

EFFET DE CERTAINS EQUILIBRES HORMONAUX SUR L'ENRACINEMENT PRECOCE DES TISSUS DU PALMIER DATTIER (*Phoenix dactylifera/ L.*)

ANJARNE, M., * ZAID, A.,**

ملخص

يعتبر التجدير المبكر عند انسجة النخيل المزروعة داخل الانابيب الزجاجية من المشاكل التي تعرقل ظهور البرعم واكثارها. ولتفادي هذا الشكل زرعت الاجزاء السفلى للاوراق الباطنية المستاصلة من قلب فسائل صنف بوسكري في ثمان أوساط غذائية تختلف من حيث تكوينها الهرموني. وقد اثبتت التجارب الأولى من هذا البحث أن الأوساط الغنية بالاوكسينات، وخصوصا حامض النفطلين الستيك تعمل على ظهور جذور تنمو بسرعة كبيرة بعد نقل الانسجة الى وسط آخر يحتوي على كمية قليلة من الاوكسينات. كما لوحظ أيضا عدم تكوين أعضاء جديدة في الأوساط التي تفتقر الى الاوكسينات.

* Laboratoire de Physiologie Végétale . Centre Régional du Haouz Pré-Sahara Institut National de la Recherche Agronomique . B. P. 533, Marrakech MAROC.

** Laboratoire de Physiologie Végétale Département de Biologie. Faculté des Sciences - Semlalia . B.P. 5115, Marrakech - MAROC -

RESUME

L'enracinement précoce des tissus du palmier dattier affecte la multiplication des souches et engendre parfois l'inhibition totale de l'initiation des bourgeons .

Pour pallier à ce problème, des bases de jeunes feuilles de coeurs de rejets de la variété BOUSKRI ont été cultivées sur huit milieux de culture de différents équilibres hormonaux . Cette première partie de l'étude nous a permis de noter que les milieux riches en auxines, surtout en ANA, favorisent l'initiation des racines dont la croissance a été stimulée en présence de concentrations en auxines relativement plus faibles . Aussi une inhibition de l'organogénèse a été notée sur les milieux pauvres en auxines .

MOTS CLÉS : Palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L., culture de tissus, organogénèse, enracinement, régulateurs de croissance .

ABSTRACT

Early rooting of date palm tissues reduce bud multiplication and is, occasionally, responsible for the inhibition of bud initiation .

In order to solve this problem, the bottom of young leaves of date palm offshoots were cultured on eight nutrient media with different levels of growth regulators . Preliminary results show that high level of auxins, especially ANA, allowed root initiation . These roots had showed a rapid growth after subculturing on a medium containing a lower level of auxins . Furthermore, Organogenesis was inhibited on media with a low concentration of auxins .

KEY WORDS : Date palm, *Phoenix dactylifera* L., tissue culture, organogenesis, rooting, growth regulators .

INTRODUCTION

La multiplication *in vitro* du palmier dattier a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche . Les plus intéressants, en dehors de l'embryogenèse somatique , concernent la régénération directe de bourgeons à partir de la base de jeunes feuilles de coeurs de rejets (RHISS et al., 1979 ; BÉAUCHESNE et al., 1986 ; ZAID , 1986) , la prolifération de bourgeons axillaires (DRIRA, 1983 ; BOUGUEDOURA et al., 1990) et la culture des explants inflorescentiels (DRIRA et BENBADIS, 1985 ; LOUTFI . 1989) .

Au laboratoire de physiologie végétale (INRA. Marrakech) , la régénération directe de bourgeons à partir de bases de jeunes feuilles du coeur de rejet (organogenèse) nous a permis de produire des milliers de plants de différentes variétés et clones de palmier dattier . Cependant, la maîtrise de cette technique pour son application à grande échelle reste entravée par certaines contraintes dont les principales sont :

- Un faible rendement de l'initiation des bourgeons .
- Le brunissement des cultures.
- L'enracinement précoce des tissus .
- La vitrification des tissus .
- Les contaminations bactériennes endogènes .

L'objet de ce travail est de contribuer à l'étude de l'un des problèmes cités ci dessus à savoir l'enracinement précoce des tissus du palmier dattier qui consiste en une émission précoce de racines pendant l'initiation et la multiplication de pousses . Ces racines une fois initiées engendrent un taux de multiplication très faible parfois même une inhibition totale de l'initiation des bourgeons . Afin de mieux connaître les origines de ce problème et de rechercher les approches nécessaire pour le surmonter, nous présentons ci-dessous certains facteurs de la rhizogenèse .

La rhizogenèse, dépendante de plusieurs facteurs, est principalement stimulée par des intensités lumineuses élevées, des concentrations faibles en minéraux, certains produits phénoliques et un rapport SUCRE/AZOTE élevé (GEORGE et SUERRINGTON, 1984) . D'autres produits tels que l'adénine, la riboflavine, et les gibbérellines, incorporés dans le milieu de culture, ont été rapportés comme inhibiteurs de l'initiation et/ou de la croissance des racines (GEORGE et SHERRINGTON, 1984 ; MARGARA, 1989) . Toutefois, ce sont les régulateurs de croissance qui ont l'effet le plus déterminant . En effet, des rapports AUXINE/CYTOKINE élevés favorisent l'enracinement (SKOOG, 1971) .

Chez le palmier dattier, l'initiation des méristèmes racinaires est favorisée par un apport d'auxines exogènes à des concentrations élevées (EEUWENS, 1978), tandis que la croissance ultérieure de ces racines est stimulée par des concentrations relativement plus faibles (EEUWENS et BLAKE, 1977 ; ZAID et TISSERAT, 1983) . D'après ces auteurs, l'ANA à des concentrations de l'ordre de 0,1mg/l permet le meilleur développement des racines .

Par ailleurs, LOUTFI (1989) a noté que des tissus issus des inflorescences développées ont plus tendance à donner des racines que ceux des inflorescences plus jeunes .

MATERIELS ET METHODES

L'enracinement précoce des tissus affecte des variétés et clones tels que DEGLET NOUR , le clone 3004, BOUSKRI, TADMENT, le clone I et le clone 3228b . Il semble que les milieux de culture utilisés au laboratoire, plus riches en auxines qu'en cytokinines, sont à la base de ce phénomène . L'objet de cette étude est de mettre au point un équilibre hormonal qui inhibe l'émission précoce de racines sans affecter l'initiation et la multiplication des souches .

Matériel végétal

Des rejets de 2 à 6kg prélevés sur la variété BOUSKRI ont été effeuillés progressivement pour aboutir au coeur du rejet constitué du méristème apical entouré de nombreuses jeunes feuilles .

Désinfestation

Les coeurs de rejets ont été désinfestés par deux trempages successifs de 20 minutes chacun : une solution fongicide contenant le Mancozan à 2g/l et une deuxième solution de l'hypochlorite de sodium (12°) additionnée de 300 mg/l de permanganate de potassium .

Mise en culture

Après une dissection en conditions aseptiques, les fragments de base de jeunes feuilles du coeur du rejet ont été mis en culture sur un milieu de base contenant les sels minéraux de MURASHIGE et SKOOG (1962) et, en mg/l, Thiamine-Hcl, 10 ; Acide nicotinique, 1 ; Pyridoxine-Hcl, 0,1 ; Biotine, ; 0,01 ; Glutamine, 200 ; Adénine, 40 ; Mio-inositol, 100 ; Polyvinyl pyrrolidone, 2000; Saccharose, 30000 et l'agar 7000. Les régulateurs de croissance utilisés varient selon les essais ci dessous :

étude de l'effet de la nature des auxines sur le comportement des tissus mis en culture

Afin d'étudier l'effet des milieux polyauxiniques et monoauxiniques sur le comportement morphogénique des tissus mis en culture, quatre milieux, dont les compositions en régulateurs de croissance sont rapportées dans le tableau I, ont été étudiés . Le milieu M1 sur lequel le problème d'enracinement précoce se pose avec acuité, sera utilisé comme témoin .

études de l'effet de la concentration totale des auxines sur le comportement des tissus mis en culture

Etant donné que des rapports AUXINE/CYTOKININE très élevés favorisent l'initiation des racines qui gênent à la multiplication des bourgeons chez les

tissus du palmier dattier mis en culture, quatre milieux de culture contenant différentes concentrations totales en auxines et dont les équilibres hormonaux sont précisés dans le tableau II, ont été essayés .

étude du comportement des tissus sur le milieu de multiplication

Après le cinquième repiquage sur les milieux d'initiation, toutes les cultures ont été transférées sur un même milieu de multiplication pauvre en auxines (AUXINE/CYTOKININE de 1,6 au lieu de 30 à 40 utilisés pour l'initiation des bourgeons) . Elles ont été incubées en lumière et sous une température de $27 \pm 2^\circ$ C avant d'être observées après deux mois .

Conditions de culture

Les cultures ont été incubées pendant les trois premiers mois en obscurité et sous une température de $27 \pm 2^\circ$ C. Elles sont par la suite transférées sous une lumière de 1500 à 2000 lux.

Observations réalisées

Pour les deux premiers essais, chaque traitement a fait l'objet de trois répétitions dont chacune correspond à l'ensemencement d'un rejet par milieu de culture . Les pourcentages de cultures qui présentent l'émission de racines, le développement de bourgeons axillaires , la formation de cals hyperhydriques, ou le brunissement des tissus ont été relevés lors du cinquième repiquage (6 mois après le premiers ensemencement) . Des observations qualitatives sur la croissance et la vitrification des tissus ont été aussi faites .

RESULTATS

Effet de la nature des auxines sur le comportement des tissus mis en culture

Les résultats de l'effet de différents milieux de culture sur le comportement morphogénique des tissus sont indiqués dans le tableau III .

L'apparition des racines a été particulièrement notée sur les milieux témoin (M1) et M3 dont les taux ont été respectivement de 18% et 13% . Les milieux M2 et M4 n'ont cependant pas favorisé l'enracinement . Ces racines ont, toutefois, présenté une croissance très faible ; en effet, elles dépassent rarement 1cm de long (figure 1) .

De même, la production de cals hyperhydriques très sensibles au brunissement a été plus importante sur les milieux M3 et M1 dont les pourcentages de cultures ayant donné ce type de cal ont été respectivement de 17,3 et 15,6% . Les autres milieux n'ont montré qu'un pourcentage de 12,5% (Tableau III) . Ces cals, en dégénérescence, sont éliminés lors des repiquages .

Tableau I : Etude de l'effet de la nature des auxines sur le comportement des tissus mis en culture .

Milieux	M1*	M2	M3	M4
NOA (mg /l)	3	3	3	3
AIA "	1	1	0	0
ANA "	1	0	1	0
IPA "	0,1	0,1	0,1	0,1
* AUX / CYTOK	50	40	40	30

* : M1 = Milieu témoin

NOA : Acide Naphtoxyacétique

ANA : Acide Naphtalèneacétique

AUX / CYTOK = AUXINE / CYTOKININE

AIA : Acide Indolacétique

IPA : 6 (dimethylallylamio) purine

Tableau II : Etude de l'effet de la concentration totale en auxine sur le comportement de tissus .

Milieux	M1*	M5	M6	M7
Auxines totales(mg/l)	5	3	1	0,1
NOA (mg /l)	3	1,8	0,6	0,06
ANA "	1	0,6	0,2	0,02
AIA "	1	0,6	0,2	0,02
IPA "	0,1	0,1	0,1	0,1
AUX / CYTOK*	50	30	10	1

* : M1 = milieu témoin

AUX / CYTOK = AUXINE / CYTOKININE

Tableau III : Effet de la nature des auxines sur le comportement des tissus mis en culture .

Milieux	M1	M2	M3	M4
Nombre de cultures " saines "	32	17	23	26
% de cultures avec racines	18	0	13	0
% de cultures avec cal hyperhydrique	15,6	12,5	17,3	12,5
% de cultures avec bourgeons axillaires préexistants	6	11,7	4,3	20,8
% de cultures brunies	22,7	41	21,7	46
% de cultures avec néoformation de bourgeons	9 %	0	0	0

Par contre, le développement de bourgeons axillaires pré-existants, a été plus favorisé sur le milieu M4 avec un pourcentage de 20,8% ; suivi de M2, M1 et M3 dont les pourcentages de cultures avec développement de tels bourgeons ont été respectivement de 11,7%, 6% et 4,3% (Tableau III) . Ces bourgeons, peu sensibles au brunissement, ont parfois dépassé 2 cm de long . Par contre, l'initiation de nouveaux bourgeons, moins fréquente sur tous les milieux, a été limitée au milieu témoin (M1) .

Le pourcentage de cultures brunies a été plus important sur les milieux M2 et M4 avec respectivement des taux de 41% et 46% . En effet, sur ces deux milieux, la croissance des tissus, très rapide pendant les deux premiers mois, a été réduite par la suite à cause d'un brunissement intense des cultures . Les milieux M1 et M3, moins sujets au brunissement, ont présenté une croissance plus stable .

Effet de la concentration totale en auxines sur le comportement des tissus mis en culture

Le tableau IV regroupe les résultats préliminaires relatifs à l'évolution et au comportement des tissus mis en culture sur les milieux M1, M5, M6 et M7. Ces résultats concernent les paramètres suivants :

- Enracinement précoce : l'émission des racines a eu lieu principalement sur le milieu témoin (M1) dont 40% des cultures ont donné des racines et sur le milieu M5 avec un taux de 9%. Par contre, les milieux M6 et M7 n'ont pas permis l'initiation des racines. Aussi, faut-il signaler que la croissance de ces racines a été très lente.

- Croissance des tissus : l'évolution de la croissance des tissus varie selon les milieux de culture. Une croissance relativement lente mais stable au cours des différents passages a été notée sur le milieu Témoin (M1). Par contre, sur les milieux M6 et M7 la croissance a été très rapide pendant les premiers passages pour chuter brutalement à partir du 2ème repiquage (Tableau IV).

De plus, sur ces deux milieux la croissance des tissus de la base des explants a été plus favorisée sur celle des ébauches foliaires.

- Formation du cal et développement des bourgeons axillaires : La formation du cal a été limitée aux milieux témoin (M1) et M5 dont les pourcentages de cultures ayant donné le cal hyperhydrique ont été respectivement de 10% et 6,8% (Tableau V). Par contre, les milieux M6 et M7 ont plus tendance à favoriser le développement des bourgeons axillaires. Des pourcentages de cultures avec développement de ces bourgeons ont été respectivement, sur les milieux M7, M6, M5 et M1 (témoin), de 17,5%, 13,3%, 6,8% et 3,3%. Ces bourgeons échappent au brunissement et émettent de nouvelles feuilles qui dépassent parfois 2 cm de long.

- Brunissement et vitrification des cultures : Les milieux M6 et M7 ont été très sujets au brunissement qui augmente surtout après le 2ème repiquage. En effet, après la chute de la croissance, les cultures brunissent malgré leur repiquage sur un milieu frais. Dans certains cas, le brunissement est précédé par une vitrification des tissus qui affecte particulièrement les explants qui ne présentent pas d'ébauches foliaires. Cette vitrification a été plus accentuée sur les milieux M7 et M6 que sur le milieu témoin (M1).

Comportement des tissus sur le milieu de multiplication

Après le transfert des cultures provenant des différents milieux d'initiation sur un même milieu de multiplication de bourgeons contenant trois auxines et trois cytokinines avec un rapport AUXINE/CYTOKININE de 1,6, nous avons noté ce qui suit :

- La croissance des racines devient très rapide. En effet, après un mois de culture, les racines dépassent 3cm de long alors qu'elles restaient bloquées au stade protubérance de 0,5 à 1cm de long sur les milieux d'initiation (Figure 1).

Tableau IV : Effet de la concentration totale en auxines sur le comportement des tissus mis en culture

Milieux	M1					M5					M6					M7					
Repiquages	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
Nbre cult. observées	17	17	17	27	30	22	19	22	24	29	16	17	19	30	30	26	28	28	28	32	40
% de cult. brunies	11	29	29	25	26	9	26	31	33	34	12,5	41	42	43	43	7,6	32	50	56	62	
Croissance de tissus	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	+++	++	-	-	-	+++	++	-	-	-	
Vitrification						+				++					++					++	
% cult. avec racines						40				9					0					0	
% cult. avec cal						10				6,8					0					0	
% cult. avec bgs axill.						3,3				6,8					13,3					17,5	

- : Croissance très faible
 ++ : Croissance moyenne

+ : Croissance faible
 +++ : Croissance rapide



Fig 1 : Effet de différentes concentrations en auxines sur la croissance des racines.

Légende : Croissance des racines :

- Sur le milieu d'initiation (à droite) .

- Sur le milieu de multiplication (à gauche) .



Fig 2 : Effet du milieu de multiplication sur la néoformation des feuilles et des bourgeons.

Légende : Néoformation de bourgeons (les 2 tubes gauche)

Production de feuilles vertes (droite) .

- Les tissus qui n'ont pas donné des racines ont produit soit des feuilles ou, dans 9% des cas, des bourgeons (Figure 2) . Cette initiation de bourgeons, malgré sa faible fréquence, nous a permis de produire des centaines de souches dont une partie a été livrée au Laboratoire du Domaine Royal de Oued Ouislan à Meknès pour la multiplication à grande échelle de la variété BOUSKRI .

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'enracinement précoce des tissus cultivés *in vitro* constitue une contrainte majeure à l'obtention et à la multiplication des bourgeons chez certaines variétés et clones du palmier dattier . La présente étude nous a permis de noter que cet enracinement a été très lié à la nature et à la concentration des auxines incorporées dans le milieu de culture .

En effet, les éliminations successives de différentes auxines du milieu de culture ont révélé que la présence de l'ANA semble nécessaire à l'émission des racines . Cette auxine a été notamment signalée comme stimulante de l'enracinement par plusieurs auteurs (TISSERAT, 1984 ; OMAR, 1988 ; ZAID et TISSERAT, 1983) .

Par ailleurs, l'utilisation de milieux contenant différentes concentrations totales en auxines avec les mêmes proportions que le milieu témoin (M1, M5, M6 et M7), a montré que la concentration totale en auxines du milieu doit dépasser un certain niveau pour qu'il y ait initiation des racines . En effet, seul les milieux contenant 3 à 5 mg/l d'auxines totale (M1 et M5) ont favorisé l'enracinement .

La croissance des racines a été toutefois très lente en présence de fortes concentrations en auxines ; et ce n'est qu'après passage sur des milieux de multiplication moins riches en auxines que les racines s'allongent .

Ces deux observations concordent avec les travaux de ZAID et TISSERAT (1983), MARGARA (1989) et EEUWENS et BLAKE (1977) qui ont rapporté que l'initiation des racines nécessite de fortes concentrations en auxines alors que leur croissance ultérieure est favorisée par des concentrations relativement plus faibles .

La formation du cal, plus importante sur les milieux riches en auxines (M1, M2, M3, M4 et M5), a diminué progressivement avec la diminution de la concentration en auxines . Dans ce cas aussi, il semble qu'un certain niveau d'auxines de 1 à 3 mg/l, au dessous duquel nous avons assisté à une simple croissance des tissus pré-existants (M6 et M7), est nécessaire pour la callogénèse. Ces cals, très sensibles au brunissement, finissent dans tous les cas par dégénérer .

La meilleure croissance des tissus a été obtenue sur les milieux pauvres en auxines (M7 et M6) ; toutefois, les cultures ont commencé à brunir à partir du deuxième repiquage . Cette rapidité de croissance pendant les deux premiers mois d'incubation peut-être expliquée par un niveau de régulateurs de croissance endogènes élevé chez les tissus mis en culture . Ces derniers ont brunis, après

épuisement de leurs réserves, à cause d'une insuffisance des régulateurs de croissance apportés par le milieu de culture . Cette hypothèse est soutenue par le faible niveau en auxines dans le milieu M13 (0,1 mg/l) d'une part et par le maintien plus prolongé des explants disposant de bourgeons axillaires qui produisent des auxines d'autre part .

De plus, il a été noté que les milieux pauvres en auxines ont plus tendance à favoriser la croissance des tissus de la base de l'explant que l'organogénèse (néoformation de feuilles, de bourgeons et de racines) .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BEAUCHESNE, G., A. ZAID and A. RHISS, 1986 . Rapid propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) through tissue culture Proceeding of the second symposium on date palm in saudi arabia .

BOUGUEDOURA, N., N.M. FERRIERE et J.L. BOMPAR, 1990 . Comportement *in vitro* de bourgeons axillaires du type indéterminé du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), J. Can. bot., 68(9) : 2004-09 .

DRIRA, N., 1983 . Multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par la culture *in vitro* de bourgeons axillaires et de feuilles qui en dérivent, C.R. Acad. Sc. Paris, Ser. III, 196, 1077-82 .

DRIRA, N et A. BENBADIS, 1985 . Multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par réversion en culture *in vitro*, d'ébauches florales de pieds femelles, J. Plants physio . 119 : 227-35 .

EEUWENS, C.J. and J. BLAKE, 1977 . Culture of coronut and date palm tissues with a view to vegetative propagation . Acta Hort., 78 : 277-86 .

EEUWENS, C.J., 1978 . Effet of organic nutriments and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date palm (*Phoenix dactylifera*) cultured *in vitro*, Physiol. Plant. 42 : 173-78 .

GEORGE, F.F. and P.D. SHERRINGTON, 1984, plant propagation by tissue culture : Handbook and directory of commercial laboratories, Edited by Exegetics Limited, Eastern Press, Redding, Berks England, 1984 .

LOUTFI, K., 1989, Multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) à partir de la culture *in vitro* d'explants inflorescentiels . Thèse de doctorat de 3ème cycle, fac. Sci. Marrakech, 120p .

MARGARA, J., 1989, Base de la multiplication végétative : Les méristèmes et l'organogenèse, INRA-PARIS, 262p.

MURASHIGE, T. and F. SKOOG, 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture, Physio plant, 15 : 473-79 .

OMAR, M., 1988 *in vitro* response of various date palm explants. Date palm journal 6 (2) : 371-88.

RHISS, A., C. POULAIN et G. BEAUCHESNE, 1979. la culture *in vitro* appliquée à la multiplication végétative du plamier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), Fruits, 34 (9) : 551-55.

SKOOG. F., 1971, Aspect of growth factor interactions on morphogenesis of tobacco tissue cultures, in : les cultures de tissus de plantes, Colloq. Int. C.N.R.S., Paris, N° 193 : 115-135.

TISSERAT, B., 1984. Propagation of date palm by shoot tip culture, HortScience, 19 (2) : 230-31.

ZAID, A., 1986. Rapid propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) through tissue culture (Abs 6). The second symposium on date palm, March 3-6, SAUDI ARABIA.

ZAID, A., and Tsserat, B. 1983, *in vitro* shoot tip differenciation in *Phoenix dactylifera* L., Date palm jour. , 2 (2) : 163-182.