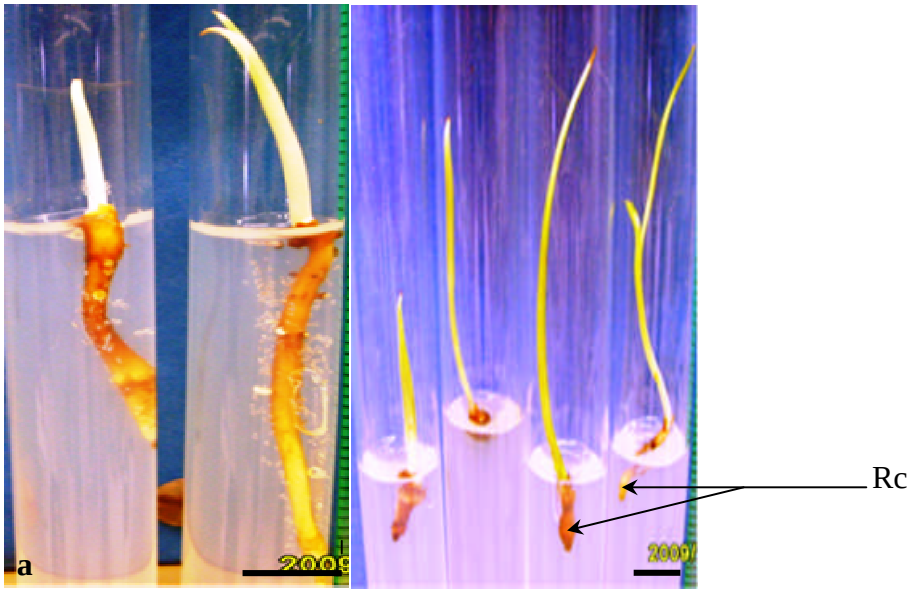


Figure 68 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière bleue

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) ; les plantes sont peu développées avec des racines épaisses.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$) ; induction de racine courte (Rc) avec un développement important de la partie caulinaire.

3.5.2.2.2- Action des auxines

3.5.2.2.2.1- Sur le milieu MSm_1

Les figures 69 et 70 résument les résultats obtenus, après deux mois de culture sur MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ et 50 $g.l^{-1}$ de saccharose additionné respectivement à l'ANA 1 $mg.l^{-1}$ et à l'AIA 0,1 $mg.l^{-1}$.

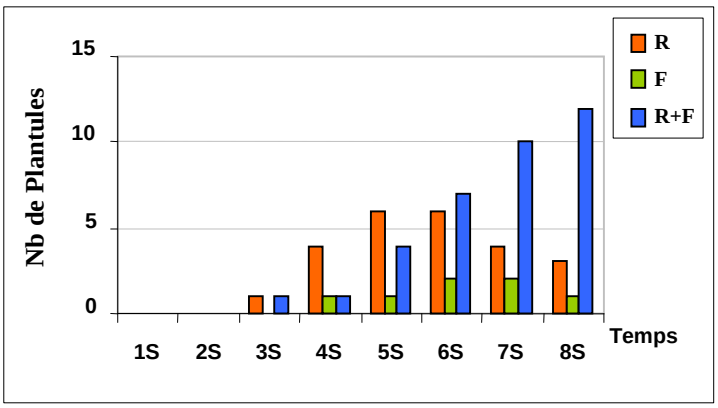


Figure 69 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

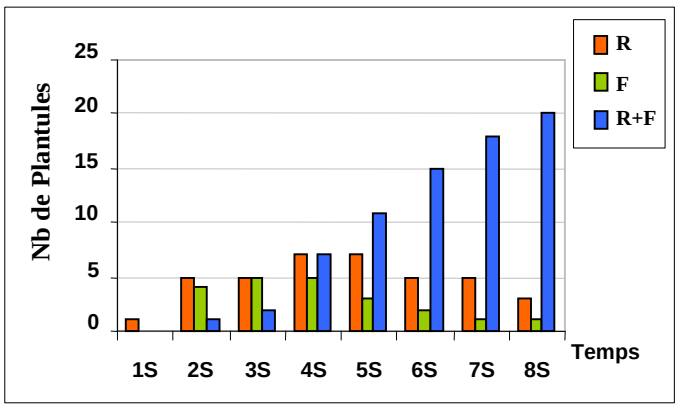


Figure 70 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

Pour 24 échantillons :

- à 30 $g.l^{-1}$, nous avons 12, 5 % de nécroses et 20,83 % de contaminations.
- à 50 $g.l^{-1}$, nous avons un pourcentage de survie de 100 %.

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

A la 8^{éme} semaine de culture, le pourcentage de plantules ayant régénéré soit des feuilles ou des racines est respectivement de 4,16 % et de 12,5 % pour les deux concentrations de saccharose. Le pourcentage de plantules ayant régénéré des plants entiers est de 50 % à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose (fig. 71a) et 83,33 % à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose (fig. 71b).

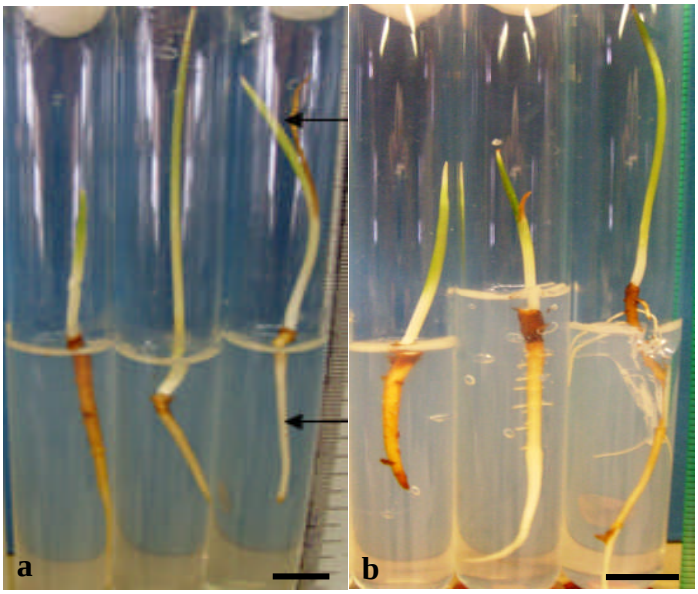


Figure 71 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière bleue

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) ; les plantes présentent des racines fines avec une partie caulinaire à feuille juvénile.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) ; obtention de plantes à plumules plus ou moins courte avec des racines épaisses pivotantes.

3.5.2.2.2.2- Sur le milieu MSm_2

Les figures 72 et 73 résument les résultats obtenus, après deux mois de culture sur MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ et 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné respectivement d'ANA 1 $mg.l^{-1}$ et d'AIA 0,1 $mg.l^{-1}$.

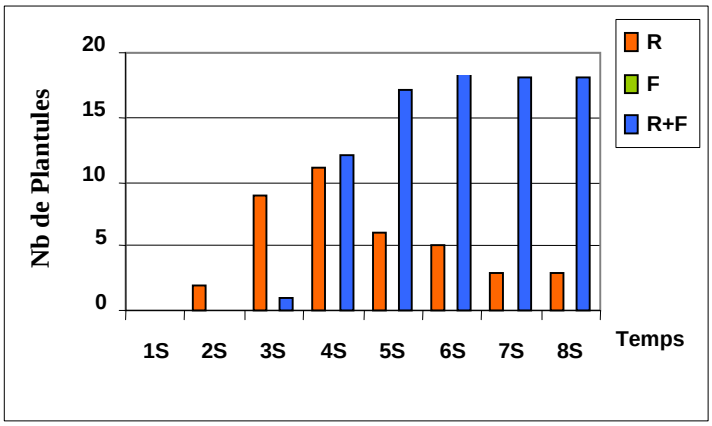


Figure 72 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

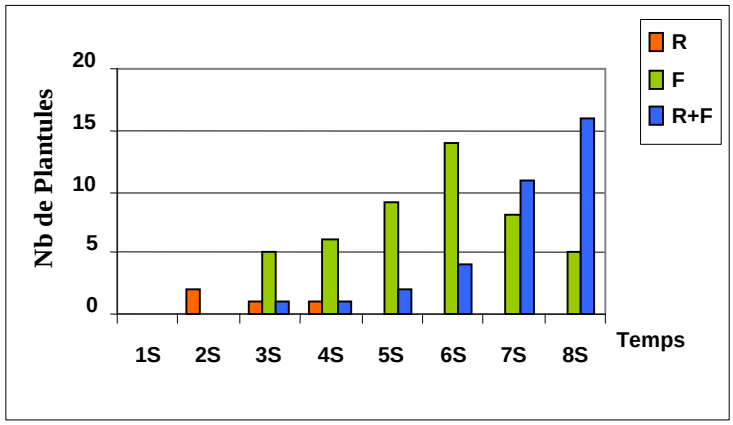


Figure 73 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

Pour 24 échantillons :

Nous avons 4,16 % de nécroses et 8,33 % de contaminations sur les deux concentrations de saccharose 50 $g.l^{-1}$ et 30 $g.l^{-1}$.

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

Au 2^{éme} mois,

- à 30 $g.l^{-1}$, le pourcentage de plantules ayant donné naissance à des racines seulement est de 12,5 %, alors que le pourcentage de plantules ayant régénéré une plante entière est de 75 % (fig. 74a).
- à 50 $g.l^{-1}$, le pourcentage d'embryons ayant développé une feuille uniquement est de 20,83 %. Régénération de jeunes plantes avec néoformation de racines à un taux de 66,66 % (fig. 74b).

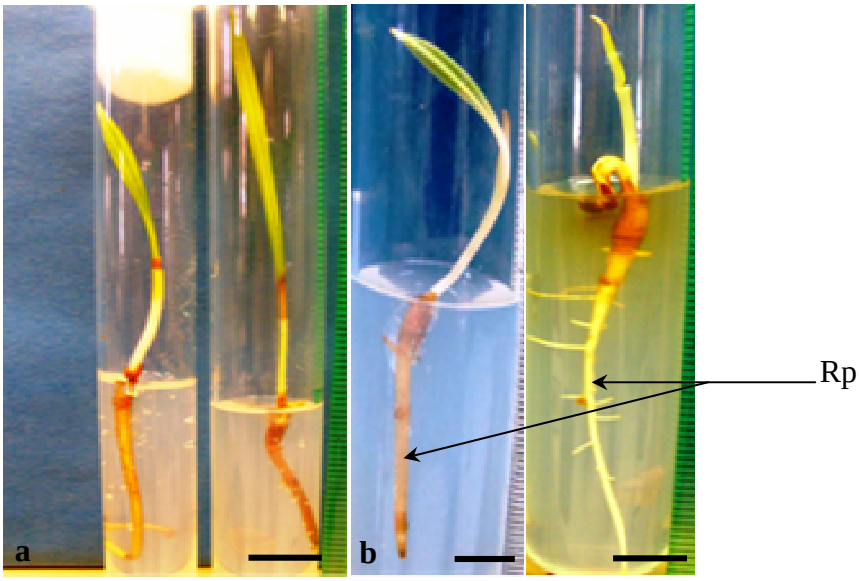


Figure 74 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière bleue.

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$); les plantes sont constituées d'une racine principale et d'une feuille juvénile à limbe plus ou moins large.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$); induction de racines principales (Pr) longues, avec des racines latérales.

A partir des résultats obtenus nous remarquons, par comparaison aux milieux témoins (MSm_1 et MSm_2), que l'addition de l'ANA (1 $mg.l^{-1}$) à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose et l'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose n'améliore en aucun cas, le pourcentage de production de plantes entières, ni celui du taux de survie. Le taux enregistré dans certains cas est nettement plus bas, l'AIA : 0,1 $mg.l^{-1}$ à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, sur le milieu MSm_2 a un pourcentage de 20,83 % de plants sans régénération. Seule la BAP (10 $mg.l^{-1}$) à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, sur le milieu MSm_2 a augmenté le pourcentage de production de plantes avec un taux de 87,5 %, avec des racines réduites (fig. 56b). Aussi le même comportement hétérogène sur le milieu minéral, dépourvu d'hormones est retrouvé en présence soit d'ANA soit d'AIA ou de BAP. L'analyse de la variance montre que les hormones influent de façon très hautement significative sur la production de plants (P = 0) (Annexe 17).

Ainsi, l'addition de l'ANA (1 $mg.l^{-1}$) et de BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose sur les deux milieux de base et l'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose sur MSm_1 favorise le développement des plantules en plants entiers, sous la lumière blanche. Alors qu'en présence de BAP (10 $mg.l^{-1}$) à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose sur les deux milieux (MSm_1 et MSm_2), le développement de la plante se fait surtout en feuille sans racines (fig. 53c et 56b). Ceci est tout simplement dû à la nature du type d'hormones à savoir que les auxines (ANA et AIA) sont en général rhizogènes, alors que la cytokinine (BAP) présente un effet caulogène, qui est dominant sous l'effet d'une forte concentration de BAP, en combinaison avec de fortes concentrations en saccharose. Ce même résultat a été rapporté par YAKOUB-BOUGDAL (1987) au cours de son travail sur la culture de plantules du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) Variété Deglet-Nour.

Effectivement, les auxines utilisées en particulier l'ANA à (1 $mg.l^{-1}$), ont révélé une tendance vers un développement du système racinaire (figure 59a et 62a) par contre l'AIA à la concentration de 0,1 $mg.l^{-1}$ à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose sur les deux milieux a limité la croissance de racines (figure 59b et 62b), par rapport à l'ANA, sans pour autant inhiber le développement. Ce qui par ailleurs, ne concorde pas avec les observations de RIJVEN (1952) qui signale que la croissance des embryons est inhibée par des concentrations d'AIA supérieures à 0,01 $mg.l^{-1}$.

Cependant, sur MSm_2, l'AIA a présenté le même comportement que la BAP (10 $mg.l^{-1}$) à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, à savoir un effet caulogène, avec un système racinaire atrophié (fig. 62b). Ce résultat a été rapporté par AMMAR et *al*. (1983) et YAKOUB-BOUGDAL, (1987) sur la variété Deglet Nour. Ce résultat montre que les fortes concentrations de BAP et d'AIA associée au saccharose 50 $g.l^{-1}$ s'opposent à l'élongation des racines. Selon JAY-ALLEMAND et CORNU (1986), différents mécanismes peuvent être impliqués : l'absorption ou le transport d'éléments minéraux ou de régulateur de croissance peuvent ne pas avoir lieu. Aussi, le bourgeon peut être producteur parallèlement d'inhibiteurs de croissance, de type hormonal ou phénolique.

Selon SKOOG (1950) une association adénine et auxine conduit à une prolifération anarchique intense (formation de cals). Ces derniers n'ont pas été obtenus au cours de notre expérimentation et ce quelque soit l'auxine associée au milieu MSm_1.

En dernier lieu, sous l'effet de la lumière blanche il convient de souligner qu'entre toutes les hormones testées, seule l'ANA (0,1 $mg.l^{-1}$) s'est avérée la plus satisfaisante pour l'objectif fixé, à savoir l'obtention de plants entiers et vigoureux (8,37 $\pm$ 0,96) (Annexe 18) (59a et 62a). Ce qui contredit les résultats de GAUTHERET (1959) et HELLER (1982) pour lesquels les monocotylédones sont à peu prés non sensibles aux auxines du fait que les tissus des monocotylédones ne présentent pas de zones génératrices libéro-ligneuses (formations secondaires) sur lesquelles les auxines sont très actives.

Après deux mois de culture, les résultats obtenus sous l'effet des radiations bleues ont confirmé l'action positive d'un traitement bref en lumière bleue, sur l'aspect morphologique des vitroplants. En outre, ils ont mis en évidence leurs effets sur l'induction de la rhizogenèse. Ainsi les résultats obtenus se résument :

L'addition de l'ANA, l'AIA et la BAP aux deux milieux de base MSm_1 et MSm_2 n'améliore en aucun cas ni le pourcentage de production en plants entiers, ni le taux de survie. Le taux le plus bas est enregistré en présence d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) (50 %) sur le milieu MSm_1. Cependant les embryons développés avec les radiations bleues, présentent toujours une bonne vigueur, avec des racines épaisses a feuilles juvéniles plus longues (71a et 74a).

L'action des radiations bleues sur la rhizogenèse du palmier dattier n'a pas encore été signalée. Cependant au cours de notre expérimentation, l'exposition à un bref traitement en lumière bleue induit, d'une part, la néoformation de racines courtes (fig. 68b), sur des embryons cultivés sur MSm_2 additionné de BAP (10 $mg.l^{-1}$) à 50 g/l de saccharose, qui sous la lumière blanche, présentaient des plantes à racines atrophiés. De l'autre, la néoformation de racines longues sur lesquelles se sont développée des racines latérales (fig. 74b), sur les embryons cultivés sur MSm_2 additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose (fig. 74b), ou les mêmes résultats avec la BAP à 10 $mg.l^{-1}$ ont été rapportés. Dans ce cas la lumière pourrait agir en modifiant la balance entre les auxines et les cytokinine endogène des embryons (CALERO, 1990).

Par ailleurs, un traitement bref en lumière bleue stimule plus particulièrement la formation de racines sur la gaine cotylédonaire sur MSm_1 et MSm_2 additionné de saccharose à 30 ou à 50 $g.l^{-1}$ et ce quelque soit le type d'hormone associée (auxine ou cytokinine) (fig. 75), ce qui souligne l'aptitude de la gaine cotylédonaire à former des racines.

La formation de racines sur la gaine cotylédonaire des plantules ne permet pas d'une façon générale leur développement ultérieur en plantes. La majorité des plantules ont en effet, développé que des racines, qui peuvent êtres atrophiées (fig. 75b_2 et c_3) ou longues (fig. 75 c_4) Cela a réduit considérablement les pourcentages de régénération, ce qui explique les faibles pourcentages de reprise.

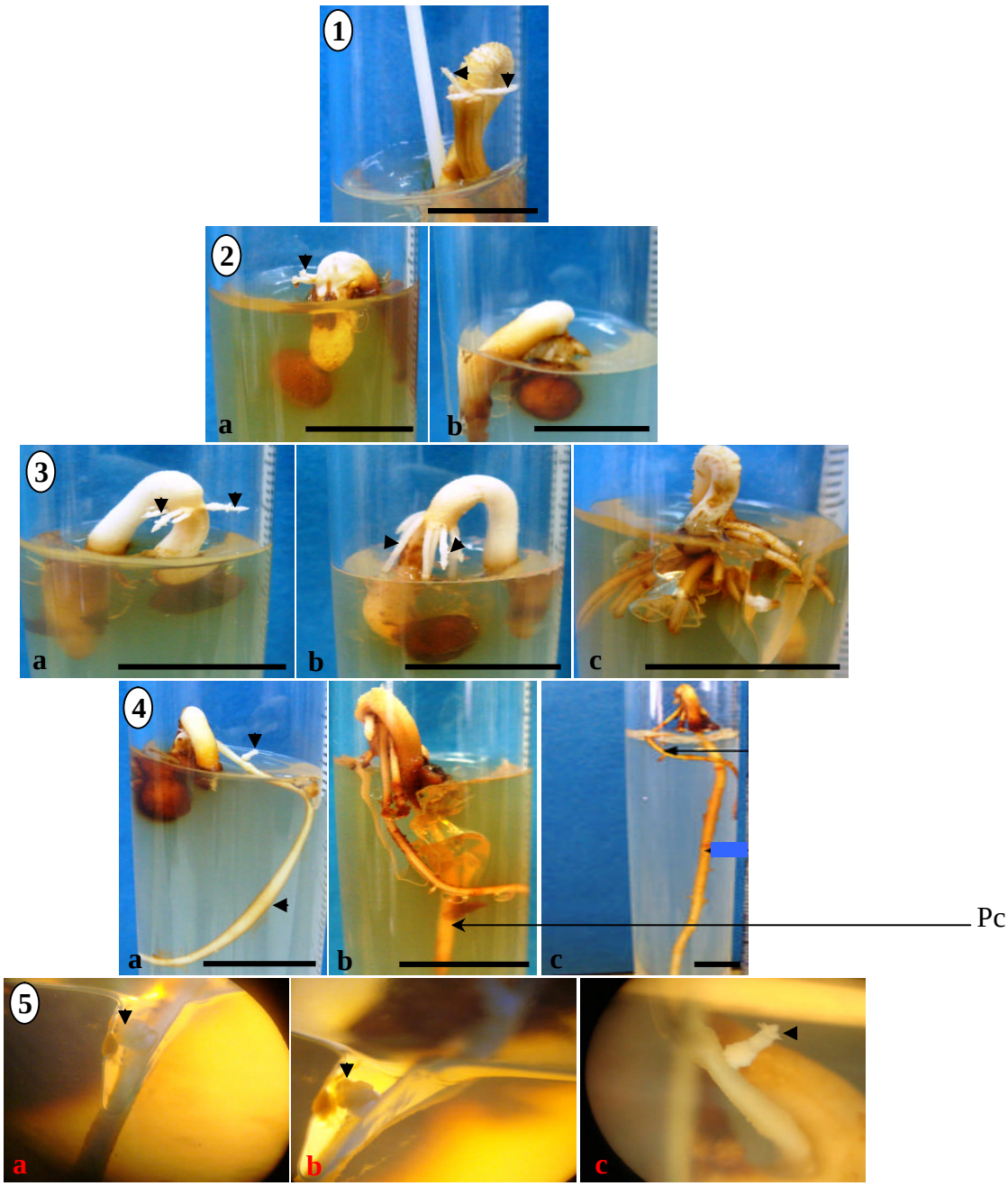


Figure 75 : Formation de racines sur la gaine cotylédonaire sur les milieux MSm_1 et MSm_2 additionnés de 30 $g.l^{-1}$ ou 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, sous la lumière bleue :

1- Milieu sans hormones.

2- BAP à 0,1 et 10 $mg.l^{-1}$; a : formation de racines épaisses (à 1 semaine de culture) ; b : les racines plongent dans le milieu, ce qui ralentit ou inhibe le développement de la plantule (à 3 semaines de culture).

3- ANA à 1 $mg.l^{-1}$; a : formation de racines fines (à 1 semaine de culture) ; b : orientation des racines vers le milieu (après 2 semaines de culture) ; c : développement intense de racines (à 6 semaines de culture)

4- AIA à 0,1 $mg.l^{-1}$; a : racine secondaire (à 4 semaines de culture) ; b : développement intense de racines sur la gaine et allongement du pétiole cotylédonaire (Pc) (à 6 semaines de culture) ; c : plante à 8 semaines de culture constituée de racines seulement.

5- Observation des stades de développement de la racine sur la gaine cotylédonaire (racine secondaire obtenue en présence d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$)). (la racine se forme après 1 semaine de culture)
a : racine ovoïde ; b : allongement de la racine ; c : racine structurée.
(G x 20)

(Les flèches indiquent l'emplacement des racines sur les gaines cotylédonaires).

3.5.3- Action des Combinaisons hormonales à base d'auxine et de cytokinine sur l'évolution des plantules en culture *in vitro*

3.5.3.1- Influence de la lumière blanche

3.5.3.1.1- Milieu MSm_1

Au cours de cette étape, nous avons mis en culture des embryons sur le milieu MSm_1, additionné de deux balances hormonales ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) avec 30 $g.l^{-1}$ de saccharose et la condition AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$) avec 50 $g.l^{-1}$ de saccharose. Les figures 76 et 77 donnent les résultats obtenus après deux mois de culture.

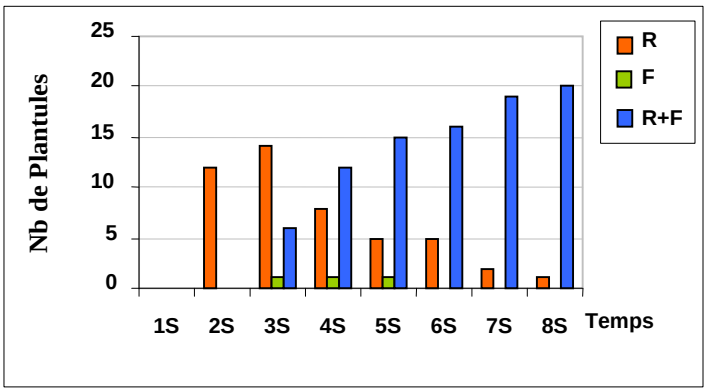


Figure 76 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

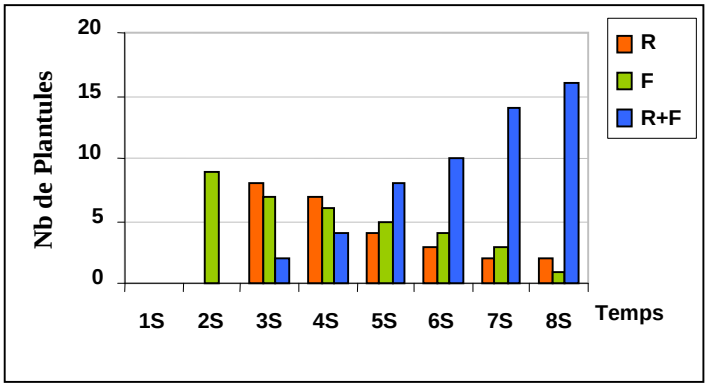


Figure 77 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

Pour 24 échantillons :

- à 30 $g.l^{-1}$, nous avons 8,33 % de contaminations et 4,16 % de nécroses.
- à 50$g.l^{-1}$, nous avons12, 5 % de contaminations et 8,33 % de nécroses.

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

A la 8^{éme} semaine de culture**,**

- à 30 $g.l^{-1}$, le pourcentage de plants présentant une racine uniquement est de 4,16 %, alors que le pourcentage de régénération de plantes entières est de 83,33 % (fig. 78a).
- à 50 $g.l^{-1}$, le pourcentage de plants avec racines seulement est de 8,33 %, le pourcentage de plants avec feuilles uniquement est de 4,16 %. Le pourcentage de plantules ayant développé des plants entiers, avec des racines atrophiées, est de 66,66 % (fig. 78b).

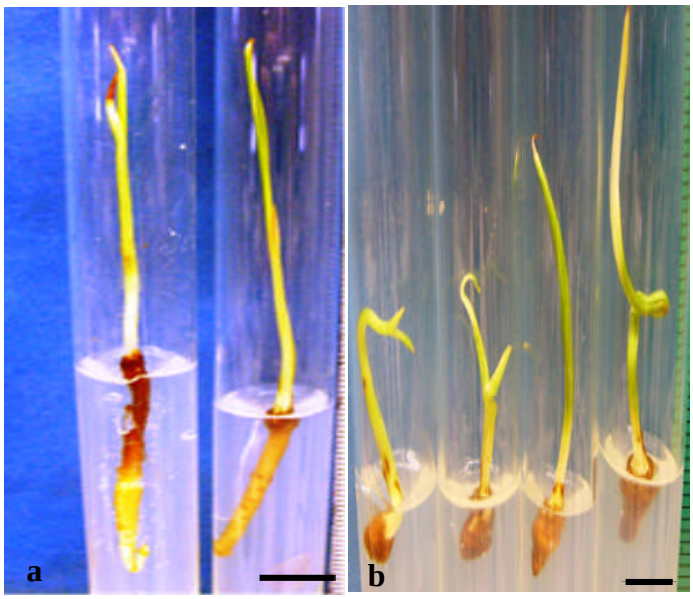


Figure 78 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière blanche

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) ; plantules ayant développé une racine principale avec une feuille juvénile.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$) ; plantes à partie caulinaire très développée et à système racinaire réduit.

3.5.3.1.2- Milieu MSm_2

Au cours de cette étape, nous avons mis en culture des embryons sur MSm_2, additionné de deux balances hormonales : ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) avec 30$g.l^{-1}$ de saccharose et la condition AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$) à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose. Les figures 79 et 80 donnent les résultats obtenus après deux mois de culture.

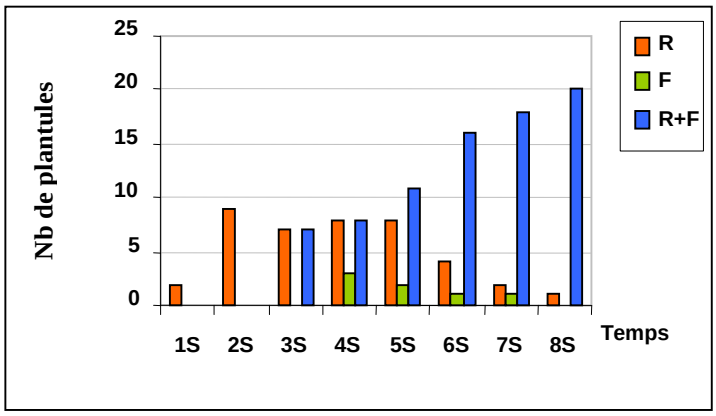


Figure 79 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

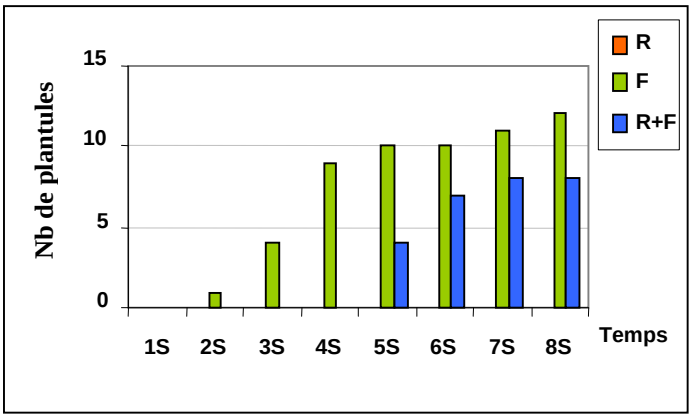


Figure 80 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

Pour 24 échantillons :

- à 30 $g.l^{-1}$, nous avons 8,33 % de contaminations et 4,16 de nécroses.
- à 50 $g.l^{-1}$, nous avons 8,33 % contaminations et 8,33 % de nécroses.

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

Après deux mois de culture ;

- à 30 $g.l^{-1}$, le pourcentage plantes présentant une racine seule, est de 4,16 %, alors que le pourcentage de plantules ayant régénéré une jeune plante est de 83,33 % (fig. 81a).
- à 50 $g.l^{-1}$, le pourcentage de plants avec des feuilles seulement est de 50 %. Le pourcentage de régénération est de 33,33 % (fig. 81b), les jeunes plantes présentent des racines atrophiées.

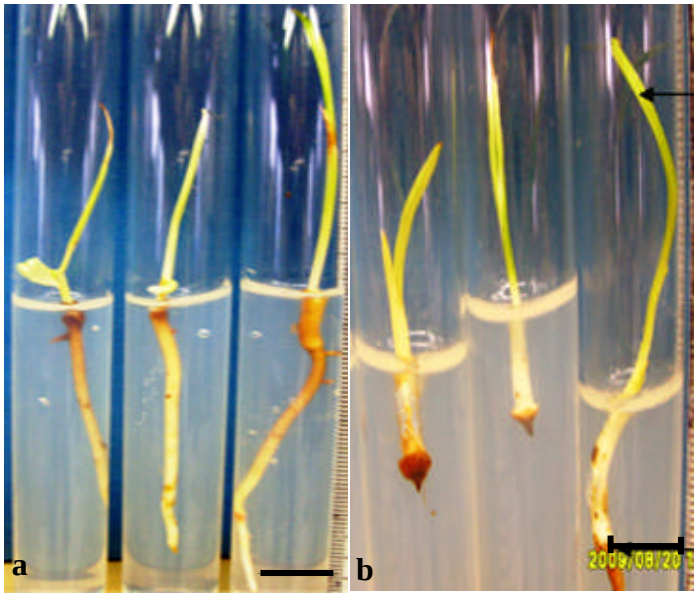


Figure 81 : Plantes du palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière blanche

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) ; les plantes sont bien développées avec des racines épaisses.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$). Plantes constituées de feuilles juvéniles bien étalées et des racines réduites.

3.5.3.2- Influence de la lumière bleue

3.5.3.2.1- Milieu MSm_1

Au cours de cette étape, nous avons mis en culture des embryons sur MSm_1, additionné de deux balances hormonales : ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose et la condition AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$) à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose. Les figures 82 et 83 résument les résultats obtenus après deux mois de culture.

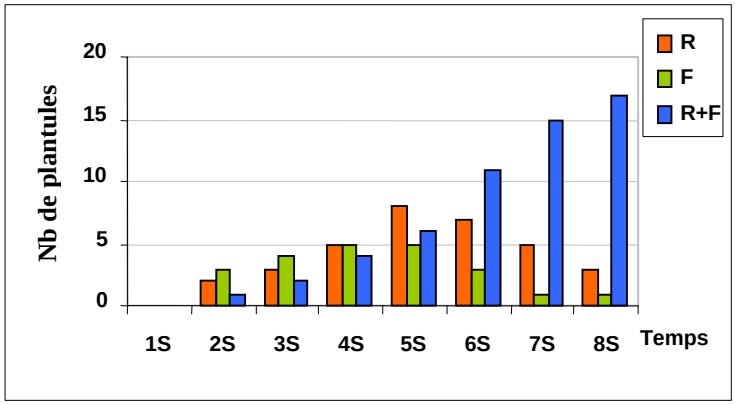


Figure 82 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

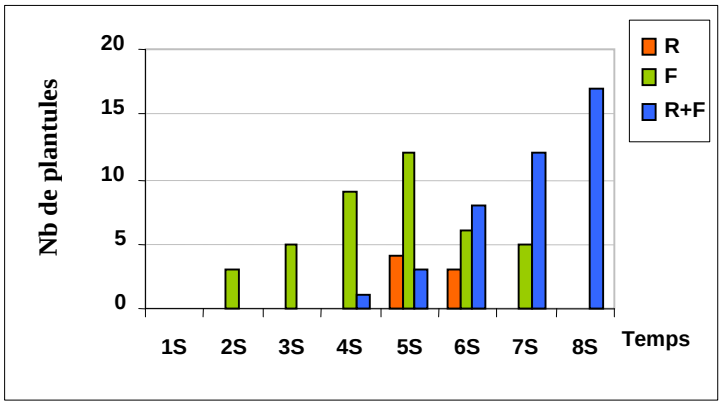


Figure 83 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_1 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

Pour 24 échantillons :

- à 30 $g.l^{-1}$, nous avons 8,33 % de contaminations et 4,16 de nécroses.
- à 50 $g.l^{-1}$/l, nous avons 16,66 % de contaminations et 12,5 % de nécroses.

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

A la 8^{éme} semaine de culture ;

- à 30 $g.l^{-1}$, le pourcentage de plantules ayant donné naissance à des racines seulement est de 12,5 %. Le pourcentage de plants avec des feuilles seulement est de 4,16 %. Le taux de régénération de plants entiers est de 70,83 %, les plants sont chétifs (fig. 84a).
- à 50 $g.l^{-1}$, le pourcentage de régénération de plants entiers est de 70,83 %, la partie caulinaire est réduite avec l'apparition de racines courtes (fig. 84b).

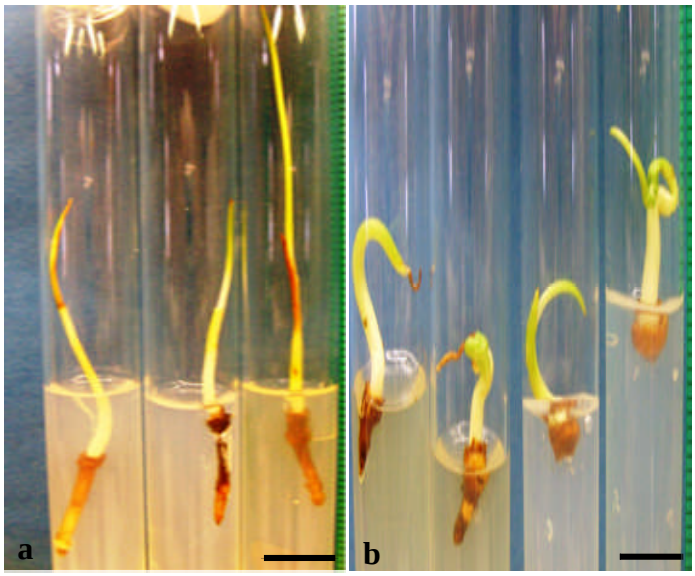


Figure 84 : Plantes de palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_1 sous la lumière bleue

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) ; les plantes sont de taille moyenne avec des racines courtes.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$) ; les plantes ont une taille réduite avec la néoformation de racines courtes.

3.5.3.2.2- Milieu MSm_2

Au cours de cette étape, nous avons mis en culture des embryons sur MSm_2, additionné de deux combinaisons hormonales : ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose et la condition AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$) à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose. Les figures 85 et 86 résument les résultats obtenus après deux mois de culture.

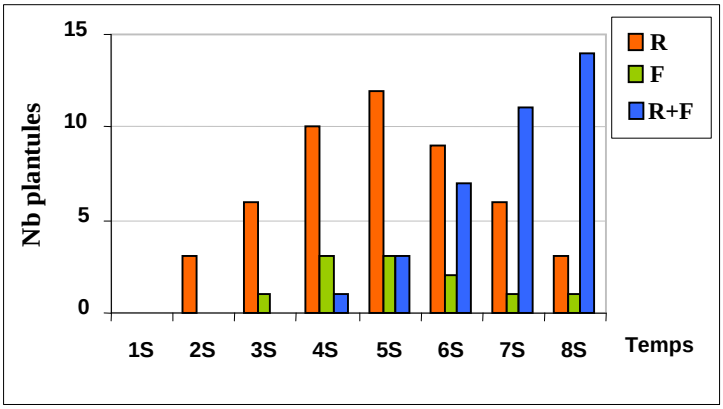


Figure 85 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

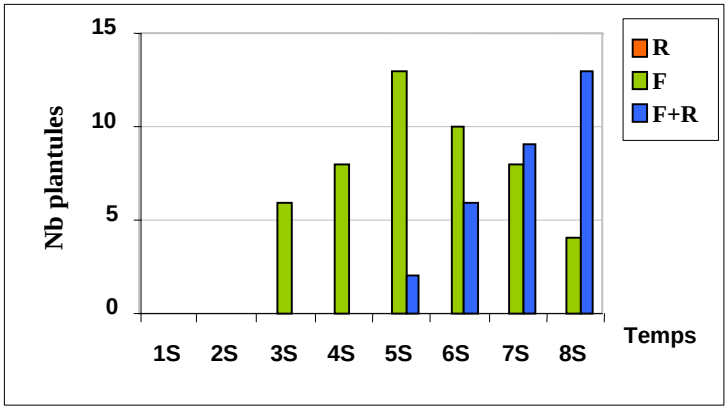


Figure 86 : Développement des embryons sur le milieu de culture MSm_2 à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$) en fonction du temps.

Pour 24 échantillons :

- à 30 $g.l^{-1}$, nous avons 20,83 % de contaminations et 4,16 de nécroses.
- à 50$g.l^{-1}$, nous avons 16,66 % contaminations et 12,5 % de nécroses.

Les observations faites sur les embryons sont les suivantes :

Après deux mois de culture ;

- à 30 $g.l^{-1}$, le pourcentage de plants présentant seulement des racines est de 12,5 %, et le pourcentage de plants présentant seulement des feuilles est de 4,16 %, alors que le pourcentage de plantes avec des feuilles et des racines est de 58,33 %, on note un développement homogène de la partie caulinaire et de la partie racinaire (fig. 87a).
- à 50 $g.l^{-1}$, le pourcentage de plants présentant des feuilles seulement est de 16,66 %, alors que le pourcentage de plantes ayant des feuilles et des racines est de 54,16 %. Les plumules sont de grande taille, nous notons l'induction de racines courtes (fig. 87b).

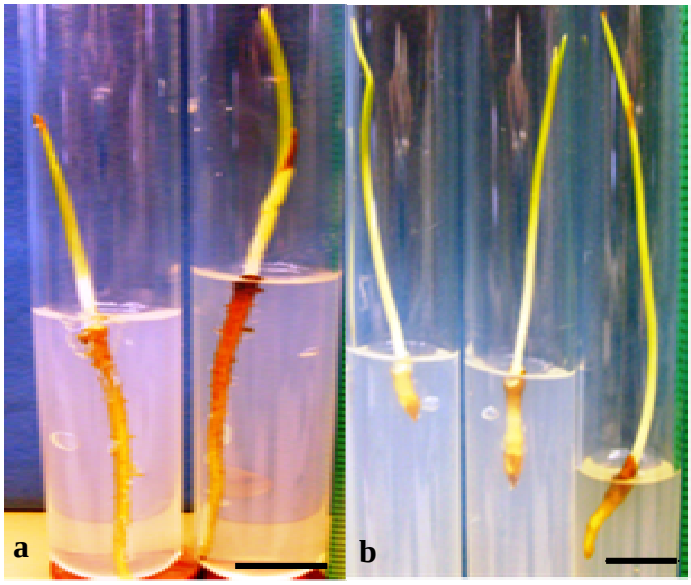


Figure 87 : Plantes de palmier dattier Cv. Tk, cultivées sur le milieu MSm_2 sous la lumière bleue

a : Plantes à 8 semaines de culture à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'ANA (1 m $g.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) ; développement équilibré de la partie caulinaire et racinaire.

b : Plantes à 8 semaines de culture à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, additionné d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$) ; induction de racines courtes sur des plantules ayant régénéré une partie caulinaire, constituée de plumules avec début d'apparition de feuilles juvéniles.

Après deux mois de culture les résultats des figures (76, 77, 79, 80, 82, 83, 85 et 86) montrent que les deux combinaisons ont permis une différenciation des embryons en plants.

La comparaison des résultats obtenus par rapport aux témoins (MSm_1 et MSm_2), sous lumière blanche, montre qu'un apport de substances de croissance sous forme d'auxine-cytokinine combinée est défavorable, d'une part, pour le taux de survie. D'autre part pour la régénération de plantes, ainsi que dans la réduction du temps d'expression des embryons. Ce qui d'ailleurs contredit les résultats obtenus par STITI (1992) sur la variété Takerboucht, BARKA (2000) et BENMIHOUB (2009) sur la variété Deglet-Nour. Cela s'explique par la position et la taille des embryons en culture. En fait, ces trois auteurs ont mis en culture des embryons de 3 mm en position couchée (limbe cotylédonaire en contact partiel avec le milieu) ce qui a entravé considérablement leur développement dans les milieux de base. En présence des activateurs de croissance, ils ont enregistré une réduction du temps de réactivité des embryons suivie d'une augmentation du pourcentage de régénération et par conséquence du taux de survis.

Nos résultats corroborent ceux de HAMLAT (1995) sur *Olea europaea* var. chemlal, pour qui les milieux les plus favorables au développement des embryons, sont les milieux de base. De même que TABTI-CHELLI (2010), a noté l'effet positif d'un milieu constitué d'eau gélosée pour la régénération des embryons de l'*O. europaea* var. chemlal, ou les pourcentages étaient plus élevés par rapport au milieu MS (1962).

Selon MONNIER (1995), les embryons isolés se développent mieux sur des milieux de base tel le milieu MS (1962), sans aucun apport hormonal.

Dans notre expérimentation, les milieux les plus satisfaisants sont ceux qui ont associé 1 $mg.l^{-1}$ d'ANA à 0,1 $mg.l^{-1}$ de BAP (83,66 % de plants sur MSm_1) (fig. 78a) ; et 83,33 % de plants sur MSm_2 (fig. 81a), pour cette combinaison contrairement aux résultats de AMMAR et BENBADIS (1977), aucune inflorescence n'a été observée sur les plantes du palmier dattier variété Takerboucht.

L'association 0,1 $mg.l^{-1}$ d'AIA à 10 $mg.l^{-1}$ de BAP 66,66 % de plants obtenus (fig. 78b) sur MSm_1 et 33,33 % de plants obtenus (fig. 81b) sur MSm_2 a réduit considérablement les pourcentages de plants régénérés, néanmoins le même résultat a été signalé par YAKOUB-BOUGDAL (1987) sur la culture d'embryons de palmier, en présence de la même combinaison à savoir l'obtention de plants à système racinaire réduit.

En effet, une forte concentration de BAP, peut être à l'origine du faible taux de rhizogenèse. D'après ALLEMAND (1982 *in* BAGHDADI, 2007) la présence d'une cytokinine notamment la BAP à dose généralement faible, est indispensable pour le développement des embryons de plusieurs essences ligneuses.

Nos essais effectués sur les plantules ont mis en évidence l'effet positif de la BAP à une dose de 0,1 $mg.l^{-1}$ en combinaison avec l'ANA à la dose de 1 $mg.l^{-1}$; par rapport à l'association BAP (10 $mg.l^{-1}$) + AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) sur les deux milieux de base MSm_1 et MSm_2.

Ces mêmes résultats ont été rapportés par STITI (1992), BARKA (2000) et BENMIHOUB (2009) sur le palmier dattier.

En effet, selon RHISS (1980), la BAP donne de meilleurs résultats lorsqu'elle est utilisée avec les auxines à faible dose.

Nos résultats rejoignent ceux obtenus par HAMLAT (1995) sur les embryons d'*O. europaea* L. variété Chemlal. HAMLAT (1995), a signalé que les milieux les plus favorables à un développement précoce, sont les milieux qui contiennent tous en commun l'ANA (0,1 $mg.l^{-1}$ ou 1 $mg.l^{-1}$), qu'elle soit associée ou non à une autre hormone (BAP : 0,05 ou 0,1 $mg.l^{-1}$). Il a montré aussi que l'addition de la BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) en plus d'ANA (1 $mg.l^{-1}$) a un effet bénéfique sur le taux de régénération et de survie.

Contrairement à nos attentes, les résultats en lumière bleue sont peu satisfaisants, en effet, après deux mois de culture le taux de plantules développant des plants entiers est de 70,83 % sur MSm_1 contre 50,38 % sur MSm_2 avec l'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$). En présence d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$), les résultats obtenus étaient pratiquement les mêmes 70,83 % sur MSm_1 et 54,16 % sur MSm_2.

Sous l'effet d'un bref traitement de lumière bleue il y'a eu induction de racines courtes sur MSm_2 et MSm_1 en présence d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + BAP (10 $mg.l^{-1}$), contrairement à la lumière blanche où les plantes étaient à système racinaire réduit, ce qui conforte nos résultats par rapport au rôle des radiations bleues, dans la néoformation racinaire.

Une observation plus minutieuse des vitroplants cultivés sous lumière bleue et blanche additionnée de combinaisons hormonales ; révèle que la lumière bleue a réduit considérablement le développement des plantules par apport a ceux développés sous lumière blanche, ceci peut être dû, soit aux combinaisons utilisées, soit au temps d'exposition à la lumière bleue, il sera donc judicieux d'élargir la gamme des traitements utilisés.

Conclusion

CONCLUSION

L'obtention de jeunes pousses par culture *in vitro* d'embryons isolés de la variété Takerboucht, variété résistante, est une méthode permettant de raccourcir le cycle de reproduction sexué et d'aboutir rapidement à la multiplication végétative.

L'utilisation d'embryons zygotiques ne permet pas de réaliser une multiplication végétative conforme et donc ne pouvant pas satisfaire la demande en vitroplants et résoudre le problème posé par la fusariose. Elle reste malgré tout importante en fournissant des sujets utiles dans le cas des programmes d'amélioration génétique ayant pour objectif la création de nouvelles variétés (MONNIER, 1995).

Cependant, l'intérêt de ce travail est d'apporter une amélioration de la technique de culture *in vitro* assurant l'obtention de plants viables, sains et entiers ; ainsi les résultats obtenus sont les suivants :

La première étape : consiste en une germination *in-vitro* des graines de palmier dattier, variété : Takerboucht.

La germination des graines de palmier dattier est du type tubulée remotive ; caractéristique de la classification de tous les palmiers (GOVAERTS et DRANSFIELD, 2005) : le pétiole et la gaine cotylédonaire finissent par se nécroser lorsque leur rôle d'intermédiaire pour l'utilisation des réserves est achevé (GATIN, 1912; TILLICH, 1995 et 2000).

La deuxième étape : concerne les tests préliminaires, à savoir l'influence de la taille, de la position, de la suppression de l'haustorium et de la gaine cotylédonaire. Ces essais se sont avérés plus favorables à l'obtention de plants entiers et viables.

On retient de l'étude de ces effecteurs sur la germination, que l'embryon de palmier Cv. Takerboucht germe et se développe mieux à 5 mm et en position debout. Lorsque la position est debout, l'organe de digestion des réserves (Lc) a plus de contact avec la solution nutritive. Ce qui a réduit considérablement le temps de réactivité des explants et a augmenté le taux de survie d'une façon très significative. La suppression de l'haustorium et de la gaine cotylédonaire, n'affiche aucune différence significative. Aussi, les embryons développés sans haustorium ont un bon aspect qualitatif et quantitatif. De plus, la suppression de l'haustorium et de la gaine cotylédonaire réduit le brunissement et donc diminue le nombre de repiquage et par conséquent minimise les risques de contaminations endophytiques.

La troisième étape : la culture *in-vitro* des embryons

Dans un premier temps, nous avons déterminé le milieu de culture le plus adéquat à la culture des embryons.

Parmi les cinq milieux testés (MS, MSm_1, MSm_2, DKW et GA), les milieux MSm_1 et MSm_2 se sont avérés plus favorables à l'obtention de plants entiers et viables alors que le milieu (GA) était le moins efficace pour la variété étudiée.

Dans un second temps, nous avons étudié l'action des radiations bleues sur la culture des embryons, afin d'améliorer leur germination, et la synthèse de leucoanthocyanes régulés par le cryptochrome des embryons (FURUYA et SHAFER, 1996). Cela nous a permis de sélectionner le traitement composite : 1 semaine de lumière bleue suivi d'une exposition à la lumière blanche.

Nous avons montré que le temps d'exposition aux radiations bleues a une action sur la réactivité des embryons mis en culture. En effet, un traitement court en lumière bleue parait convenir le mieux à la production de plants (action favorable sur la germination et sur le développement de la plantule). Le traitement réduit considérablement le temps d'expression des embryons (100 % de plants régénérés après 5 semaines de culture). Aussi, une observation plus minutieuse des vitroplants, permet de constater que la taille et la vigueur sont nettement meilleures. Une exposition à la lumière bleue supérieure à une semaine provoque une embryogenèse plus faible, quelle que soit la mesure considérée.

Par ailleurs, l'analyse quantitative des leucoanthocyanes au sein des embryons en culture, révèle la présence et la variation des concentrations en leucoanthocyanes dans les embryons, ce qui confirme leur photosensibilité (CALERO, 1989). L'absence de différence significative des teneurs entre le milieu MSm_1 et MSm_2 (sous une même condition) laisse supposer que la synthèse des leucoanthocyanes est régie par la nature de l'éclairement (WINKEL-SHIRLEY, 2002).

Les résultats montrent aussi que deux phases se succèdent durant la mise en culture. Ces phases se distinguent à la fois par la sensibilité à la lumière (mesurée par la teneur en leucoanthocyanes sous différentes radiations) et par le temps de réactivité et de l'exaltation morphogène des embryons.

Durant la première semaine de culture, le cryptochrome est actif (les radiations bleues sont plus actives sur la synthèse de leucoanthocyanes par rapport à la lumière blanche), est le taux de réactivité est important ;

Après la deuxième semaine, l'activité des différents photorécepteurs change progressivement, ainsi les teneurs diminuent sensiblement sous les radions bleues. Alors qu'en lumière blanche les concentrations augmentent progressivement, ce qui provoque de plus forte synthèse (22,04 $mg.g^{-1}$ pour MSm_1 et 19,03 $mg.g^{-1}$ pour MSm_2). Parallèlement, durant la deuxième semaine, la réactivité est corrélée négativement à la teneur en leucoanthocyanes sous la lumière bleue.

Il y a donc un seuil, pour lequel il existe une symétrie entre l'évolution de la sensibilité à la lumière et celle du temps de réactivité et de l'exaltation morphogène des embryons chez le palmier dattier var. Takerboucht.

La dernière étape : la culture des plantules sur milieu MSm_1 et MSm_2 en présence de substances de croissance, utilisée individuellement ou en couple auxine-cytokinine, sous

l'influence d'un traitement composite (bleu/blanc) et d'un témoin à la lumière blanche et de deux concentrations en saccharose nous a permis de constater que :

Les résultats des cultures dépendent essentiellement de la nature de la lumière et de la concentration du saccharose. En effet, la culture des embryons montre que les potentialités de prolifération ne répondent pas de la même façon vis-à-vis de la lumière, à la même concentration de saccharose. Ainsi sur milieux MSm_1 et MSm_2 additionnés à 30 $g.l^{-1}$ de saccharose, nous avons obtenu un taux élevé de caulogénèse et de rhizogenèse (plants régénérés : 100 % sur MSm_1 respectivement en lumière bleue et blanche et 95,83% et 91,66 % sur MSm_2 respectivement en lumière bleue et blanche, alors qu'à 50 $g.l^{-1}$ de saccharose, le temps et le taux de réactivité sont plus faibles : 87,5 % et 83,33 % sur MSm_1 respectivement en lumière bleue et blanche et 79,16 % et 83,33 % sur MSm_2 respectivement en lumière bleue et blanche. L'effet d'un bref traitement en lumière bleue, dans le processus de germination des embryons de palmier dattier var. Takerboucht permet de réduire le temps de réactivité des embryons (apparition de 25 % de racines après 1 semaine de culture).

De toutes les hormones testées AIA, BAP, seule l'ANA (1 $mg.l^{-1}$) parait convenir mieux à la production de plants.

L'AIA 0,1 $mg.l^{-1}$ additionnée de 50 $mg.l^{-1}$ sur MSm_2, a manifesté un pouvoir caulogène, présentant ainsi le même comportement que la BAP à 10 $mg.l^{-1}$, à savoir des plants à système racinaire très réduit (sous lumière blanche).

L'effet des radiations bleues a manifesté un pouvoir rhizogène. En effet, un traitement bref en lumière bleue a induit d'une part : la néoformation de racines (racines courtes) sur des plantules cultivées sur MSm_2 additionnées de BAP (10 $mg.l^{-1}$) et/ ou la néoformation de racines longues, sur lesquelles se sont développées des racines latérales en présence d'AIA (0,1 $mg.l^{-1}$). D'autre part, ils ont stimulé plus particulièrement la formation de racines, sur la gaine cotylédonaire, indifféremment sur MSm_1 et MSm_2 et ce quelque soit l'hormone associée (auxine ou cytokinine) et la concentration appliquée. Cela souligne l'aptitude de la gaine cotylédonaire à former des racines. Ces observations supposent que la gaine cotylédonaire manifeste une bonne réactivité rhizogène (des observations similaires ont été rapportées par AMMAR et *al*. (1983) et STITI (1992) sur la culture d'embryons du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. sous l'action de l'auxine seule).

Concernant l'effet des combinaisons à base d'auxine-cytokinine, sur le comportement des plantules en culture, soumises à la lumière blanche, l'ANA (1 $mg.l^{-1}$) + BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) est favorable à la production de plants, en culture sur MSm_1 (83,66) et MSm_2 (83,33) ; contrairement à l'AIA 0,1 $mg.l^{-1}$ + BAP 10 $mg.l^{-1}$ où les plantes présentaient un pouvoir caulogène.

De même, les résultats sous l'effet d'un bref traitement en lumière bleue, n'ont pas été satisfaisants pour l'objectif fixé. Nous avons enregistré des taux de régénérations faibles et identiques, sur un même milieu pour les deux combinaisons. Sous l'effet d'un traitement

composite (bleue/blanche), une néoformation de racines est observée sur des plantules cultivées sur MSm_1 et MSm_2, additionnées d'AIA 0,1 $mg.l^{-1}$ + BAP 10 $mg.l^{-1}$.

Ainsi, il se dégage de la plupart de nos observations que les milieux riches en cytokinines favorisent la formation de bourgeons, alors que les milieux auxiniques donnent des pourcentages élevés en racines.

Aussi, ces résultats montrent que pour parfaire la culture de plantules, en absence d'albumen il faut additionner aux substances minérales, des substances organiques agissant à de faibles doses et permettant l'accélération de la germination de l'organe et donc l'orientation de son évolution vers l'objectif voulu.

L'effet d'un éclairement bref en lumière bleue est favorable au développement des embryons (temps moyen de germination réduit et plants vigoureux). De plus, ils stimule la rhizogenèse et favorise la reconstitution de plantes entières sur des embryons excisés de palmier dattier Cv. Takerboucht.

Références bibliographiques

- **ABERLENC-BERTOSSI F., SANÉ D., DAHER A., BORGEL A. et DUVAL Y., 2006.** Aptitude à la déshydratation des embryons zygotiques de palmier à huile et de palmier dattier : étude de l'expression de gènes LEA. Les Actes du BRG. 6 : 401-413.
- **AHMAD M. (1999).** Seeing the world in red and blue: insight into plant vision and photoreceptors. Plant Biology 2, 230-235.
- **AHMED I. A., AHMED A. W. K. et ROBINSON R. K., 1995.** Chemical-composition of date varieties as influenced by the stage of ripening. *Food Chemistery*, Vol. 54, (3), pp: 305-309.
- **AL-SALIH, A. A. et AL RAWI A**., **1987.** A study of the cytology of two female cultivars of **date palm**. **Date Palm** J. 5, 123–142.
- **AL-AFIFI M. et AL-BADAWI A., 1998.** Proceedings of the First International Conference on Date Palm. Al-Ain, UAE, March 8-10, 1998. 643 p.
- **AL-KHATEEB A. A. (2008).** Regulation of in vitro bud formation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.)cv. Khanezi by different carbon sources. *Bioresource Technology*, 99, pp: 6550–6555.
- **AL-KHAYRI J. M., 2007.** Date palm *Phoenix dactylifera* L. micropropagation. *In* **JOIN S. M. et HÄGGMAN H., 2007.** Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Editions Springer, Netherlands, chap 46, pp: 509-526.
- **AL-SHAHIB W. et MARSHALL R. (2003).** The fruit of the date palm: its possible use as the best food for the future?. International Journal of Food sciences and Nutrition 54(4), 247-259.
- **AMER W. M., 1994.** Taxonomic and documentary study of food plants in Ancient Egypt. Ph.D. Thesis, Cairo University (voir aussi : AMER W. M., History of Botany Part 1: The Date Palm in Ancient History, Botany Department, Faculty of Science, Cairo University, Egypt [http://www.levity.com/alchemy/islam08.html]).
- **AMMAR S. et BENBADIS A. K., 1977.** Multiplication végétative de palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. par la culture de tissus de jeunes plantes issues de semis. *C. R. Hebd.* Séances *Acad. Sci. Sér*. D, 284: 1789-1791.
- **AMMAR S., 1978.** La culture de tissus de plantes issues de graines, appliquée à la multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Thèse de Doctorat. Fac. Sc., Tunis, 107 p.
- **AMMAR S., BENBADIS A. K. et DRIRA N., 1983.** La culture *in vitro* du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Bulletin *Soc. Bot.* (2) 102: 130, résumé.
- **APG II, 2003.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc.* 141:399-436.
- **ASSY BAH B. DURAND-GASSELIN T. ENGELMANN F. et PANNETIER C., 1989.** The *in vitro* culture of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos. Revised and

simplified method for obtaining coconut plantlets, suitable for transfer to the field. Oléagineux, 44 (11): 521-523.

- **AUGE R., 1989.** Les phénomènes physiologiques lies à la réalisation des cultures *in vitro*. *In* **AUGE R., BEAUCHESNE G., BOCCON-GIBOD J., DECOURTYE L., DIGAT B., JALOUZOT R., MINIER R., MORAND J. C., REYNOIRD J. P., STRULLU D. G. et VIDALIC H., 1989.** La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Editions TEC&DOC, Paris, Chap. II, pp: 7-29.
- **BAAZIZ M. et BENDIAB K., 1994.** Amélioration génétique du palmier dattier assistée par les marqueurs biochimiques et moléculaires ; in « Quel avenir pour l'amélioration des plantes ? ». Ed AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, pp: 413-422.
- **BAGHDADI H., 2007.** Essais de régénération de deux pistachiers: *Pistacia vera* L. et *Pistacia atlantica* Desf. par semis, bouturage et culture *in vitro*. Mémoire de magister, U.S.T.O., Oran, 151 p.
- **BALLARE C. L., SANCHEZ R. A., SCOPEL A. L., CASAL J. J., et GHERSA C. M., 1987.** Early detection of neighbour plants by phytochrome perception of spectral changes in reflected sunlight. *Plant, Cell and Environment.* 10, pp: 551-557.
- **BARKA O., 2000.** Influence des régulateurs de croissance sur les embryons et les extrémités du pétiole cotylédonaire de Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) var Deglet Nour cultivé *in-vitro.* Mémoire Ing., FSBA, UMMTO, 96 p.
- **BARROW S. C., 1998.** A monograph of *Phoenix* L. (*Palmae*: *Coryphoideae*). Kew Bull. 53, part 3: 513-575.
- **BARROW S. C., 1999.** Systematic studies in *Phoenix* L. (*Palmae*: *Coryphoideae*). *In* **HENDERSON A. and BORCHSENIUS F., 1999.** Evolution, variation and classification of palms. HENDERSON and BORCHSENIUS eds., *Memoirs of New York Botanical garden* 83: 215-223.
- **BASHAH M. A., 1996.** Date variety in the Kingdom of Saudi Arabia. Guidance booklet. Palms and Dates. King Abdulaziz University Press. Riyadh. Saudi Arabia.
- **BEAL J. M., 1937.** Cytological studies in the genus *Phoenix*. *Bot. Gaz.* 99 : 400-407.
- **BELARBI-HALLI R., DEXHEIMER J. Et MANGENOT F., 1983.** Le pneumatode chez *Phoenix dactylifera* L. Structure et ultrastructure. Can. J. Bot., 61 : 1367-1376.
- **BELARBI-HALLI R., DEXHEIMER J. Et MANGENOT F., 1984.** Le pneumatode chez *Phoenix dactylifera* L. Ultrastructure de la paroi de la cellule aérifère chez des pneumatodes jeunes provenant de cultures axéniques. Can. J. Bot., 62 : 972-981.
- **BELGUEDJ M. et SALHI A., 2006.** Perspectives de lutte biologique contre les ravageurs du palmier dattier dans la région de Biskra. *In* **ABED F., 2006.** Conférence régionale : Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier Contre le Bayoud. Alger, pp: 66-68.

- **BENBADIS A. K., 1992.** Coconut and date palm. *In* **HAMMERSCHLAG F. A. et LITZ R. E., 1992.** Biotechnology of Perennial Fruit Crops. CAB International, Wallingford, pp: 383-400.
- **BENKHALIFA A., 2006.** Situation de la lutte contre le bayoud en Algérie. *In* **ABED F., 2006.** Conférence régionale : Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier Contre le Bayoud. Alger, pp: 1-2.
- **BENMAHIOUL B., 2009.** Amélioration de la micropropagation *in vitro* du pistachier (*Pistacia vera* L.) en vue de l'extension des vergers en Algérie. Thèse de doctorat, faculté des sciences, USTOMB, 137 p.
- **BENMIHOUB S., 2009.** Influence des milieux de culture sur la croissance des extrémités cotylédonaires et des embryons du dattier (*phoenix dactylifera* L.) var Deglet Nour, cultivés *in-vitro*. Mémoire de DES, FSBA, UMMTO, 77 p.
- **BETA T., NAM S., DEXTER J. E. et SAPIRSTEIN H. D., 2005.** Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal chem*., pp : 390-393.
- **BLANC A. MERY J. C. et BOISARD J., 1996.** Action des radiations de lumière rouge sur la survie et la tubérisation de germes de pomme de terre cultivés '*in vitro*' : influence de leur âge physiologique. *Potato research* 29 : 381-389.
- **BOUNAGA N. et DJERBI M., 1990.** Pathologie du Palmier dattier : Les systèmes agricoles oasiens. Options Méditerranéennes, *Sér*. A (11) : 128-132.
- **BOUNAGA N., 1991.** Le palmier dattier: rappels biologiques et problèmes physiologiques. *In* **RIEDACKER A., DREYER E., PAFADNAM C., JOLY H., BORY G., 1991.** Physiologie des Arbres et Arbustes en zones arides et semi-arides. Editions John Libbey Eurotext, Paris, pp: 323-336.
- **BRIGGS W. et CHRISTIE J., 2002.** Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. Plant Science 7(5), 204-209.
- **BRIGGS W. R. et HUALA E., 1999.** Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 15, pp : 33-62.
- **BRUNETON J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (3^{e} édition). Editions TEC & DOC, Paris, 1120 p.
- **CALERO N. (1989).** Action de radiations rouges et bleues sur l'embryogenèse somatique du palmier dattier (*phoenix dactylifera* L.) en culture *in vitro* et sur sa teneur en leucoathocyanes. C. R. Société de Biologie 183, pp : 307-313.
- **CARPENTER J. B. et ELMER H. S., 1978.** Pests and diseases of date palm. United States Department of Agriculture, Agriculture Handbook, Washington DC, N° 527, 42 p.
- **CHALKER-SCOTT L. (1999).** Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. Food Technology, 53, 46–48.
- **CHAMPAGNAT R., BAILLAUD L. et OZENDA P., 1969.** Biologie végétale III. Croissance, morphologie et reproduction. Edition Masson, Paris, 417 p.

- **CHAO C. T. et KRUEGER R. R., 2007.** The Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.): Overview of Biology, Uses and Cultivation. HortScience 42 (5): 1077-1082.
- **CHASE M. W., STEVENSON D. W., WILKIN P. et RUDALL P. J., 1995.** Monocot systematics: a combined analysis. *In* **RUDALL P. J., CRIBB P. J., CUTLER D. F. et HUMPHRIES. 1995.** Monocotyledons: systematics and evolution. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK, pp: 685-730.
- **CHASE M. W., SOLTIS D. E., SOLTIS P. S., RUDALL P. J., FAY M. F., HAHN W. J., SULLIVAN S., JOSEPH J., MOLVRAY M., KORES P. J., GIVNISH T. J., SYTSMA J. et PIRES J. C., 2000.** Higher-level systematics of the monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. *In* **WILSON K. L. et MORRISON D. A., 2000.** Systematics and evolution of monocots, CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia, pp: 3-16.
- **CHEIKH R., ZAID M. et AIT CHITT A., 1989.** Travaux de recherche conduits sur l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Compte rendu du deuxième séminaire maghrébin, sur la multiplication rapide du palmier dattier par les techniques de culture *in vitro*. 9-12 Octobre, Maroc, résumé.
- **CHEVALIER A., 1952.** Recherches sur les *Phoenix* africains. *Rev. Int. Bot. Appl. Agric. Trop*. 32: 205-236, 355-356.
- **COMBES D., 2002.** Comparaison de modèles de transferts radiatifs pour simuler la distribution du rayonnement actif sur la morphogenèse (MAR) au sein d'un peuplement végétal à une échelle locale. DEA Université BLAISE PASCAL, Clermont-Ferrand, 132 p.
- **COME D., 1970.** Les obstacles de la germination. Edition Masson et Cie, Paris, 162 p.
- **CORNER E. J. H., 1966.** The natural history of palms. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 393 p.
- **DAGNELIE P., 1980.** Statistiques théoriques et appliquées: Les bases théoriques. *Presses Agr*., tome I, Gembloux, 436 p.
- **DAVID A., 1972.** Effets de diverses solutions minérales sur la néoformation des tissus de pin maritime en culture *in-vitro*. *C.R. Acad. Sci*., Paris, t. 275.
- **DELA G., OR E., OVADIA R., NISSIM-LEVI A., WEISS D. et OREN-SHAMIR M. (2003).** Changes in anthocyanin concentration and composition in 'Jaguar' rose flowers due to transient high-temperature conditions. Plant Science 164, 333-340.
- **DJERBI M., 1988.** Les maladies du palmier dattier. Projet régional de lutte contre le Bayoud, FAO, 127 p.
- **DJERBI M., 1991.** Biotechnologie du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : voies de propagation des clones résistants au bayoud et de haute qualité dattière. Options Méditerranéennes, Série Séminaires, 14, pp : 31-38.

- **DJILLALI Z., 2008.** Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmier dattier (cultivars Deglet Nour et Takerboucht) en vue de la résistance contre le Bayoud. Mémoire de magister, I.N.A., Alger, 98 p.
- **DOWSON et ATEN, 1962.** Dates Handling, Processing and Packing. (FAO) Plant Production and Protection Series N° 13/FAO Agricultural Development, N° 72. FAO, Rome, 392.
- **DRIRA N., 1985.** Multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par néoformations induites en culture *in vitro* sur des organes végétatifs et floraux prélevés sur la phase adulte. Thèse d'état es-sciences. Faculté des Sciences de Sfax, Tunis, 121 p.
- **DRIVER J. A. et KUNIYKI A. H., 1984.** *In vitro* propagation of *Paradox walnut* rootstock. *Hort*. *Sciences*. 19 (4): 507-509.
- **DUVALL M. R., CLEGG M. T., CHASE M. W., CLARK W. D., KRESS W. J., HILLS H. G., EGUIARTE L. E., SMITH J. F., GAUT B. S., ZIMMER E. A. et LEARN G. H., 1993a.** Phylogenetic hypotheses for the monocotyledons constructed from *rbcL* sequences data. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 607-619.
- **DUVALL M. R., LEARN G. H., EGUIARTE L. E., et CLEGG M. T., 1993b.** Phylogenetic analysis of *rbc*L sequences identifies *Acorus calamus* as the primal extant monocotyledon. *Proceedings of the national Academy of sciences,* USA 90: 4641-4644.
- **EEUWENS C. J., 1978.** Effects of organic nutrients and hormones in growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera* L.) palms cultured *in vitro*. *Physiol*. *Plant*., 42 : 173-178.
- **EL HADRAMI I., 1991.** Rapport de synthèse de l'atelier "Culture *in vitro* du Palmier dattier". Options Méditerranéennes, Série Séminaires, 14 : 167-177.
- **EL HADRAMI I., 1995.** L'embryogenèse somatique chez *Phoenix dactylifera* L.: quelques facteurs limitants et marqueurs biochimiques. Thèse d'état es-sciences, Université Cadi AYYAD, Marrakech, 227 p.
- **EL HADRAMI et BAAZIZ, 1995.** Somatic embryogenesis and analysis of peroxidases in *Phoenix dactylifera* L.. *Biologia Plantarum*, 37, pp: 205-211.
- **EL HADRAMI I. et EL HADRAMI A., 2009.** Breeding Date Palm. *In* **JAIN S.M. et PRIYADARSHAN P.M., 2009.** Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species. Editions Springer New York, Chap. 6 : 191-216.
- **EL MODAFAR C. et EL BOUSTANI E.-S., 2002.** Contribution des polyphénols aux mécanismes de défense des plantes. *In* **REGNAULT-ROGER C., PHILOGENE B. JR. et VINCENT C., 2002.** Biopesticides d'origine végétale. Editions TEC&DOC, Paris, chap. 11, pp: 169-185.
- **FANKHAUSER C. (2002).** Light perception in plants: cytokinins and red light join forces to keep phytochrome B active. Plant Science 7(4), 143-145.

- **FAYADH J. M. et AL-SHOWIMAN S. S., 1990.** Chemical composition of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *J. Chem. Soc. Pa*k. 12: 84-103.
- **FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2004.** Key statistics of food and agriculture trad. *In* http://www.fao.org/es/ess/toptrad.
- **FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2005.** Key statistics of food and agriculture trad. *In* http://www.fao.org.
- **FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2006.** 2005 worldwide dates production statistics. *In* http://www.faostat.fao.org/faostat/servlet/toptrad.
- **FERRY M., TOUTAIN G. et MONFORT S., 1991.** La multiplication du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *In* **RIEDACKER A., DREYER E., PAFADNAM C., JOLY H., BORY G., 1991.** Physiologie des Arbres et Arbustes en zones arides et semi-arides. Editions John Libbey Eurotext, Paris, pp: 353-363.
- **FKI L., MASMOUDI R., DRIRA N. et RIVAL A., 2003.** An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Deglet Nour. *Plant cell Rep*., 21: 517-524.
- **FRANKLIN K., 2009.** Light and temperature signal crosstalk in plant development. Plant Biology, 12: 63-68.
- **FURUYA M. et SCHÄFER. (1996).** Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes. *Plant science*, 1 (9): 301-306.
- **GAMBORG O., MILLER R. et OJIMA K., 1968**. Nutrient requirements of suspension cultures of soy bean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50 : 151-158.
- **GATIN G. L., 1912.** Les palmiers. Histoires naturelles et horticoles des différents genres. Editeurs Octave Doin et fils. 338 pages.
- **GAUTHERET R. J., 1959.** La culture des tissus, Techniques et réalisations. Editions Masson et Cie, Paris, 863 p.
- **GINIEIS CH., 1957.** Etude morphologique et anatomique des embryons de quelques espèces du genre *Phoenix*. Bulletin du muséum national d'histoire naturelle, Paris, 29 (5) série 2 : 439-445.
- **GLASNER B., BORES A., ZAID A. et EMMENS J., 2002.** Date harvesting, packinghouse management and marketing aspects. *In* **ZAID A., 2002.** Date palm cultivation. Food and Agriculture Organization Plant Production and protection of the United Nations, Rome, Italy, 156: 177-208.
- **GOVAERTS R. et DRANSFIELD J., 2005.** World checklist of palms. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew, 223 p.
- **GUIGNARD J. L., 2000.** Biochimie végétale (2^{e} édition). Edition DUNOD, Paris, 273 p.

- **HAMLAT M., 1995.** Influence des phytohormones sur les embryons et les microboutures d'Olivier (*Olea europea* L.) var. Chemlel, cultivés *in vitro*. Thèse de magister, UMMTO, 167 p.
- **HANNACHI S., KHITRI D., BENKHALIFA A. et BARC DE LA PERRIERE R. A., 1998.** Inventaire variétal de la palmeraie Algérienne. Editions ANEP, Rouiba, Alger, 225 p.
- **HARBORNE J. B., 1963.** Plant polyphenols**.** The structure of acylated anthocyanins. *Phytochemistry*, 3: 151-160.
- **HARBORNE, J. B., et WILLIAMS, C. A., 2000.** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, (55): 481–504.
- **HAYWARD P. M., 1984.** "Determination of phytochrome parameters from radiation measurements". *In* **SMITH H. et G. HOLMES G., 1984.** Techniques in photomorphogenesis. Eds. *Academic Press*, pp**:** 159-173.
- **HELLER R., 1982.** Physiologie végétale : Développement. Ed. Masson. Tome 2, 215 p.
- **HELLER R., ESNAULT R. et LANCE C., 2000.** Physiologie végétale, Développement. Dunod. 6ème éd., Tome 2, Paris, 336 p.
- **HOWARD F. W., MOORE D., GIBLIN-DAVIS R. M. et ABAD R. G., 2001.** Insects on palms. CABI International, Wallingford, Oxon, UK, **pp**
- **HUMAULT G., 1975.** Influence de différents milieux de culture sur la Croissance des tissues d'asperge (*Asparagus officinalis*) cultivés *in-vitro*. C. R. Acad. Sci., Paris, t. 280.
- **IBRAHIM A. M.F., EL KOBBIA A. MA, KITAT F. M., et ABD EL KAWY M. M., 1998.** Cytological studies on date palm. Chromosomal behavior during meiosis of two date palm (*Phoenix dactylifera* L.) male type. *Alexandria J. Agric. Res*. 43 (2), 237-246.
- **JARADAT A. A., 2001.** Date palm – a tree with a taste for salt. *Biosalinity News*, 2 (2), 5-7.
- **JARADAT A. A. et ZAID A., 2004.** Quality traits of date palm fruits, in a center of origin and center of diversity. *Food Agr. Environ.* 2: 208-217.
- **KENDRICK R. E. et KRONENBERG G. H. M., 1994.** Photomorphogenesis in plants. Editions Martinus Nijhoff publishers, 2nd Edition, Dordrecht, Netherlands, 828 p.
- **KONG J., CHIA L., GOH N., CHIA T. et BROUILLARD R., 2003.** Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry, 64: 923–933.
- **LEBRETON P. et BOUCHEZ M-P., 1967.** Distribution des composés polyphénoliques chez les pariétales, *Phytochemistry*, vol. 6 : 1601-1608.
- **LIN C., 2000.** Plant blue-light receptors. Plant Science 5(8): 337-342.
- **LORENC-KUKULA K., WROBEL-KWIATKOWSKA M., STARZYCKY M. et SZOPA J., 2007.** Engineering flax with increased flavonoïd content and thus *Fusarium* resistance. Physiological and Molecular Plant Pathology, 70: 38-48.

- **LOUTFI K. et CHLYAH H., 1998.** Vegetative multiplication of date palms from *in vitro* cultured inflorescences: effect of somme growth regulator combination and organogenetic potential of various cultivars. *Agronomie* 18: 573-580.
- **LOUTFI K. et EL HADRAMI I., 2004.** *Phoenix dactylifera* L., Date Palm. *In* **LITZ R. E., 2004.** Biotechnology of fruits and nut crops. CABI Publishing, UK, pp: 144-156.
- **LOUVET T. J. et TOUTAIN G., 1973.** Recherches sur les fusarioses. Nouvelles observations sur la fusariose du palmier dattier et précisions concernant la lutte. *An. Phyto.* (5) : 35-52.
- **LUGASI A., HOVARI J., SAGI K. V. et BIRO L., 2003.** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegedientsis*.1-4 : 119-125p**.**
- **MACHEIX J.-J, FLEURIET A. et JAY-ALLEMAND C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. (Eds.) Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, 192 p.
- **MAIRE R., 1952.** Flore de l'Afrique du Nord. Editions Lechevalier, Paris, tome I, 366 p.
- **MAIRE R. et KILLIAN C., 1930.** Le Bayoud, maladie du dattier. *Soc. Hist. Nat. Afr. Nord*, 21 :89-101.
- **MALIK, K.A., 1984.** Flora of Pakistan. Pakistan agricultural Research council, Islamabad. 153: 20-25.
- **MANETAS Y., 2006.** Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red?. Flora 201: 163-177.
- **MAZLIAK P., 1998.** Physiologie végétale. Croissance et développement. Editions Hermann, Tome 2, Paris, 575 p.
- **MESSIAEN C. M., BLANCARD D., ROUXEL F. et LAFON R., 1991.** Les maladies des plantes maraîchères (3è édition). Editions INRA, Paris, 552 p.
- **Ministère de l'Agriculture, 2006.** Statistiques Agricoles. Ministère de l'agriculture, série A, 2006.
- **MOHR H. et SHROPSHIRE W., 1983.** An introduction to photomorphogenesis. *In* **SHROPSHIRE W et MOHR H., 1983.** Photomorphogenesis. Encylopedia of plant physiology 16 A. Editions Springer-Verlag, Berlin, pp: 24-28.
- **MONNIER M., 1976.** Culture *in-vitro* de l'embryon immature de *Capsella bursa-pastoris Moench*. *Rev. Cyt. Biol. Végét*., 39, 120 p.
- **MONNIER M., 1988.** Culture d'embryons et d'ovules. ***In* ZRYD J. P., 1988.** Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Ed. Presses polytechniques Romands, Suisse, pp : 105-118.
- **MONNIER M., 1995.** Culture of zygotic embryos. *In* **THORPE T. A., 1995.** *In vitro* embryogenesis in plants. Editions Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp: 117-153.

- **MOORE H. E., 1963.** An annotated check list of cultivated palms. *Principes*, 7 (4):119-184.
- **MOORE H. E., 1973.** The major groups of palms and their distribution. *Gentes herb*. 11, pp: 27-141.
- **MOOR H. E. et UHL N. W., 1973.** The monocotyledons: their evolution and comparative biology VI. Palms and the origin and evolution of Monocotyledons. *Quart. Rev. Biol*., 48, pp : 414-436.
- **MULEO R. et MORINI S., 2008.** Physiological dissection of blue and red light regulation of apical dominance and branching in M9 apple rootstock growing *in vitro*. *Journal of plant physiology*, 165: 1838-1846.
- **MUNIER P., 1973.** Le palmier dattier. Coll. Techniques agricoles et productions tropicales. Editions 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. Plantarum.*, 15, pp : 473-497.
- **NABORS M., 2008**. Biologie végétale : Structure, fonctionnement, écologie et biotechnologies, Pearson Education, Paris, 614 p.
- **NEMEC B., 1910.** Das problem der befruchtungsvorgange und andere zytologische fragen. Berlin: Gebruder Borntraeger. 532 p.
- **NIXON R.W., 1951.** The date palm: « Tree of Life » in the subtropical deserts. Econ. Bot. 5, pp : 274-301.
- **NIXON R.W. et CARPENTER J.B., 1978.** Growing dates in the United States. United State Department of Agriculture Bulletin no. 207.
- **ODETOLA J. A., 1987.** Studies on seed dormancy, viability and germination in ornamental palm. Principes, 31: 24-30.
- **OMAR M. S., HAMEED M. K. et AL-RAWI M. S., 1992.** Micropropagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In* **BAJAJ Y. P. S., 1992**. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Protoplast and Genetic Engineering. Springer-Verlag, Berlin, Vol. 18: 471-492.
- **OREN-SHAMIR M., 2009.** Does anthocyanins degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants?. Plant Science 177, 310–316.
- **OZENDA P., 2004.** Flore et végétation du Sahara (3^{e} édition). Editions CNRS, Paris, 662 p.
- **PARKS B., FOLTA K. et SPALDING E., 2001.** Photocontrol of stem growth. Plant Biology 4, 36–440.
- **POPENOE P. B., 1973.** The date palm. Editions Field Research Projects, Miami, FL. 247 p.
- **PRATT L. H., 1994.** Distribution and localization of phytochrome within the plant. *In* Photomorphogenesis in Plant. Editions Martinus Nijhoff publishers, 2nd Edition, Dordrecht, Netherlands, pp: 163-185.

- **QACIF N., BAAZIZ M. et BENDIAB K., 2007.** Biochemical investigations on peroxidase contents of male and female inflorescences of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae*, 114 : 298-301.
- **QUEZEL R. et SANTA S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions CNRS, Paris, tome 2, 1170 p.
- **RABECHAULT H., 1962.** Recherche sur la culture *in vitro* des embryons de palmier à huile (*Elaeïs guineensis* Jacq.) I, 10 : 757-764.
- **RABECHAULT H., AHEE J. et GUENIN G., 1976.** Recherche sur la culture *in vitro* des embryons de palmier à huile (*Elaeïs guineensis* Jacq.) XII. Effets de substances de croissance à des doses supra optimales. 4 (31) : 159-163.
- **RAHMANIA, 1982.** Contribution à la connaissance du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. et de l'agent de (Bayoud) *Fusarium oxysporum f. sp. Albedinis.* Aspects ultrastructuraux des relations hôtes parasite. Thèse 3ème cycle, ISB, USTHB, Alger, 122 p.
- **REDDY R. K. et SHARMA R., 1998.** Spatial distribution and temporal regulation of phytochromes A and B levels in maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36 (10): 737-745.
- **REUVENI O., ADATO Y. et LILIEN-KIPNIS H., 1972.** A study of new and rapid methods for the vegetative propagation of date palms. *Date Grower's Inst. Rep.* 49, p. 16–24.
- **REUVENI O. et KIPNIS H., 1974.** Studies of the *in vitro* culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues and organs. *Volcani Institute of Agricultural Research,* 145, pp: 1-40.
- **REUVENI O., 1979.** Embryogenesis and plantlets growth of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) derived from callus tissues. *Plant Physiol*. (*suppl.*) 63, p. 138.
- **REYNOLDS I. D. et MURASHIGE T., 1979.** Asexual embryogenesis in callus culture of palms. *In vitro* 15, pp: 383-387.
- **RHISS A., 1980.** Palmier dattier, Multiplication végétative en culture *in vitro*. Thèse de 3ème cycle, université de Paris Sud centre d'Orsay, 160 p.
- **SAKA H., 2001.** Somatic embryogenesis and cell suspension cultures, from mature zygotic embryos of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Recherche Agronomique, 8: 13-18.
- **SEDRA M. H., 2006.** Le Bayoud en Afrique du Nord : extension, particularités de la variabilité génétique des souches de l'agent causal et nouveaux clones marocains du palmier prometteurs pour combattre la maladie. *In* **ABED F., 2006.** Conférence régionale : Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier Contre le Bayoud. Alger, pp: 6-11.
- **SGHAIER B., BAHLOUL M., GARGOURI-BOUZID R. et DRIRA N., 2008.** Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour: Comparative study. *Scientia horticulturae*, vol. 116, (2) : 169-175.

- **SILJAK-YAKOVLEV S., BENMALEK S., CERBAH M., COBA DE LA PENA T., BOUNAGA N., BROWN S. C., et SARR A., 1996.** Chromosomal sex determination and heterochromatin structure in date palm. Sexual Plant Rep. 9, pp: 127-132.
- **SMITH H., 2000**. Phytochromes and light signal perception by plants an emerging synthesis. *Nature* 407: 585-691.
- **SPICHIGER R. E., SAVOLAINEN V. V., FIGEAT M. et JEANMONOD D., 2002.** Botanique systématique des plantes à fleurs (2e édition). Editions PPU ROMANDES, Lausanne, 413 p.
- **STITI K., 1992.** Culture de plantules de palmier dattier (variété : Takerboucht). Mémoire d'ingénieur en agronomie, UMMTO, 45 p.
- **SUDHERSAN C. et ABO EL-NIL M., 1999.** Occurrence of hermaphroditism in the male date palm. Palms 43: 18-19, 48-50.
- **SUETSUGU N. et WADA M., 2003.** Cryptogam blue-light photoreceptors. Plant Biology 6, 91-96.
- **SUZUKI H., SASAKI R., OGATA Y., NAKAMURA Y., SAKURAI N., KITAJIMA M., TAKAYAMA S., AOKI K., SHIBATA D. et SAITO K. (2007).** Metabolic profiling of flavonoids in *Lotus japonicus* using liquid chromatography Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Phytochemistry 69, 99–111.
- **TAKHTAJAN A., 1997.** Diversity and classification of flowering plants. Columbia university press, New York, 643 p.
- **THOMAS M. J., 1980.** Applications physiologiques de la culture d'embryons isolés. *In* : Connaissance de la biologie des arbres par les cultures *in vitro*. 2ème réunion de la Section Française de l'IAPTC sur l'arbre *in vitro*. Paris, 14-15 nov. 1980.
- **TETU et *al*., 1987.**
- **TILLICH H-J., 1995.** Seedlings and systematics in monocotyledons**. *In* RUDALL P., P. CRIBB P., D. CUTLER D., et HUMPHRIES C., 1995.** Monocotyledons: systematics and evolution. eds., Royal Botanic Gardens, Kew, vol. 1, pp: 303-352.
- **TILLICH H-J., 2000.** Ancestral and derived character states in seedlings of monocotyledons. ***In* WILSON, K. et MORRISON D., 2000.** Systematics and evolution of monocots. eds., CSIRO, Melbourne, pp: 212-229.
- **TISSERAT B., 1979.** Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. *Journal of experimental Botany*, 30 (119): 1275-1283.
- **TISSERAT B., 1984.** Date palm. *In* **SHARP W. R., EVANS D. A., AMMIRATO P. V. et YAMADA Y., 1984.** Handbook of Plant Cell Culture. Macmillan Publishing Company, New York, Vol. 2: 505-545.
- **TOMLINSON P. B., 1990.** The structural biology of Palms. Clarendon Press Oxford, 489 p.

- **UHL N. W. et DRANSFIELD J., 1987.** Genera palmarum: A classification of palms based on the work of HAROLD E. and MOORE J., Hortorium and International Palm Society, Allen Press, Lawrence, Kansas.
- **VANDERCOOK C.E., HASEGAWA S., et MAIER. V. P., 1980.** Dates. *In* **NAGY S. et SHAW P. E., 1980.** Tropical and subtropical fruits: Composition, properties, and uses. AVI Publishing Company, West port, CT. pp: 506-541.
- **VERCAUTERN J., CHEZEC C. et TRIAUD J., 1998.** Les polyphénols 96. Editions INRA, Paris, 289 p.
- **VOGELMANN, T. C. et HAN, T., 2000.** Measurement of gradients of absorbed light in spinach leaves from chlorophyll fluorescence profiles. *Plant Cell and Environment.* 23(12): 1303-1311.
- **WINKEL-SHIRLEY B. (2002).** Biosynthesis of flavonoïds and effects of stress. *Plant Biology*, 5: 218-223.
- **WRIGLEY G., 1995.** Date palm. *In* **SMARTT J. et SININIONDS N. W., 1995.** Evolution of crop plants. 2nd ed. Longman Group, Essex, UK, pp: 399-403.
- **YAKOUB-BOUGDAL S., 1984.** Etude des radiations rouges sur des méristèmes et sur des embryons en culture *in vitro* chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Approches quantitatives. Mémoire de DEA, Paris VI, 56 p.
- **YAKOUB-BOUGDAL S., 1987.** Etude des inductions morphogénétiques chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) Cv. Deglet-Nour en culture *in vitro*. Analyses cytophotométrique et autoradiographique. Doctorat unique. Paris VI, 75 p.
- **YAKOUB-BOUGDAL S., 2005.** Morphogenèse *in vitro* du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et de l'Olivier (*Olea europea* L. var. Chemlel). Thèse d'état es-sciences. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, 191 p.
- **ZAID A., DE WET P. F., 2002.** Climatic requirements of date palm, *In* **ZAID A., 2002.** Date palm cultivation. Food and Agriculture Organization Plant Production and protection of the United Nations, Rome, Italy, 156: 57-72.
- **ZAID A., DE WET P. F., DJERBI M. et OIHABI A., 2002.** Diseases and pests of date palm, *In* **ZAID A., 2002.** Date palm cultivation. Food and Agriculture Organization Plant Production and protection of the United Nations, Rome, Italy, 156, pp: 227-281.
- **ZAID A. et TISSERAT B., 1983.** Morphogenetic responses obtained from a variety of somatic explant tissues of Date palm, *Biol. Mag.*, Tokyo, 96, pp: 67–73.
- **ZAID A.** and **TISSERAT B., 1984.** Survey of the morphogenetic potential of excised palm embryos "in vitro". *Crop Res*. 24, pp: 1-9.
- **ZAID M., 1989.** Embryogenèse somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Thèse de doctorat, Université de Paris Sud Orsay, 92 p.
- **ZEIGER E., 1990.** Light perception in guard cells. *Plant, Cell and Environment.* 13, pp: 739-747.

- **ZOHARY et SPEIGEL-ROY, 1975.** Beginnings of fruits growing in the old world. *Rev. Sci*., 187 (4174): 319-327.
- **ZOHARY D. ET HOPF M., 1988.** Domestication of plants in the old World: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley. Clarendon Press, Oxford. 278 p.
- **ZOHARY D. ET HOPF M., 1993.** Date palm *Phoenix dactylifera* L. Domestication of plants in the old World. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford, pp: 157-162.
- **ZOHARY D., HOPF M., 2000.** Domestication of Plants in the Old World. Oxford University press, New York, third edition. 185 p.
- **ZRYD J. P., 1988.** Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Editions presses polytechniques Romands, Suisse, 308 p.

Annexe

Annexe 1 : Milieux de cultures (composition en $mg.l^{-1}$)

	MURASHIGE et SKOOG MS (1962)	MURASHIGE et SKOOG modifié MSm_1	MURASHIGE et SKOOG modifié MSm_2	DRIVERS et KENWOUKI (1984)	GAMBORG et *al.* (1968)
Macro éléments					
- **NH_4NO_3**	1650	1650	1650	1418,8	--
- **KNO_3**	1900	1900	1900	---	2500
- **$CaCl_2, 2H_2O$**	440	440	440	147,6	150
- **$Mg\ SO_4, 7H_2O$**	730	730	730	740	250
- **$KH_2\ PO_4$**	170	170	170	258,4	--
- **NaH_2PO_4, H_2O**	--	--	--	--	150
- **$Ca(NO_3)_2, 4H_2O$**	--	--	--	1963,7	--
- **K_2SO_4**	--	--	--	1560	--
Micro éléments					
- **H_3BO_3**	6,2	6,2	6,2	6,2	--
- **$MnSO_4, 4H_2O$**	22,3	22,3	22,3	22,3	10
- **$ZnSO_4, 7H_2O$**	8,6	8,6	8,6	8,6	2
- **KI**	0,83	0,83	0,83	0,83	3
- **$Na_2Mo\ O_4, 2H_2O$**	0,025	0,025	0,025	0,025	0,25
- **$CuSO_4, 7H_2O$**	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
- **$CoCl_2, 6H_2O$**	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Solution de fer chélate					
- **Na_2EDTA**	37,25	37,25	40, 50	37,2	14,9
- **$FeSO_4, 7H_2O$**	27,85	27,85	27,85	27,9	11,1
Addenda					
- **Glycine**	2	2	0,5	2	--
- **Inositol**	100	100	100	100	100
- **Thiamine**	0,1	0,1	0,1	0,1	10
- **Pyridoxine**	0,5	0,5	0,5	0,5	1
- **Acide Nicotique**	0,5	0,5	0,5	0,5	1
- **Glutamine**	200	200	200	200	--
- **Adénine**	--	30	--	--	--
- **Biotine**	--	0,01	--	--	1
Sucre commercial	30 $g.l^{-1}$	30 et 50 $g.l^{-1}$	30 et 50 $g.l^{-1}$	30 $g.l^{-1}$	30 $g.l^{-1}$
pH	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
Agar	7 $g.l^{-1}$	7 $g.l^{-1}$	7 $g.l^{-1}$	7 $g.l^{-1}$	7 $g.l^{-1}$

Annexe 2 : Effet de l'agent désinfectant sur la germination des graines du palmier dattier cv. Takerboucht (Résultats de l'analyse de la variance).

	S.C.E	**DDL**	**C.M.**	**TEST F**	**PROBA**
VAR. Totale	647,402	8	80,925		
VAR. Stérilisant	532,241	2	266,12	13,865	**0,00622**
VAR. Résiduelle	115,162	6	19,194		

Annexe 3 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS concernant l'effet du stérilisant sur la réactivité des embryons de palmier dattier cv. Takerboucht.

Facteurs	**Types**	**Moyennes ± Ecart-types**	**Groupes homogènes**	
Stérilisants	***NaClO***	93,75 ± 1,09	A	
	$HgCl_2$	83,33 ± 6,07		B
	Ca $(ClO)_2$	74,95 ± 4,41		B

Annexe 4 : Moyenne des contaminations, nécroses et taux de survies cumulés, en fonction du temps, des embryons de palmier dattier Cv. TK obtenus pour un test de germination portant sur 96 graines.

Durée de latence de chaque graine (en jours)	Moyenne de graines germées			Moyenne de graines contaminées			Moyenne de graines nécrosées		
	NaClO	*Ca $(ClO)_2$*	*$HgCl_2$*	*NaClO*	*Ca $(ClO)_2$*	*$HgCl_2$*	*NaClO*	*Ca $(ClO)_2$*	*$HgCl_2$*
3	1								
4	4,75								
5	9,75								
6	14,5								
7	17,75		0,5	0,25			0,25		
8	21,5	1	1	0,5			0,5		
9	22,5	3,33	3				1		
10		5	5,75						
11		7	7		1,67				
12		10,33	8		2,34				
13		11,66	9,5			0,5			
14		13,99	11,5		3,01				0,5
15		15,66	14,25		3,34	1			
16		16,66	15,5		3,67				1
17		17,66	18,25			2,25		0,67	1,25
18		17,99	19					2,34	
19			20			2,5			1,5
Totale	24			24			24		

Annexe 5 : Effet de la taille sur la production de plants entiers chez la variété Takerboucht (Résultats de l'analyse de la variance).

	S.C.E	**DDL**	**C.M.**	**TEST F**	**PROBA**
VAR. Totale	1779,667	3	593,223		
VAR. Taille	1709,822	1	1709,822	48,961	**0,01638**
VAR. Résiduelle	69,845	2	34,922		

Annexe 6 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS concernant l'effet de la taille sur la régénération de plants entiers de palmier dattier cv. Takerboucht

Facteurs	Types	Moyennes ± Ecart-types	Groupes homogènes	
Taille	**cinq mm**	54 ± 6,15	A	
	trois mm	12,65 ± 5,65		B

Annexe 7 : Effet de la position sur la production de plants entiers chez la variété Takerboucht (Résultats de l'analyse de la variance).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
VAR. Totale	1153	3	384,333		
VAR. Position	1089	1	1089	34,031	**0,02471**
VAR. Résiduelle	64	2	32		

Annexe 8 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS concernant l'effet de la position sur la régénération de plants entiers de palmier dattier cv. Takerboucht

Facteurs	Types	Moyennes ± Ecart-types	Groupes homogènes	
Position	**debout**	54 ± 5,657	A	
	à plat	21 ± 5,657		B

Annexe 9 : Effet de la suppression de l'haustorium et de la gaine cotylédonaire sur le développement et la viabilité des plantules de palmier dattier var. Takerboucht (Résultats de l'analyse de la variance).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
VAR. Totale	1226,833	5	245,367		
VAR. Facteur 1	104,167	1	104,167	0,371	**0,57839**
VAR. Résiduelle	1122,667	4	280,667		

Annexe 10 : Effet du milieu sur la production de plants entiers chez la variété Takerboucht (Résultats de l'analyse de la variance).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
VAR. Totale	6894,1	9	766,011		
VAR. Milieu	6364,6	4	1591,15	15,025	**0,00666**
VAR. Résiduelle	529,5	5	105,9		

Annexe 11 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS concernant l'effet du milieu sur la régénération de plants entiers de palmier dattier cv. Takerboucht

Facteurs	Types	Moyennes ± Ecart-types	Groupes homogènes	
Milieu	MSm1	100 ± 0	A	
	MSm2	91,5 ± 12,021	A	
	Milieu MS	54 ± 5,657		B
	Milieu DKW	45,5 ± 17,678		B
	Milieu Gamborg	37,5 ± 6,364		B

Annexe 12 : Effet de la lumière sur le développement des plantules du palmier dattier chez la variété Takerboucht (Résultats de l'analyse de la variance).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
VAR. Totale	10334,81	9	688,987		
VAR. Lumière	1973,581	1	1973,581	10,435	**0,01189**
VAR. Résiduelle 1	1513,045	8	189,131		

Annexe 13 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS concernant l'effet de la lumière sur la régénération de plants entiers de palmier dattier cv. Takerboucht

Facteurs	Types	Moyennes ± Ecart-types	Groupes homogènes	
Lumière	quatre semaines de blanc	91,75 ± 6,94	A	
	une semaine de bleue/trois semaines de blanche	65 ± 20,551	A	B
	quatre semaines de bleue	64,57 ± 5,802	A	B
	deux semaines de bleue/ deux semaines de lumière blanche	44,25 ± 0,408		B
	trois bleue/un blanc	42 ± 3,64		B

Annexe 14 : Effet de la lumière, du milieu en fonction temps sur la teneur moyenne en leucoanthocyanes synthétisés dans les embryons mis en culture selon les radiations (blanche et bleue) et les milieux de culture (MSm_1 et MSm_2). (Résultats de l'analyse de la variance).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
VAR. Totale	920,983	47	19,595		
VAR. Lumières	7,084	1	7,084	0,579	**0,45824**
VAR. Milieux	0,456	1	0,456	0,037	**0,84242**
VAR. Temps	214,777	3	71,572	5,853	**0,00273**
VAR. Lumières * Milieux	1,635	1	1,635	0,134	**0,71744**
VAR. Lumières * Temps	238,166	3	97,389	6,49	**0,00156**
VAR. Milieux * Temps	23,865	3	7,955	0,65	**0,59206**
VAR. Lumières * Milieux* Temps	43,552	3	14,517	1,187	**0,33051**
VAR. Résiduelle 1	391,447	32	12,233		

Annexe 15 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS concernant l'effet de l'interaction Lumières * Temps sur la teneur moyenne en leucoanthocyanes synthétisés dans les embryons mis en culture.

Facteurs	Types	Moyennes ± Ecart-types	Groupes homogènes		
Lumières * Temps	Blanche 4^{em} semaine	16,98 ± 5,93	A		
	Bleue 2^{em} semaine	13,722 ± 3,51	A	B	
	Bleue 3^{em} semaine	13,582 ± 2,40	A	B	
	Bleue 4^{em} semaine	11,427 ± 2,37		B	
	Blanche 3^{em} semaine	9,565 ± 3,05		B	
	Blanche 1er semaine	8,852 ± 2,25		B	
	Blanche 2^{em} semaine	7,942 ± 1,01		B	
	Bleue 1er semaine	7,682 ± 1,96			C

Annexe 16 : Effet de la concentration de saccharose et de la lumière sur le développement des plantules du palmier dattier chez la variété Takerboucht (Résultats de l'analyse de la variance).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
VAR. Totale	25,875	7	3,696		
VAR. Lumière	4,125	1	0,125	0,03	**0,8699**
VAR. Saccharose	3,125	1	3,125	0,758	**0,43621**
VAR. Lumière*Saccharose	6,125	1	6,125	1,485	**0,2904**
VAR. Résiduelle 1	16,5	4	4,125		

Annexe 17 : Effet de la lumière, des milieux et des hormones sur le développement des plantules du palmier dattier chez la variété Takerboucht (Résultats de l'analyse de la variance).

	S.C.E	**DDL**	**C.M.**	**TEST F**	**PROBA**
VAR. Totale	235,438	63	3,737		
VAR. Lumières	6,25	1	6,25	4,651	**0,03671**
VAR. Milieux	12,25	1	12,25	9,116	**0,00493**
VAR. Hormones	109,938	7	15,705	11,688	**0**
VAR. Lumières * Milieux	0,562	1	0,562	0,419	**0,52928**
VAR. Lumières * Hormones	27,25	7	3,893	2,897	**0,01834**
VAR. Milieux * Hormones	22,75	7	3,25	2,419	**0,04148**
VAR. Lumières * Milieux* Hormones	13,438	7	1,92	1,429	**0,22792**
VAR. Résiduelle 1	43	32	1,344		

Annexe 18 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS concernant l'effet des hormones sur la régénération de plants entiers de palmier dattier cv. Takerboucht.

Facteurs	**Types**	**Moyennes ± Ecart-types**	**Groupes homogènes**		
Hormones	sans hormone (30 $g.l^{-1}$)	11,625 ± 0,59	A		
	sans hormone (50 $g.l^{-1}$)	10 ± 1,13		B	
	BAP (10 $mg.l^{-1}$) + 50 $g.l^{-1}$	9,375 ± 0,70		B	
	BAP (0,1 $mg.l^{-1}$) + 30 $g.l^{-1}$	9,25 ± 0,37		B	
	BAP + ANA (0,1 + 1 $mg.l^{-1}$) + 30 $g.l^{-1}$	8,875 ± 0,59		B	
	AIA (0,1 $mg.l^{-1}$) + 50 $g.l^{-1}$	8,5 ± 0,84		B	
	ANA (1 $mg.l^{-1}$) + 30 $g.l^{-1}$	8,375 ± 096		B	
	BAP + AIA (10 + 0,1 $mg.l^{-1}$) + 50 $g.l^{-1}$	6,75 ± 1.36			C