Abréviations

AIB : Acide beta-indole butyrique

ANA : Acide naphtaléneacètique

ANOA : Acide naphtoxyacétique

BAP : 6-benzylaminopurine

CCI : Concentration chlorophylle index

2,4-D : Acide 2,4 dichlorophénoxyacétique

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

KIN : Kinétine

MS : MURACHIG et SKOOG

Liste des photos, figures et des tableaux

Photo 1 : Les différentes étapes de l'organogenèse chez le palmier dattier……26

Photo 2 : vitrification d'une souche…….27

Photo 3 : Contamination de culture…….27

Photo 4 : L'enracinement précoce d'une souche……..28

Photo 5 : Brunissement d'un explant……28

Photo 6 : Plante morte en serre……29

Photo 7 : Plantules trempées dans une solution antifongique…….36

Photo 8 : Plantules en phase d'acclimatation……..36

Photo 9 : Echelle de verdissement progressif ……37

Photo 10 : Etat de collet (a) collet fermé, (b) collet ouvert ……...38

Photo 11 : (a) plantules avec un faible taux de reprise en serre (b) plantules vigoureuses provenant du milieu M1……..46

Figure 1 : Effet des régulateurs de croissance sur la longueur des feuilles……41

Figure 2 : Effet des régulateurs de croissance sur le nombre des feuilles……..41

Figure 3 : Effet des régulateurs de croissance sur le nombre de racines……....42

Figure 4 : Effet des régulateurs de croissance sur la longueur des racines……43

Figure 5 : Effet des régulateurs de croissance sur le verdissement……44

Figure 6 : Effet des régulateurs de croissance sur la concentration de la chlorophylle…….44

Figure 7 : Effet de la nature de sucre sur la longueur des feuilles…….47

Figure 8 : Effet de la nature de sucres sur la longueur et le nombre des racines……..48

Figure 9 : Effet de la nature de sucre sur la concentration de la chlorophylle……..49

Tableau 1 : Les différentes combinaisons hormonales utilisées…….34

Tableau 2 : % Plantules avec collet fermé dans différents milieux d'hormones……..45

Tableau 3 : l'effet des différents traitements sur le développement des plantules……...46

Tableau 4 : % Plantules avec collet fermé dans différents milieux de sucre ……...49

Tableau 5 : l'effet de la nature des sucres sur le développement des plantules……50

Tables des matières

Introduction.....10

Partie bibliographique..... 12

I-Présentation botanique du palmier dattier 12

II-Les variétés du palmier dattier 13

III- L'importance socio-économique et écologique du palmier dattier.....13

IV- Situation actuelle de la production mondiale des dattes.....14

V- Situation actuelle de la production nationale des dattes.....19

VI Les contraintes de palmier dattiers 21

VII-Plan National du développement de la phoéniciculture 25

VIII-Techniques de multiplication 27

1-Multiplication par semis..... 27

2-Multiplication par rejets..... 27

3-Culture in vitro 28

3-1-Embryogenèse somatique..... 29

3-2-Organogenèse 29

IX- Les avantages et les inconvénients de la technique d'organogenèse 30

X-Importance de la source carbonée et des régulateurs de croissance 30

Matériels et méthodes..... 32

I-Matériel végétal 32

II- Milieux et condition de culture..... 33

III- Observations et critères d'évaluation..... 35

IV-Analyse des données..... 35

Résultats et discussion..... 35

I-Effet des régulateurs de croissance sur la phase d'élongation et d'acclimatation 36

1-phase d'élongation 37

a-Longueur et nombre de feuilles 37

b-Longueur et nombre de racines 37

c-Verdissement..... 38

d-Taux de chlorophylle 38
e-Etat de collet 38
2-phase d'acclimatation..... 38
I-Effet des régulateurs de croissance sur la phase d'élongation et d'acclimatation 39
1-phase d'élongation 40
a-Longueur et nombre de feuilles 40
b-Longueur et nombre de racines 41
c-Taux de chlorophylle 41
d-Etat de collet 41
2-phase d'acclimatation..... 42
Discussion 44
Conclusion.....48
Références bibliographiques.....49

Introduction

Le Palmier Dattier constitue le pivot de l'écosystème oasien des régions sahariennes et présahariennes du Maroc. Il contribue, à hauteur de 40 à 60%, à la formation des revenus agricoles pour 1 million d'habitants (EL Hadrami, 1998). Il fournit divers matériaux destinés à l'artisanat, à la construction ou à la production d'énergie. De plus, il joue un rôle d'écran en protégeant les oasis contre les influences désertiques et crée un microclimat favorisant le développement des cultures sous-jacentes.

À la fin du 19ème siècle, le Maroc occupait le 3ème rang parmi les pays producteurs et une place de choix au niveau du commerce extérieur des dattes grâce, notamment, à la qualité de celles-ci. Malheureusement, après cette longue période de prospérité des palmeraies marocaines, et à partir du début de 20ème siècle, la situation est totalement renversée et ne cesse de se dégrader. Ainsi, et partant des 15 millions de pieds qui peuplaient les palmeraies marocaines et dont la majorité était représentée par des variétés de bonne qualité, il ne reste actuellement que 4,743 millions de pieds, dont une grande partie est constituée de sujets francs très diversifiés et de qualité variable (Anonyme ,1994). Cette régression est due essentiellement à :

✴La maladie du Bayoud qui est à l'origine de la destruction de plus des2/3 du patrimoine phoénicicol (Fernandez et *al*., 1995) ;

✴L'effet de sécheresses prolongées qui ont entraîné le desséchement partiel de plus de 500 000 palmiers. Durant les années 80, près de 350 000 palmiers ont été desséchés dans les seules palmeraies d'Ouarzazate et d'Er-Rachidia (Haddouchi, 1995, Anonyme, 1998.) ;

✴Problème de l'ensablement des palmeraies

✴Désintérêt des populations et leur reconversion vers des secteurs plus rémunérateurs, laissant le palmier à son propre sort sans soins particuliers à l'exception des irrigations, des pollinisations et de la récolte (EL Hadrami, 1998).

La reconstitution des palmeraies détruites par le Bayoud, la reconversion des zones menacées, et la création de nouveaux périmètres, par le semis des graines (méthode sexuée), reste non fiable , et la méthode végétative (asexuée) nécessite un nombre important de rejets. En effet, la production naturelle de rejets par un palmier ne dépasse guère 20 à 40 rejets durant toute sa vie. Ainsi, la méthode traditionnelle reste lente et limitée en raison du nombre restreint de

rejets produits et ne peut répondre par conséquent aux besoins importants exigés pour l'extension rapide des palmeraies.

La multiplication rapide du palmier dattier par les techniques de culture "*in vitro*" constitue l'unique voie pouvant apporter une solution dans un délai raisonnable d'autant plus que tous les clones sélectionnés pour leur résistance au Bayoud sont représentés par un nombre faible d'individus. Cette technique permet également la production de vitroplants indemnes de *Fusarium*, permettant ainsi d'éviter la dispersion de la maladie.

Plusieurs techniques de culture *in vitro* sont utilisées mais seule la technique de l'organogenèse est adoptée pour la production de matériel végétal de base (souches bourgeonnantes) et des vitroplants. (Engelmann, 1991).

Cette technique, repose sur le principe de la stimulation des potentialités des tissus des explants ensemencés pour débourrer des bourgeons végétatifs susceptibles de se multiplier *in vitro*. L'origine préexistante de ces bourgeons confère à cette technique un maximum de conformité et d'homogénéité génétique des vitroplants produits (Engelmann, 1991).

En culture *in vitro*, les régulateurs de croissance conditionnent, en grande partie, l'orientation ou l'expression morphogénétique des tissus et donc le type de néoformation obtenu car c'est la balance auxine/cytokinine qui est déterminante dans l'orientation de l'organogenèse.

On outre les hydrates de carbone jouent un rôle primordial pour compenser l'activité photosynthétique des tissus réduite à cause du faible développement des feuilles, de l'échange limité de gaz et de l'humidité relative élevée. (Kozai *et al.*, 1991)

Malgré les avantages énormes de cette technique moderne, l'organogenèse du palmier dattier se heurte encore à des problèmes de pertes et de flétrissements des plantules au niveau de la phase d'acclimatation. En fait, les recherches faites sur l'acclimatation du palmier dattier ont montré que les plantules transférées *ex vitro* doivent avoir certaines caractéristiques importantes durant la phase d'élongation,qui leur permettent d'assurer un taux de reprise élevé dans la serre (Abahmane, 2011a)

L'objectif de notre travail est de tester l'effet des différentes balances hormonales et des différentes sources d'hydrates de carbones sur les plantules de la variété Mejhoul afin d'optimiser la phase d'élongation et d'acclimatation de l'organogenèse.

Rapport-Gratuit.com

Étude Bibliographique

I-Présentation botanique Du Palmier dattier

Le palmier dattier a été dénommé *Phœnix dactylifera* par Linné en 1734. Cette dénomination dérive de *Phœnix* (phénicien), car c'était les Phéniciens qui ont diffusé cette plante. Le terme spécifique est composé de dactylus indiquant dattes dérivant du grec daktulos, signifiant doigt, en raison de la forme du fruit.

Le dattier est une monocotylédone, arborescente, pérenne de la famille des palmacées(Arécacées), dans la classification de Martius et Blume (Munier, 1973).

Phœnix dactylifera est caractérisé par un stipe très élancé, pouvant atteindre 30 m de hauteur. Les feuilles, réunies en un nombre de 20 à 30 au maximum forment une couronne apicale clairsemée. Elles sont pennées et peuvent atteindre 6 m de longueur. L'espèce est dioïque et porte des inflorescences mâles ou femelles, appelées spadices, enveloppées d'une très grande bractée membraneuse, la spathe. Les fleurs femelles ont trois carpelles indépendants, dont un seul se développe pour former la datte. Les fruits (les dattes) groupées en régimes, sont des baies oblongues, de couleur orange-foncé à maturité, longues jusqu'à 5 cm chez les variétés cultivées, contenant une pulpe sucrée et une graine de consistance ligneuse (Zouine. 2007).

Le dattier est une espèce xérophile et adaptée aux conditions des zones arides et semi-arides. Il pousse sur des sols neutres, profonds, bien drainés, assez riches ou susceptible d'être fertilisés. L'intensité maximale de végétation est atteinte à des températures de 30 à 40°C. Comme tous les arbres fruitiers, le palmier dattier possède un cycle biologique au cours duquel il passe par une période de repos végétatif en hiver où la croissance de tous les organes est bloquée à l'exception des inflorescences qui se trouvent en cours de formation. La reprise de végétation a lieu au printemps lorsque la température du sol dépasse 12°C. La période de maturation des fruits correspond aux mois les plus chauds de l'année (Zouine. 2007)

II-Variétés du palmier dattier :

La notion de « variété » est à utiliser avec précaution pour les palmiers dattiers. Il s'agit plus de cultivars qui par usage commercial ont reçu le vocable de variétés. Il existe des milliers de cultivars (qui sont en fait des clones) à identifier avec précaution.

Les différentes variétés sont généralement classées selon la texture et la consistance des fruits à maturité en deux grands groupes : les dattes sèches et les dattes molles. Les dattes intermédiaires en demi-sèches ou demi-molles.

Au Maroc, on compte près de 223 variétés comme Boufeggous, BouYittob, le Mejhoul, Bousthammî, Bouskri, jihel,Aguelide...(Taoutain *et al.*,1971).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

III- Importance socio-économique et écologique Du Palmier dattier

Le palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.) est «l'arbre» fruitier par excellence du désert où il constitue le pivot de l'agriculture oasienne caractérisée par une stratification et une association de plusieurs cultures sous-jacentes. Aussi, le dattier présente l'immense bénéfice de lutter contre la désertification par l'interception du rayonnement solaire intense et la mise en place d'un « barrage vert et productif », l'oasis. La présence de cet « arbre » fruitier dans ces zones lui confère un rôle écologique indéniable en y limitant la progression des espaces steppiques et l'ensablement des terres agricoles.

Dans le milieu oasien, la culture du palmier dattier revêt une importance socio-économique certaine permettant la subsistance de nombreuses familles dont les moyens d'existence reposent sur les produits générés directement et indirectement par cet arbre fruitier. En effet, le palmier dattier est cultivé essentiellement pour ses dattes qui représentent la base de l'alimentation des populations oasiennes et la composante vitale dans les oasis compte tenu de leur importance nutritionnelle et économique.

Les dattes sont des fruits hautement énergétiques riches en hydrate de carbone, en éléments minéraux et en vitamines en plus d'un grand pouvoir antioxydant attribué à leur richesse en composés phénoliques. Ceci permet de classer la datte parmi les fruits les plus chers au monde faisant ainsi de la phœniciculture un des secteurs les plus rémunérateurs. À titre indicatif, une plantation qui s'étend sur un hectare peut comporter 100 pieds de palmier dont chacun peut produire jusqu'à 100 kg de dattes au cours d'une seule récolte. Dans ce cas, le bénéfice du phœniciculteur peut être de 1 200 000 DH annuellement pour des variétés de dattes de première qualité (Mejhoul), et de 200 000 DH pour des variétés de qualité moindre telles que la variété Bousthami noir. Ce calcul, aussi simplifié soit-il, reflète toute l'importance économique du secteur dattier en tant que principale culture de rente dans les palmeraies. (Aberlenc-Bertossi 2010)

VI-Situation actuelle de la production mondiale de la datte

La culture des palmiers dattiers est l'une des activités les plus importantes sur le plan économique dans les zones arides du Moyen-Orient et Afrique du Nord où il est cultivé pour ses précieuses dattes. Dans cette région, 62 millions des 105 millions de palmiers dans le monde poussent sur une superficie de plus d'un million d'hectares (ha) (El Hadrami et Al

Khayari, 2012). La production mondiale de dattes est de 7,04 million de tonnes métriques environ et génère d'importantes activités commerciales (FAO, 2008).

V- Situation actuelle de la production nationale des dattes

Le patrimoine phoenicicole est concentré au niveau de trois principales régions, à savoir Ouarzazate (41%), Tafilalet (28%) et Tata (20%). L'activité phœnicicole contribue à hauteur de 40 à 60% dans la formation du revenu agricole pour plus de 1,4 million d'habitants.

La palmeraie marocaine couvre une superficie d'environ 48.000 ha, correspondant à environ 4,8 millions de palmiers, soit une densité moyenne de 100 pieds à l'hectare, ce qui place le Royaume au 3ème rang au niveau des pays du Maghreb et le 7ème au niveau mondial.

En année normale, la production nationale des dattes s'élève à plus de 100.000 tonnes. Quant à la consommation, elle s'élève à 3 kg/habitant au niveau national contre 15 kg/habitant au niveau des zones de production (Palmier dattier : Le Maroc occupe la 7ème place au niveau mondial[en ligne]. Le matin 30/10/2014)

Il convient de signaler, par ailleurs, que les régions d'Ouarzazate et d'Errachidia contribuent à elles seules à hauteur d'environ 90% de la production nationale de dattes.

VI- Contraintes de la phoeniciculture au Maroc

Le développement de la phoeniciculture au Maroc dépend de la levée de plusieurs contraintes qui sont liées à : la sécheresse, le vieillissement des palmeraies, la salinité, la désertification, l'érosion génétique et les maladies, comme le Bayoud.

- Sécheresse

Bien que le palmier dattier soit considéré comme l'une des espèces végétales les mieux adaptées aux conditions des zones arides et semi-arides, l'eau reste cependant un facteur primordial pour son développement et pour sa prolifération. Ainsi, la production peut varier dans certains pays comme le Maroc, selon la pluviométrie. En 1985 (année sèche), la production n'était que de 12000 tonnes alors qu'elle s'était élevée à 120000 tonnes en 1990 (année humide). Ceci est dû essentiellement à l'insuffisance de la mobilisation et de la régularisation des eaux d'irrigation.

Par ailleurs, la programmation des irrigations par les eaux du barrage se fait essentiellement pour répondre aux besoins des grandes cultures basses, en particulier les céréales, et ne tient

compte que très peu des besoins du palmier dattier. La régulation des eaux dans le Draa et le Ziz avait cependant permis d'atténuer ces fluctuations et de réduire l'effet des sécheresses prolongées sur la production et la survie des palmiers (Zouine. 2007).

- Vieillissement des palmeraies

Le dattier produit une seule fois par an. Ceci conduit les phoeniciculteurs à délaisser le dattier pour d'autres activités et cultures plus rentables (El Hadrami et *al*., 1998). À termes, ce délaissement se traduit par le vieillissement des palmeraies et l'arrêt de l'extension de l'aire de culture du système. Nous pouvons espérer, dans les quelques années à venir, la remise en valeur des oasis, par le rajeunissement urgent des palmeraies. Au Maroc, le programme de plantation a débuté depuis 1980 afin de permettre, d'une part, le rajeunissement progressif du patrimoine phoenicicole et d'autre part, de corriger la densité des peuplements des oasis.

- Salinité

Le palmier dattier connait aussi le problème de la remontée de la nappe phréatique salée sous l'effet de la multiplication des forages d'eau, au mauvais drainage des eaux agricoles et à la mauvaise gestion des eaux usées. Ce problème constitue un obstacle physique et chimique qui limite la progression racinaire du palmier dattier, ce qui cause un dysfonctionnement dans le patrimoine phoenicicole et entraîne une réduction de la production du palmier dattier, aussi bien en qualité qu'en quantité.

- Maladie du Bayoud

Le Bayoud est une fusariose vasculaire causée par un champignon tellurique, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa). Ce champignon pénètre par le système racinaire, envahit les vaisseaux conducteurs de la sève et entraîne leur obstruction. Ceci engendre un flétrissement des feuilles et par la suite la mort de la plante après quelques mois ou quelques années depuis l'apparition de la maladie. Les estimations de la gravité de ce fléau montrent que les 2/3 de la palmeraie marocaine ont été détruit en un siècle (Fernandez *et al.*, 1998; El Hadrami *et al.*, 1998). Certaines variétés marocaine de très bonne qualité ont disparu dont Berni et Idrar (Pereau-Leroy 1958).

Cette fusariose gagne encore du terrain en Algérie et menace les palmeraies tunisiennes constituées principalement par la variété Deglet Nour sensible au *Fusarium* (Louvet et Toutain, 1973; 1988). Pour sauvegarder l'écosystème saharien décimé par le Bayoud,

différentes méthodes de lutte ont été appliqués mais sans aucun succès. En effet, la méthode de lutte chimique par fumigation par le bromure de méthyle et la chloropicrine reste incertaine et écologiquement dangereuse (Vanacher, 1991). La méthode de lutte génétique qui est basée sur la sélection et la multiplication de palmiers résistants au Bayoud et de bonne qualité dattière est menacée aujourd'hui par l'apparition de nouvelles races physiologiques de l'agent pathogène (Sedra, 1994; Sedra et Besri, 1994). L'étude des facteurs biochimiques intervenant dans la défense du palmier dattier vis-à-vis du Bayoud est d'une importance majeure pouvant contribuer efficacement à la mise en place des moyens de lutte.

Les différents travaux réalisés sur les jeunes plantules du palmier dattier et sur les peroxydases et les composés phénoliques (indicateurs potentiels de la résistance contre le Bayoud) ont montré que l'application des isolats non pathogènes de Fusarium oxysporum, des Bactéries antagonistes (El Hassni et al., 2004b) ou des éliciteurs incluant l'acide salicylique (Dihazi et al., 2003), l'acide jasmonique (El Hadrami et al., 2000; Jaïti et al., 2004) et le chitosane (El Hassni et al., 2004a) constitue une nouvelle approche de lutte contre le Bayoud chez le palmier dattier.

- L'érosion génétique

Les conséquences des contraintes de types biotiques et abiotiques que subissent les palmeraies, résident d'abord dans une érosion génétique des oasis. L'Homme n'est pas exclu comme acteur principal dans cette situation. Son manque d'intérêt pour les cultivars de qualité moyenne et faible est une cause indirecte de cet appauvrissement du pool génétique. L'extension des cultures monovariétales aura des répercussions néfastes dans l'avenir. Les palmeraies algériennes comptent actuellement 45% de la variété 'DegletNour'. La même variété occupe actuellement plus de 60% des palmeraies tunisiennes. Sa progression était de 14%, 19%, 38% et 60,5% respectivement en 1939, 1956, 1974 et 1995 (Zouine. J 2007)

Devant ces énormes contraintes dont souffre le secteur phoenicicole au Maroc, des stratégies ont été nées pour la sauvegarde des oasis et pour la promotion du développement durable en milieu oasien.

Stratégie du Plan Maroc vert (PMV)

Cette stratégie a donné dès son lancement une forte impulsion au secteur agricole, contribuant ainsi à l'émergence d'une agriculture moderne et solidaire. Elle place le développement du palmier dattier en tant que souci majeur.

Le programme de développement du palmier dattier dans le cadre du Plan Maroc vert, lancé en 2009, a érigé cette culture en filière prioritaire pour donner une nouvelle dynamique à l'économie agricole dans les zones oasiennes.

En effet, ce plan s'est fixé comme objectif la reconstitution et la densification des palmeraies existantes et la création de nouvelles plantations modernes aussi bien à l'intérieur des palmeraies qu'à l'extérieur de celles-ci dans les zones où l'eau est disponible. À travers ce programme, le Royaume concrétise l'intérêt particulier qu'il accorde à la filière phoenicicole et à l'amélioration de sa productivité.

Avec la mise en œuvre du Plan Maroc Vert et grâce aux efforts considérables déployés par les producteurs, la profession et l'Etat, la filière phoénicicole a connu une nette amélioration de ses performances.

La production de dattes a ainsi atteint 108.000 tonnes en 2013, soit +15% par rapport à l'année 2010, date du début du contrat programme signé entre le Gouvernement et l'Interprofession (FIMADATTES, La Fédération Interprofessionnelle Marocaine des Dattes).

Cependant, malgré ces performances, la filière fait face à un certain nombre de défis :

- Le développement du palmier dattier fait face à un déficit de production de vitroplants et un mix variétal non adapté aux besoins des investisseurs, ce qui limite l'investissement au niveau de la filière notamment dans le cadre des projets de Partenariat Public Privé.
- Le Maroc importe près de 30% de ses besoins en dattes et l'approvisionnement du marché local par la production nationale devrait constituer une priorité dans le but de couvrir la demande nationale notamment durant la période de Ramadan. Le déficit en capacités frigorifiques limite le calendrier et le potentiel de commercialisation des producteurs.

Le Maroc aujourd'hui est devant un défi d'accélération du rythme d'extension des superficies du palmier dattier et d'amélioration de sa productivité conformément aux orientations stratégiques du Plan Maroc Vert, notamment les objectifs du contrat programment à l'horizon 2020. (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime)

VII -Plan National de développement de la phoéniciculture

Le Maroc aspire à atteindre une production de 160 000 tonnes en 2020 contre 90 000 actuellement. Le plan vise également la reconstitution et la densification des palmeraies déjà

existantes (48 000 ha), la création de nouvelles plantations modernes (17000 ha), ainsi que la mise à niveau de l'ensemble de la filière. A fin septembre 2013, il a été procédé à la plantation de 1 million de palmiers dattiers depuis le lancement du Plan Maroc Vert, avec une estimation de 1,25 million de plants à fin 2013, soit un taux de réalisation de 109%, et un objectif de 3 millions à l'horizon 2020. De plus, 21 unités de valorisation et de stockage des dattes ont été créées. Deux nouveaux projets totalisant un investissement de 90 MDH lancés dans la province d'Errachidia.

Ce plan national a permis également la mise en place d'un Laboratoire National de culture des tissus du palmier dattier à Errachidia afin d'augmenter la production nationale à 50 000 souches bourgeonnantes annuellement et la conclusion de contrats entre le ministère de l'Agriculture et de la pêche maritime et trois laboratoires privés pour la production de 500 000 vitroplants par an. Il concerne également la création de 23 groupements d'intérêt économique.

Par ailleurs, les chercheurs se penchent de plus en plus sur les techniques de biotechnologies et de biologie moléculaire visant la multiplication en masse des clones sélectionnés et dont la sélection est assistée par les marqueurs moléculaires (Anonymous, 2006). Toutefois, le développement de nouvelles techniques de multiplication du palmier dattier (organogenèse, embryogenèse somatique) remet en discussion la sauvegarde de la diversité génétique du palmier dattier et des palmeraies, tandis que l'évaluation de la diversité génétique du palmier dattier par les marqueurs biochimiques et moléculaires comme les isoenzymes, s'avère un préalable obligatoire pour tracer des stratégies de conservation du palmier dattier (Baaziz, 2003).

VIII-Techniques de multiplication de palmier dattier

1-Multiplication par semis

La multiplication du palmier dattier par semis est la méthode la plus ancienne utilisée par les phoéniciculteurs pour la création et l'extension des palmeraies. Elle demeure de nos jours très employée dans les schémas de sélection et d'amélioration. En effet, le palmier dattier étant dioïque et hétérozygote, sa multiplication par graines produit une population très hétérogène ; le sexe et la qualité du fruit restent indiscernables jusqu'à la floraison (Aissam, 1993 ; Loutfi, 1999).

2-**Multiplication par rejets**

La plantation des rejets permet l'obtention de plants conformes aux pieds mère dont ils proviennent. Ce mode de multiplication végétative permet non seulement la propagation, mais également la préservation des génotypes les plus intéressants. Cependant, la plantation de rejets ne permet pas à elle seule d'accroître, voire de maintenir les palmeraies. Des contraintes limitent son utilisation à grande échelle ; c'est le cas notamment de :

- La non disponibilité de rejets : un arbre ne peut produire plus de 45 rejets d'une façon irrégulière qui dépend de l'environnement, de la variété et de l'âge de la plante (Barret, 1973;Reuveni et Lilien-Kipnis, 1974);
- La lenteur de la méthode : 30 années sont nécessaires pour obtenir un million de palmiers à partir d'un rejet (El Hadrami *et al*., 1998);
- Les rejets constituent un moyen de dissémination de la maladie du Bayoud et des autres maladies infectieuses (El Hadrami *et al*., 1998).
- Les difficultés d'arrachage et surtout les taux de reprise et de réussite de ses plantations qui ne dépasse pas en général 50 %.

L'utilisation de l'outil biotechnologique fondé sur les techniques de culture de tissus, constitue sans doute le moyen le plus prometteur pour la reconstitution des palmeraies dévastées via une multiplication à grande échelle du palmier dattier.

3-**Culture in vitro**

La culture *in vitro* est un terme très général pour désigner la culture de cellules ou de tissus qui se développent dans un milieu nutritif en conditions d'asepsie pour une période de temps indéfinie. Les trois principaux champs d'action de la culture *in vitro* concernent :

- la culture de cellules individuelles ou de protoplastes;
- la culture de tissus ou d'organes
- la culture de plantes entières.

La micropropagation s'inscrit dans ce dernier champ d'activités et a pour principal objectif la multiplication de clones à grande échelle. Elle consiste à multiplier un individu donné à partir d'un fragment de végétal placé sur un milieu nutritif en conditions aseptiques. La base biologique de la méthode est le développement de bourgeons préexistants sur les fragments de plantes mis en culture, ou l'induction de nouveaux bourgeons dits « adventifs » (néoformation) sur les explants.

Le principal intérêt de la multiplication *in vitro* du palmier dattier est de répondre aux besoins en plants beaucoup plus rapidement que par le recours aux rejets : en moyenne dix tous les dix ans à partir de rejet contre doublement tous les mois dans le cas de la multiplication par

organogenèse *in vitro*. Le recours à la multiplication *in vitro* s'il présente l'avantage de rendre rapidement disponible un très grand nombre de plants clonés présente néanmoins le risque d'accélérer encore l'appauvrissement de l'agro-diversité par la réduction à quelques cultivars de réputation internationale le nombre des variétés proposées par les laboratoires commerciaux de culture *in vitro*. Néanmoins, la multiplication *in vitro* présente l'avantage de permettre la multiplication de génotype de très grande qualité rare ou encore sans rejet.

Un autre intérêt très important de la multiplication *in vitro* est de permettre l'échange de matériel sain et, plus particulièrement indemnes vis à vis des deux principaux organismes mortels du dattier connus aujourd'hui : le *Fusariumoxysporum* f. sp. *albedinis* responsable de la maladie mortelle du bayoud et le charançon rouge des palmiers. Dans les deux cas, c'est, en totalité ou en grande partie, à cause de l'échange de rejets infestés que ces organismes ont été disséminés et continuent à l'être.

Deux méthodes de micropropagation sont en cours de recherche et/ou de développement : l'embryogenèse somatique et l'organogenèse.

3-1-Embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique (encore appelée embryogenèse asexuée) consiste à obtenir des embryons non zygotiques à partir de différents tissus de la plante mère. Classiquement, on définit l'embryon comme étant une plante au stade initial de son développement. Il s'agit en fait d'une structure bipolaire qui, suite au processus de germination, donne naissance à une nouvelle plante. Habituellement, l'embryon s'édifie à partir d'une cellule initiale, le zygote, formé lors de la reproduction sexuée (embryon zygotique). Les embryons dits somatiques peuvent se développer à partir de cellules somatiques ou germinales placées sur des milieux de culture appropriés. De tels embryons se développent directement à partir de cellules méristématiques des explants ou indirectement à partir de cals. Les embryons somatiques produits sont, en principe, génétiquement identiques et capables de produire des clones à partir de génotypes donnés. Les explants utilisés, comme pour la technique d'organogenèse, proviennent de la base de jeunes feuilles de cœurs de rejets, des inflorescences…etc (El Hadrami et Baaziz, 1995; Loutfi, 1999).

L'embryogenèse somatique *in vitro* est obtenue soit par voie directe, sans formation de cals, soit par voie indirecte, après formation d'un cal.

L'inconvénient principal est que les doses élevées des hormones dans le milieu rendent les plantules enclines à la mutation qui produit des variations somaclonales, et qui ne sont manifestés qu'après quelques années de plantation en champ. Cependant, ces variations somaclonales produites par l'embryogenèse somatique, représentent une diversité génétique

Rapport-Gratuit.com

induite qui peut avoir des traits génétiques souhaitables dans la multiplication moléculaire. (Fki *et al.*, 2011)

3-2- Organogenèse

Cette technique, repose sur le principe de la stimulation des potentialités des tissus des explants ensemencés pour former des bourgeons végétatifs susceptibles de se multiplier *in vitro*. L'origine préexistante de ces bourgeons confère à cette technique un maximum de conformité et d'homogénéité génétique des vitroplants produits (Ferry, 2008).

L'organogenèse permet d'obtenir des bourgeons et pousses adventives sur les tissus de plusieur stypes d'explants (bourgeons axillaires, base de jeunes feuilles de cœurs de rejets, jeunes inflorescences…etc.). Elle peut être directe (multiplication par bourgeonnement axillaire) ou indirecte en passant par un stade cal (multiplication par bourgeonnement adventif).

3-2-1-Multiplication par bourgeonnement axillaire

Les bourgeons axillaires sont des bourgeons qui se trouvent à la base des feuilles. La mise en culture d'un tel bourgeon sur un milieu approprié permettra son évolution en une pousse feuillée. A leur tour, les bourgeons existant à la base des feuilles et ébauches foliaires produites *in vitro* peuvent donner naissance à d'autres bourgeons. C'est l'utilisation d'un milieu de culture avec un équilibre hormonal adéquat qui permet le maintien de la capacité de régénération et de la formation de jeunes pousses à chaque cycle de multiplication. Ainsi, la multiplication peut se poursuivre d'une façon parfois indéfinie. Après l'obtention du nombre désiré de bourgeons, les cultures sont transférées sur un milieu qui favorise l'élongation et l'évolution des bourgeons en plantules complètes. La multiplication par bourgeonnement axillaire permet de produire des vitroplants conformes aux variétés d'origines. Cependant, le séjour prolongé dessouches sur le milieu de culture augmente le risque de produire des plants non conformes (Loutfi, 1999; Anjum et Hakoomat, 2004).

3-2-2-Multiplication par bourgeonnement adventif

Les bourgeons adventifs sont des bourgeons qui se forment sur des endroits inhabituels de la plante ; leur initiation peut, en principe, être induite sur n'importe quel organe ou tissu végétal. Lorsqu'on met en culture des explants constitués d'entre nœuds, les cellules initiales de l'explant se dédifférencient et se divisent rapidement pour former un cal. Une fois transféré

sur un milieu favorable, ce cal donne naissance soit à des pousses constituées principalement de bourgeons adventifs soit à des embryons somatiques. Il est important de signaler que vu le passage par cals, la multiplication par bourgeonnement adventif peut donner un pourcentage des plantes génétiquement non conformes à la plante mère.

✴A l'état actuel, la technique d'organogenèse, assurant une certaine conformité variétale, est l'unique voie de micropropagation du palmier dattier au Maroc. Elle a été choisie depuis 1980, comme technique pour rajeunir et repeupler les palmeraies dévastées par le Bayoud.

La technique d'organogenèse se compose de quatre étapes :

- Initiation :

L'initiation de tissus organogènes se fait à partir de sites potentiellement méristématiques préexistants au niveau de l'épiderme interne de la base des jeunes feuilles du bourgeon terminal ou du cœur du rejet (Aissam, 1990) ; ces cellules préméristématiques commencent à fonctionner par suite de la levée d'inhibition exercée par le bourgeon axillaire ; cette levée peut être mécanique par élimination du bourgeon ou chimique sous l'action des hormones à dominance auxinique. Cette phase se déroule à l'obscurité et aboutit à la formation de souches réactives.

- Multiplication :

La multiplication des bourgeons s'effectue à la lumière dans un milieu où la teneur en cytokinines est augmentée. Ce cycle est répété autant de fois qu'il faut pour atteindre le nombre de bourgeons désirés.

- Élongation :

Cette étape consiste à cultiver les plantules dans des milieux aillant des concentrations en hormones (cytokinines) qui favorisent leur allongement.

- Enracinement :

Dans la culture *in vitro*, la phase d'enracinement est généralement favorisée par l'addition des auxines dans les milieux de culture. Les hormones de croissances les plus usuellement utilisées pour stimuler la rhizogenèse sont l'ANA, l'AIB et l'AIA, responsable de l'induction racinaire.

- Acclimatation :

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

C’est une étape très importante, dite aussi de transition, car chaque échec à cette étape veut dire échec à tous les stades précédents, et perte du temps, des efforts, et des coûts

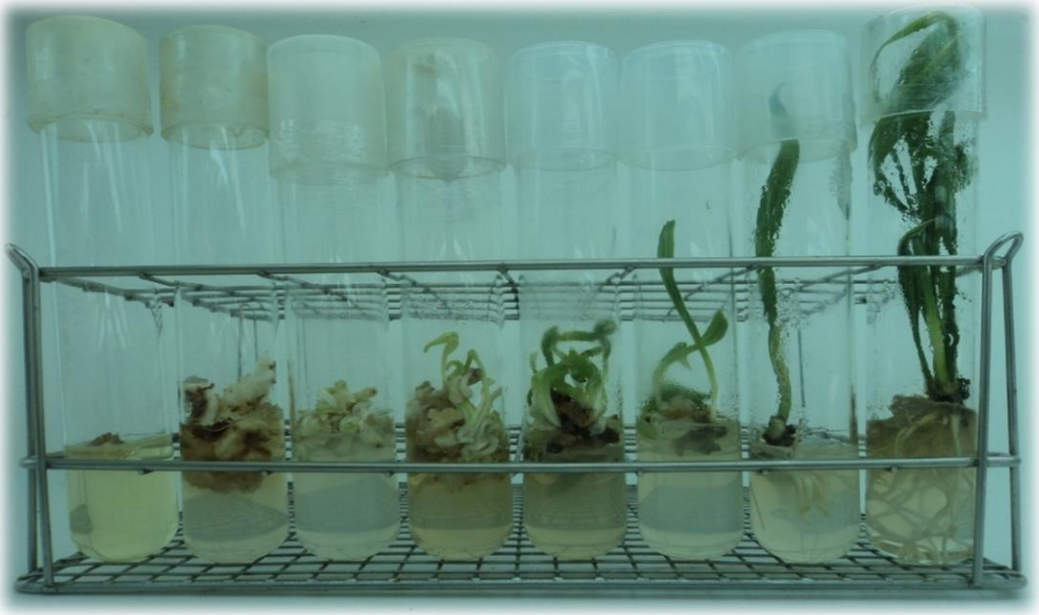


Photo 1 : Les différentes étapes de l’organogenèse chez le palmier dattier

IX-Avantages et inconvénients de la technique d’organogenèse :

1 Avantages :

Cette technique permet :

- La production massive de copies conformes d’individus-élites en un délai court ;
- la production de plants nécessite peu d’espace à cause de la miniaturisation du système et peut être programmée indépendamment des saisons puisque tous les paramètres physiques sont maîtrisables en module de culture ;
- la conservation du matériel génétique *in vitro* sur un espace réduit plutôt qu’en serre. Ex. banques d’espèces ou de variétés en voie d’extinction conservées pendant plusieurs années (Boxus *et al.,* 1995).

2- Inconvénients :

Vitrification

La culture des tissus du palmier dattier est sensible au phénomène de vitrification. Ce désordre physiologique est caractérisé par un développement de tissus avec une carence en lignification. Elle est due à l’accumulation de l’eau dans les tissus cultivés. De nombreux facteurs qui engendrent ce désordre sont cités dans la littérature ; le plus important d’entre eux

est des niveaux élevés de régulateurs de croissances, et de certains sels minéraux (particulièrement l'ammonium) dans le milieu de culture (Loutfi, 1999; El Bellaj, 2000).

Photo 2 : vitrification d'une souche

Contaminations :

La contamination *in vitro* par des champignons, des bactéries, ou des levures, est l'un des problèmes les plus graves au niveau des laboratoires de culture des tissus (El Bellaj, 2000; Fki, 2005)

Photo 3 : Contamination de culture

Enracinement précoce :

Pendant la phase de multiplication, les plantules peuvent avoir un système racinaire bien développé avant la phase d'enracinement ; ce qui engendre une diminution du taux de multiplication des souches. Ce phénomène est due à la composition du milieu de culture et surtout la balance auxine /Cytokinines (Saidi *et al.*, 2009).

Photo 4 : L'enracinement précoce d'une souche

Brunissements des explants :

C'est l'un des facteurs entravant l'organogenèse chez les ligneux en générale. En effet, il résulte de l'oxydation des composés phénoliques émis par les tissus en culture suite au contact entre les enzymes d'oxydation (polyphénoloxydases et peroxydases) et les substrats phénoliques (El Hadrami, 1995; El Hadrami *et al.,* 1998; El Bellaj, 2000). De même, le pH, la température, la teneur en oxygène du milieu peuvent influencer l'intensité du brunissement. Poulain *et al.* (1979) ont montré que l'oxydation des composés phénoliques conduit rapidement à la nécrose et à la mort des tissus du palmier dattier.

Photo 5 : Brunissement d'un explant

Pertes durant la phase de l'acclimatation :

La phase d'acclimatation est l'un des facteurs limitant de la culture *in vitro*. Au cours de cette étape de sevrage en serre, le taux de mortalité des plantes issues de conditions *in vitro* peut être élevé. Les plantes commencent d'abord par flétrir puis se nécrosent, laissant des signes indicateurs de la pourriture du collet et des lésions sur la tige (Ghorbel *et al*.,1998).

Photo 6 : Plante morte en serre

X- Importance de la source carbonée et des régulateurs de croissance

La source du carbone

Les tissus en cultures *in vitro* sont largement hétérotrophes via à vis du carbone en raison de l'absence ou de l'insuffisance de l'assimilation chlorophyllienne. Il est donc indispensable d'ajouter une source carbonée (des glucides) au milieu de culture. Les glucides remplissent deux fonctions principales dans les milieux de culture ; ils fournissent de l'énergie nécessaire pour la croissance des tissus et maintiennent une pression osmotique donnée du milieu de culture (ryd, 1988). Cette pression osmotique, appelée aussi « effet osmoticum », peut avoir diverses actions sur les tissus. Elle agit, dans certains cas, sur l'orientation ou l'expression morphogénétique des tissus (Belaizi et Boxus, 1995 ; Charniere *et al.*, 1999), dans d'autres cas , sur la maturation des embryons somatiques produits (Walker et Parrott, 2001).

En dépit de l'utilisation marquée du saccharose et des succès obtenus, d'autres sucres ont été également décrits comme source de carbone dans la micropropagation des espèces ligneuses. Le sorbitol s'est avéré efficace chez diverses rosacées (Coffin *etal*1986 ; Marino et *al* 1993). Des sucres réducteurs tels que le glucose et le fructose, normalement non transportés dans les tubes criblés, peuvent cependant être aisément assimilés et métabolisés chez plusieurs espèces ligneuses et constituent une meilleure source de carbone. Le glucose est une source de carbone efficace pour la culture de tissus pour le genre Alnus (Wainwright et Scrace, 1989) , pour *Potentilla fruticosa* et *Ficus lyrata* (Wainwright *etal*1989) et *Quercus robur* (Gruselle, 1994)

L'influence de la source de carbone (saccharose, glucose, fructose, mannitol et sorbitol) a été étudiée sur l'induction et la multiplication des bourgeons axillaires du *Chêne-liège* (Elkbiach et *al*., 2002). Le saccharose à 20 g/l favorise le mieux la calogenèse sur le milieu WPM, additionné des microéléments et du mélange vitaminique MS et contenant 4,5 µM de BA. Le saccharose donne encore les meilleurs résultats, à 30 g/l, lors de la phase de multiplication sur le même milieu contenant 2,2 µM de BA et 1,44 µM d'AG3. Le mannitol ne stimule pas le débourrement. Le fructose et le sorbitol ne permettent pas une amélioration du taux de calogenèse ni de multiplication. Le saccharose à 30 g/l conduit à un enracinement satisfaisant des pousses (Elkbiach et *al*., 2002)

✳ **Régulateurs de croissance**

Un régulateur de croissance est défini comme étant, une substance qui, suivant sa concentration absolue ou relative dans le milieu, peut supprimer, permettre ou modifier sous certaines conditions les processus de cytodifférenciations (Street, 1977).

L'organogenèse est fortement influencée par les régulateurs de croissance. Les deux hormones, les plus souvent utilisés, d'une manière conjointe ou séquentielle, sont les auxines et les cytokinines.

En fait Skoog et Miller (1957), signalent que c'est l'équilibre auxine/cytokinine qui détermine la néoformation d'un organe particulier. En général, des équilibres auxine/cytokinine à dominance cytokinique favorisent le bourgeonnement et ceux en faveur des auxines provoquent l'apparition des racines. C'est le cas chez de nombreuses espèces telles *Quercus suber* (Romano *et al*, 1992), *Nicotiana tobacum*(Attfield et Evans, 1991) et *Fraxinus americana* (Bates *et al*, 1992). L'influence de ce rapport hormonal n'est, cependant, pas une règle générale pour toutes les espèces végétales. En effet, il suffit, dans certains cas, d'ajouter

au milieu de culture l'un ou l'autre des deux régulateurs précités pour parvenir à une réponse morphogénétique (Seon *et al.*, 1998).

L'ANA est une auxine utilisée dans les milieux de bourgeonnement mais en association avec des cytokinines. Ainsi Yang*et al.*,(2006) ont obtenu, chez l'*Acacia crassicarpa* un optimum de régénération de pousses avec 0,5mg/l de l'ANA et 0,5mg/l de thidiazuron. Chez la même espèce l'élongation des pousses adventives a été favorisée à une concentration de 0,5 mg/l d'AIB.

La BAP est une cytokinine reconnue par son effet favorable sur le bourgeonnement chez de nombreuses espèces. Chez *Solanum pseudocapsicum* L., Timir *et al* (2014) ont monté que pour l'induction de l'organogenèse, le milieu de régénération optimale était le milieu MS additionné de 4,44 µM/l de BAP et 1,43 µM/l AIA. En 2008, Akaneme et *al.*ont testé une gamme de combinaisons auxine/cytokinine chez *Pinus caribaea* ; deux formes de cal ont été observées. Dans les cultures avec l'acide naphtalène-acétique (ANA) x 6-amino purine furfurylique (Kinétine), 100% des cals obtenus ont été friables, tandis que dans les cultures avec l'ANA x 6-benzyl-aminopurine (BAP) des cultures, 100% des cals friables ont été formé uniquement avec un ratio de 1:2 ANA/BAP. De nombreux cals compacts ont aussi été formés par les diverses combinaisons de l'ANA et le BAP. La friabilité des cals a été encouragée par l'interaction de l'indole butyrique (AIB) et de BAP, mais l'organogenèse n'a pas été atteinte. (Akaneme *et al*2008)

Chez le palmier dattier Boufis *et al.*, (2013) ont montré que les traitements (10 mg/l 2,4-D, 1mg/l de BAP) et(50 mg/l 2,4-D, 1mg/l de BAP) accélèrent l'initiation et la multiplication des cals dans un milieu solide.

Les résultats de la recherche sur le matériel végétal du palmier dattier à partir des inflorescences ont démontré que ce type de tissus est très sensible aux régulateurs de croissance, particulièrement les auxines. En fait, la concentration tolérable d'auxines la plus utilisée (ANA, 2,4-D et AIB) est d'environ 2 $mg.l^{-1}$. En outre, l'ANA s'est révélé le plus efficace des auxines dans la formation des bourgeons. Dans le cas des cytokinines, le 2-iP a été plus efficace que la zéatine combinée avec BA (Loutfi, 1999). En outre, la combinaison d'une auxine et de deux cytokinines s'est avéré plus efficace sur la croissance des tissus et de la formation des bourgeons (Abahmane, 2005a; Loutfi, 1999; Drira, 1985).

Concernant la balance des régulateurs de croissance, il a été montré qu'une forte balance Auxine/cytokinine [NDA (0,5 mg.l-1), AIB (0,5 mg.l-1), BA (0,1 mg.l-1)] permet un pourcentage élevé des réactions tissulaires, mais la formation de racines était la plus

fréquente. Dans la situation inverse [ANA (0,5 mg.l-1), BA ou 2-iP (2 mg.l-1)], le bourgeonnement a été obtenu directement à partir de cultures (Abahmane, 2005b; Loutfi, 1999)

Plusieurs travaux ont été effectués sur l'embryogenèse somatique à partir de cœurs de rejets pour déterminer la meilleure combinaison hormonale. Ainsi, Daikh et Demarly (1987), signalent pour la première fois l'obtention d'embryons somatiques à partir de milieu liquide, contenant des concentrations élevées en auxines (AIA et ANA), cytokinines (BAP) et kinétine.

El Bellaj (2000) a confirmé que l'utilisation d'un milieu de culture solide de MS additionné de 0.5 $mg.l^{-1}$ de BAP, 0.1 $mg.l^{-1}$ de 2.4-D et de 150 $mg.l^{-1}$ du charbon actif améliore nettement la phase d'induction et de multiplication des embryons somatiques.

Malgré les multitudes de travaux entrepris en culture *in vitro* des tissus du palmier dattier, ils sont encore insuffisants pour répondre aux nombreuses questions qui se posent. En fait, les recherches faites sur l'acclimatation du palmier dattier ont montré que les plantules transférés *ex vitro* doivent avoir certaines caractéristiques importantes qui leur permettent d'assurer un taux de reprise élevé dans la serre (Abahmane, 2011). Certains génotypes sélectionnés de palmier dattier produisent des plantules vigoureuses d'une bonne qualité ayant les caractéristiques souhaitées (collet fermé, surface foliaire importante, nombre importants de feuilles et de racines, taux de chlorophylle élevé etc.) tandis que d'autres produisent des plantules de qualité inférieure (collet ouvert, plantules chétives, etc.). Dans ce dernier cas, les plantules doivent être conservées dans le laboratoire jusqu'à ce qu'ils acquièrent des caractéristiques souhaitées durant la phase d'élongation.

En conséquence, la phase d'acclimatation est l'étape la plus importante dans le protocole de la micropropagation du palmier dattier, elle détermine la réussite du processus

Le présent travail a été entrepris afin d'optimiser la technique d'organogenèse chez le palmier dattier. Il vise la détermination de l'influence des combinaisons hormones/sucre sur la phase d'élongation et d'acclimatation des plantules de la variété Mejhoul.

Nous avons testé les hormones : l'acide naphtaléneacètique (ANA), L'acide beta-indole butyrique (AIB), la kinètine et de la benzylaminopurine (BAP), et différents nature de sucre : Sucre commercial, saccharose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), manitol ($C_6H_{14}O_6$) et sorbitol ($C_6H_{14}O_6$)

Matériel et méthodes

RapportGratuit.com

I- Le matériel végétal

Pur évaluer les effets des différentes sources de carbone ainsi que les différents régulateurs de croissance sur le développement du palmier dattier en culture *in vitro*, des plantules présentant le même aspect morphologique de la variété Mejhoul ont été utilisées. Les phases d'initiation, de multiplication et le début de l'élongation, ont été réalisée au laboratoire national de culture des tissus du palmier dattier d'Errachidia à partir du cœur de rejets provenant d'Erfoud.

II-Effet des régulateurs de croissance et de la nature de sucres sur la phase d'élongation et d'acclimatation

Le milieu de base utilisé est le milieu Murashige et Skoog (MS). Dix combinaison hormonales ont été testées afin d'étudier l'effet des régulateurs de croissance sur l'élongation des plantules (tableau 1) en utilisant le sucre granulé commercial. Par la suite, la meilleure combinaison hormonale obtenue a été sélectionnée pour déterminer l'effet de la nature des sucres. Quatre types de sucre différents ont été ainsi additionnés aux milieux de culture à savoir le saccharose, le mannitol, le sorbitol et le sucre granulé commercial.

Tableau 1 : Les différentes combinaisons hormonales utilisées

	AIB (1mg /l)	ANA (1mg /l)	BAP (1mg /l)	KIN (1mg /l)
M1	0	0	0	0
M2	1	0	1	0
M3	1	0	0	1
M4	0	1	1	0
M5	0	1	0	1
M6	1	1	1	0
M7	1	1	0	1
M8	1	0	1	1
M9	0	1	1	1
M10	1	1	1	1

1-Préparation du milieu de culture

Dans une marmite déposée sur un agitateur chauffant, on met une quantité précise de l'agar et de l'eau. Après homogénéisation de ces constituants on ajoute les macroéléments, les oligo-éléments, le Fer qui est solubilisé dans la solution EDTA afin d'éviter sa précipitation, les vitamines, et l'adénine et le sucre.

Dans un erlen on prend 3 litres du milieu MS sans hormones. Selon l'essai, on ajoute les hormones et le sucre puis le pH du milieu doit être égal à une valeur de 5,8.

Pour chaque milieu de culture, nous avons effectué 20 répétitions.

Les bocaux sont mis dans un autoclave réglé à une température de 120°C et une pression de 1 bar pendant 30 min pour la stérilisation.

2-Repiquage et culture des plantules

Les plantules ont été repiquées sur les différents milieux de culture puis incubées sous une température de 27± 2 °C avec un photopériodisme de 16h, une humidité au voisinage de 100%, et une intensité lumineuse de 2620 lux. Les cultures sont entretenues par repiquages sur des milieux frais tous les 25 jours.

3-Acclimatation des plantules

Les plantules ont été rincées à l'eau tiède et trempées dans une solution antifongique (PELT 44 à une concentration d'1g/l) pendant 20 min (photo 9). Leur plantation a été effectuée dans des alvéoles humidifiés contenant un mélange de sable, graviers et tourbe à volume égal (1/3).

La température de la serre vitrée a été maintenue à 26± 2 °C. L'humidité relative été maintenue au voisinage de 70% grâce au système d'humidification. Afin de favoriser l'humidité, Les alvéoles ont été mis en place sous des tunnels en plastique (photo 8).

Chaque 2 à 3 jours les plantules ont été pulvérisées à l'aide d'une solution antifongique (PELT 44 à une concentration 0,5g/l) afin d'éviter la pourriture des feuilles et du collet.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Photo 7 : Plantules trempées dans une solution antifongique

Photo 8: Plantules en phase d'acclimatation

III-Observations et critères d'évaluation

Pour évaluer l'effet des différents milieux de cultures sur le comportement et l'élongation des plantules ainsi que leur vigueur avant leur transfert en serre pour l'acclimatation, des observations ont été faites pour chaque milieu et lors de chaque repiquage.

1-Nombre et longueur des feuilles néoformées

Ce critère d'évaluation représente une estimation de la capacité des plantules, mises en culture sur les différents milieux, à s'allonger et à néoformer d'autres feuilles. Le nombre des feuilles néoformées et leurs longueur ont été noté au moment de chaque observation

2-Nombre et longueur des racines néoformées

Ce critère d'évaluation estime la capacité des plantules, mises en culture sur les différents milieux, à néoformer d'autres racines. Le nombre des racines néoformées et leurs longueur ont été noté au moment de chaque observation.

3- Verdissement

Ce critère d'évaluation donne une idée sur la quantité de chlorophylles synthètisées au moment de chaque observation et aussi sur la capacité photosynthétique pour chaque plantule. Ceci a été réalisé par comparaison de chaque plantule à une gamme formée de 5 plantules qui présentent un degrée de verdissement progressif (photo 9).

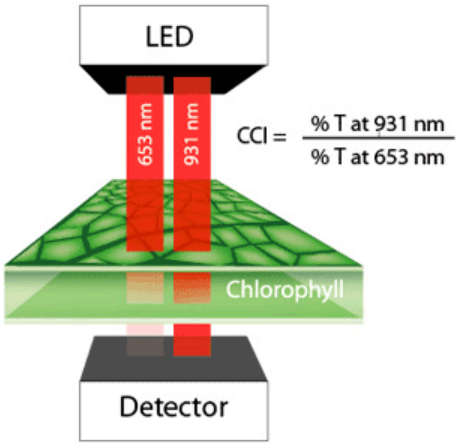
Photo 9 : Echelle de verdissement progressif

4- Teneur en chlorophylles

C'est un paramètre qui confirme l'observation morphologique. Il est mesuré à l'aide d'un chlorophylle-mètre CCM-200.

La transmission des chlorophylles est spécifiquement élevée dans les ondes proches de l'infrarouge et très faible dans la gamme des rouges parce que les plantes vertes absorbent le rayonnement visible pour la photosynthèse et transmettent les rayons proches de l'infrarouge, qu'ils n'utilisent pas.

Le CCM-200 chlorophylle-mètre utilise des LED qui émettent des longueurs d'ondes spécifiques dans les plages rouges et infrarouges. Le détecteur analyse le rapport des deux longueurs d'onde pour déterminer l'indice de concentration de chlorophylle (CCI).



5-état du collet

Ce critère est évalué par estimation de l'ouverture et la fermeture de collet (photo 10)

- Si le collet est ouvert ➞ risque de pourriture lors de l'acclimatation
- Si le collet est fermé ➞pas de pourriture lors de l'acclimatation

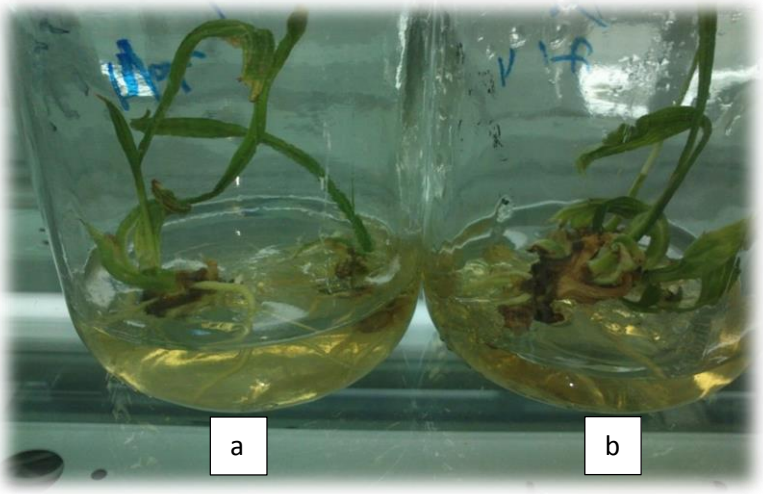


Photo 10 : état de collet a- collet fermé. b- collet ouvert

IV- Analyse statistique

Les résultats chiffrés ont été soumis à une analyse de variance (ANOVA). Le modèle adopté était complètement randomisé (CRD) à un niveau de signification de 5%. Les moyennes ont été comparées avec des différences significatives par le test de Student-Newman-Keuls (SNK) à 5% en utilisant SPSS v. 16.0 (IBM, Chicago, IL, USA) pour Windows.

Résultats

I-Effet des régulateurs de croissance sur la phase d'élongation et d'acclimatation

1- Phase d'élongation

a-Longueur et nombre de feuilles

D'après les analyses statistiques des résultats obtenus, un effet significatif (P <0,05) des régulateurs de croissance sur la longueur des feuilles a été relevé. Nous constatons comme le montre très clairement la figure 1, une distinction des milieux : **M9** (1mg/l d'ANA, 1mg/l de BAP et 1mg/l de KIN), **M8** (1mg/l d'AIB, 1mg/l de BAP et 1mg/l de KIN) et **M10** (1mg/l d'AIB, 1mg/l d'ANA, 1mg/l de BAP et 1mg/l de KIN).

La balance hormonale en faveur des cytokinines dans ces milieux a donné le meilleur allongement des feuilles avec des valeurs élevées de 17,2 cm à 19,2 cm

Les plantules mises sur les milieux : **M7** (1mg/l d'AIB, 1mg/l d'ANA, 1mg/l de KIN), **M3** (1mg/l d'AIB et 1mg/l de KIN) et **M5** (1mg/l d'ANA et1mg/l de KIN), ont donné également un allongement des feuilles assez important. Ces résultats montrent qu'une balance hormonale avec la KIN seule favorise l'allongement des feuilles avec des valeurs de 12 cm à 14 cm.

Les milieux **M1** (sans hormones), **M6** (1mg/l d'AIB, 1mg/l d'ANA et 1mg/l de BAP), **M2** (1mg/l d'AIB et1mg/l de BAP) et **M4** (1mg/l d'ANA et 1mg/l de BAP) ont donné un allongement faible des feuilles. Ceci montre que les milieux avec une balance hormonale en faveur des auxines défavorisent l'allongement des feuilles.

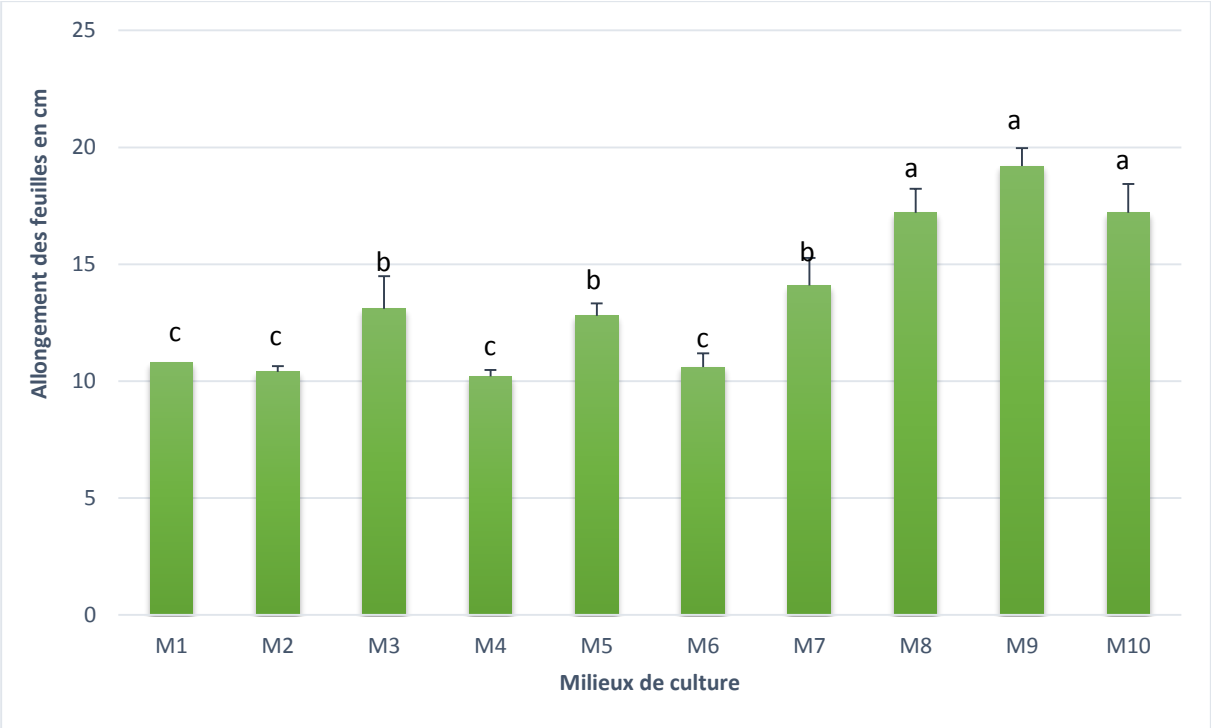


Figure 1: Effet des régulateurs de croissance sur la longueur des feuilles

Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls

Concernant l'effet des régulateurs de croissance sur le nombre de feuilles néoformées, les observations réalisées le long de l'observation ont montré qu'il n'est pas significatif (figure 2).

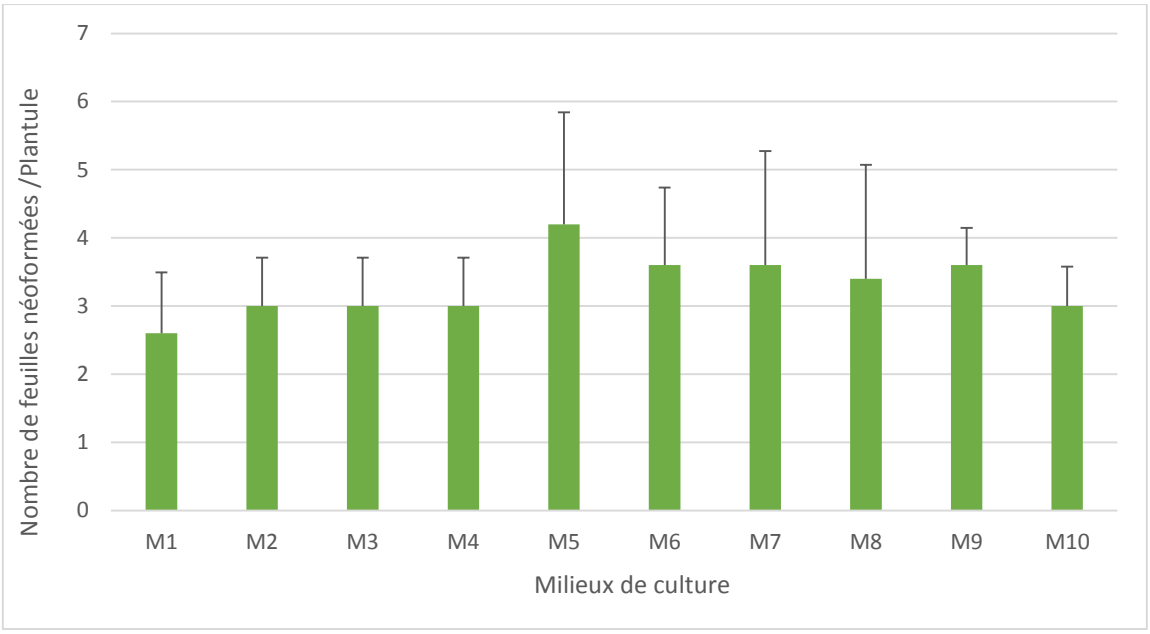


Figure 2: Effet des régulateurs de croissance sur le nombre des feuilles néoformées

b-Nombre et longueur des racines

D'après les analyses statistiques, et comme le montre la figure 3 on constate qu'il n'y a pas d'effet significatif des régulateurs de croissance sur la longueur des racines.

Figure 3 : Effet des régulateurs de croissance sur la longueur des racines

Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls

La figure 4 par contre montre une bonne émission racinaire chez les plantules mises dans les milieux : **M4**(1mg/l d'ANA, 1mg/l de BAP), **M9**(1mg/l d'ANA, 1mg/l de BAP et 1mg/l de KIN), **M7**(1mg/l d'AIB,1mg/l d'ANA, et 1mg/l de KIN) , **M5**(1mg/l d'ANA et 1mg/l de KIN), **M10**(1mg/l d'AIB,1mg/l d'ANA, 1mg/l de BAP et 1mg/l de KIN) , **M6**(1mg/l d'AIB,1mg/l d'ANA, 1mg/l de BAP). Le meilleur nombre de racines a été obtenu sur le milieu **M4 avec une valeur de 5,9**

Par contre les milieux : **M3** (1mg/l d'AIB et 1mg/l de KIN), **M8** (1mg/l d'AIB,1mg/l de BAP et 1mg/l de KIN),**M2**(1mg/l d'AIB et1mg/l de BAP) et **M1** (sans hormones) ont donné un nombre assez faible de racines.

Ainsi, ces résultats montrent que les milieux contenant l'ANA seule ou combiné avec l'AIB favorisent l'émission racinaire, tandis que les milieux avec l'AIB seule ont conduit à une diminution de nombre de racines.

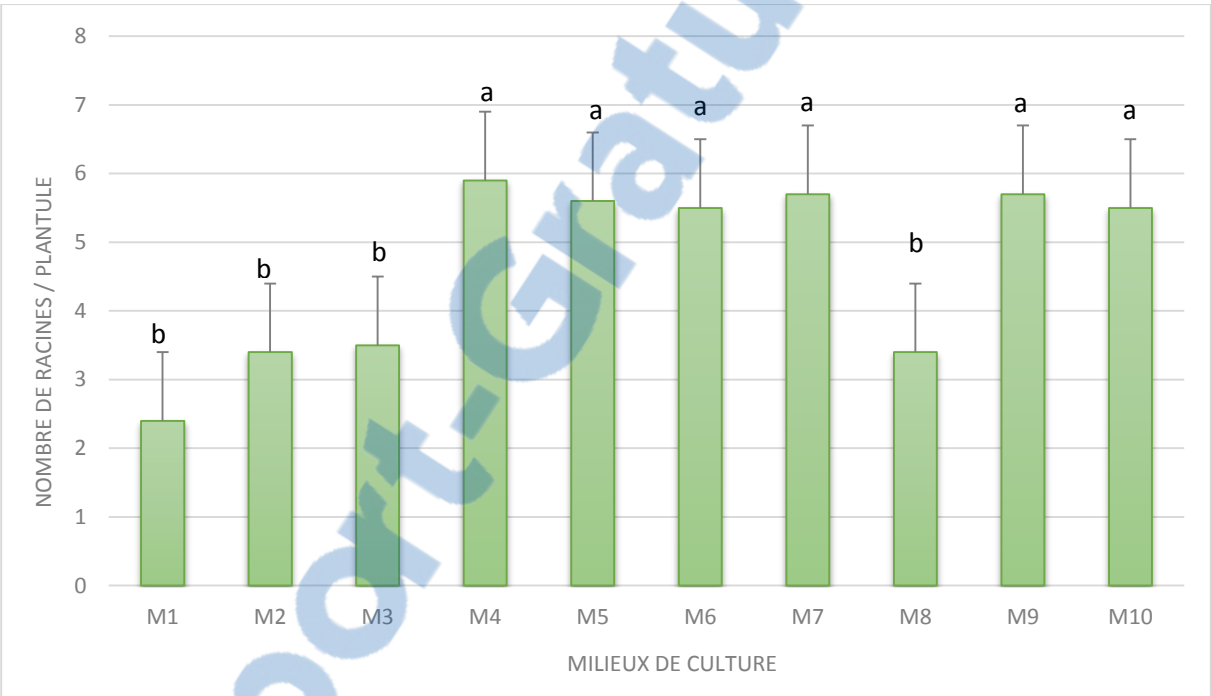


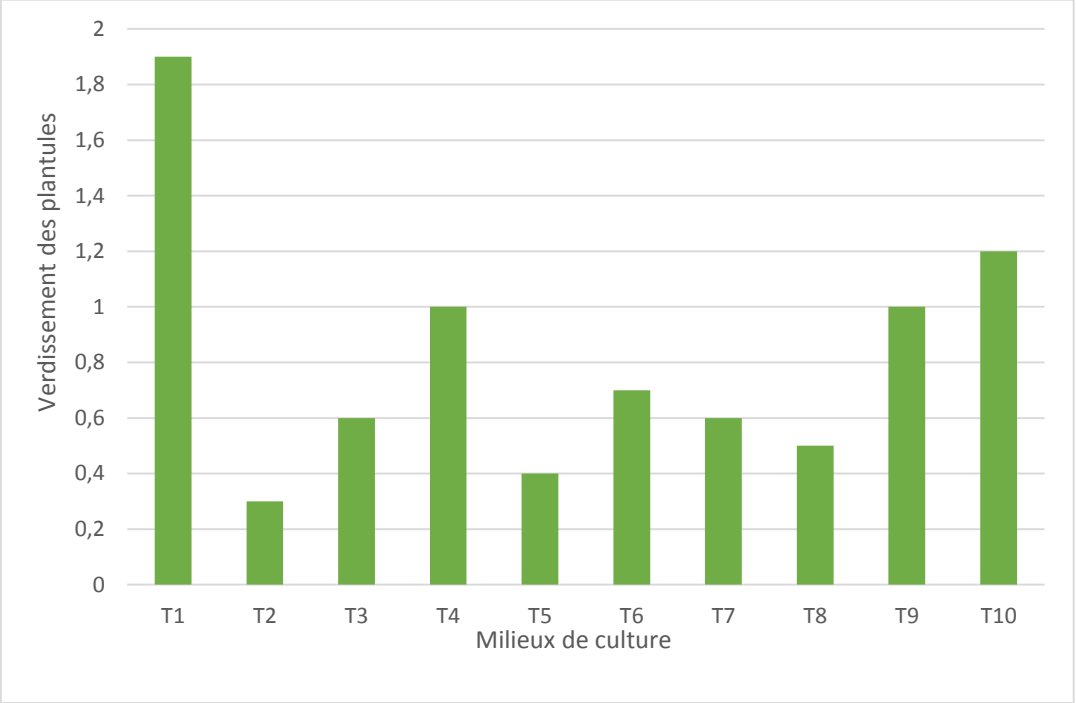
Figure 4: Effet des régulateurs de croissance sur le nombre de racines néoformées

Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls

c-Verdissement et teneur en chlorophylles

D'après les observations visuelles, on constate que le milieu M1 sans hormones a donné des plantules avec un verdissement important par rapport aux autres milieux (figure 5). La détermination de la teneur en chlorophylle a confirmé ce résultat (figure 6). En effet, le taux de chlorophylle a été de l'ordre de 6,78 CCI chez les plantes cultivées sur le milieu M1 et il n'a pas dépassé 4,2 CCI pour les autres milieux.

Rapport-Gratuit.com



a

Figure 5 : Effet des régulateurs de croissance sur le verdissement des plantes

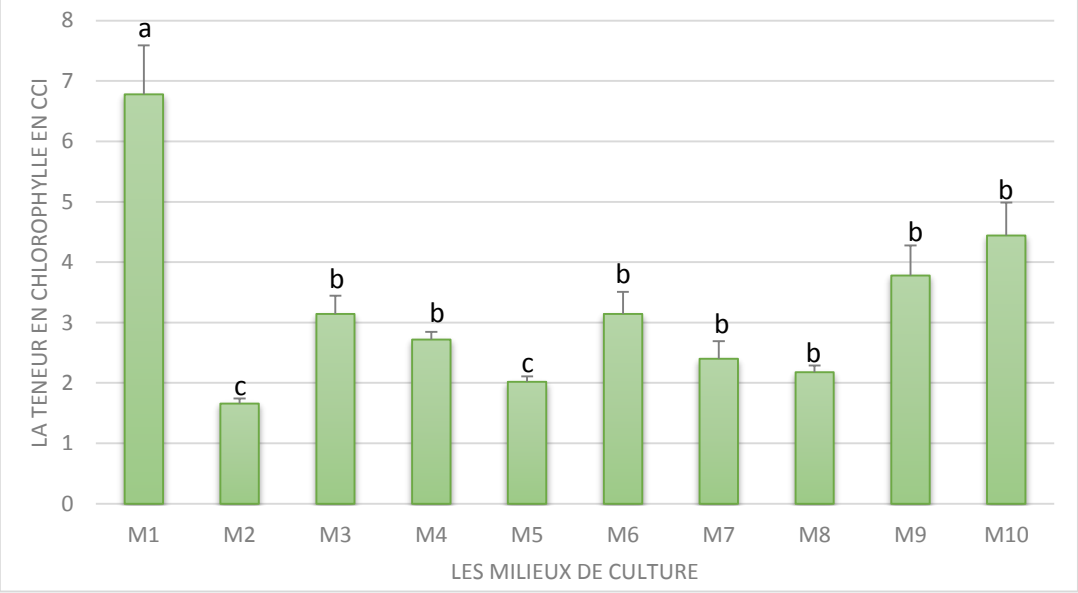


Figure 6 : Effet des régulateurs de croissance sur la concentration en chlorophylles des feuilles

Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls

d-État de collet

D'après les observations faites, on constate au cours du temps que le milieu M1 dépourvu d'hormones a donné un pourcentage élevé des plantules avec collet fermé (70%) par rapport aux autres milieux. Les plantules mises sur ce milieu ont montré également une surface foliaire importante par rapport aux autres milieux

Tableau 2 : Pourcentages des Plantules présentant un collet fermé sur les différents milieux de culture

Les traitements	% des plantules avec collet fermé
T1	70%
T2	40%
T3	30%
T4	45%
T5	50%
T6	35%
T7	40%
T8	55%
T9	35%
T10	40%

2- Phase d'acclimatation

Les plantules obtenues à partir de différents traitements ont été transféré à la serre d'acclimatation, et leur taux de survie a été évalué après 25 jours. Ce taux a été de l'ordre de 70% pour les plantules qui avaient été cultivées sur le milieu M1 sans hormones (photo 11).

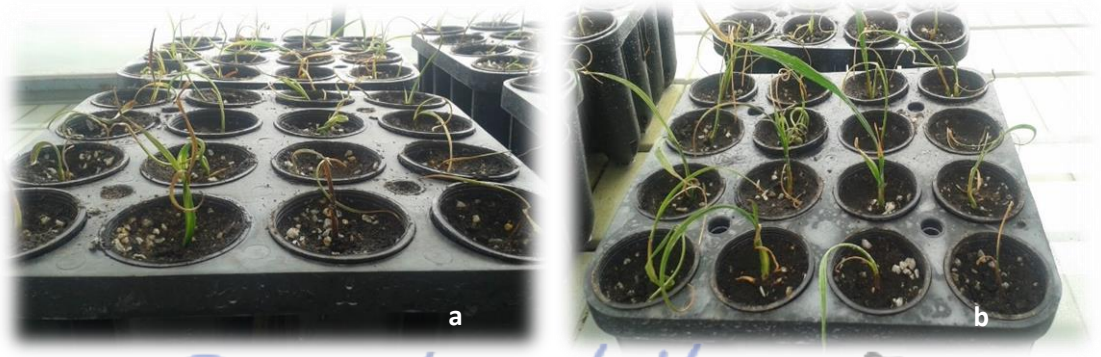


Photo 11 : (a) plantules avec un faible taux de reprise en serre (b) plantules vigoureuses provenant du milieu M1

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Tableau 3 : l'effet des différents traitements sur le développement des plantules

Milieu D'élongation	Longueur des feuilles	Nombre de racine	Longueur des racines	Taux de chlorophylle	Porosité
M1	10,8±0,97c	2,4±0,55b	3,5±0,65a	6,78±3,61a	20,64±3,80a
M2	10,4±1,07c	3,4±1,43b	2,7±0,57a	1,66±0,38c	10,3±0,71c
M3	13,1±6,22b	3,5±1,67b	3,7±0,67a	3,14±1,37b	12,52±4,72b
M4	10,2±1,22c	5,9±1,34a	3,6±2,07a	2,72±0,56b	9,64±1,59c
M5	12,8±2,39b	5,6±4,28a	3,95±1,27a	2,02±0,39c	12,88±4,98b
M6	10,6±2,66c	5,5±1,67a	4,3±0,84a	3,14±1,65b	18,44±8,77b
M7	14,1±5,24b	5,7±1,79a	4,2±1,35a	2,4±1,31b	18,3±0,88b
M8	17,2±4,62a	3,4±1,95b	2,9±1,14a	2,18±0,49b	15,48±3,95b
M9	19,2±3,44a	5,7±0,71a	4,2±2,17a	3,78±2,21b	13,3±1,10b
M10	17,2±5,53a	5,5±1,48a	3,9±1,89a	4,44±2,45b	18,021±6,11b

II-Effet de la nature des sucres sur la phase d'élongation et d'acclimatation

1-Phase d'élongation

D'après le premier essai relatif à l'effet des régulateurs de croissance sur la phase d'élongation et d'acclimatation, nous avons conclu que les plantules cultivées sur le milieu M1 sans hormone ont montré une concentration élevée en chlorophylles et une vigueur importante durant la phase d'élongation et un taux de reprise élevé en serre. Afin d'étudier l'effet de la nature des sucres sur l'élongation et l'acclimatation des plantules de Mejhoul, nous avons testé sur un milieu dépourvu d'hormones les sucres suivants : le saccharose, le sorbitol, le mannitol et le sucre commercial.

a-Longueur des feuilles

Les analyses statistiques ont montré une différence significative ($P < 0,05$) d'allongement des feuilles entre les quatre traitements. Ainsi, un allongement important des feuilles a été relevé sur le milieu contenant le saccharose (avec une valeur de 13,6cm) comparés aux autres milieux de culture (figure 7). Par contre aucune différence significative n'a été notée concernant le nombre de feuilles néoformées (figure 8).

Figure 7 : Effet de la nature des sucres sur la longueur des feuilles

Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls

b-Longueur et nombre de racines

Les résultats présentés dans la figure 8 ont montré que la nature des sucres n'influence ni la néoformation des racines ni leurs longueurs

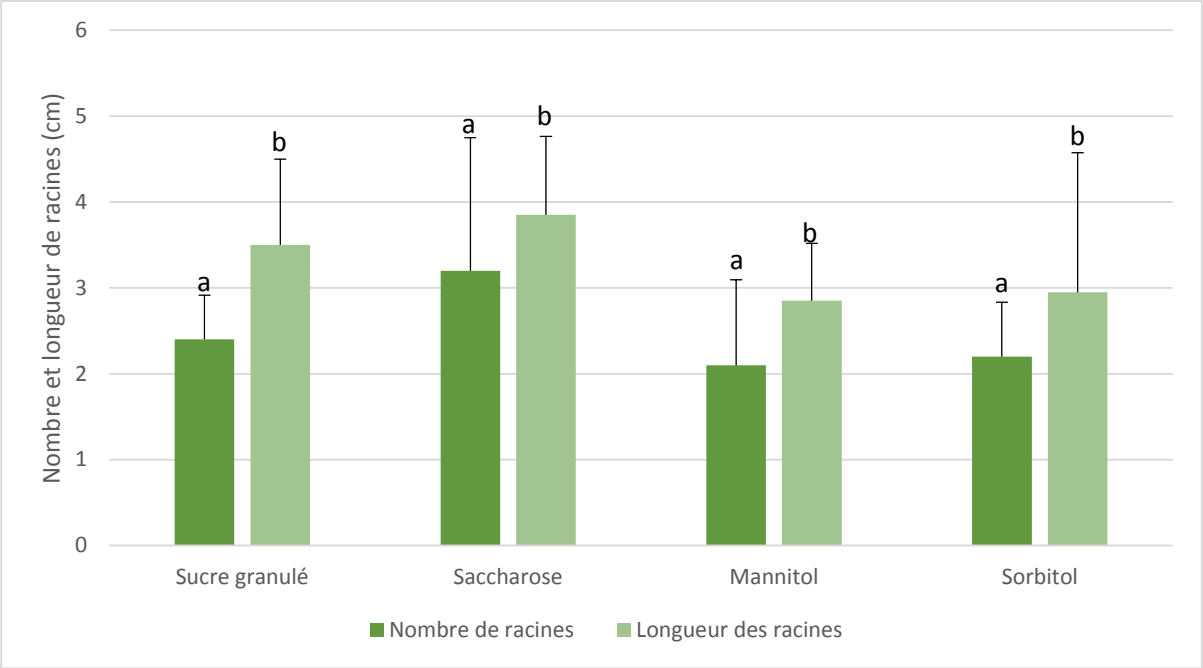


Figure 8 : Effet de la nature des sucres sur la longueur et le nombre des racines

Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls

c-Teneur en chlorophylle

D'après les analyses statistiques, on constate qu'il y a un effet significatif (P <0,05) de la nature des sucres sur la concentration en chlorophylles. En effet, les indices de concentration en chlorophylles ont été plus importants chez les plantes cultivées sur le milieu contenant le saccharose (10,04 CCI) suivis de ceux obtenues sur le milieu avec sucre granulé (6,78 CCI). Tandis que pour le sorbitol et le mannitol cet indice n'a pas dépassé 4 CCI (figure 9).

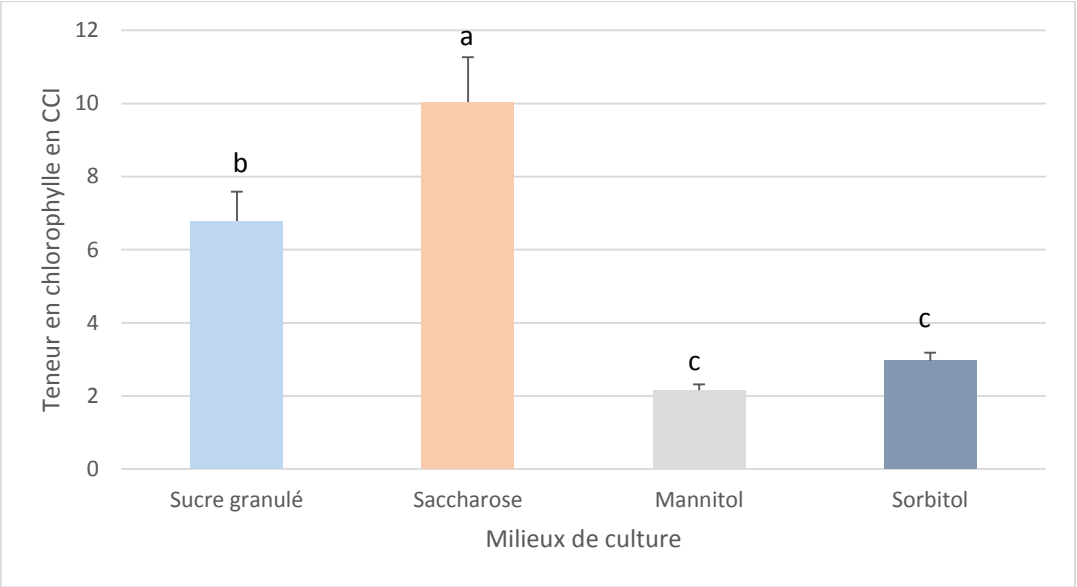


Figure 9 : Effet de nature de sucre sur la concentration en chlorophylles

Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls

d- État de collet

Le milieu contenant le saccharose s'est montré plus favorable pour la fermeture de collet avec un pourcentage qui a atteint 90%, plus élevé que celui obtenu avec le milieu contenant le sucre granulé. Les milieux contenant le mannitol et le sorbitol ont donné un pourcentage faible des plantules avec collet fermé.

Tableau 3 : pourcentage des plantules avec collet fermé selon la nature des sucres

	Sucre granulé	saccharose	mannitol	sorbitol
% Plantules avec collet fermé	70%	90%	55%	40%

2-Phase d'acclimatation

Après 25 jours, le taux de survie des plantules était plus élevé pour les plantules qui avaient été cultivées sur le milieu M1 additionné de saccharose (80%). Ce taux a également été important pour les plantules cultivées sur milieu avec sucre granulé (70%). Les plantes des milieux contenant le mannitol et le sorbitol ont montré des taux de reprise faibles respectivement 20% et 25%.

Tableau 5 : l'effet de la nature des sucres sur le développement des plantules

Milieu	Longueur des feuilles	Nombre de racine	Longueur des racines	Taux de chlorophylle
Sucre granulé	10,8±1,11b	2,4±0,52a	3,5±1,00a	6,78±3,61b
Saccharose	13,6±1,47a	3,2±1,55a	3,85±0,91a	10,04±5,48a
Mannitol	9,65±1,86b	2,1±0,99a	2,85±0,67a	2,16±0,69c
Sorbitol	10,8±1,11b	2,2±0,63a	2,95±1,62a	2,96±0,99c

Discussion

Les régulateurs de croissances sont impliqués dans la morphogenèse en culture *in vitro*. Dans ce travail, nous avons constaté qu'une balance en faveur des cytokinines favorise l'allongement alors que celle en faveur des auxines entraine l'enracinement. La présence de la kinétine toute seule dans le milieu de culture a été plus prompte à l'allongement des feuilles mais sans néoformation nouvelle de feuilles. L'ANA seule ou combiné avec l'AIB a permis une bonne émission racinaire. Ces résultats sont supportés par les travaux de Mazri et Meziani (2013) qui en utilisant des plantules de cv. Najda ont montré que la longueur des feuilles augmente avec l'augmentation de la concentration en kinetine. Les plus longues feuille ont été observé sur milieu contenant 1mg/L d'ANOA et 1mg/L de KIN avec une valeur de 15,1cm. De leur côté, Khan et Bi Bi,(2012) ont recommandé une combinaison de 0,5 mg/L de BAP et 0,5 mg / L KIN pour le cultivar Dhakki. Par contre, Le travail de Jaiti (1993) sur la multiplication des souches de palmier dattier cv Boufeggous et cv Bouskri, a montré que le milieu sans hormones présente l'allongement le plus important.

Selon Othmani *et al.* (2009), des plantules ont été allongées et enracinées avec succès sur le milieu MS contenant 0,1 mg / L de ANA sans BAP. La capacité d'enracinement est détériorée quand une concentration de 0,1 mg / L de BAP a été inclus dans le milieu, et il y avait une diminution prononcée de la formation de racines sur milieu MS dépourvu de régulateurs de croissance. Alors que Al Kaabi et al. (2001) ont rapporté que les milieux sans hormones étaient très bénéfiques lors de la phase d'élongation.

Les travaux de Khierallah et Bader (2007) ont rapporté que l'addition de 0,5 mg / L de l'ANA a donné les meilleurs résultats pour l'enracinement (longueur moyenne des racines : 5,4 cm), et que l'augmentation de la concentration de l'auxine n'a pas entraîné de racines courtes. Toutefois, El-Hammadi (1999) a signalé que la longueur moyenne des racines diminue avec l'augmentation des concentrations d'auxine. Ces résultats contradictoires pourraient refléter l'implication du génotype dans la réponse des plantes aux régulateurs de croissance. Dans notre cas les régulateurs de croissance n'ont pas montré un effet significatif sur la longueur des racines

Un milieu sans hormone s'est révélé plus efficace pour l'obtention de plantes présentant une bonne teneur en chlorophylle et un collet fermé (plus vigoureuse). Ces résultats sont en accord avec ceux de Mazri et Meziani (2013) qui ont montrés que les plantules de la variété Najda cultivées sur des milieux sans hormones ont des feuilles plus larges et plus vertes que

ceux cultivés sur des milieux contenant des régulateurs de croissance. Par contre, notre résultat n'a pas été conforme à celui de Sidky *et al.* (2007), qui ont déclaré que des plantules cultivées sur le milieu MS/2 contenant 0,1 mg / L d'ANA étaient plus vigoureuses que celles obtenues sur les milieux sans hormones.

Les plantules cultivées pendant la phase d'élongation sur un milieu sans hormones ont donné une fois transférées en serre pour l'acclimatation un très bon taux de survie (70%). Selon Picoli *et al.* (2001), l'échec de survivre dans la serre est principalement due à un mauvais fonctionnement des feuilles, et non pas des racines. Ceci est en accord avec nos résultats, puisque le taux de survie était plus élevé chez les plantules ayant des feuilles de bonne qualité avec une concentration en chlorophylles élevée, et plus faible chez les plantules avec des feuilles rabougries, même si elles avaient un bon système racinaire. Sane et al. (2006) ont rapporté que la transition des plantules dans un milieu dépourvu d'hormone conduit à la formation de racines ramifiées qui aboutissent à une faible survie après le transfert en serre. Othmani *et al.* (2009 a, b) ont rapporté que les plantules mises en culture sur un milieu MS/2 liquide contenant 1 mg / L-3 indole-butyrique (AIB) juste avant l'acclimatation ont abouti à un taux de survie de 80% pour les plantules de cv. Deglet Nour, et 60% pour celles de Boufeggous.

Sane et al. (2006) ont rapporté que la transition des plantules dans un milieu dépourvu d'hormone conduit à la formation de racines ramifiées qui aboutissent à une faible survie après le transfert en serre. Selon Picoli et al. (2001), l'échec de survivre dans la serre est principalement due à un mauvais fonctionnement des feuilles, et non pas des racines. Ceci est en accord avec nos résultats, puisque le taux de survie était plus élevé chez les plantules ayant des feuilles de bonne qualité avec une concentration de chlorophylle élevé, et plus faible chez les plantules avec des feuilles rabougries, même si elles avaient un bon système racinaire. Othmani et al. (2009a, b) ont rapporté que les plantules en culture dans MS liquides / 2 milieu contenant 1 mg / L-3 indole-butyrique (AIB) juste avant l'acclimatation ont abouti à un taux de survie de 80% pour les plantules de cv. Deglet Nour, et 60% pour ceux de Boufeggous.

La nature des sucres a eu un effet significatif sur la qualité des plantes obtenues en phase d'élongation et par conséquent a influencé le taux de survie des plantes en phase d'acclimatation.

Rapport-Gratuit.com

Le saccharose donne les meilleurs résultats ; il s'est avéré satisfaisant pour le développement des plantules. L'allongement des feuilles est important (13,6cm), le taux de chlorophylle est élevé (10,04 CCI) et le pourcentage des plantules avec le collet fermé est élevé (90%). La longueur et le nombre des racines ne sont pas influencée par la variation de la nature de sucre. L'utilisation du sucre commercial comme source carbonée a donné des résultats satisfaisant mais avec un taux de chlorophylle faible (6,78CCI). Le mannitol et le sorbitol se sont avérés inefficace pour l'allongement et le verdissement des feuilles. Le jaunissement des feuilles est plus accentué avec le mannitol (2,1 CCI) et les feuilles sont en général petites (9,6 cm).

Nos résultats sont en accord avec les travaux Coffin *et al* (1976), et Pua *et al* (1985) sur le Chêne-liège, qui ont montré que le saccharose s'est avéré la source de carbone la plus favorable pour un débourrement optimum des bourgeons de *Quercus Suber*. Gruselle a montré en 1994 que le glucose est meilleur que le saccharose lors de la multiplication des bourgeons de *Quercus robur*. Il en est de même chez l'espèce de bananier (Rukundo, 2012)

Bien que le sorbitol soit prouvé être une meilleure source d'énergie pour différents génotypes de Pommiers (Coffin, 1976), il s'est montré inhibiteur pour le développement des plantules du palmier dattier

Par ailleurs, des études comparant les effets des différents sucres sur la croissance des explants *in vitro* ont montré que le saccharose a les effets positifs les plus élevés. Cette découverte a abouti à sa large utilisation dans la culture tissulaire en tant que source de carbone (Petersen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999;.Fuentes *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2001;. Liu *et al.*, 2006). Les effets positifs du saccharose sur la croissance des explants *in vitro* sont liés à son rôle activateur, à sa forte solubilité dans l'eau, sa neutralité électrique et l'absence d'effet inhibiteur sur la majorité des processus biochimiques (Smith, 1995).
Les résultats de notre étude sont en corrélation avec ces conclusions précédentes où le saccharose a montré les meilleurs résultats de croissance par rapport aux autres traitements. Il a également été noté que l'utilisation de sucre granulé de laboratoire a entraîné des résultats assez importants. Cette différence entre le saccharose et le sucre granulé de laboratoire peut être associée à la qualité de ces sucres. Selon l'indication du récipient, la pureté du saccharose était de 85%. Cette pureté est plus élevée que celle du sucre granulé

De plus, il a été révélé que la capacité à métaboliser les différents types d'hydrates de carbone diffère dans le règne végétal et la réponse des cultures de plantules à différents traitements de sucre semble dépendre du génotype (Cuenca et Vieitez, 2000). Il a également été suggéré que les effets négatifs de certains sucres sur la croissance des plantes sont causés par l'inefficacité de leur métabolisme par les cellules de ces cultures. Cette incapacité à utiliser tout type de sucre par les plantules *in vitro* pourrait être due soit à son absorption réduite ou à l'absence ou l'insuffisante de l'activité de dégradation d'enzymes dans ces espèces (Jain *et al.*, 1997) Ces explications pourraient être les principales causes de la faible croissance de nos plantules cultivées sur les milieux de culture avec du mannitol et du sorbitol .

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Conclusion

En conclusion, le présent travail a mis en évidence le rôle des balances hormonales et de la nature des sucres dans l'amélioration de la phase d'élongation et d'acclimatation des plantules de cv Mejhoul et a fourni une méthode pratique pour la production de plantules de ce cultivar en voie de disparition.

Nos résultats indiquent que le milieu M1 sans hormones additionné de saccharose est le meilleur milieu pour la phase d'élongation, étant donné que les plantules produites sur ce milieu ont montré le meilleur taux de survie lors de l'acclimatation (80%). Les résultats actuels pourraient aider à réduire les phénomènes indésirables pendant la phase d'élongation et d'acclimatation et peuvent être utile pour produire un grand nombre de plantes. Ils peuvent être généralisés aux autres variétés du palmier dattier étant donné que la variété Mejhoul est considérée comme la plus récalcitrante aux techniques de multiplication *in vitro*.

Comme deuxième perspective à ce travail on propose de faire une étude économique en comparant le sucre commercial granulé et le saccharose afin d'opter pour le sucre qui procure le gain à l'échelle des laboratoires de production de vitroplants du palmier dattier.

Références bibliographiques

Abahmane.L 2013. Recent achievements in date palm (Phoenix dactylifra L.) micropropagation from inflorescence tissues. In : Emir.J.Food Agric 2013.25(11) :863-874

Abahmane, L.2011a. Date palm micropropagation via organogenisis. In : S.M. Jain, J.M.Al-Khayri and D.V. Johnson (Eds), pp.69-90. Date Palm Biotechnology, Springer, Dordrecht

Akaneme, Florence Ifeoma and Eneobong, Effiom Eneobong. 2008Tissue culture in Pinus caribaea Mor. var. Hondurensis barr. and golf. II: Effects of two auxins and two cytokinins on callus growth habits and subsequent organogenesis.African Journal of Biotechnology Vol. 7 (6), pp. 757-765, 18 March 2008

Aissam F, 1990. Observation histologique sur l'organogenèse et le développement des bourgeons du palmier dattier (Phoenix dactylifera L.) en culture « in vitro », thèse de 3ème cycle, Université Cadi Ayyad Marrakech, Maroc, 99pp.

Aissam F. 1993, Thèse de 3 e cycle, Université Cadi Ayyad, Faculté des SciencesSemlalia, Marrakech-Maroc : 109 p.

Al Kaabi H, Rhiss A, Hassan MA., 2001 Effect of auxins and cytokinins on the in vitro production of date palm bud generative tissues and on the number of differentiated buds. Proceedings second international conference on date palm Al Ain, UAE, pp 47–86

Attfield, E.M.Evans, P.K. 1991. Stage in the initiation of root and shoot organogenesis in cultured leaf explants of Nicotians tobacum cv Xanthi nc. J. exp Botany, vol.4é N°234, pp° 59-63

Baaziz, M. 1989. The activity and preliminary characterisation of peroxidases in leaves of cultivars of date palm, Phoenix dactylifera L. New Phytol. 1989; 111: 403-411.

Bates, S., Preece , J.E, Nayarrete , N.E., Vansambrek, W and Gaffney, R.R. 1992. Thidiazuron stimulats shoot organogenesis and s.31:21-29omatic embryogenesis in white ash (fraxinus americana L.) Plant cell tissue and organ culture).

Belaizi (M.), Boxus (P.) - In vitro shoot multiplication of cork oak (Quercus suber L.). Influence of different carbohydrates. - Bull. Rech. Agron. Gembloux, 1995, 30(1-2), 39-46

Boxus *et al.*, 1995**.**Rôle de la culture in vitro dans la conservation du matériel génétique sur un espace réduit.BV 93, Ed Cned. Aupelf- Uref. 191p.

Coffin (R.), Taper (C.D.), Chong (C.) - Sorbitol and sucrose as carbon source for callus culture of some species of the Rosaceae. - Can. J. Bot., 1976, 54(7), 547-551 Daikh H & Dermarl, 1987 Résultats préliminaires sur l'obtention d'embryons somatiques et la réalisation de semences artificielles de palmier dattier. Fruits. 42: 593-596.

Cuenca, B. & Vieitez, A., 2000. Influence of carbon source on shoot multiplication and adventitious bud regeneration in in vitro beech cultures. Plant growth regulation, 32 (1), pp.1-12.

Drira, N. **and A. Benbadis,** 1985.Végétative multiplication of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by reversion of *in vitro* cultured female flower buds. J. Plant Physiol., 119: 227-235.

El Bellaj M 2000**.**Etude de quelques paramètres Biochimiques en relation avec l'acquisition des potentialités embryogenèse et la maturation des embryons somatiques chez le Palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.). Thèse de Doctorat, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia-Marrakech.

El Hadrami I 1995. L'embryogenèse somatique chez *Phœnix dactylifera* L. : quelques facteurs limitant et marqueurs biochimiques. Thèse de Doctorat, Université Cadi Ayyad, Facultédes Sciences-Semlalia, Marrakech. 227 p.

EL Hadrami I 1998. Patrimoine génétique et techniques de propagation in vitro pour le développement de la culture de palmier dattier. Sécheresse, 9 (2): 139-146.

El–Hammady AA 1999 Regeneration of date palm "Sewy" cv. plantlets by somatic embryogenesis through callus with reference to the genetic stability. Proceedings international conference on date palm, Assiut, Egypt, pp 117–131

El Gharras, H. 2009**.** "Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review." *International Journal of Food Science and Technology* 44(12): 2512-2518.

El Kbiach, M. L. (1), A. Lamarti (1), A. Abdali (1), A. Badoc 2002 Culture in vitro des bourgeons axillairs de chêne-liège (*Quercus Suber L*.) Bull. Soc. Pharm.Bordeaux, 2002, 141, 105-116

Fernandez D, *et al.*, 1995. Le Bayoud du palmier dattier, une maladie qui menace la phoéniciculture, phytoma, la défense des végétaux, 469 :36-39.

Ferry M., 2008. Intérêts, limites et perspectives de la multiplication in vitro du dattier pour le développement de cette culture. Actes du 3ème Séminaire du réseau AUF-BIOVEG «Biotechnologies du palmier dattier », Montpellier (France), 18-20 novembre 2008. Éditrice scientifique : Frédérique Aberlenc-Bertossi. IRD ÉditionsCollection Colloques et séminaires Paris, 2010.

John F.Seelye, Garry K. Burge , and Ed R.Morgan. Acclimatizing tissue culture plants : Reducing the shock. Combined Proceedings International Plant Propagators'Society , Volume 53, 2003

Fki L., R. Masmoudi, W .Kriaa, A. Mahjoub, A.B. Sghaier, R. Mzid, A. Mliki, A.Rival and N. Drira. 2011 Dat palm micropropagation via somatic embryogenesis. In : S. M.Jain, J.M.Al-Khayri and D.V.Johnson (Eds.) pp. 47-68.Date Palm biotechnology, Springer, Dordrecht.

Fki L, Masmoudi R, Drira N & A. Rival.2003. An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, Phoenix dactylifera L., cv. Deglet Nour. Plant Cell Rep., 21: 517-524.

Fuentes, S. R. L., C Alheiros, M. B. P., Manetti-Filho, J. & Vieira, L. G. E., 2000. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in Coffea canephora. Plant cell, tissue and organ culture, 60 (1), pp.5-13.

Ghorbel A., Chatibi A., Kchouk M.L., 1998. Maîtrise des aléas de la production in vitro et à grande échelle du pêcher-amandier GF-557. X GREMPA Seminar. Zaragoza : CIHEAM, 1998. p.139-150 (Cahiers Options Méditerranéennes ; n. 33).

Gruselle (R.) - Influence of different carbon sources on in vitro multiplication of Quercus robur L. - In COST 87. Woody Plant Group, 1994

Haddouchi M., 1995**.**Situation actuelle et perspectives de développement du Palmier dattier au Maroc. Proceeding ''Journées Internationales sur Le Palmier dattier dans l'agriculture d'oasis des pays méditerranéens". *Options médit*. N° 28.63-79. Elche, Espagne, 25-27 Avril 1995

Jain, R., Davey, M., Cocking, E. & Wu, R., 1997. Carbohydrate and osmotic requirements for high-frequency plant regeneration from protoplastderived colonies of indica and japonica rice varieties. Journal of experimental botany, 48 (3), pp.751.

Jaiti F 2008.Interaction Palmier dattier-Fusarium oxysporum albedinis : Elicitation et études des mécanismes de défense. Thèse de Doc. Universite Cadi Ayyad Faculté des Sciences Semlalia-Marrakech

Khan S, Bi Bi T.,2012 Direct shoot regeneration system for date palm (PhœnixdactyliferaL.) cv. Dhakki as a means of micropropagation. Pak J Bot 44:1965–1971

Khierallah HSM, Bader SM., 2007 Micropropagation of date palm (Phoenix dactylifera L.) var. Mektoom through direct organogenesis. Acta Hort 736:213–224

Kozai (T.)1991 - Micropropagation under photoautotrophic conditions. - In Debergh (P.C.), Zimmerman (R.H.) Micropropagation Technology and Application. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1991, p 447-469.

Loutfi K 1999**.**Organogenesis et embryogenèse somatique à partir des tissus floraux du Palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.) cultivés *in vitro*. Aspects histologiques et caryologie des vitroplants. Thèse de Doctorat, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia-Marrakech.

Liu, T. H. A., Lin, J. J. & Wu, R. Y., 2006. The effects of using trehalose as a carbon source on the proliferation of Phalaenopsis and Doritaenopsis protocorm-like-bodies. Plant cell, tissue and organ culture, 86 (1), pp.125129.

Mazri MA,Meziani R 2013 An improved method for micropropagation and regeneration of date palm (Phœnix dactyliferaL.). J Plant Biochem Biotechnol 22:176–184

Messar E.M. 1996 Le secteur phoenicicole algérien : Situation et perspectives à l'horizon 2010. Options Méditerranéennes A 28,23-44.

Mello, M. O., Dias, C. T. S., Amaral, A. F. C. & Melo, M., 2001. Growth of Bauhinia forficata Link, Curcuma zedoaria Roscoe and Phaseolus vulgaris L. cell suspension cultures with carbon sources. Scientia Agricola, 58 (3), pp.481-485. 7.

Munier, 1973**.**Le palmier dattier. Paris : Ed. Maison-neuve et Larose, 217p

Murashige T & Skoog F 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497

Othmani A, Bayoudh C, Drira N, Marrakchi M, Trifi M 2009 Regeneration and molecular analysis of date palm (Phoenix dactylifera L.) plantlets using RAPD markers. Afr J Biotechnol 8 (5):813–820

Pereau-Leroy 1958 Le palmier dattier au Maroc. Ministère de l'Agriculture, Service de la Recherche Agronomique, Maroc et Institut Français de Recherches Fruitière Outre-Mer)

Petersen, K. K., Hansan, J. & Krogstrup, P., 1999. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of Miscanthus x ogiformis HondaGiganteus'. Plant cell, tissue and organ culture, 58 (3), pp.189-197. 8.

Picoli EA, Otoni WC, Figueira ML, Carolino SM, Almeida RS, Silva EA, Carvalho CR, Fontes EP 2001 Hyperhydricity in vitro egg plant regenerated plants : structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). Plant Sci 160(5):857–868

Poulain C, Rhiss A & Beauchesne G 1979**.**Végétative propagation of date palm by in vitro

Rhouma, 1996. Le palmier dattier en Tunisie : un secteur en plein expansion. Options Méditerranéennes A 28, 85-104.

Romano (A.), Noronha (C.), Martins-Loução (M.A.) - Influence of growth regulators on shoot proliferation in Quercus suber L. - Ann. Bot. (London), 1992, 70(6), 531-536. Saidi. F, H.S. Cherif, H. Metidji, A. Rouibia, C. Chaouiaet al ., nr. 3-4 (71-72)/2009.

Rukundo Placide, 2012. Comparative study of effects of table sugar, laboratory grade sucrose and mannitol on growth of banana plantlets under in vitro conditions. Rwanda Journal.Volume 28, Series E, 2012 : Agricultural Sciences

Sane D, Aberlenc-Bertossi F, Gassama-Dia Y, Sagna M, Trouslot M, Duval Y, Borgel A (2006) Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (Phoenix dactylifera L.). Ann Bot 98:301–308

Schopfer,P *et al.*2002**.** Evidence that hydroxyl radical mediate auxin-induced extension growth.Planta 214,821-828.

Sedra M.H. 2003. Le palmier dattier, base de la mise en valeur des oasis du Maroc. Techniques phoénicicol et création d'oasis. Editions INRA (Rabat, Maroc). 265 p.

Sidky RA, Zaid ZE, El-Bana A (2007) Optimized protocol for in vitro rooting of date palm (Phoenix dactylifera L.). Proceedings fourth international symposium on date palm, King Faisal University, Al Hassa, Saudi Arabia, pp 454–46

Smith, C., 1995. Carbohydrate chemistry. LEA, PJ; LEEGOOD, RC Plant biochemistry and molecular biology. Chichester : John Wiley & Sons, pp.73111.

Timir L. Baran Jha, Tapojita Samaddar, Sayantani Nath and Anusree Das. 2014

Direct Organogenesis and Genetic Characterization of Solanum pseudocapsicum L. in vitro

Regenerated.Plant Tissue Cult. & Biotech. 24(1) : 65-76, 2014 (June)

Touraine C1992. Inhibition de l'oxygène singulet et de l'anion superoxyde par les flavonoïdes. Etude structure activité. Thèse de doctorat, Université de toulouse.

Wainwright (H.), Scrace (J.) - Influence of in vitro preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on in vivo establishment. - Scientia Hortic. (Amsterdam), 1989, 38(3-4), 261-267

Walker D.R .et Parrot A.W., 2001**.** Effect of polyethylene gycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. Plant Cell Tissue and organ Culture 64: 55 – 62

Yang Mingjia , Xiangming Xie, Xiaoqing He & Fangqiu Zhang.2006. Plant regeneration from phyllode explants of Acacia crassicarpa via organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2006 85 : 241-245

Zouine J, 2007**.** Embryogenèse somatique chez Phoenix dactylifera L.: Amélioration des conditions de culture et étude de paramètres biochimiques impliqués dans la multiplication, la maturation et la germination des embryons somatiques.Thèse de Doctorat, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences-Semlalia, Marrakech.

Zryd J.P., 1988 **:** Culture de cellules, tissus et organes végétaux .Ed .Press.Polytechniques Romandes Suisse 308p