

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش - الجزائر
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA d'El-Harrach)



Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences agronomiques

Thème

**Micropropagation en masse de quatre cultivars algériens de palmier dattier
(*Phoenix datylifera* L.) par embryogenèse somatique**

Présentée par :
BOUFIS Nazim

Devant le jury composé de :

Directeur de thèse :	Khélifi L.	Pr. ENSA-Alger.
Président :	Mefti M.	Pr. ENSA-Alger.
Examineur :	Amdoun R.	Dir. Rech. INRF-Alger.
Examineur :	Harfi B.	Dir. Rech. CRBT-Constantine.
Examineur :	Mahdid M.	Pr. ENS-Alger.

Soutenue publiquement le : 12 / 02 / 2023

A mes grands-parents,

A mon PAPA, à ma MAMAN,

A mon épouse HINDA et à mon fils MOHAMMED ALI,

A mon frère MEHDI, à son épouse HIBA et au petit ACYL.

Remerciements

Notre travail expérimental a été initié au niveau du Laboratoire de Ressources génétiques et biotechnologies (LRGB) à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique puis poursuivi au niveau du Laboratoire de culture *in vitro* de la Division Biotechnologies et Amélioration des Plantes (DBAP) à Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie.

Je suis heureux d'exprimer ici tout d'abord mes remerciements les plus sincères et ma profonde reconnaissance à tous ceux qui, de loin ou de près, m'ont aidé à réaliser ce travail et en particulier à:

- Monsieur Khélifi L., professeur à l'ENSA. d'avoir accepté de diriger ce travail. Les enseignements reçus, les conseils et les remarques qu'il m'a régulièrement prodigués tout au long de la phase expérimentale ont largement contribué à sa réalisation. Son intérêt et sa patience ainsi que ses orientations lors de la rédaction ont été pour moi de précieux encouragements. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de mes remerciements les plus sincères.
- Monsieur Mefti M., professeur à l'ENSA, qui me fait l'honneur de présider le jury de soutenance. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude et de ma grande reconnaissance.
- Monsieur Abdoun R., directeur de recherche à l'INRF. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance d'avoir accepté d'examiner ce travail.
- Monsieur Harfi B., directeur de recherche au CRBT. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ce travail.
- Monsieur Mahdid M., professeur à l'ENS. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent également à Madame Khélifi M., professeur à l'ENSA dont les conseils avisés et les encouragements ont été de précieuses aides durant toute la phase d'expérimentation. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance et à lui exprimer mes remerciements les plus sincères.

Je tiens aussi à remercier Monsieur Titouh K., attaché de recherche à l'INRA, pour sa collaboration à la publication d'articles ainsi qu'à son assistance fraternelle.

Ce travail doit beaucoup à la présence des personnels de soutien du département de phytotechnie de l'ENSA et de la DBAP de l'INRAA-Baraki qui n'ont pas épargné leurs efforts. Pour cette assistance, je me dois de leur exprimer toute ma reconnaissance et ma fierté de les avoir eu à mes côtés surtout dans ces moments de doute et d'interrogation que ce travail a généré.

De nombreux étudiants, de passage pour de courts stages ou pour la réalisation de leur projet de fin d'études à l'INRAA, ont contribué par leur curiosité et/ou leurs questions à ce que certaines de mes interrogations soient mieux précisées. C'est l'occasion de les remercier aussi au moment où ce travail s'achève.

Je tiens également à remercier mes collègues et ami(e)s de l'INRAA de la station expérimentale de Mehdi Boualem- Baraki : Chahineze, Hafida, Rabah, M^{me} Ramla et Said avec qui j'ai partagé

mes études et notamment ces longues années de thèse pour leur aide, leur disponibilité et leur assistance amicale durant toute cette période si particulière de ma vie.

Je ne peux terminer ces remerciements sans penser à mes amis : Hamza, Housseem, Meziane, Mustapha, Redouane et Zinou qui ont toujours cru en moi et qui ont été toujours là pour me remonter le moral quand il le fallait. Même s'il n'est pas possible d'exprimer, ici, tout ce que je leur dois durant toutes ces années, qu'ils sachent que l'amitié dont ils m'ont gratifié et leur soutien constant ont été pour moi d'un apport inestimable.

Abstract: Somatic embryogenesis of date palm is a powerful tool for the large-scale production of genetically identical and disease-free plants. The objective of this work is to suggest a scheme for the production of vitroplants *via* somatic embryogenesis. Established from (04) date palm cultivars, this scheme consists of four main steps: induction and multiplication of nodular callogenesis on solid and/or liquid media, initiation of somatic embryogenesis in agitated liquid medium and maturation of proembryos followed by germination on agar medium. The results show that the presence of concentrations ≥ 10 mg/L of 2,4-D combined with activated charcoal ≥ 150 mg/L promote the initiation and multiplication of nodular calli on the solid medium. An average multiplication factor of 6.3 is obtained in a liquid medium containing 1 mg/L of 2,4-D. In addition, the alternation of media (liquid/solid) in the presence of 1 mg/L of AS promotes embryogenesis initiation and improves the yield of somatic embryos as well as their germination.

Key words: Callogenesis, somatic embryos, alternation of liquid/solid culture media, *Phoenix dactylifera* L., cultivars, vitroplants.

ملخص: تعد تقنية توليد الأجنة الجسدية عند نخيل التمر أداة قوية لإنتاج على نطاق واسع لنباتات متوافقة وراثيًا وخالية من الأمراض. الهدف من هذا العمل هو اقتراح مخطط لإنتاج غرسات مخبرية عن طريق تقنية توليد الأجنة الجسدية. تم إنشاء هذا المخطط من (04) أصناف من نخيل التمر، ويعتمد هذا المخطط على المراحل التالية: تحفيز ومضاعفة التولد العقدي للكالوسات على الأوساط الصلبة و/أو السائلة، بداية لتوليد الأجنة الجسدية في وسط متحرك، ونضج الأجنة الأولية ثم إنباتها على وسط جيلوزي. و أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن وجود تراكيز من 2,4-D ≤ 10 mg/L مجتمعة مع تراكيز ≤ 150 mg/L من الفحم المنشط تعزز التحصل وإكثار الكالوسات الجنينية في أوساط صلبة. تم الحصول على عامل متوسط التضاعف 6.3 مرة في وسط سائل يحتوي على 1 mg/L من 2,4-D بالإضافة إلى ذلك فإن تناوب الوسائط (سائلة / صلبة) في وجود 1 mg/L من AS يعزز التطور الجنيني ويحسن إنتاج الأجنة الجسدية وكذلك إنباتها.

الكلمات الدالة:

تولد كالوسي، أجنة جسدية، تناوب أوساط غذائية سائل / صلب، *Phoenix dactylifera* L.، أصناف، غرسات مخبرية.

Résumé : L'embryogenèse somatique constitue chez le palmier dattier un puissant outil pour la production à grande échelle de plants génétiquement conformes et indemnes de maladies. L'objectif du présent travail consiste à proposer un schéma pour la production, par embryogenèse somatique, de vitroplants. Etabli à partir de (04) cultivars de palmier dattier, ce schéma s'articule autour des étapes suivantes : induction et multiplication de callogenèse nodulaire sur milieux solides et/ou liquide, initiation de l'embryogenèse somatique en milieu liquide agité et maturation des proembryons suivie de la germination sur milieu gélosé. Les résultats obtenus montrent que la présence de concentrations ≥ 10 mg/L de 2,4-D combinées avec des doses de charbon actif ≥ 150 mg/L favorisent l'initiation et la multiplication des cals nodulaires sur le milieu solide. Un facteur moyen de multiplication de 6,3 fois est obtenu en milieu liquide contenant 1 mg/L de 2,4-D. Par ailleurs, l'alternance de milieux (liquide /solide) en présence de 1 mg/L d'AS favorise l'initiation de l'embryogenèse et améliore le rendement en embryons somatiques ainsi que leur germination.

Mots clés : Callogenèse, embryons somatiques, alternance milieux de culture liquide/solide, *Phoenix dactylifera* L., cultivars, vitroplants.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Evolution des pourcentages du nombre de palmiers représentant le cultivar Deglet Nour au niveau des principales wilayas productrices de dattes (Comparaison 2005 et 2015) (MADRP, 2015).....	6
Tableau 02 : Evolution de la culture du palmier dattier (comparaison 2005 et 2015) (MADRP, 2015)	7
Tableau 03 : Caractéristiques du matériel végétal initial utilisé	50
Tableau 04 : Composition du milieu de base MS modifié par Tisserat (1979).....	36
Tableau 05 : Combinaison des régulateurs de croissance testés sur les explants pour chacun des cultivars mis en culture	37
Tableau 06 : Composition du milieu de culture solide (MC _s) pour l'initiation de la callogenèse.....	37
Tableau 07 : Nombre d'explants mis en culture pour chaque cultivar étudié et des balances hormonales testées	37
Tableau 08 : Modifications apportées à la composition du milieu de culture pour la multiplication des cals en milieu liquide agité (MC _L).....	40
Tableau 09 : Modifications apportées à la composition du milieu pour l'induction de l'embryogenèse somatique et la maturation des PEM en milieu liquide agité (ME _L).....	42
Tableau 10 : Traitements à l'AS testés pour l'initiation de l'embryogenèse somatique chez le cultivar DNF.	43
Tableau 11 : Origine des cals nodulaires utilisés pour l'induction de l'embryogenèse somatique.....	45
Tableau 12 : Modifications apportées à la composition du milieu pour l'induction de l'embryogenèse somatique en milieu liquide agité (ME _L)	46
Tableau 13 : Traitements à l'AS testés pour l'initiation de l'embryogenèse somatique chez les quatre (04) cultivars étudiés.....	46
Tableau 14 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur les combinaisons (Cultivars-Milieus de culture) lors de l'apparition du phénomène de brunissement.....	51
Tableau 15 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur les combinaisons (Cultivars-Milieus de culture) pour l'induction de la callogenèse primaire.....	53
Tableau 16 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur les combinaisons (Cultivars-Milieus de culture) lors de l'étape de l'entretien et multiplication de la callogenèse nodulaire	56
Tableau 17 : Réactivité et intensité de brunissement évaluées à l'œil nu en présence des traitements à l'AS	61
Tableau 18 : Variation de l'intensité de la réactivité et du brunissement des suspensions en fonction des traitements à l'AS testés et des cultivars étudiés	67
Tableau 19 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur les poids frais obtenus au niveau des combinaisons (Cultivars-Traitements) lors de l'étape de l'induction de l'embryogenèse somatique en milieux liquides agités.	70
Tableau 20 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur le nombre moyen d'EMS obtenus en milieux liquides agités au niveau des combinaisons (Cultivars-Traitements)	72
Tableau 21 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur le nombre moyen d'EMS obtenus après étalement des des PEM issus des suspensions sur milieux solides au niveau des combinaisons (Cultivars-Traitements).....	76
Tableau 22 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur les teneurs en PT des amas embryonnaires issus des étalements PEM obtenus en milieu liquide au niveau des combinaisons (Cultivars-Traitements).....	78
Tableau 23 : Variation de l'intensité de la réactivité et du brunissement des cals étalés sur milieux solides évalués à l'œil nu en fonction des traitements à l'AS testés et des cultivars étudiés	80
Tableau 24 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur le nombre moyen d'EMS obtenus sur milieux solides au niveau des combinaisons (Cultivars-Traitements).....	83
Tableau 25 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur les teneurs en PT des amas embryonnaires obtenus sur milieux solides au niveau des combinaisons (Cultivars-Traitements).....	85
Tableau 26 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur le nombre moyen d'EMS obtenus au niveau des combinaisons (Cultivars-Origines-Traitements)	88
Tableau 27 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur les teneurs en PT des amas proembryonnaires obtenus au niveau des combinaisons (Cultivars-Origines -Traitements).....	91

Liste des figures

Figure 01 : Principaux pays producteurs de dattes en en terme de superficies cultivées pour l'année 2016 (FAO, 2018)	3
Figure 02 : Principaux pays producteurs de dattes pour l'année 2016 (FAO, 2018)	5
Figure 03 : Principaux pays exportateurs de dattes pour l'année 2016 (FAO, 2018)	5
Figure 04 : Descripteurs taxonomiques du palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	11
Figure 05 : Principes théoriques des voies de développement cellulaire en condition de culture <i>in vitro</i> ..	20
Figure 06 : Schéma théorique des techniques de propagation in vitro chez les végétaux	20
Figure 07 : Protocole adopté lors de l'initiation de la callogenèse primaire à partir d'explants préalablement stérilisés issus du cœur de rejet de quatre (04) cultivars de palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	35
Figure 08 : Protocole adopté lors de l'entretien des cals secondaires induits au niveau des explants des quatre (04) cultivars de palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) sur milieux solides	38
Figure 09 : Protocole adopté lors de la multiplication des cals secondaires induits sur les explants issus de quatre (04) cultivars de palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) en milieu liquide agité.....	39
Figure 10 : Protocole adopté lors de l'étude de l'application de l'AS sur les différentes phases de l'embryogenèse somatique du cultivar Deglet Nour	42
Figure 11 : Protocole adopté lors de l'étude des effets de la modification du type de milieu et de la concentration d'acide salicylique et sur les différentes phases de l'embryogenèse somatique chez quatre cultivars de palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i> L.).....	45
Figure 12 : Variation du taux de contamination initiale après deux (02) mois de culture	50
Figure 13 : Variation du phénomène de brunissement-nécrose en fonction des cultivars et des milieux de culture après deux (02) mois de culture.....	51
Figure 14 : Variation de la callogenèse primaire en fonction des cultivars et des milieux de culture après deux (02) mois de culture	53
Figure 15 : Variation du nombre d'explants présentant une callogenèse de type nodulaire en fonction des cultivars et des milieux de culture au cours de 30 mois de culture (15 subcultures)	60
Figure 16 : Evolution du facteur de multiplication en fonction du temps pour chacun des cultivars étudiés.....	58
Figure 17 : Courbe de croissance des suspensions cellulaires obtenue à partir des poids frais pendant huit (08) semaines de culture.....	61
Figure 18 : Variation du poids frais des suspensions en fonction des traitements à l'AS au cours des huit (08) semaines de culture.....	62
Figure 19 : Effet des traitements à l'AS sur le nombre moyen d'EMS obtenus en milieu liquide agité chez le cultivar DNF après huit (08) semaines de culture	63
Figure 20 : Variation du pourcentage de germination observé en fonction la concentration d'AS	64
Figure 21 : Courbe de croissance des suspensions cellulaires obtenue à partir des facteurs de multiplication moyens durant les neuf (09) semaines de culture réalisées.....	67
Figure 22 : Variation du poids frais des suspensions en fonction des cultivars et des traitements à l'AS au cours des neuf (09) semaines de culture	71
Figure 23 : Variation du nombre moyen d'EMS en fonction des cultivars et des traitements à l'AS après neuf (09) semaines de culture en milieu liquide agité.....	73
Figure 24 : Variation du nombre moyen d'EMS issus des étalements des suspensions cellulaires sur milieu solide en fonction des cultivars et des traitements à l'AS après quatre (04) semaines de culture	77
Figure 25 : Variation de la teneur en PT des amas embryonnaires après étalement des suspensions cellulaires sur milieu solide en fonction des cultivars et des traitements à l'AS.....	79
Figure 26 : Variation du nombre moyen d'EMS obtenus sur milieu solide en fonction des cultivars et des traitements à l'AS.....	84
Figure 27 : Variation de la teneur en PT des amas embryonnaires issus du milieu solide en fonction des cultivars et des traitements à l'AS.....	86
Figure 28 : Variation du nombre moyen d'EMS obtenus en fonction en fonction des cultivars, des traitements à l'AS et du type de milieu de culture d'origine.....	89

Figure 29 : Variation de la teneur en PT des amas embryonnaires obtenus en fonction des cultivars, des traitements à l'AS et du type de milieu de culture d'origine	92
Figure 30 : Variation de la réactivité des EMS issus du milieu liquide agité en fonction des cultivars et des traitements à l'AS.....	94
Figure 31 : Variation de la réactivité des EMS issus de l'étalement des suspensions cellulaires sur milieu solide en fonction des cultivars et des traitements à l'AS.....	96
Figure 32 : Variation de la réactivité des EMS issus du milieu solide en fonction des cultivars et des traitements à l'AS.....	98
Figure 33 : Variation du pourcentage de conversion des EMS en vitroplants en fonction des cultivars, des traitements à l'AS et du type de milieu de culture d'origine.....	100

Liste des planches

Planche 01 : Stérilisation et dissection du matériel végétal	34
Planche 02 : Callogenèse primaire	54
Planche 03 : Callogenèse secondaire	59
Planche 04 : Effet de l'AS sur l'embryogenèse somatique du cultivar Deglet Nour (DNF) en milieu liquide (ME _L)	65
Planche 05 : Initiation de l'embryogenèse et maturation des PEM en milieux liquides agités	68
Planche 06 : Initiation de l'embryogenèse somatique en milieux liquides et maturation des PEM en milieux solides	75
Planche 07 : Initiation de l'embryogenèse somatique et maturation des PEM en milieux solides.....	81
Planche 08 : Germination des EMS et conversion en vitroplants en milieux solides.....	101

Liste des abréviations

2,4-D : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique.

AS : Acide salicylique.

BAP : 6-benzylaminopurine.

DNF : Cultivar Deglet Nour femelle.

DNM : Cultivar Deglet Nour mâle.

EMS : Embryons somatiques structures.

GR : Cultivar Ghers.

MS : Murashige et Skoog.

PEM : Proembryons.

PT : Protéines totales solubles.

TK : Cultivar Takerbucht.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1- Données générales sur le palmier dattier	3
1-1- Origine et répartition géographique	3
1-1-1- Origine	3
1-1-2- Répartition mondiale	3
1-1-3- Répartition en Algérie.....	4
1-2- Importance économique, sociale et écologique	4
1-2-1- Dans le monde	4
1-2-2- En Algérie	6
1-3- Descripteurs taxonomiques du palmier dattier.....	8
1-3-1- Descripteurs taxonomiques.....	8
1-3-2- Taxonomie proprement dite du palmier dattier	10
1-4- Diversité génétique du palmier dattier	12
1-4-1- Génétique du palmier dattier	12
1-4-2- Diversité génétique dans le monde et en Algérie	12
2- Contraintes de la culture du palmier dattier	14
2-1- Menaces biotiques	14
2-2- Menaces abiotiques	15
2-3- Menaces anthropogéniques	15
2-4- Changements climatiques	15
2-5- Maîtrise de la propagation du palmier dattier comme moyen de lutte.....	16
3- Propagation du palmier dattier	17
3-1- Propagation conventionnelle du palmier dattier	17
3-1-1- Propagation sexuée par semis	17
3-1-2- Propagation végétative par rejet	17
3-2- Propagation par les techniques de culture de tissus	18
3-2-1- Micropropagation du palmier dattier	23
3-2-2- Etapes de la propagation par embryogenèse somatique	27
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	
1- Matériel végétal	50
2- Stérilisation et dissection du matériel végétal.....	50
3- Initiation de la callogenèse primaire	35
3-1- Protocole expérimental	35
3-2- Conditions de culture	35
3-3- Paramètres considérés	37
4- Gestion de la callogenèse secondaire	38
4-1- Entretien de la callogenèse secondaire sur milieux solides	38
4-1-1- Protocole expérimental	38

4-1-2- Conditions de culture	38
4-1-3- Paramètres considérés.....	39
4-2- Multiplication des cals secondaires en milieu liquide agité.....	39
4-2-1- Protocole expérimental	39
4-2-2- Conditions de culture	40
4-2-3- Paramètres considérés.....	40
5- Embryogenèse somatique	41
5-1- Application de l'acide salicylique au cours de l'embryogenèse somatiques chez le cultivar Deglet Nour	41
5-1-1- Matériel végétal	41
5-1-2- Protocole expérimental	41
5-1-3- Induction de l'embryogenèse et maturation des PEM en milieu liquide agité	42
5-1-3-1- Conditions de culture	42
5-1-3-2- Paramètres considérés	43
5-1-4- Germinations des EMS issus du milieu liquide agité	44
5-1-4-1- Conditions de culture	44
5-1-4-2- Paramètres considérés	44
5-2- Effets du milieu de culture et de l'acide salicylique sur l'embryogenèse somatique des quatre cultivars.....	44
5-2-1- Matériel végétal	44
5-2-2- Protocole expérimental	45
5-2-3- Induction de l'embryogenèse somatique et maturation des PEM en milieux liquides agités.....	46
5-2-3-1- Conditions de culture	46
5-2-3-2- Paramètres considérés	46
5-2-4- Maturation sur milieux solides des PEM issus des milieux liquides..	47
5-2-4-1- Conditions de culture	47
5-2-4-2- Paramètres considérés	47
5-2-5- Induction de l'embryogenèse somatique et maturation des PEM sur milieux solides.....	47
5-2-5-1- Conditions de culture	47
5-2-5-2- Paramètres considérés	48
5-2-6- Germination des embryons somatiques sur milieux solides.....	48
5-2-6-1- Conditions de culture	48
5-2-6-2- Paramètres considérés	49
6- Analyses statistiques.....	49

CHAPITRE III : RESULTATS

1- Contaminations initiales	50
2- Callogenèse primaire	50
2-1- Variation du pourcentage de brunissement des explants en fonction des milieux de culture et des cultivars	50

2-2- Variation du pourcentage de callogenèse primaire en fonction des milieux de culture et des cultivars	52
3- Callogenèse secondaire	55
3-1- Variation de la callogenèse secondaire sur milieux solides	55
3-2- Variation de la callogenèse secondaire en milieu liquide agité	58
4- Embryogenèse somatique	60
4-1- Effet de l'acide salicylique sur l'embryogenèse somatique de DNF en milieu liquide agité	60
4-1-1- Evolution générale des cultures en suspension.....	60
4-1-2- Variation du poids frais des suspensions cellulaires en milieux agités.....	62
4-1-3- Variation du nombre d'EMS obtenus en milieux liquides agités	63
4-1-4- Variation du pourcentage de germination des EMS obtenus en milieux agités.....	63
4-2- Effets du milieu de culture et de l'AS sur l'embryogenèse somatique et maturation des PEM	66
4-2-1- Induction et maturation des PEM en milieux liquides agités	66
4-2-1-1- Evolution générale des suspensions	66
4-2-1-2- Variation du poids frais des culture en suspension	69
4-2-1-3- Variation du nombre d'EMS obtenus en milieux liquides agités .	72
4-2-2- Induction des PEM en milieux liquides et maturation sur milieux solides.....	74
4-2-2-1- Evolution générale des PEM issus des cultures en suspension étalés sur milieu solide	74
4-2-2-2- Variation du nombre d'EMS issus de l'étalement des PEM issus des cultures en suspension sur milieux solides.....	74
4-2-2-3- Variation de la teneur en PT	78
4-2-3- Induction et maturation sur milieux solides.....	80
4-2-3-1- Evolution générale des cultures	80
4-2-3-2- Variation du nombre d'EMS obtenus sur milieux solides	82
4-2-3-3- Variation de la teneur en PT	84
4-2-4- Effet du milieu de culture sur l'évolution des PEM vers l'état structuré.....	86
4-2-4-1- Variation du nombre moyen d'EMS.....	86
4-2-4-2- Variation de la teneur moyenne en PT.....	89
4-3- Effets du milieu de culture et de l'AS sur la conversion des EMS placés sur milieux solides de germination.....	92
4-3-1- Evolution générale des EMS mis en germination.....	92
4-3-2- Variation de la réactivité des EMS issus des milieux liquides agités .	92
4-3-3- Variation de la réactivité des EMS issus de l'étalement sur milieux solides.....	95
4-3-4- Variation de la réactivité des EMS issus des milieux solides.....	97
4-3-5- Conversion des EMS en vitroplants en fonction du milieu de culture d'obtention	99

CHAPITRE IV : DISCUSSION

1- Callogenèse.....	102
2- Embryogenèse somatique	105
2-1- Effet de l'acide salicylique sur l'embryogenèse somatique en milieu liquide agité chez le cultivar Deglet Nour	105
2-2- Effets de la modification du milieu de culture et de l'acide salicylique sur l'embryogenèse somatique des quatre cultivars	108
2-2-1- Embryogenèse somatique obtenue en milieux liquides agités	108
2-2-2- Embryogenèse somatique obtenue par alternance de milieux (liquides/solides)	109
2-2-3- Embryogenèse somatique obtenue sur milieux solides	110
2-2-4-Embryogenèse somatique obtenue en fonction du type de milieux	110
 CONCLUSION GENERALE.....	 112
 Références Bibliographiques :.....	 115
 Annexe I.....	 126
 Article	 158

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Une des espèces les plus importantes de la famille des Aracées (*Araceae*), le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une espèce pérenne monocotylédone dioïque adaptée aux conditions édapho-climatiques des zones arides et semi-arides (El Hadrami et al., 2012).

Sa culture est considérée comme une activité stratégique en raison du rôle qu'elle joue sur plusieurs plans : économique, social et écologique au niveau des pays producteurs particulièrement au Moyen-Orient et en Afrique du Nord. Parallèlement à cela, le patrimoine phœnicicole mondial qui est estimé à plus de 5000 cultivars, est sujet à de nombreuses contraintes biotiques et abiotiques aggravées par l'action de l'homme. Ces contraintes vont aller en s'accroissant avec les changements climatiques globaux annoncés (El Hadrami et al., 2009 ; Bekheet, 2011 ; Jain, 2012 a ; Jaradat, 2011 ; Jaradat, 2016).

En Algérie, le patrimoine phœnicicole national caractérisé par une grande diversité variétale, est sujet à une menace majeure : la fusariose vasculaire du palmier dattier ou maladie du Bayoud. Celle-ci est causée par un champignon tellurique, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* W.L. Gordon, (1965). Apparue en Algérie vers 1898, elle a déjà détruit plus de trois millions de palmiers dans le Sud-Ouest Algérien et continue jusqu'à nos jours de progresser vers les zones saines (palmeraies du Sud-Centre et de l'Est) car aucun moyen de lutte curative efficace n'a pu être mis au point. La lutte contre la maladie du Bayoud repose exclusivement sur des mesures prophylactiques (Jaradat, 2011 ; Jain, 2012 a ; Jaradat, 2016).

Face à ce risque, seule la lutte génétique est en mesure de faire face à la progression de l'agent du Bayoud vers les zones saines. Par ailleurs, la diversité variétale existante est menacée par l'érosion génétique due à l'extension de la culture monovariétale imposée par les besoins du marché exigeant des variétés de haute qualité commerciale telle que la variété Deglet Nour, qui est malheureusement sensible au Bayoud (Boudoura et al., 2010 ; Bouguedoura et al., 2015 ; Benzohra et al., 2022).

Dans le but de faire face à cette situation et afin de maintenir, de valoriser ou d'améliorer cette diversité, la maîtrise de la propagation du palmier dattier devient fondamentale. Cet objectif ne peut être atteint qu'avec le recours aux techniques de culture *in vitro* afin de pallier aux insuffisances des méthodes conventionnelles de multiplication (par graines ou par rejets) (Zaid et al., 2002 ; Jain, 2012 a et b).

En effet, les techniques de régénération par la culture *in vitro* ou micropropagation permettent l'obtention rapide, indépendamment de la saison, d'un grand nombre de plants génétiquement conformes et indemnes de maladies (Loyola-Vargas et al., 2008 ; Bhojwani et al., 2013 ; Singh, 2015).

Actuellement, deux techniques de micropropagation sont utilisées pour la régénération du palmier dattier (Jain ,2012 a et b ; Mazri et al., 2015, Al Khayri et al., 2017 ; Al Khayri et al.,

2018). Il s'agit de l'organogenèse qui repose sur la capacité de bourgeonnement de différents types d'explants et de l'embryogenèse somatique qui permet l'obtention d'embryons à partir de cellules somatiques. Les embryons somatiques subissent le même processus de développement que celui des embryons zygotiques issus d'une fécondation donnant ainsi naissance à des plantes entières (Jimenez, 2001 ; Jimenez, 2005 ; Hussain et al., 2012 ; Loyola-Vargas et al., 2008 ; Rai et al., 2011 ; Solis Ramos et al., 2012 ; Sahijram et al., 2015).

De ces deux techniques, c'est l'embryogenèse somatique qui est la plus avantageuse, car elle offre les meilleures potentialités : rapidité d'obtention, facilité d'exécution et présentation de taux élevés de multiplication par rapport à l'organogenèse. Cependant, l'embryogenèse somatique présente l'inconvénient de la variation somaclonale (Fki et al, 2011 ; Jain et al., 2011 ; Mazri et al., 2015).

Par ailleurs, le palmier dattier demeure une espèce récalcitrante à la technique de l'embryogenèse somatique à cause de l'influence très marquée du facteur génotypique qui se traduit d'une part par la lenteur de la réponse et le faible taux de multiplication des explants mis en culture et d'autre part par la faible fréquence de maturation et de germination des embryons somatiques obtenus entravant ainsi l'établissement de protocoles fiables, simples et reproductibles (Zaid et al., 2002, Jain, 2012 a).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre présente étude. Son objectif consiste à proposer un schéma de production de vitroplants *via* l'embryogenèse somatique chez quatre cultivars algériens de dattier : Deglet Nour femelle, Deglet Nour mâle, Ghers et Takerbucht.

La démarche générale suivie consiste à apporter des modifications sur les composantes du milieu de culture au cours des différentes étapes de production.

CHAPITRE I :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1- Données générales sur le palmier dattier

1-1- Origine et répartition géographique

1-1-1- Origine

Bien que l'importance économique et socioculturelle du palmier dattier reste incontestable, les connaissances sur l'origine de sa culture, l'histoire de sa diffusion et les processus ayant mené à sa domestication demeurent limités et imprécis. Cependant, le palmier dattier serait l'un des premiers arbres fruitiers à avoir été cultivé par l'homme. Les connaissances actuelles se fondent principalement sur les vestiges archéologiques qui attestent de sa culture, selon les auteurs, entre le 7^{ème} et le 4^{ème} millénaire avant notre ère en Mésopotamie et tout autour du Golfe Persique (Gros-Balthazard, 2012 ; Gros-Balthazard et al., 2013 ; Tengberg 2012 ; Tengberg et al., 2013 ; Jaradat, 2015 ; Wales, 2017).

Un récent travail portant sur la structure génétique du palmier dattier, au niveau des régions où la pratique de la phoeniciculture est ancienne, a permis de mettre en évidence une diversité génétique dont la variation est structurée géographiquement ce qui implique que le Golfe Persique pourrait ne pas avoir été le seul centre de domestication du palmier dattier. L'Afrique du Nord pourrait ainsi avoir été un centre de domestication, soit indépendamment (domestication primaire) ou après l'introduction de génotypes du Moyen-Orient et leur croisement avec des palmiers dattiers locaux (domestication secondaire) (Zehdi-Azouzi et al., 2015 ; Moussouni et al., 2017).

1-1-2- Répartition mondiale

La phoeniciculture pratiquée exclusivement dans les régions arides et semi-arides du monde sur les cinq continents couvre une superficie estimée en 2016 à 1.353.159 Ha (FAO, 2018) la figure 01 représente sa répartition mondiale en terme de pourcentage de surface par pays. Cependant les régions les plus favorables et les plus productrices sont comprises entre les 24^{ème} et 34^{ème} parallèles de latitude Nord soit de l'est du Maroc à l'ouest du Pakistan (Munier, 1973, Zaid et al., 2002, Manickavasagan et al., 2012, Johnson et al., 2015 a et b).

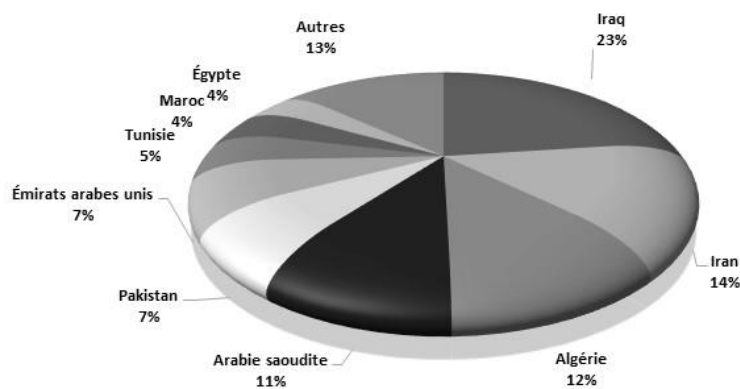


Figure 01: Principaux pays producteurs de dattes en en terme de superficies cultivées pour l'année 2016 (FAO, 2018)

1-1-3- Répartition en Algérie

En Algérie, l'aire de culture du palmier dattier s'étend depuis la frontière marocaine à l'Ouest jusqu'à la frontière tuniso-libyenne à l'Est et depuis l'Atlas Saharien au Nord jusqu'à Tamanrasset au Sud, Djanet au Sud-Est et Reggane au Sud-Ouest. (Bouguedoura et al., 2010 ; Bouguedoura et al., 2015).

La culture du palmier dattier en Algérie est établie en plusieurs oasis réparties dans le Sud du pays (zone saharienne) occupant une superficie de 166 893 ha (MADRP, 2015). Ces oasis peuvent être classées en quatre groupes (Bouguedoura et al., 2010 ; Bouguedoura et al., 2015) :

- Groupe des palmeraies septentrionales : se situant au niveau des contreforts des chaînes montagneuses de l'Atlas Saharien (Monts des Ouled Naïl, Bou Saâda, Sud de Batna). Ces palmeraies sont constituées d'un ensemble d'oasis parsemées marquant les limites Nord du Sahara algérien.
- Groupe des palmeraies orientales : les Zibans (Biskra), l'Oued Ghir (Ouargla), le Souf (El-Oued) et le M'zab (Ghardaia). Ces palmeraies représentent les principales régions productrices, indemnes de Bayoud mais avec une tendance à la monoculture d'une seule variété, la Deglet Nour.
- Groupe des palmeraies occidentales : Saoura (Beni Abbes), Touat (Adrar), Gourara (Timimoun) et le Tidikelt (Reggane). Ces palmeraies renferment une grande diversité variétale mais à faible ou moyenne valeur marchande où l'on retrouve l'unique cultivar reconnu résistant à la maladie du Bayoud : Takerbucht.
- Groupe des palmeraies méridionales : Djanet, Tamanrasset.

1-2- Importance économique, sociale et écologique

1-2-1- Dans le monde

L'intérêt économique du palmier dattier est multiple. Cependant, la pratique de sa culture est destinée principalement à la production de fruits (dattes) qui peuvent être consommés à l'état frais, séchés ou transformés sous diverses formes (Chao et al., 2007 ; Manickavasagan et al., 2012).

Ainsi la culture du palmier dattier est considérée comme étant une des plus importantes productions fruitières dans de nombreuses parties du monde caractérisées par un climat aride associé à des températures élevées. Toutefois sa culture se concentre essentiellement dans les pays où sa pratique est ancienne : Moyen-orient et Afrique du Nord (Chao et al., 2007, Ashraf et al., 2011 ; Manickavasagan et al., 2012 ; Siddiq et al., 2013). En effet, sur les 39 pays producteurs de dattes recensés par la FAO (2018), cinq (05) pays (Égypte, Iran, Algérie, Arabie saoudite, Émirats arabes unis et Iraq) totalisent à eux seuls 56 % de la production mondiale de dattes, estimée à 8 460 443 de tonnes pour l'année 2016, dont la répartition en pourcentage par pays est donnée dans la figure 02.

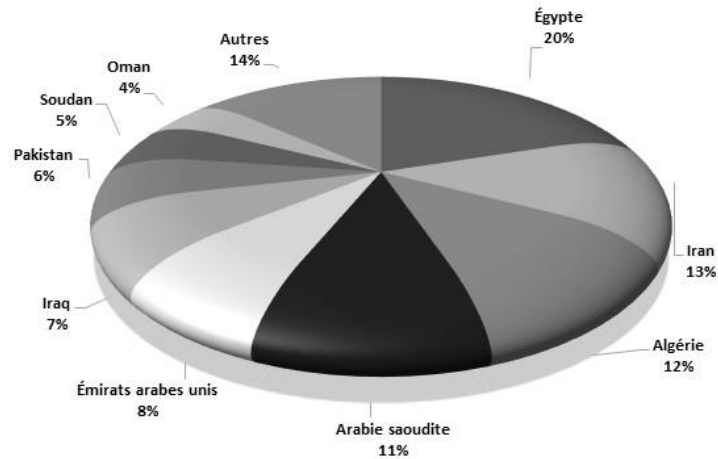


Figure 02 : Principaux pays producteurs de dattes pour l'année 2016 (FAO, 2018)

L'essentiel de la production mondiale est consommé localement. Pour l'année 2013 (FAO, 2018), le volume des exportations n'a représenté que 9,10 % (825271 tonnes) de la production mondiale totale de dattes permettant d'engendrer pour les pays producteurs des revenus d'une valeur de 993 102 dollars US. Selon Siddiq et al. (2013), trois cultivars dominent le marché mondial : Medjhoool, Deglet Nour et Barhi.

Les principaux pays exportateurs en terme de pourcentage de tonnage produit par ordre décroissant pour l'année 2016 (FAO, 2018) sont : le Pakistan, l'Iraq, la Tunisie, l'Arabie saoudite et l'Iran (Figure 03).

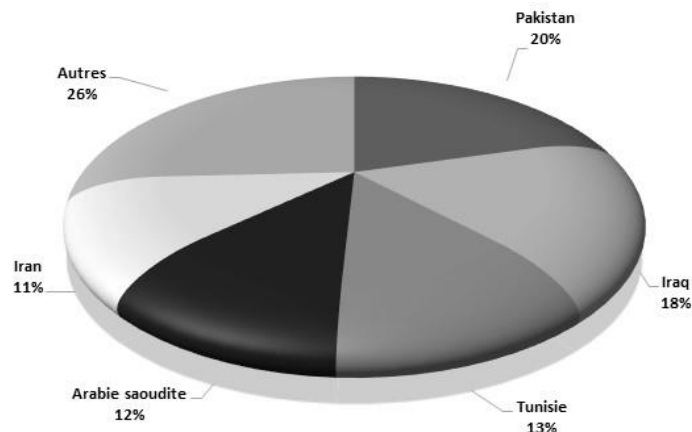


Figure 03 : Principaux pays exportateurs de dattes pour l'année 2016 (FAO, 2018).

L'essentiel des zones phoenicicoles mondiales est situé dans des pays en développement ou sous-développés où la production de dattes constitue des ressources financières nationales et locales non négligeables. De plus la culture du palmier dattier est considérée comme étant une culture vivrière indispensable car elle joue un rôle majeur dans l'alimentation humaine (à l'état frais ou conservé) et constitue une source de sous-produits aux utilisations diverses (élevage, transformation, construction, ...) permettant ainsi la sédentarisation des populations au niveau des zones productrices (Battesti, 2005, Chao, 2007, El-Juhany et al., 2010, Ashraf et al., 2011, El Hadrami et al., 2012).

Par ailleurs et parce qu'il est adapté aux conditions arides (faible pluviométrie, températures élevées, salinité des sols et eaux d'irrigation), le palmier constitue l'élément fondamental de l'écosystème oasien. Il crée les conditions favorables à l'établissement des cultures sous-jacentes (arboriculture, céréaliculture, maraîchage, culture fourragère...) et à la préservation de la biodiversité oasienne (faune, flore et micro-organismes) (Bekheet, 2011 ; El-Juhany et al., 2010 ; Jaradat ,2011).

Il participe aussi à la lutte contre la désertification, phénomène accéléré ces dernières décennies par le réchauffement climatique (Bekheet, 2011 ; El-Juhany et al., 2010 ; Jaradat ,2011).

1-2-2- En Algérie

En Algérie, la culture du palmier dattier occupe une superficie de 166 893 ha répartie sur 16 wilayas caractérisées par un climat aride (subsaharien à saharien) : Adrar, Batna, Bechar, Biskra, Djelfa, El-Bayadh, El-Oued, Ghardaia, Illizi, Khenchela, Laghouat, Naama, Ouargla, Tamanrasset, Tebessa, Tindouf (MADRP, 2015).

La production de dattes en Algérie (tous types confondus) est principalement concentrée dans la partie Sud-Est du pays regroupant les wilayas de Biskra, de Ouargla et d'El Oued qui produisent respectivement 41,18 %, 24 ,98 % et 13,09% de la production nationale totalisant ainsi 79,24%, (MADRP, 2015). Cette situation s'explique par les spécificités édaphiques et pédoclimatiques des wilayas du Sud-Est, par les pratiques culturelles générant des rendements importants ainsi que par la valeur marchande des cultivars exploités principalement : Deglet Nour qui représente 60, 27 % du nombre total de palmiers en culture (Tableau 01) (Benzouche et al., 2012 ; MADRP, 2015).

Dans le reste des wilayas productrices, la production est moins importante, elle contribue à hauteur de 20,85 % de la production nationale totale de dattes répartie comme suit : Sud-Ouest (Adrar et Béchar) avec 12,22%, le centre-sud (Ghardaia et Tamanrasset) avec 6,2%.

Le reste de la production nationale, soit 1,71%, est produit par les 9 autres wilayas.

Tableau 01 : Evolution des pourcentages du nombre de palmiers représentant le cultivar Deglet Nour au niveau des principales wilayas productrices de dattes (Comparaison 2005 et 2015) (MADRP, 2015).

Principales Wilayas productrices	Palmiers cultivés		Palmiers en production	
	2005	2015	2005	2015
Biskra	60,51%	61,63%	52,03%	60,38%
El-Oued	65,86%	64,73%	64,91%	64,61%
Ouargla	53,67%	54,47%	50,90%	52,81%

L'analyse de l'évolution de la filière nationale de la datte établie, sur la base des données fournies par le ministère de l'agriculture (entre 2005 et 2015), permet de constater une

augmentation de la production totale qui est passée de 5.162.934 à 9.903.770 quintaux. Cette augmentation est liée à l'action combinée de trois (03) facteurs (Tableau 02) :

- l'augmentation des superficies cultivées (+12,84%) ;
- l'entrée en production des nouvelles plantations (+49,62 %) ;
- l'amélioration des pratiques culturales qui s'est traduite par une augmentation des rendements (+28,51 %).

Tableau 02 : Evolution de la culture du palmier dattier (comparaison 2005 et 2015) (MADRP, 2015)

	2005	2015	Différence	Augmentation (2005 année de référence)
Superficie (Ha)	147906	166893	18987	12,84%
Nombre total de palmiers	16515090	18605027	2089937	12,65%
Nombre total de palmiers en production	10364890	15508404	5143514	<u>49,62%</u>
Production (Qx)	5162934	9903770	4740836	<u>91,82%</u>
Rendement (Kg/arbre)	49,8	64	14,2	<u>28,51%</u>

Le patrimoine phoenicicole national pour l'année 2015 est estimé à 18.605.027 palmiers, dont 15.508.404 sont en production soit 83,4% du patrimoine national (MADRP, 2015). Cet écart (16,6 %) renferme trois catégories de palmiers: les pieds mâles nécessaires à la pollinisation, les nouvelles plantations non productives et les plantations sénescentes (Bougueddoura et al., 2015).

Les principales variétés cultivées en Algérie sont : Deglet Nour, Ghars, Tafezouine, Mech Degla et Degla Beida (Benzouche et al., 2012).

Seules les variétés à haute valeur marchande comme la Deglet Nour (85.70% des exportations) et quelques quantités d'autres variétés de dattes fraîches sont exportées en vrac, branchettes et parfois conditionnées. Concernant les variétés sèches, celles-ci sont exportées principalement vers les régions subsahariennes à travers des opérations de troc (Bougueddoura et al., 2015 ; Benzouche et al., 2012).

En Algérie, la culture du palmier dattier est considérée comme le pilier de l'agriculture saharienne traditionnelle et moderne. En effet toutes les parties du palmier dattier sont utilisées : fruits, graines, tronc et feuilles avec des utilisations multiples dans l'alimentation humaine ou animale mais également dans l'artisanat et la construction. De plus de par sa présence dans les zones sahariennes à conditions extrêmes (désertiques), la culture du palmier dattier permet le développement de différentes formes de vies animale et végétal jouant par ce biais un rôle indispensable dans le maintien/fixation et la survie des populations de ces régions (Bougueddoura et al., 2010 ; Bougueddoura et al., 2015).

1-3- Descripteurs taxonomiques du palmier dattier

1-3-1- Descripteurs taxonomiques

Le palmier dattier est une angiosperme monocotylédone arborescente à tronc monopodique qui peut être décrit comme suit :

1- Système racinaire :

Le palmier dattier n'a pas de racine pivotante. Son système racinaire est fasciculé et ses racines sont fibreuses (Figure 04-A). Il est formé de plusieurs types de racines ; les racines de premier ordre se développent directement à partir de la graine et émettent très tôt des racines de deuxième ordre qui émettent à leur tour des racines de troisième ordre et ainsi de suite. Toutes les racines peuvent présenter des pneumatodes qui sont des organes à vocation respiratoire et qui se présentent sous forme de petites lenticelles. Le développement du système racinaire est variable en fonction du cultivar, de la nature du sol, des pratiques culturales et du mode d'irrigation. Elles peuvent ainsi largement s'étendre au-delà de la zone de projection de la frondaison et peuvent atteindre de grandes longueurs dans le cas de la présence d'une nappe phréatique profonde (Meunier, 1973 ; Djerbi, 1994; Zaid et al., 2002).

2- Stipe (tronc) :

Le tronc du palmier dattier est appelé stipe et sa forme est généralement cylindrique ou rarement tronconique (Figure 04-A). L'élongation du tronc qui se fait à partir de la partie coronaire par le bourgeon terminal ou phyllophore peut atteindre ou dépasser une hauteur de 20 mètres et sa circonférence moyenne peut atteindre 1 à 1,10 m (Zaid et al., 2002, Munier, 1973).

3- Palme (feuille) :

Les palmes sont issues du bourgeon terminal. Ce sont des feuilles composées, pennées, disposées sur le tronc en hélice. Les folioles sont régulièrement disposées en position oblique le long du rachis, isolées ou groupées, pliées longitudinalement en gouttière ou transformées en épines sur la partie inférieure du limbe. A l'extrémité inférieure de la palme, le rachis s'élargit pour former le pétiole qui s'insère directement au tronc (Figure 04-B) (Munier, 1973).

A l'aisselle de chaque palme se trouve un bourgeon adventif ou axillaire qui, en se développant, peut donner naissance à une inflorescence dans la région coronaire, à un rejet dans la région basale (permettant la multiplication végétative du palmier dattier) et à un gourmand dans la région moyenne et sous-coronaire (Munier, 1973).

Selon la variété, l'âge du palmier et les conditions environnementales, les feuilles du palmier dattier mesurent de 2 à 6 m de long (4 m de moyenne) et ont une durée de vie normale de 3 à 7 ans. Un palmier dattier adulte en bon état de végétation, peut avoir jusqu'à 150 palmes actives

en même temps avec une formation annuelle allant de 10 à 30 nouvelles palmes (Munier, 1973; Zaid et al., 2002).

Les feuilles des jeunes plants issus de graines sont caractérisées par un pétiole peu développé et un limbe entier (feuilles primordiales entières). Ce type de feuilles se forme durant les deux ou trois premières années qui suivent la germination des graines. La première feuille formée est réduite à une gaine : c'est la gaine post-cotylédonaire. Les feuilles suivantes sont formées par un limbe vert entier de plus en plus grand et présentant des plis. Le bourgeon terminal initie ensuite les feuilles définitives ou feuilles adultes qui présentent un rachis bien développé et un limbe découpé en folioles (feuilles pennées à folioles séparées) (Djerbi, 1994).

4- Inflorescences :

Le palmier dattier est une espèce dioïque dont les fleurs unisexuées mâles ou femelles sont portées par des pieds différents. La pollinisation en conditions naturelles est accomplie par le vent, les abeilles et les insectes. L'inflorescence du palmier dattier (mâle ou femelle) a pour origine la région coronaire du stipe (palmes âgées d'une année). Celle-ci se présente en grappes d'épis appelées spadices recouvertes avant la floraison par une bractée ou membrane entièrement fermée appelée spathe dont la couleur verdâtre varie en fonction des cultivars et le développement des inflorescences (Munier, 1973 ; Djerbi, 1994 ; Zaid et al., 2002).

Le nombre annuel de spathe issues d'un pied femelle varie de 0 à environ 25 (avec une moyenne de 12) et peuvent contenir jusqu'à 10 000 fleurs /spathe. Chez les pieds mâles le nombre de spathe ainsi que le nombre de fleurs/spathe produits annuellement sont encore plus importants (Munier, 1973 ; Djerbi, 1994 ; Zaid et al., 2002).

Les spathe femelles sont de forme allongée alors que les spathe mâles sont plus courtes et plus renflées avec une légère dépression dans leur partie supérieure (Figure 04-C). Cette différenciation permet de reconnaître le sexe des inflorescences avant leur épanouissement. (Munier, 1973 ; Djerbi, 1994 ; Zaid et al., 2002). Ainsi à l'ouverture des spathe, on peut distinguer les deux types de fleurs par rapport à leurs formes et à leurs couleurs. En effet, les fleurs femelles sont de forme globulaire avec un calice légèrement bordé en vert et une corolle de couleur blanc ivoire alors que les fleurs mâles sont de forme légèrement allongée avec un calice et une corolle de couleur blanche ivoire (Munier, 1973).

5- Datte (fruit) :

Le fruit du dattier, la datte, est une baie issue du développement après fécondation d'un seul carpelle. La datte est composée d'un mésocarpe charnu protégé par un fin péricarpe. La consistance de la datte peut être molle, demi-molle ou sèche (dure). L'endocarpe se présente sous la forme d'une membrane très fine entourant le noyau (Figure 04-D) (Munier, 1973 ; Djerbi, 1994 ; Zaid et al., 2002).

La forme, la couleur, la consistance, les dimensions ainsi que le poids de la datte varient selon les cultivars, les conditions édapho-climatiques et les itinéraires techniques pratiqués (Munier, 1973 ; Djerbi, 1994 ; Zaid et al., 2002).

6- Noyau (graine) :

La graine du palmier dattier dite noyau est de forme oblongue, lisse ou pourvue de protubérances latérales en arêtes ou ailettes, avec un sillon ventral assez profond et un embryon dorsal dur formant un ensemble globulaire en dépression protégé par un albumen dur et corné de nature cellulosique (Figure 04-D) (Munier, 1973; Zaid et al., 2002).

Les caractéristiques du noyau de la datte (forme, dimensions et poids) varient également en fonction des cultivars et des conditions de culture. (Munier 1973; Djerbi, 1994; Zaid et al., 2002).

La germination de la graine est hypogée (Figure 04-E). On assiste tout d'abord au soulèvement de l'opercule qui permet l'émergence de l'extrémité radiculaire poussée par le pétiole cotylédonaire qui s'accroît considérablement et s'enfonce profondément en terre (germination remotive tubulée). Par la suite, la jeune plantule laisse apparaître la première feuille après déchirure de la gaine cotylédonaire et reste reliée à l'albumen corné par le limbe cotylédonaire qui constitue un haustorium assurant la nutrition. Le développement de la jeune plante se poursuit avec l'apparition de nouvelles feuilles, toujours simples et engainantes à l'extrémité en pointe alors que la racine principale émet des radicelles et des racines secondaires qui naissent au niveau du collet (Djerbi, 1994).

1-3-2- Taxonomie proprement dite du palmier dattier

Le palmier dattier dénommé *Phoenix dactylifera* L. par Linné en 1734, est une plante angiosperme monocotylédone arborescente.

Selon the Angiosperm Phylogeny Group (APG IV) (Chase et al., 2016) la classification du palmier dattier se présente comme suit :

Super ordre :	Lilianae (monocotylédones)
Ordre :	<i>Arecales</i>
Famille :	<i>Arecaceae</i>
Genre :	<i>Phœnix</i>
Espèce :	<i>Phoenix dactylifera</i> L.

Le genre *Phoenix* regroupe 12 espèces acceptées en plus du palmier dattier (*Pheonix dacylifera* L.) et qui sont: *Phoenix acaulis* Roxb., *Phoenix atlantica* A.Chev., *Phoenix caespitosa* Chiov., *Phoenix canariensis* H.Wildpret, *Phoenix loureiroi* Kunth, *Phoenix paludosa* Roxb., *Phoenix pusilla* Gaertn., *Phoenix reclinata* Jacq., *Phoenix roebelenii* O'Brien, *Phoenix rupicola* T.Anderson, *Phoenix sylvestris* (L.) Roxb., *Phoenix theophrasti* Greuter (WCVP, 2022):

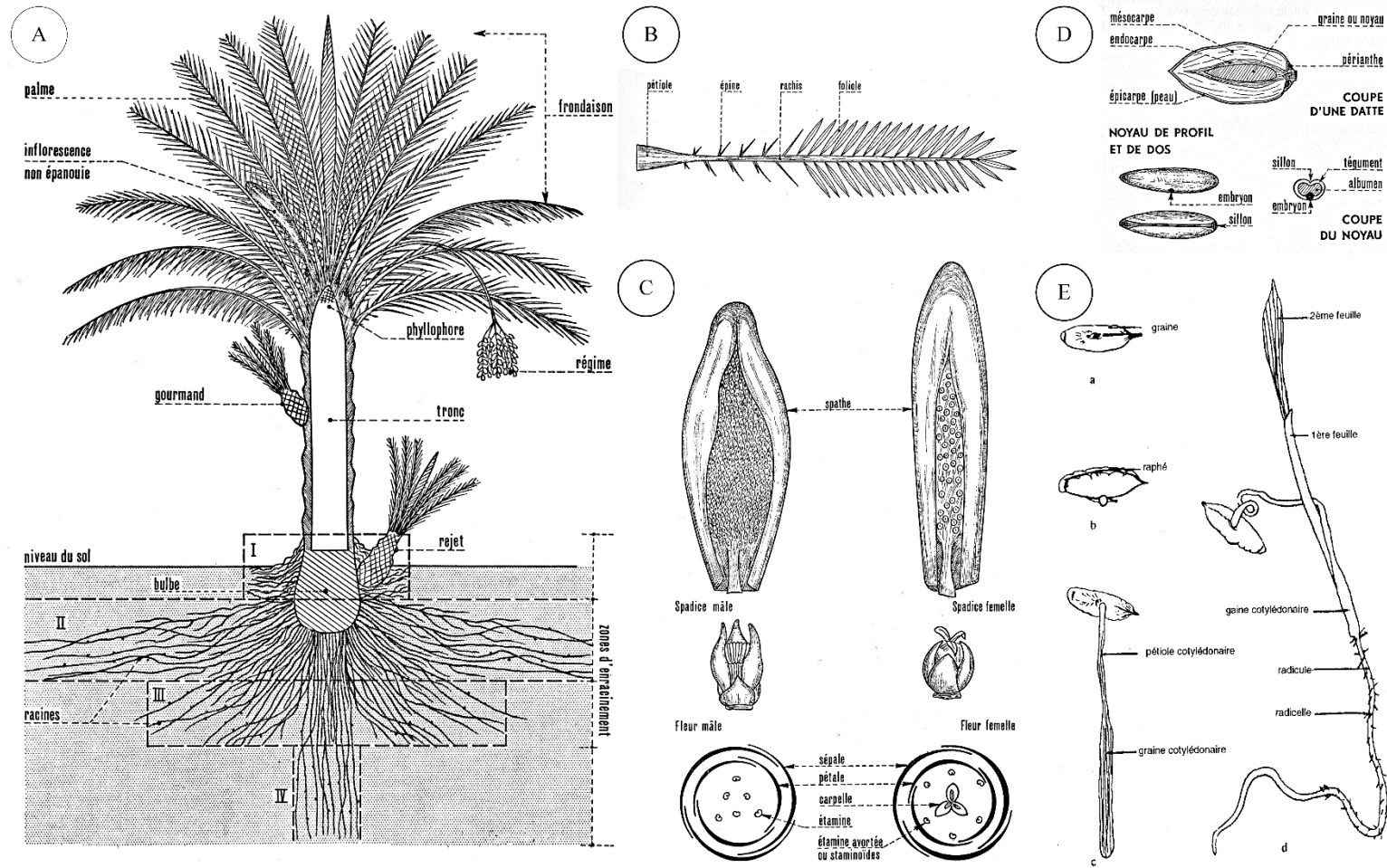


Figure 04 : Descripteurs taxonomiques du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)

A : Figuration schématique du palmier dattier (Munier, 1973),

B : Schéma d'une palme de palmier dattier (Munier, 1973),

C : Schéma des organes floraux du palmier dattier (Munier, 1973),

D : Schéma du fruit et de la graine du palmier dattier (Munier, 1973),

E : Schéma des différents stades morphologiques de la germination chez le palmier dattier (Djerbi, 1994).

1-4- Diversité génétique du palmier dattier

1-4-1- Génétique du palmier dattier

Le nombre de chromosomes du palmier dattier (*Phoenix dactilyfera* L.) le plus largement mentionné est de 36 ($n=18$, $2n=36$). Cependant de nombreux auteurs rapportent que le nombre chromosomique varierait de $2n=26$ à $2n=36$ avec des cas d'aneuploïdie et de polyploidie signalés entre cultivars et au sein du même cultivar (Zaid et al., 2002; Shabana et al., 2010; Abul-Soad et al., 2017).

Les espèces de *Phoenix* sont inter-fertiles. L'hybridation interspécifique d'espèces distinctes conduit généralement à une progéniture hybride fertile. De tels flux de gènes spontanés sont possibles, sinon communs, en culture aussi bien que dans la nature (Gros-Balthazard, 2013).

1-4-2- Diversité génétique dans le monde et en Algérie

La diversité génétique est définie comme les variations génétiques entre espèces, sous-espèces, cultivars, populations ou clones individuels qui peuvent être caractérisées aux niveaux morphologique, physiologique, biochimique et moléculaire (Jaradat, 2016).

La diversité génétique du palmier dattier représente la variation héritable au sein et entre les populations sauvages et cultivées dans les palmeraies ou les plantations modernes alors que la diversité phénotypique représente l'effet d'interaction entre la diversité génétique et l'environnement. C'est ce qui représente l'indicateur apparent de la diversité des dattiers qui est à la base de la sélection et de la conservation, ainsi que son amélioration pour une utilisation durable (El Hadrami et al., 2009 ; Jaradat, 2016).

La diversité génétique du palmier dattier est le résultat de siècles de pratique de sélection artificielle (phoeniculteurs) au niveau local ou régional d'individus dérivés d'une seule graine unique, clonée et multipliée par voie végétative (Bekheet, 2011 ; Jaradat, 2016 ; Abul-Soad et al., 2017).

Cependant, la caractérisation et la nomenclature des cultivars de palmier dattier existants reste encore complexe en raison de la longue histoire de la culture (sélection artificielle millénaire), des larges échanges du germoplasme, de la dioecie de la plante, de son mode de propagation naturelle par semis n'assurant pas l'identité variétale et de l'existence d'un grand nombre de synonymes et d'homonymes au niveau local et régional (Chao et al., 2007).

La diversité génétique mondiale actuelle du palmier dattier est importante mais reste également peu connue. En effet, selon de nombreux auteurs, cette diversité est estimée entre 3000 et 5000 cultivars répertoriés au niveau des pays où la production est ancienne en se basant essentiellement sur un critère phénotypique : la qualité des fruits produits. Cependant, la plupart de ces cultivars sont endémiques et ne sont plus ou peu cultivés au niveau des palmeraies (El Hadrami et al., 2009).

Selon Johnson (2011), un nombre réduit de cultivars d'élites produisant des dattes à haute valeur commerciale (estimé à 10 % du nombre total) sont multipliés et cultivés à grande échelle.

En Algérie où la culture du palmier dattier est considérée comme ancestrale, la sélection est faite principalement à partir de plantations de rejets de cultivars existants dans la même zone de culture et dans une faible mesure à partir de francs issus de semis (khalts ou Dgoul), qui poussent au hasard dans les oasis et les palmeraies. Cette pratique est répandue au niveau des régions ravagées par le Bayoud (Bouguedoura et al., 2010 ; Bouguedoura et al., 2015). Les khalts représentent jusqu'à 10% de la population de palmiers dattiers, et ils peuvent être une nouvelle source pour la sélection de pieds femelles essentiellement. Ainsi, si un pied khalt femelle présente un caractère intéressant (par exemple la qualité du fruit), il peut être choisi par les phoeniculteurs pour être cloné et devenir un cultivar. Il recevra une désignation et peut donc être préservé et multiplié végétativement par rejets (Bouguedoura et al., 2010 ; Bouguedoura et al., 2015).

Le patrimoine génétique algérien renferme un nombre moins important de pieds mâles. En effet dans une palmeraie de semis naturel, des pourcentages à peu près égaux de pieds mâles (Dokkars) et femelles (Nakhlates) coexistent alors que dans une palmeraie cultivée, le nombre de palmiers mâles est généralement réduit à une proportion de 1 à 2% de la plantation. Ces derniers vont servir à la pollinisation réalisée manuellement sans recevoir une appellation propre. Dans certains cas de similitude végétative, un palmier mâle est identifié par rapport au palmier femelle auquel il ressemble (Bouguedoura et al., 2015).

Plusieurs travaux ont eu pour objet l'étude du patrimoine phoenicole algérien. Cependant, ces derniers se sont intéressés uniquement à la diversité des cultivars femelles sur la base de critères biométriques et agronomiques alors que les rôles xenic et metaxenic des pieds mâles n'est plus à démontrer (Chao et al., 2007; Mohammadi et al., 2017 ; Al-Najm et al., 2021).

Dans ce cadre, nous pouvons citer le travail publié en 1998, réalisé par une équipe de quatre (04) chercheurs (Hannachi et al., 1998) et qui a permis de recenser 940 cultivars dont les 2/3 ont été échantillonnés sur une quinzaine de régions naturelles. Ce travail a permis de confirmer l'importance de la diversité génétique que renferme la phoeniculture algérienne qui repose sur une distribution d'Est en Ouest assez marquée.

Cette diversité peut être décrite comme suit:

- Palmeraies du Sud-Ouest : celles-ci renferment une diversité très appréciable et c'est justement cette diversité qui a permis aux palmeraies de rester productives malgré le fléau du Bayoud.
- Palmeraies potentielles du Sud-Est : la diversité est considérable malgré la prédominance de la variété Deglet nour.
- Palmeraies marginales : elles se caractérisent également par leur grande diversité.

2- Contraintes de la culture du palmier dattier

Les agrosystèmes oasiens des pays du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord (principaux pays producteurs) subissent ces dernières décennies des changements physiques et socio-économiques rapides qui ont déjà conduit à la disparition de quelques oasis (Jaradat, 2016).

Ce déclin de certaines oasis, bien qu'il puisse se produire soudainement, représente souvent le résultat cumulatif d'une lente régression de l'agrobiodiversité et de la réduction de la résilience écologique (capacité à retrouver un fonctionnement et un développement normal après dégradation) de l'oasis (Battesti 2012, Huang et al., 2013).

Cependant, à part quelques cas documentés d'oasis où la culture du palmier dattier a diminué ou a même disparu, la production mondiale de dattes n'a pas cessé d'augmenter depuis les dernières décennies (Jaradat 2013 ; Jaradat, 2016).

En effet au cours des 50 dernières années, des changements importants sont survenus chez la plupart des pays producteurs de dattes dans la gestion et la conduite des palmeraies, dans la récolte, le conditionnement, la transformation et la commercialisation des dattes. Certaines de ces pratiques ont contribué positivement à la conservation de la ressource génétique du palmier dattier alors que d'autres pratiques ont eu un impact négatif sur cette conservation. (Bekheet, 2011 ; Jaradat, 2011 ; Jaradat, 2016).

Les secteurs phoenicicoles de la région du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord sont confrontés à des menaces de nature similaires qui peuvent être résumées comme suit :

2-1- Menaces biotiques

Au regard de l'importance de leur incidence économique et leur sévérité élevée, deux menaces biotiques sont considérées comme majeures (Jaradat, 2011 ; Jain, 2012 a ; Jaradat, 2016) :

- Le charançon rouge du palmier *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (1790) qui provoque de graves dommages dans les palmeraies de l'Est de l'Arabie, de l'Irak et de l'Egypte, et
- la maladie Bayoud, causée par un champignon tellurique qui est le *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* W.L. Gordon (1965) qui a déjà détruit plus de 13 millions de pieds de palmiers en Algérie et au Maroc au cours du siècle dernier.

En Algérie, la maladie du Bayoud constitue la menace majeure (dont les conséquences néfastes restent irréversibles puisqu'aucun moyen de lutte curative efficace n'a pu être mis au point) et la cause d'une érosion génétique importante au niveau des palmeraies infestées du sud-ouest et du centre du pays (Bouguedoura et al., 2010 ; Bouguedoura et al.2015).

2-2- Menaces abiotiques

Nous pouvons citer ici l'ensablement, le manque d'eau en raison de longues périodes sans pluie et l'assèchement de nombreux puits mais aussi la salinisation des sols qui est en train de devenir une menace réelle au niveau des palmeraies en expansion dans plusieurs pays producteurs dont l'Algérie (Bekheet, 2011 ; Jaradat, 2011 ; Bouguedoura et al., 2010 ; Bouguedoura et al., 2015).

Cette dernière est causée par la présence de quantités excessives de sels (principalement de sels de chlorure de sodium soluble) due à l'action conjointe de la qualité des eaux d'irrigation et à l'absence ou à la détérioration des réseaux de drainage ce qui affecte sérieusement la croissance des palmiers (Bekheet, 2011 ; Jaradat, 2011 ; Bouguedoura et al., 2010 ; Bouguedoura et al.2015 ; Haj-Amor et al., 2017).

2-3- Menaces anthropogéniques

Les menaces anthropogéniques sont les menaces résultant de l'activité de l'homme. La plus significative est la tendance qu'ont de nombreux pays producteurs de dattes à s'orienter vers le développement de plantations modernes, basées sur quelques cultivars d'élite sous la pression de la demande des marchés (Bekheet, 2011). C'est le cas de l'Algérie où le cultivar Deglet Nour est presque exclusivement transplanté au niveau des nouveaux périmètres irrigués malgré sa sensibilité connue à la maladie du Bayoud. (Bouguedoura et al., 2010 ; Bouguedoura et al.2015 ; Bedjaoui et al., 2020 ; Faci et al., 2021).

De plus, l'expansion rapide des plantations modernes entrera en concurrence avec les oasis traditionnelles ce qui nuira à la conservation dynamique de la diversité génétique du palmier dattier conduisant ainsi à une érosion génétique inéluctable (Bekheet et al., 2013 ; Bekheet, 2011 ; Bouguedoura et al., 2010 ; Bouguedoura et al.2015 ; Bedjaoui et al., 2020 ; Faci et al., 2021).

Par ailleurs, les changements/transformation socio-économiques en cours depuis des décennies au niveau des régions productrices, ont conduit à une perte progressive des connaissances (savoir et savoir-faire) ancestrales des populations autochtones en ce qui concerne à la fois la gestion des palmeraies et le maintien d'une diversité variétale dont l'avenir est de plus en plus incertain (Jaradat, 201 ; Bouguedoura et al., 2010 ; Bouguedoura et al.2015 ; Benmehaia et al., 2018).

2-4- Changements climatiques

Selon Pauls et al. (2013), le changement climatique mondial aura un impact sur la diversité génétique intraspécifique à travers :

- des changements dans la distribution spatio-temporelle des variants génétiques à mesure que les gammes de populations et d'espèces changent,

- des changements du niveau de plasticité phénotypique des individus et des populations afin de répondre aux nouvelles conditions environnementales,
- des altérations dans l’adaptation évolutive aux conditions environnementales changeantes. Dans de nombreux cas, ces changements réduisent la diversité génétique des populations et des espèces, évoluant dans les situations extrêmes vers l’érosion génétique ce qui entraînera une réduction de la viabilité de la population et à son extinction.

Par conséquent, si les changements climatiques augmentent la fréquence et/ou l’intensité des sécheresses, cela conduirait à l’extension de la désertification et à la perte irréversible des agrosystèmes oasiens équilibrés et productifs actuels (Bekheet, 2011 ; Jaradat, 2011, Jaradat, 2016).

Dans ce contexte, nous pouvons citer les résultats de modélisations réalisées par Shabani et al. (2012) qui suggèrent que les régions adaptées à la culture du palmier dattier pourraient devenir plus chaudes et plus sèches. Si cela venait à être confirmé, les régions productrices actuelles deviendraient inadaptées, ce qui induirait un déclin économique et par conséquent des répercussions néfastes sur le niveau de vie et même l’avenir des populations de ces régions.

2-5- Maîtrise de la propagation du palmier dattier comme moyen de lutte

Comme décrit précédemment, la culture du palmier dattier en Algérie est considérée comme étant une culture stratégique vu le rôle qu’elle joue sur plusieurs plans : économique, social et écologique.

Par ailleurs, la palmeraie algérienne qui renferme environ un millier de cultivars est sujette à de nombreuses contraintes biotiques, abiotiques et anthropologiques dont l’impact préjudiciable irréversible sera accentué avec les changements climatiques (Bouguedoura et al., 2010 ; Bouguedoura et al.2015 ; Bedjaoui et al., 2020 ; Faci et al., 2021).

Au vu de cette situation, une stratégie à deux volets, à savoir la conservation et l’amélioration génétique, doit être mise en place et dont la réussite dépendra fortement de la maîtrise de propagation à grande échelle du palmier dattier.

Pour ce faire, seule l’utilisation des biotechnologies végétales principalement celles se rapportant aux techniques de propagation *in vitro* pourraient faire face aux défis imposés par l’ampleur des menaces actuellement recensées.

En effet, la micropropagation constitue un outil puissant permettant de maintenir, de valoriser ou d’améliorer la diversité variétale existante ou induite chez le palmier dattier (Jain, 2012 ; Bekheet, 2011 ; Johnson, 2011 ; Beckheet, 2013 a ; Al Khayri et al., 2018).

3- Propagation du palmier dattier

3-1- Propagation conventionnelle du palmier dattier

Deux types de propagation naturelle dite conventionnelle permettent de multiplier le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) :

3-1-1- Propagation sexuée par semis

Egalement appelée reproduction sexuée, la propagation par semis de graines, bien qu'utile à des fins d'amélioration génétique (car économique dans le cas de zones connaissant des problèmes de salinité ou d'infestation par le Bayoud), ne convient pas à la multiplication conforme à grande échelle (production commerciale) en raison de ce qui suit (Zaid et al, 2002 ; Jain, 2012 a et b):

- Le palmier dattier est une espèce dioïque et par conséquent la moitié de la descendance est composée de plantules mâles et l'autre moitié de plantules femelles, sans aucun moyen de déterminer à un stade précoce le sexe de la progéniture, ni la qualité du pollen ou du fruit avant la floraison. Il est à signaler ici, que des résultats prometteurs portant sur la mise au point de méthodes moléculaires de détermination du sexe à un stade précoce chez le palmier dattier ont été publiés. Nous pouvons citer les travaux de Al Mahmoud et al. (2012), Chérif et al. (2013), Intha et al. (2018) et Mohammed et al. (2019) dont les résultats obtenus n'ont pas encore été généralisés.
- Les palmiers femelles provenant de semis de graines ont une croissance extrêmement lente et une maturation sexuelle tardive (qui ne se manifeste souvent qu'à partir de la septième année) produisant par la suite des fruits de qualité variable qui est généralement inférieure à celle des palmiers parentaux.
- Les palmiers dattiers sont hétérozygotes, ce qui engendrera une variation importante au sein de la descendance augmentant ainsi les risques de la perte des caractéristiques parentales recherchées. En effet, dans une plantation issue de semis, il est rare de trouver plus de 10% des palmiers produisant des fruits de qualité satisfaisante. En d'autres termes, la propagation par semis ne permet pas d'assurer la conformité génétique.
- Les palmiers issus de semis diffèrent considérablement en ce qui concerne le potentiel de production, la qualité des fruits et le temps de récolte, ce qui rend très difficile leur commercialisation.

3-1-2- Propagation végétative par rejet

La propagation par rejets, également appelée propagation asexuée ou végétative, offre les avantages suivants (Zaid et al, 2002):

- Les palmiers issus de rejets sont génétiquement conformes aux pieds mères. En effet, les rejets se développent à partir de bourgeons axillaires au niveau de la région basale du tronc du pied mère et, par conséquent, le fruit produit après transplantation sera identique à celui produit par le pied mère permettant ainsi d'homogénéiser la production.
- Les palmiers issus de rejets produisent des fruits à partir de deux ou trois ans de plantation alors que ceux issus de graines fleurissent plus tardivement vers la cinquième année).

Cependant, la propagation par rejet, bien qu'elle permette le maintien/la sauvegarde de la conformité génétique, reste une méthode difficile, laborieuse et donc coûteuse ne permettant pas, par conséquent, de satisfaire les besoins importants en matériel végétal. En effet, nous pouvons résumer les inconvénients de la propagation du palmier dattier par rejet comme suit (Zaid et al., 2002 ; Jain, 2012 a et b) :

- La production de rejets est limitée à une courte période (une période végétative courte d'environ 10 à 15 ans) de la durée de vie totale du palmier.
- Durant cette courte période, seul un nombre limité de rejets est produit (10 à 30 rejets, au plus) selon le cultivar et les itinéraires techniques appliqués (travail du sol, irrigation et fertilisation).
- Les rejets nécessitent des soins appropriés car ils présentent souvent de faibles taux de survie après transplantation.
- L'utilisation de rejets favorise la propagation des maladies et des ravageurs du palmier dattier.

3-2- Propagation par les techniques de culture de tissus

La culture *in vitro* des tissus végétaux est un ensemble de techniques permettant la culture de cellules, de tissus, d'organes ou de leurs fragments sur des milieux de cultures synthétiques en conditions environnementales aseptiques et contrôlées (Thorpe, 2007; Loyola-Vargas et al., ; 2008). En effet, l'une des applications à l'échelle industrielle les plus largement utilisées dans plusieurs pays à travers le monde est la propagation *in vitro* (ou micropropagation) de plantes génétiquement conformes (clones) qui, autrement, seraient difficiles à propager classiquement par graines et/ou par des moyens végétatifs (Loyola-Vargas et al., 2008 ; Bhojwani et al., 2013 ; Singh, 2015).

Chez le palmier dattier les avantages de la propagation *in vitro* peuvent être résumés comme suit (Zaid et al, 2002 ; Alkhateeb, 2008 ; Ferry, 2011 ; Johnson, 2011 ; jain, 2012 a et b):

- Multiplication à grande échelle dans l'espace et dans le temps de plants génétiquement uniformes.

- Absence d'effet saisonnier sur les vitroplants car ils peuvent être multipliés dans des conditions contrôlées en laboratoire tout au long de l'année.
- Propagation rapide de cultivars femelles sains (exempts de maladies et de parasites) ou de mâles ayant un pollen supérieur avec des caractéristiques de métaxénie utiles (taille des fruits et des graines, couleur, ...).
- Propagation de clones à partir des cultivars d'élite ou résistants (au Bayoud par exemple) déjà existants ou bien issus de programmes d'amélioration génétique.
- Maintien /conservation du germoplasme existant (diversité variétale et banques de germoplasme).
- Échange facile et rapide de matériel végétal entre les différentes régions d'un pays ou entre les pays sans risque de propagation de maladies et d'organismes nuisibles.

Les techniques de micropropagation reposent sur la propriété caractéristique des cellules végétales, qu'est la totipotence. Cette dernière est définie comme étant la capacité qu'ont les cellules d'un tissu végétal déjà spécialisé, donc différencié, à perdre cette spécialisation en revenant à un état méristématique (état dédifférencié) puis se différencient de nouveau pour redonner des cellules spécialisées d'un nouveau tissu et produire par la suite une plante entière (Figure 05) (Vasil, 2008 ; Brukhin et al., 2011 ; Kumar et al., 2012).

La culture ou le développement *in vitro* des cellules et des tissus dépend de différents facteurs, tels que le génotype, le stade de développement d'un explant, l'âge et l'état physiologique d'une plante donneuse d'explant et l'environnement externe incluant la composition des milieux et les conditions de culture physique (température d'incubation, photopériode). L'interaction entre tous ces facteurs conduit à l'induction et à l'expression d'un mode spécifique de différenciation et de développement cellulaire (Figure 06) (Gaj, 2004).

Les milieux de culture utilisés en culture *in vitro* contiennent tous les nutriments nécessaires à la croissance et au développement normaux des plantes. Ils sont principalement composés d'éléments minéraux (macro et micro-éléments), de vitamines, de composants organiques (vitamines, acides aminés, ...), de régulateurs de croissance (phytohormones), de sources de carbone (saccharose, glucose, ...) et d'agents gélifiants (agar, phytigel, ...) dans le cas des milieux solides) (Loyola-Vargas et al., 2008 ; Bhatia et al., 2015).

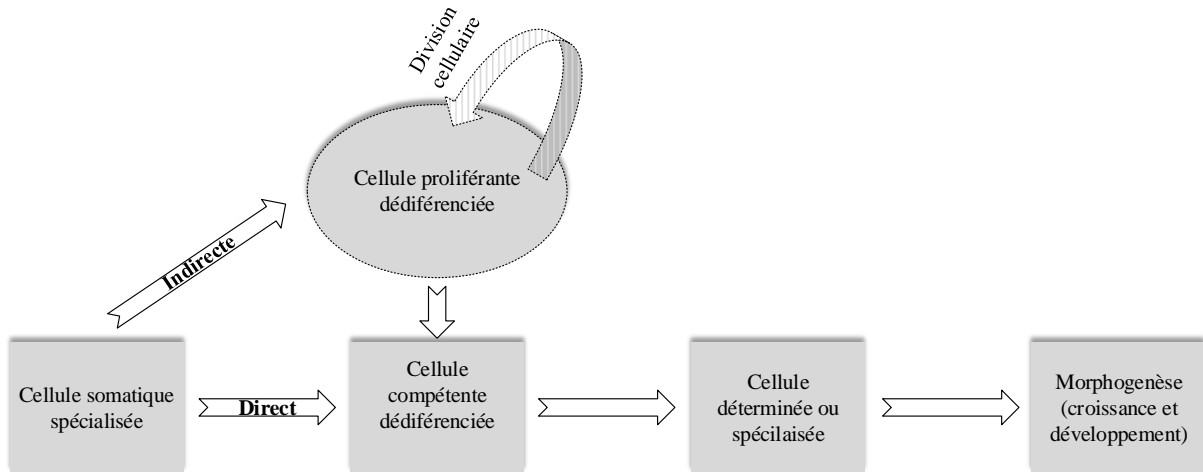


Figure 05 : Principes théoriques des voies de développement cellulaire en condition de culture *in vitro* (Loyola-Vargas et al., 2008)

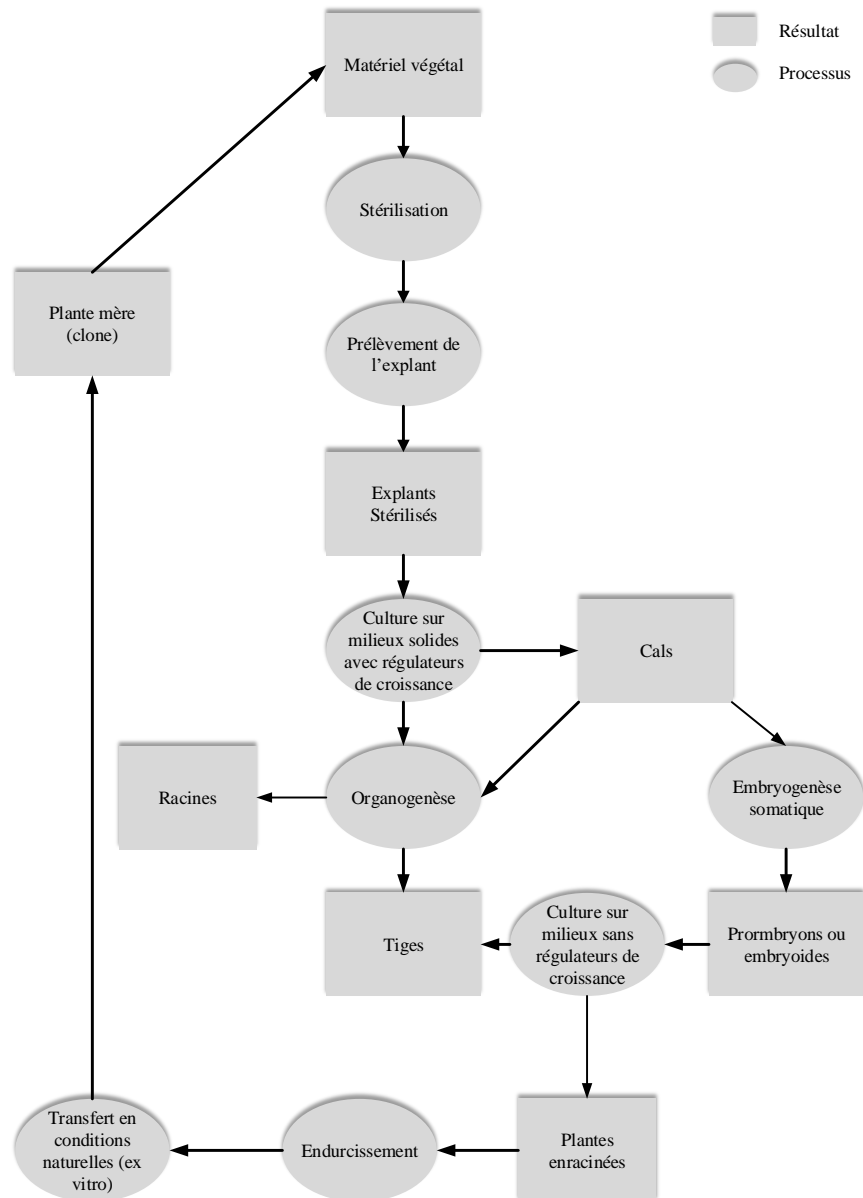


Figure 06 : Schéma théorique des techniques de propagation *in vitro* chez les végétaux (Hussain et al., 2012)

Plusieurs milieux de culture ont été mis au point mais c'est les milieux MS (Murashige et Skoog, 1962) et B5 (Gamborg et al., 1968) qui sont les plus largement utilisés pour la propagation *in vitro* de nombreuses espèces végétales. Le pH des milieux est également important car il affecte à la fois la croissance des plantes et l'activité des régulateurs de croissance des plantes. Il est ajusté à la valeur entre 5,4 – 5,8. Deux types de milieux à savoir solide et liquide peuvent être utilisés pour l'ensemble des étapes de culture. Des adjuvants tels que l'acide ascorbique, la polyvinylpyrrolidone (PVP) et le charbon actif peuvent être nécessaires pour certaines espèces qui présentent des cas extrêmes de brunissement des tissus (Bhatia et al., 2015 ; Kumar et al, 2012).

L'addition de régulateurs de croissance des plantes ou phytohormones joue un rôle essentiel dans la détermination de la voie de développement. Le type et la concentration des hormones utilisées dépendent principalement de l'espèce, du tissu ou de l'organe cultivé et de l'objectif de la culture (Hussain et al., 2012).

En effet, tous les processus importants de la croissance des plantes, du métabolisme et de leur morphogenèse sont régulés par des molécules appelées régulateurs de croissance ou phytohormones. Ces molécules sont capables d'influencer des processus cellulaires à des concentrations extrêmement faibles dans la cellule et sont produites au niveau d'emplacements proches ou distants de la cellule ciblée (Osborne et al., 2005 ; Davies, 2010).

Les régulateurs de croissance largement reconnus dans les cultures de tissus sont : les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'acide abscissique et l'éthylène. Cet usage est dû à l'ancienneté de leur découverte et à la bonne connaissance de leurs effets profonds sur la régulation de la croissance et du développement des plantes (Davies, 2010 ; Rivas-San Vicente et al., 2011).

En effet, le modèle conventionnellement retenu en culture *in vitro* et qui détermine la nature de la régénération est le rapport endogène de l'auxine et de la cytokinine. Ainsi, schématiquement il est considéré qu'un rapport relativement élevé de cytokinine /auxine ($R \geq 1$) au sein de l'explant favorise la régénération des pousses alors qu'un rapport faible en cytokinine /auxine ($R \leq 1$) conduit à la régénération des racines. Le rapport intermédiaire ou équilibré ($R \approx 1$) favorise la prolifération de cellules indifférenciées (amas de cals) (Brukhin et al., 2011 ; Hussain et al., 2012 ; Kumar et al, 2012).

Plus récemment, cette liste des phytohormones a été élargie pour inclure de nombreuses molécules endogènes de signalisation dont l'action sur le développement de la plante n'avait pas été établie auparavant (Santner et al., 2009 ; Davies, 2010 ; Dharmasiri et al., 2013 ; Smith et al., 2017).

L'une de ces nouvelles phytohormones est l'acide salicylique. Ce dernier est la parfaite illustration d'une molécule endogène de nature phénolique (acide ortho-hydroxybenzoïque) ayant de nombreux rôles au niveau de la plante. En effet, ces dernières années, l'acide salicylique a fait l'objet de recherches intensives en raison de sa fonction de signal endogène

intervenant dans les réponses de défense locales et systémiques des plantes contre les agents pathogènes. Il a été également constaté que l'acide salicylique intervient lors de la réponse des plantes aux stress abiotiques tels que la sécheresse, le refroidissement, la toxicité des métaux lourds, la chaleur, le rayonnement UV et la salinité/les stress osmotiques tout en atténuant leurs effets délétères à des degrés divers. Parallèlement à son implication lors des stress biotiques et abiotiques, l'acide salicylique joue un rôle crucial dans la régulation des processus physiologiques et biochimiques tout au long de la vie de la plante (Vlot et al., 2009 ; Rivas-San Vicente et al., 2011 ; Sharma, 2013 ; El-Esawi, 2017 ; Ahmad et al., 2019 ; Arif et al., 2020).

Deux (02) voies de biosynthèse sont admises : la voie majeure de l'isochorismate et la voie de la phénylalanine ammonia-lyase. Ainsi, une fois synthétisés, les niveaux de l'acide salicylique libre sont régulés par un certain nombre de modifications chimiques qui produisent des formes inactives stockées dans la vacuole, jusqu'à ce qu'il soit nécessaire d'activer les réponses déclenchées par l'acide salicylique (Chen et al., 2009 ; Smith et al., 2017 ; Maruri-López et al., 2019).

Dans ce sens, de nombreux travaux documentés attestent de l'effet de l'application exogène de l'acide salicylique sur de multiples aspects de la croissance et du développement des plantes comprenant la germination des graines, la croissance végétative, la floraison, le rendement en fruits, la sénescence, la fermeture des stomates, la thermogenèse, la photosynthèse, la respiration, ... (Rivas-San Vicente et al., 2011 ; Sharma, 2013 ; Maruri-López et al., 2019).

Bien que les mécanismes biochimiques qui régissent la plupart de ces processus restent à définir, l'application exogène de faibles niveaux d'acide salicylique favorisent la capacité antioxydante de la plante en conditions normales ou de stress alors que des niveaux élevés d'acide salicylique peuvent entraîner la mort cellulaire (Raskin et al., 1990 ; Kawano et al., 2004 ; Maruri-López et al., 2019 ; Koo et al., 2020).

Il convient de rappeler ici, que l'une des principales limitations de la culture *in vitro* des plantes est l'apparition de la variation dite somaclonale au niveau de la descendance multipliée (Kunert et al., 2003 ; Al-Kaabi et al., 2006 ; Bhatia et al., 2015 ; Etienne et al., 2016 ; El-Sherif et al., 2018).

Le terme « variation somaclonale » a été introduit par Larkin et Scowcroft (1981) afin d'englober les variations phénotypiques de toute nature survenant au sein d'une descendance (théoriquement) clonale appelées somaclone, générée à partir d'une seule plante mère par culture *in vitro* de tissus.

Ces variations phénotypiques peuvent être d'origine génétique (dont la transmission à la descendance suit les taux de ségrégation mendéliens) ou épigénétique (généralement réversible). Les altérations génétiques typiques sont les modifications au niveau du nombre de chromosomes (polyploïdie et aneuploïdie), de la structure des chromosomes (translocation, délétion, insertion et duplication) et de la séquence d'ADN (mutations de bases) ; alors que les

événements typiques liés à l'épigénétique sont l'amplification et la méthylation génétique (Al-Kaabi et al., 2006; Bhatia et al., 2015 ; Etienne et al., 2016).

Les somaclones (variants) se développent spontanément pendant la culture tissulaire en raison de la plasticité du génome et de sa capacité à se restructurer en réponse à des conditions exogènes ou endogènes rencontrées *in vitro* (El Hadrami et al., 2011).

En effet, plusieurs facteurs influencent l'apparition de la variation somaclonale. Nous pouvons citer ici (Jain, 2012 b ; Etienne et al., 2016; El-Sherif et al., 2018):

- Le stress oxydatif induit lors de l'excision des tissus.
- Le choix de la source du tissu de l'explant de départ.
- L'âge de la plante donneuse.
- Le passage par une phase de callogenèse.
- Le type et la concentration des régulateurs de croissance.
- Les conditions nutritionnelles et environnementales de culture appliquées.
- Le nombre de sous-cultures réalisées (âge des cultures).

Cependant malgré le risque d'apparition de somaclones, la propagation *in vitro* appliquée au palmier dattier est une méthode économiquement fiable lorsque la production est importante car elle présente de nombreux avantages indéniables par rapport aux méthodes conventionnelles de propagation (El Hadrami et al., 2009).

3-2-1- Micropropagation du palmier dattier

Depuis les premiers rapports d'études sur la régénération *in vitro* du palmier dattier (Tisserat, 1979, 1982), de nombreux chercheurs ont décrit différents protocoles portant sur la micropropagation du palmier dattier (Al Khayri et al., 2017).

Actuellement, deux techniques sont utilisées : l'organogenèse et l'embryogenèse somatique (Jain ,2012 a et b ; Mazri et al., 2015, Al Khayri et al., 2017 ; Al Khayri et al., 2018). Ces techniques peuvent être décrites comme suit :

1- Micropropagation par organogenèse du palmier dattier :

L'organogenèse végétale *in vitro* est un processus au cours duquel des organes *de novo*, tels que les bourgeons, les racines et les pousses, peuvent être produits à partir de tissus cultivés, appelés explants, sous certaines conditions physiques et chimiques (Thorpe, 1980).

Chez le palmier dattier, la technique d'organogenèse est basée sur l'exploitation des potentialités des tissus méristématiques de former de nouvelles pousses, généralement sans passer par le stade cal et avec utilisation des hormones de croissance en faibles doses produisant ainsi des vitroplants génétiquement identiques aux plantes mères (Kunert et al., 2003 ; Abahmane, 2011 ; Zaid et al.,2011 ; Bekheet, 2013).

Le plus souvent, l'efficacité de l'organogénèse chez le palmier dattier est considérée comme faible. Ceci est dû au faible nombre d'explants répondant à la culture *in vitro*, au temps long requis pour la phase d'initiation, aux faibles taux de multiplication et à la forte influence du cultivar et du milieu de culture. Aussi et malgré le contournement de la phase de callogenèse, une variation somaclonale peut survenir en raison de la faible fréquence de sous-cultures ou de l'utilisation excessive de régulateurs de croissance pour maximiser la formation de pousses. En effet, l'origine (ou la source) des bourgeons méristématiques est importante par rapport à l'uniformité des vitroplants issus de l'organogénèse. Si les bourgeons sont préexistants, alors les plantes seront génétiquement identiques, mais si les bourgeons sont nouvellement formés, la possibilité de propagation de somaclones sera inévitable (Zaid et al., 2011).

Le cycle de micropropagation par l'utilisation de la technique de l'organogénèse comprend quatre étapes consécutives : initiation, multiplication, élongation et enracinement des bourgeons méristématiques. Le succès des cultures organogènes dépend fortement de la réussite de la phase d'initiation qui reste encore problématique (Abahmane, 2011 ; Zaid et al., 2011 ; Bekheet, 2013).

En effet, la formation de bourgeons adventifs sur des explants de palmiers dattiers dépend de nombreux facteurs tels que les composants des milieux, le génotype mais aussi le temps écoulé entre la collecte des explants de départ et leur introduction en conditions *in vitro*. (El Hadrami et al., 2009 ; Zaid et al., 2011 ; Mazri et al., 2015).

2- Micropropagation par embryogénèse somatique du palmier dattier :

Appelée aussi embryogénèse asexuée, l'embryogénèse somatique est définie comme étant le processus par lequel une cellule ou un groupe de cellules somatiques, dans des conditions appropriées à l'induction, génèrent des cellules embryogènes. Ces dernières subissent une série de changements morphologiques et biochimiques et aboutissent à la production de structures bipolaires (embryons somatiques) sans connexion vasculaire avec le tissu originel. Comme pour les embryons zygotiques, les embryons somatiques ainsi produits peuvent évoluer en plantes entières par une série ordonnée de stades de développement embryonnaire caractéristiques de l'espèce (Jimenez 2001 ; Jimenez, 2005 ; Hussain et al., 2012 ; Loyola-Vargas et al., 2008 ; Rai et al., 2011 ; Solis Ramos et al., 2012 ; Sahijram et al., 2015).

Le processus de la régénération par embryogénèse somatique est conventionnellement divisé en deux étapes principales de développement cellulaire, à savoir l'induction et l'expression des capacités embryogènes (Jimenez, 2005).

Ainsi, les cellules somatiques différenciées acquièrent en premier, soit directement soit indirectement, des caractéristiques embryogènes au moyen d'une réorganisation complète de l'état cellulaire, y compris la physiologie, le métabolisme et l'expression des gènes (Fehér, 2005 ; Jiménez, 2005 ; Fehér, 2008 ; Zavattieri et al., 2010). Seules quelques cellules somatiques sont sensibles aux stimuli physiques et chimiques qui déclenchent la voie de

l'embryogenèse somatique. Ces cellules, qui représentent un état intermédiaire entre les cellules somatiques et embryogènes, sont dites compétentes (Gaj, 2004).

Il est à signaler, ici, que bien que les mécanismes impliqués dans la transition de l'état cellulaire, de somatique à embryogène, ne soient pas clairs, il s'agit en général d'un processus de dédifférenciation et d'activation de la division cellulaire qui aboutit habituellement à la formation d'un cal proembryogène (Vinãs et al., 2011).

Par la suite, les cellules ou tissus induits atteignent le stade d'expression dans lequel les cellules se différencient en embryons somatiques en passant par les stades de l'embryogenèse zygotique après un changement dans une ou plusieurs conditions de culture (milieu de culture, régulateurs de croissance végétale, source de glucides, potentiel osmotique, etc.) (Fehér, 2005 ; Jiménez, 2005 ; Fehér, 2008 ; George et al., 2008). Diverses protéines de réserve, protéines spécifiques (LEA), acides gras et sucres, tous requis pour la germination, sont synthétisés durant cette étape. Cette accumulation de réserves et le processus de dessiccation permettent aux embryons somatiques d'atteindre la maturité et de se préparer ainsi à la germination et au développement ultérieur en plantules (conversion) (Rai et al., 2011, Saleh et al., 2016).

Le succès de la mise en place réussie d'un « système d'embryogenèse somatique » repose d'une part sur le bon choix du matériel végétal (source de cellules compétentes) qui dépend du génotype, de l'âge et de l'état physiologique/développemental de l'explant et de la plante donneuse, et d'autre part, par la détermination des facteurs physiques et chimiques qui activent l'orientation vers l'embryogenèse somatique. (Gaj, 2004 ; Sahijram et al., 2015; Vinãs et al., 2011).

Chez le palmier dattier et selon une analyse bibliographique réalisée par Gantait et al. (2018) l'essentiel des travaux réalisés depuis deux décennies ont porté sur l'embryogenèse somatique indirecte c'est-à-dire à travers le passage par le stade dédifférencié « cal » où un ensemble de facteurs morphogénétiques, chimiques et physiques ont été étudiés dans le but d'optimiser les différentes étapes des protocoles de régénération. Le passage par le stade cal se fait à partir de cellules somatiques ou à partir de la régénération de culture de protoplastes (Titouh et al., 2015 ; Titouh et al., 2017).

Quatre (04) principales étapes sont largement retenues au niveau des protocoles de propagation *in vitro* par voie de l'embryogenèse somatique chez les végétaux (Jiménez 2005, Fehér 2008, George et al., 2008, Saleh et al., 2016):

- Étape (01) ou induction de la callogenèse qui correspond à l'étape de dédifférenciation du tissu somatique formant des cals primaires (pro-embryogènes).
- Étape (02) ou induction des structures embryogènes qui correspond à l'étape multiplication (prolifération) de la callogenèse primaire suivie du développement de cals secondaires (embryogènes).

- Étape (03) ou formation et maturation des embryons qui correspond à l'étape de différenciation en embryons somatiques (expression de l'embryogenèse somatique) avec accumulation des substances de réserve et dessiccation.
- Étape (04) ou conversion en plantules qui correspond à l'étape de germination des embryons somatiques et de la régénération en plantules complètes jusqu'à leur transplantation en plein champ.

Il est à signaler ici, comme pour de nombreuses espèces végétales, que la survenue d'anomalies (variations somaclonales) constitue le problème le plus grave associé à la culture de tissus du palmier dattier (Al-Kaabi et al., 2006 ; Jain, 2012 a et b). Seule l'utilisation des techniques moléculaires permet de déceler précocement l'apparition de variants afin de garantir l'uniformité génétique de la descendance issue des processus de multiplication *in vitro* (Zaid et al., 2002 ; Al-Kaabi et al., 2006 ; Kumar et al., 2010 El Hadrami et al., 2011).

Plusieurs résultats contradictoires d'études ayant pour objet la conformité génétique des plants de palmier dattier issus de l'embryogenèse somatique ont été publiés (El Hadrami et al., 2011 ; Mazri et al., 2015).

Djerbi (2000) a signalé la fructification anormale de palmiers dattiers cv Barhee dérivés de l'embryogenèse somatique tandis que Saker et al. (2000) a noté une variabilité génétique de 4% en utilisant des marqueurs RAPD au niveau de vitroplants de la variété Zaghoul.

Al-Kaabi et al. (2006) ont noté une variabilité de 0,6 % chez le cultivar Klass en utilisant les marqueurs AFLP. Quant à Saker et al. (2006), ils ont signalé respectivement 2,6, 0,79 et 1% de polymorphisme en utilisant les marqueurs AFLP chez les cultivars Sakkoty, Gandila et Bertamoda.

Un niveau plus élevé de polymorphisme a été signalé par Moghaieb et al. (2011) avec une variabilité de 37,8% chez des vitroplants du cultivar Ferhi en utilisant des amorces RAPD.

Contrairement à ces auteurs, Smith et al. (1995) n'ont pu mettre en évidence aucune anomalie chez les plants du cultivar Barhee dérivés de l'embryogenèse somatique. De même, Al-Ghamdi (1996) n'a également observé aucune différence significative dans la floraison et la nouaison des fruits lorsque deux cultivars, Thoory et Zahdi, ont été étudiés.

Kumar et al. (2010), Othmani et al. (2009 a) et Othmani et al. (2010) ont étudié la fidélité génétique de plantules dérivées d'embryogenèse somatique à l'aide d'amorces AFLP, ISSR et RAPD et ont confirmé la stabilité génétique de la descendance.

La stabilité génétique confirmée par l'utilisation des marqueurs moléculaires au niveau des travaux cités précédemment peut être expliquée par l'utilisation de faibles concentrations d'auxines (principalement du 2,4-D), par l'utilisation d'explants initiaux juvéniles mais aussi par la réduction du nombre de sous-cultures réalisées diminuant ainsi les risques d'apparition de variants (Mazri et al., 2015).

En effet, la nature du système de propagation *in vitro* utilisé peut augmenter les risques d'apparition de somaclones où on retrouve une probabilité plus élevée de produire des modifications génétiques et / ou épigénétiques chez les plantes régénérées à travers le passage par le stade cal (El-Sherif et al., 2018).

Cependant, selon El Hadrami et al. (2011), chez le palmier dattier l'aspect génotypique joue un rôle primordial. En effet, certains cultivars peuvent présenter une fidélité au génotype et produire un taux élevé de plantes conformes tandis que d'autres sont plus sujets aux variations.

Malgré le risque de variabilité génétique et qui pourrait être à l'origine de l'expression d'un nouveau trait potentiellement intéressant tel que la résistance à une maladie, l'approche la plus avantageuse est de loin la micropropagation par la voie de l'embryogenèse somatique, (Zaid et al., 2002 ; Al-Kaabi et al., 2006, Kumar et al., 2010 ; El Hadrami et al., 2011 ; Jain, 2012).

Par ailleurs, l'établissement de protocoles fiables, simples et reproductibles de régénération *via* l'embryogenèse somatique du palmier dattier permet non seulement de produire à grande échelle des vitroplants à des fins de production et/ou de conservation du pool génétique existant mais aussi constitue un outil puissant permettant la mise en œuvre de programmes de création variétale (fusion de protoplastes, mutagenèse, variation somaclonale , transgénèse) vis-à-vis d'agents biotiques et abiotiques (Jain, 2012 a et b ; Al Khayri et al, 2017 ;Al Khayri et al, 2018).

3-2-2- Etapes de la propagation par embryogenèse somatique

Largement étudiée chez le palmier dattier, la régénération *via* l'embryogenèse somatique est considérée comme l'outil le plus puissant permettant d'atteindre une production à grande échelle (Fki et al, 2011 ; Jain et al., 2011 ; Mazri et al., 2015).

A cette fin, les étapes qui sont largement retenues pour la propagation *in vitro* par l'embryogenèse somatique indirecte (passage par le stade cal) chez le palmier dattier peuvent être présentées comme suit (Mazri et al., 2015 ; Saleh et al., 2016 ; Al Khayri et al., 2017 ; Al Khayri et al., 2018):

- Etape (01) ou initiation et multiplication de la callogenèse :

L'initiation de cals ou callogenèse à partir d'explant primaire (cellule différenciée, fragment de tissus ou d'organes) constitue l'étape initiale indispensable à l'établissement de nombreux protocoles de régénération *in vitro* *via* l'embryogenèse somatique. Elle représente la conséquence directe de l'action combinée du stress subi lors de la séparation de l'explant primaire et des conditions de culture *in vitro* appropriées (Ikeuchi et al., 2013 ; Fehér et al., 2015).

En culture *in vitro* de tissus végétaux, le cal est défini comme étant une masse cellulaire proliférante inorganisée avec des loci méristématiques ou dédifférenciés plus au moins aptes à

régénérer des plantes entières (Loyola-Vargas et al., 2008 ; Ikeuchi et al., 2013 ; Fehér et al., 2015). En d'autres termes, le cal comprend des cellules ayant différents degrés de différenciation où il est souvent admis que les cals peuvent être multipliés en tant que tissu non organisé pendant une période illimitée par des transferts périodiques sur du milieu frais (Bhojwani et al., 2013 ; Ikeuchi et al., 2013).

L'hétérogénéité cellulaire du cal est dérivée des explants multicellulaires utilisés pour initier les cultures de cals et / ou induite par les conditions de culture. Ainsi, les cals du même explant peuvent présenter des variations considérables en ce qui concerne la couleur, la texture, la compacité, la quantité d'eau et le potentiel chimiosynthétique et morphogène (Loyola-Vargas et al., 2008 ; George et al., 2008 ; Bhojwani et al., 2013).

Dans la pratique, il est généralement facile de faire la distinction entre les cals embryogènes et non embryogènes en fonction de leur morphologie et de leur couleur. (Loyola-Vargas et al., 2008 ; George et al., 2008 ; Bhojwani et al., 2013).

Chez le palmier dattier, le processus d'initiation de la callogenèse embryogène est très lent. Ceci est principalement dû à la nature arborescente de la plante. Le processus d'initiation et de prolifération des cals embryogènes dépend de divers paramètres tels que le génotype, la source de l'explant, les hormones végétales et les conditions de culture (Al Khayri et al., 2017).

Plusieurs types d'explants, selon leur source, ont été testés afin d'initier les cultures chez le palmier dattier. Cependant deux sources d'explants sont retenues dans la majorité des protocoles : inflorescences immatures et explants issus du sommet du cœur de rejets (Gantait et al., 2018). Les explants prélevés (toutes origines confondues) doivent subir un processus de désinfection avant la mise en culture (El Hadrami et al., 2009 ; Mazri et al., 2015 ; Al Khayri et al., 2017, Gantait et al., 2018).

L'initiation de la callogenèse embryogène chez le palmier dattier, nécessite de fortes doses d'auxines et ceci indépendamment du type d'explant utilisé (Al Khayri et al., 2017).

Durant cette première étape de culture, les explants mis en culture sont placés dans l'obscurité à une température de 25 ± 2 C°. L'entretien et la multiplication de la masse de cals embryogènes se fait par des transferts périodiques sur milieux frais solides ou bien liquides (Loutfi et al., 2005 ; El Hadrami et al., 2009 ; Mazri et al., 2015 ; Al Khayri et al., 2017).

De nombreuses espèces végétales (principalement les espèces ligneuses) cultivées *in vitro* présentent des brunissements au niveau des explants et des milieux de culture causant dans les cas les plus extrêmes la nécrose des explants. Ce phénomène est le résultat de l'oxydation des phénols produits par les explants en réponse aux conditions de culture, notamment la lumière (Al Khateeb, 2008 ; Bhojwani et al., 2013 ; Bhatia et al., 2015).

L'intensité du phénomène de brunissement dépend de la variabilité inter et intra-spécifique des plantes mères ou donneuses, de l'âge du tissu (les tissus plus âgés montrent plus de

brunissement), de la saison d'initiation des cultures et de la composition des milieux et des conditions physiques de culture (Bhojwani et al., 2013). Chez le palmier dattier, ce phénomène est un problème fréquent et un des principaux obstacles à la réussite des processus de régénération *in vitro* (Loutfi et al., 2005 ; Zaid et al., 2011).

Semblables à d'autres systèmes végétaux, des différences ont été constatées entre les génotypes de palmier dattier en termes de potentiel embryogène qui se traduisent par des variations des teneurs en composés phénoliques, de protéines et de peroxydases. En effet, les cultures embryogènes de palmier dattier se caractérisent généralement par une accumulation de polyphénols qui indiquerait une acquisition d'un potentiel embryogène. Parallèlement, une augmentation de l'activité de certaines isoformes de peroxydases peut également être observée, entraînant l'apparition du phénomène de brunissement des tissus (Baaziz et al. 1994 ; El Hadrami et al., 1995 ; Al Khateeb, 2008 ; El Hadrami et al., 2009 ; Fki et al., 2011 ; Abahmane, 2011).

Pour y remédier, l'ajout du charbon actif ou d'autres antioxydants tels que la PVP et l'acide ascorbique aux milieux de culture est essentiel en raison de la capacité des tissus du palmier dattier à s'oxyder rapidement. Par ailleurs, l'adoption de certaines mesures préventives est recommandée à savoir: la collecte du matériel végétal initial pendant les saisons d'hiver et de printemps, l'incubation des explants en condition d'obscurité au cours des premiers mois de culture, l'utilisation d'explants de petite taille issus de tissus juvéniles (tissus moins lignifiés) et les transferts fréquents sur du milieu frais (Zaid et al., 2002 ; Al Khateeb, 2008 ; El Hadrami et al., 2009 ; Zaid et al., 2011 ; Fki et al., 2011 ; Mazri et al., 2015).

Chez le palmier dattier, la durée nécessaire à l'établissement de la callogenèse embryogène reste importante et peut varier de quelques mois à plusieurs mois avec des variations importantes du potentiel embryogénique des cals obtenus. Ces fluctuations sont le résultat de la combinaison entre plusieurs facteurs : le type d'explant (nature et état physiologique), les conditions nutritionnelles (régulateurs de croissance, type et nature des milieux de culture, source de carbone et additifs tels que le charbon actif), les conditions environnementales de culture (température et luminosité) et le facteur génotypique. En effet, des différences importantes ou significatives entre cultivars ont souvent été constatées chez le palmier dattier (El Hadrami et al., 2009 ; Mazri et al., 2015 ; Saleh et al., 2016 ; Al Khayri et al., 2017, Gantait et al., 2018).

- Etape (02) ou induction de l'embryogenèse somatique :

Durant la première étape de culture, les cellules somatiques acquièrent des caractéristiques embryogènes au moyen d'une réorganisation complète de l'état cellulaire, y compris la physiologie, le métabolisme et l'expression des gènes qui aboutissent à des cals embryogènes après un changement dans une ou plusieurs conditions de culture. En d'autres termes, la compétence embryogénique est exprimée au niveau d'une cellule unique ou d'un groupe de cellules dédifférenciées capables de se différencier en embryons si elles reçoivent des inducteurs de différenciation (Fehér, 2005 ; Jimenez, 2005 ; Quiroz-Figueroa et al., 2006).

Deux catégories de conditions inductives sont maintenant reconnues : régulateurs de croissance végétale (niveaux cellulaires internes et / ou externes) et facteurs de stress (choc osmotique, stress hydrique, ions de métaux lourds, altérations du pH du milieu de culture, traitements par choc thermique ou froid, hypoxie, antibiotiques, rayons ultraviolets et traitements mécaniques ou chimiques) (Jimenez, 2005 ; Zavattieri et al, 2010).

Chez le palmier dattier, l'induction de l'embryogenèse somatique est réalisée à partir de cals nodulaires plus ou moins friables mis en culture sur milieux gélosés ou liquides et ceci en l'absence ou en présence de faibles doses de régulateurs de croissance et sous des conditions d'obscurité ou de faible luminosité (Abul-Soad, 2011 ; Mazri et al., 2015, Al Khayri et al., 2017 ; Gantait et al., 2018 ; Mazri et al., 2019).

- Etape (03) ou maturation des embryons somatiques :

Cette étape fait suite à l'expression de l'embryogenèse somatique et se manifeste visuellement par l'apparition d'embryons somatiques à différents stades de développement au niveau des amas de cals ou au niveau des suspensions cellulaires. (Fki et al., 2003 ; Sané et al., 2006 ; Mazri et al., 2019).

Différentes approches sont poursuivies durant cette étape (modification de la composition des milieux de culture, addition d'agents osmotiques, dessiccation,...) mais dont l'objectif principale est de favoriser l'accumulation de réserves telles que les protéines nécessaires à la conversion ultérieure en plantules (Fki et al., 2003 ; Sané et al., 2006 ; Sghaier et al., 2009 ; Sghaier et al., 2010 ; Mazri et al., 2015 Shareef et al., 2016 ;).

Deux types de milieu sont utilisés à savoir le milieu gélosé et le milieu liquide agité. Ce dernier type constitue une alternative puissante car il permet l'établissement de suspensions cellulaires qui sont définies comme étant des suspensions plus ou moins homogènes d'agrégats de cellules en division rapide dispersées dans un milieu liquide agité (aéré) (George et al., 2008 ; Loyola-Vargas et al., 2008 ; Bhojwani et al., 2013).

L'utilisation du milieu liquide pour le développement des embryons somatiques est plus avantageuse par rapport à l'utilisation du milieu solide ou gélosé. En effet, les agrégats de cellules plus ou moins homogènes cultivées en milieu liquide aboutissent rapidement à des taux de multiplication et de croissance importants en raison d'une absorption uniforme et rapide (grâce aux grandes surfaces cellulaires directement en contact avec le milieu) et d'une assimilation plus efficace de l'eau et des éléments nutritifs contrairement au milieu solide qui génère des gradients de concentration ralentissant ainsi la croissance. De plus, les inhibiteurs de croissance sécrétés tels que les composés phénoliques sont rapidement dilués à des niveaux inoffensifs minimisant ainsi leur incidence sur la croissance (Ascough et al., 2004 ; Gupta et al., 2005 ; Mehrotra et al., 2007 ; Al Khateeb et al., 2014).

Parallèlement à l'amélioration de l'expression des potentialités embryogènes, l'utilisation du milieu liquide agité à travers la mise en place de suspensions cellulaires permet d'observer les différents stades de développement de l'embryon somatique chez le palmier dattier : Trois (03)

stades bien distincts allant de l'état globulaire typique au stade mature parfaitement différencié et structuré ont été identifiés par Fki et al. (2001 ; 2011) :

- Stade (01) ou stade globulaire (juvénile) qui est discernable après une semaine de culture en suspension où on peut observer la différenciation de minuscules masses en globules, parfaitement sphériques, dont les futurs méristèmes caulinaires et racinaires ne sont pas encore reconnaissables.
- Stade (02) ou stade post-globulaire (globulaire mature) qui peut être repéré au-delà de la deuxième semaine de culture. Les embryoïdes, en début de développement, laissent apparaître une légère invagination conduisant à des structures rappelant le stade cœur chez les Dicotylédones. Ces embryoïdes (proembryons) sont caractérisés par une symétrie sensiblement axiale car le développement du cotylédon à l'origine de la feuille cotylédonnaire est encore très faible.
- Stade (03) ou stade embryon structuré qui prend forme à partir de la cinquième semaine de culture en suspension. Le développement du cotylédon à l'origine de la feuille cotylédonnaire est très important. Le méristème racinaire, bien visible, ne se montre pas encore très actif compte tenu du faible développement de la racine.

- Etape (04) ou germination des embryons somatiques structurés en vitroplants :

La germination des embryons somatiques structurés de palmier dattier est réalisée sur un milieu gélosé en absence ou en présence de faibles doses d'hormones de croissance. Cependant, les pourcentages de germination obtenus par de nombreux auteurs sont encore faibles nécessitant des efforts de recherche dans ce domaine (El Hadrami et al., 2009 ; Jain, 2012 a et b ; Mazri et al, 2015 ; Saleh et al.2016 ; Al Khayri et al, 2017).

La germination des embryons somatiques structurés chez le palmier dattier se manifeste à travers l'apparition de la 1^{ère} feuille à la suite à la fissuration de la feuille cotylédonnaire d'où elle émerge suivie par un début d'élongation de la racine suite à l'entrée en activité du méristème racinaire marquant la naissance d'une jeune plante structurée.

Le développement des deux types de méristèmes est asynchrone. En effet, Le méristème caulinaire, prenant généralement le pas sur le méristème racinaire, donne naissance à une plante dont la partie aérienne est très bien développée. Le cas opposé débouche, en général, sur le blocage du méristème caulinaire dont la croissance semble être inhibée par le démarrage précoce du méristème racinaire. De nombreux embryons sont ainsi perdus (Fki et al., 2001).

De plus, ces pertes sont accentuées par l'apparition du phénomène de vitrification ou d'hyperhydricité. En effet, les explants (cals, embryons somatiques ou vitroplants) évoluant en *in vitro* dans des conditions hétérotrophiques (milieux de culture synthétiques) combinées à un environnement très humide, présentent des anomalies morphologiques, anatomiques, physiologiques et métaboliques importantes. (Ascough et al.,2004 ; Bhojwani et al., 2013 ; Bhatia et al., 2015).

Chez le palmier dattier, la vitrification (l'hyperhydricité, hyperhydrie) se manifeste par une apparence vitreuse, translucide ou gonflée des préembryons et embryons structurés suite à l'accumulation excessive de l'eau compromettant par la suite tout développement ultérieur (Fki et al., 2001 ;Zouine et al., 2007 ; Zouine et al, 2005 ; Sidky et al., 2013 ; El-Dawayati et al., 2017).

Selon Al Khateeb (2008), la vitrification chez le palmier dattier est le résultat de la combinaison de plusieurs facteurs : utilisation de milieux liquides, utilisation de fortes concentrations d'hormones végétales et / ou en ions d'ammonium, présence d'humidité élevée et de gaz, en particulier d'éthylène, à l'intérieur des tubes de culture.

Afin de réduire l'impact du phénomène de vitrification, certaines mesures peuvent être mises en œuvre telles que l'utilisation de milieux solides, la réduction des concentrations de régulateurs de croissance et en ions d'ammonium, l'augmentation de la concentration en gélose (Abahmane, 2011 ; Alkhateeb, 2008 ; Mazri et al., 2015 ; Khokhar et al.,2017).

Au final, la qualité des vitroplants obtenus ainsi que leur aptitude à se développer normalement lors des étapes ultérieures d'endurcissement et d'acclimatation dépendent fortement des conditions nutritionnelles et environnementales *in vitro* subis au cours du processus de régénération (Hazarika et al., 2006 ; Chandra et al., 2010 ; Hassan et al., 2014 ; Gantait et al, 2018).

CHAPITRE II :

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

1- Matériel végétal

Notre travail expérimental a été initié à partir de rejets de cultivars collectés au niveau des palmeraies du Sud-Est (Biskra) et du Sud-Ouest (Adrar) (Tableau 03).

Toutes les étapes de culture sont réalisées en respectant les mesures nécessaires d'asepsie liées aux techniques de culture *in vitro*. Ces mesures consistent à stériliser les récipients de culture *in vitro* et les milieux de culture mais également à désinfecter l'outillage et les hottes avant toute manipulations du matériel végétal.

Tableau 03 : Caractéristiques du matériel végétal initial utilisé.

Cultivars	Origine géographique	Poids (kg)	Type de dattes	Sensibilité au Bayoud
Deglet Nour femelle (DNF)	Biskra (Tolga)	5	Demi-molle	Sensibles
Deglet Nour mâle (DNM)		4	-	
Ghers (GR)		3	Molle	
Takerbucht (TK)	Adrar	5	Demi-molle	Résistant

2- Stérilisation et dissection du matériel végétal

La stérilisation ainsi que la dissection du matériel végétal sont effectuées conjointement (stérilisation de surface) permettant au final d'isoler la partie apicale du cœur du rejet. Cette dernière renferme le méristème apical, les ébauches foliaires, les bourgeons axillaires ainsi que la base des jeunes feuilles.

Pour chacun des rejets collectés, le déroulement de la stérilisation-dissection se déroule selon les étapes suivantes (Planche 01) :

- Elimination à l'aide d'une scie et d'un sécateur de la partie racinaire, des palmes épineuses ainsi que leurs gaines fibreuses jusqu'aux deux dernières palmes protégeant les parties tendres du cœur du rejet.
- Rinçage de la partie du cœur du rejet extraite à l'eau du robinet.
- Immersion de la partie apicale du cœur du rejet dans la solution de stérilisation (150 mg/L de HgCl₂) durant une (01) heure sous hotte à flux laminaire.
- Nettoyage et élimination des deux dernières palmes apparentes à l'aide de pince et scalpel.
- Immersion une deuxième fois dans la solution de stérilisation pendant une (01) heure.
- Rinçage trois (03) fois de suite à l'eau distillée stérile.
- Nettoyage et élimination des parties brunies suite à l'action du HgCl₂ à l'aide de pince et scalpel.
- Fragmentation aléatoire de la partie apicale extraite du cœur du rejet en explants de 0,5 cm³.

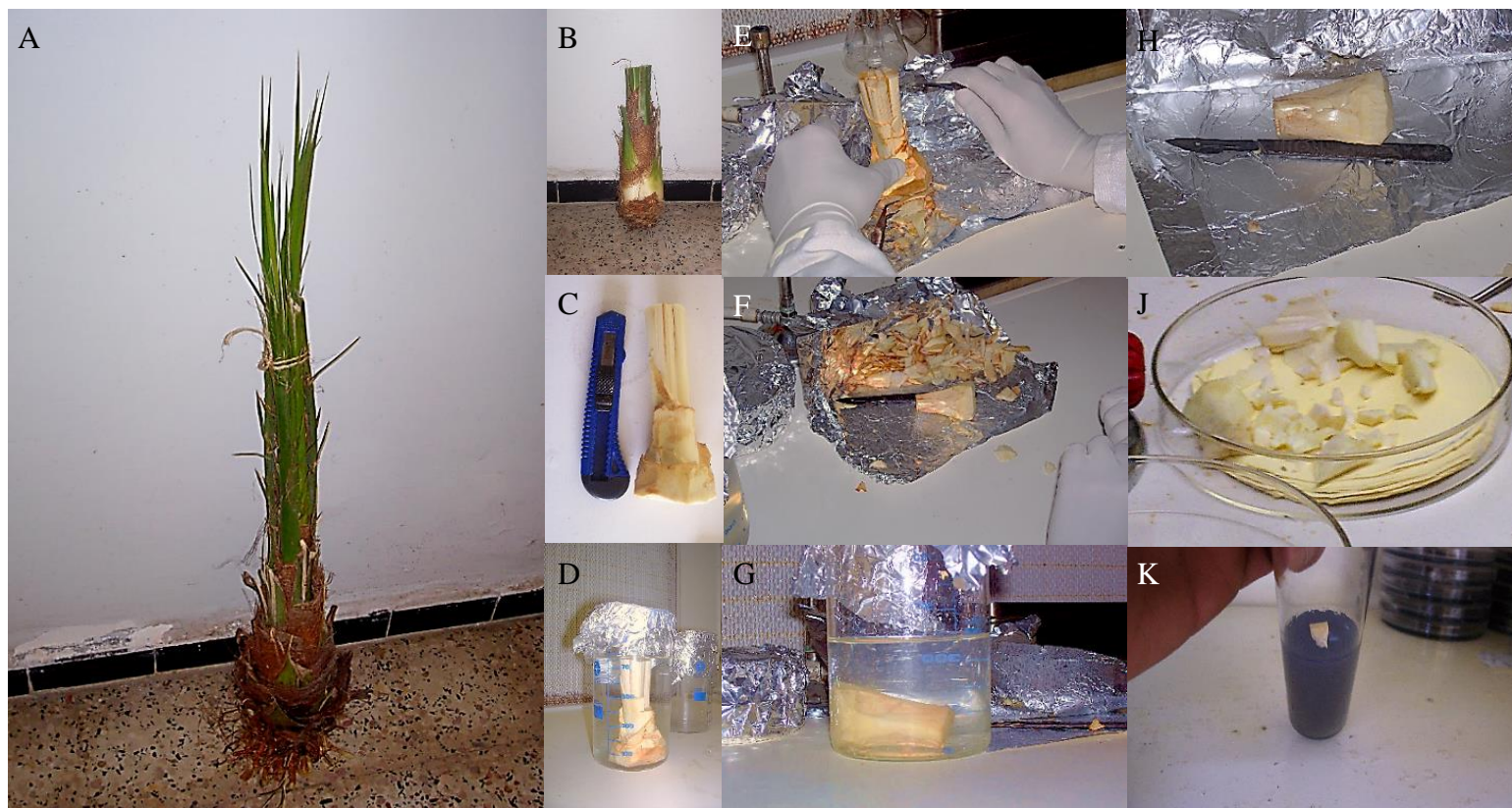


Planche 01 : Stérilisation et dissection du matériel végétal.

- A :** Rejet du cultivar Deglet Nour d'un poids d'environ 5 kg.
- B :** Elimination de la partie racinaire et la partie supérieure des palmes
- C :** Elimination des palmes épineuses et des gaines fibreuses jusqu'aux deux dernières palmes protégeant les parties tendres du cœur du rejet.
- D :** Immersion de la partie apicale du cœur du rejet dans la solution de stérilisation.
- E et F :** Nettoyage et élimination des deux dernières palmes apparentes.
- G :** Immersion une deuxième fois dans la solution de stérilisation.
- H :** Nettoyage et élimination des parties brunies suite à l'action du $HgCl_2$
- J :** Fragmentation aléatoire de la partie apicale extraite du cœur du rejet en explants de $0,5\text{ cm}^3$.
- K :** Mise en culture des explants.

3- Initiation de la callogenèse primaire

3-1- Protocole expérimental

Le protocole expérimental adopté durant la première étape de culture dont l'objectif est l'initiation de la callogenèse primaire est décrit au niveau de la figure 07.

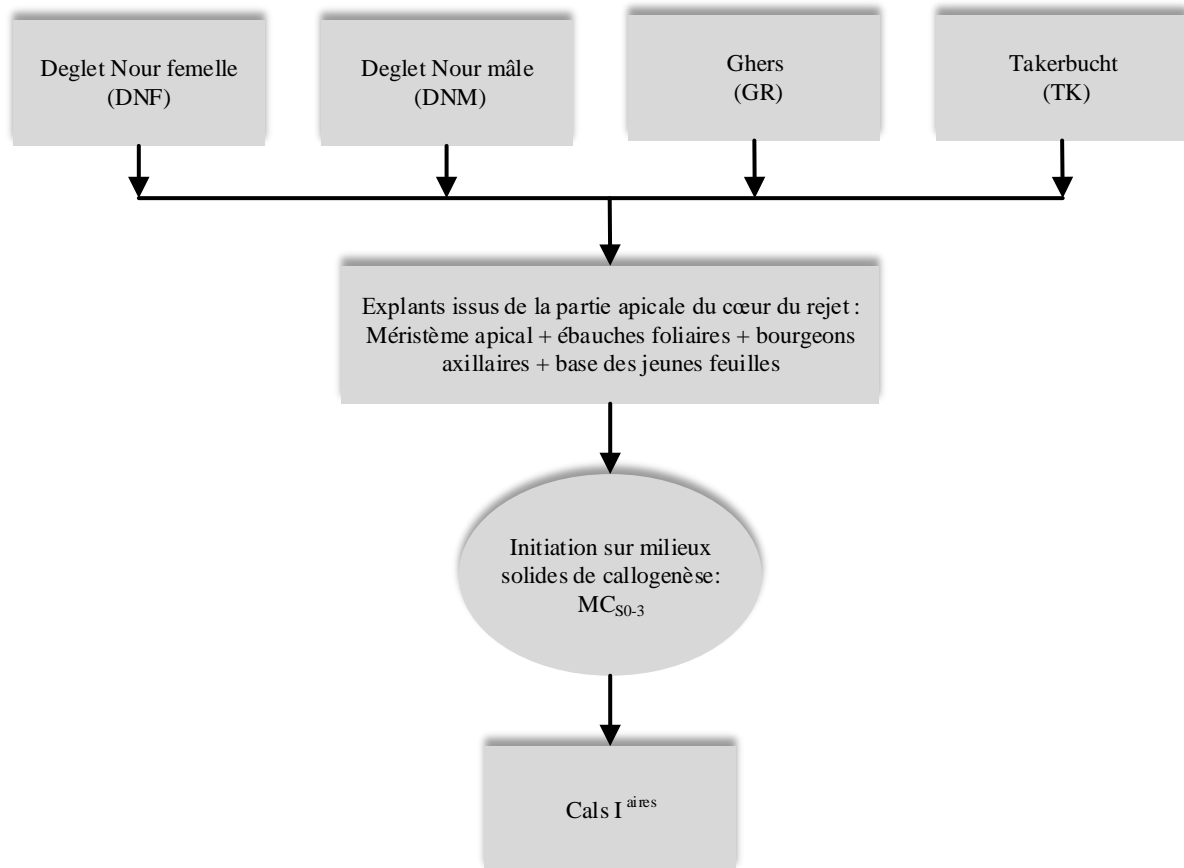


Figure 07 : Protocole adopté lors de l'initiation de la callogenèse primaire à partir d'explants préalablement stérilisés issus du cœur de rejet de quatre (04) cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.).

3-2- Conditions de culture

En vue d'initier la callogenèse, les explants de 0,5 cm³ isolés et stérilisés sont répartis dans des tubes à essais standards (160 x 24 x 1,2 mm) contenant 20 mL de milieu de culture solide. Ce dernier dont la composition de base est celle de de Murashige et Skoog (MS) (1962) modifié par Tisserat (1979) (Tableau 05) est additionné des éléments suivants (Tableau 04) :

- Additifs organiques : myo-inositol, L-glutamine, adénine.
- Source de carbone ou carbohydrates : saccharose.
- Auxine: 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D).
- Cytokinine : 6-benzylaminopurine (BAP).
- Agent adsorbant de polyphénols : charbon actif.
- Agent gélifiant : agar (Sigma–Aldrich®).

Les régulateurs de croissance sont apportés au milieu de base MS modifié sous forme combinée : 2,4-D /BAP (mg/L). Au total, quatre (04) combinaisons sont appliquées : 0/0, 5/1, 10/1, 50/1. Le charbon actif est additionné au milieu à raison de 30 mg/mg de 2,4-D (Tableau 05). Le pH est ajusté à 5,8 avant l'addition de l'agent gélifiant (Tableau 06).

Les explants sont mis en culture à raison d'un explant par tube à essais et numérotés (minimum 12/traitement/ cultivar) afin de réduire les risques de contamination (Tableau 07). Ainsi, chaque explant (ou tube à essais) sera à l'origine d'une souche qui sera évaluée tout au long des différentes étapes de culture.

L'ensemble des cultures ainsi réalisées sont placées dans l'obscurité à une température de $27^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tableau 04: Composition du milieu de base MS modifié par Tisserat (1979).

Composition	Eléments	Concentration (mg/L)
Macroéléments	KNO ₃	1900
	NH ₄ NO ₃	2000
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	440
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	270
	Na H ₂ PO ₄	170
Microéléments	MnSO ₄ , 4H ₂ O	22,3
	ZnSO ₄ , 4H ₂ O	8,6
	H ₃ BO ₃	6,2
	KI	0,83
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025
Fe-EDTA	Na ₂ EDTA	37,25
	FeSO ₄ , 7H ₂ O	27,85
Vitamines	Glycine	2
	Pyridoxine	0,5
	Acide nicotinique	0,5
	Thiamine HCl	0,1

Tableau 05 : Combinaison des régulateurs de croissance testés sur les explants pour chacun des cultivars mis en culture.

Traitements	MC _{S0}	MC _{S1}	MC _{S2}	MC _{S3}
Rapports : 2,4-D /BAP	0	5	10	50
2,4-D (mg/L)	0	5	10	50
BAP (mg/L)	0	1	1	1
Charbon actif (mg/L) (30mg de C.A. pour 1mg/L de 2,4 –D)	0	150	300	1500

Tableau 06 : Composition du milieu de culture solide (MC_S) pour l’initiation de la callogenèse.

Composition	MCS
Macroéléments	Milieu de base MS modifié par Tisserat (1979)
Microéléments	
Fe-EDTA	
Vitamines	
Myo-inositol (mg/L)	
L-Glutamine (mg/L)	100
Adénine (mg/L)	40
Saccharose (g/L)	45
Charbon actif	30mg pour 1mg 2,4-D
2,4-D /BAP (mg/L)	0/0,5/1, 10/1, 50/1
Agar (g/L)	7

Tableau 07 : Nombre d’explants mis en culture pour chaque cultivar étudié et des balances hormonales testées.

Cultivars	Traitements			
	MC _{S0}	MC _{S1}	MC _{S2}	MC _{S4}
Deglet Nour femelle (DNF)	16	16	16	16
Deglet Nour mâle (DNM)	13	13	13	13
Ghers (GR)	12	12	12	12
Takerbucht (TK)	13	13	13	13

3-3- Paramètres considérés

Un bilan a été établi à la fin des deux premiers mois de culture. Les observations ont porté sur :

- les contaminations,

- les brunissements,
- la callogénèse induite primaire au niveau des explants mis en culture.

4- Gestion de la callogénèse secondaire

4-1- Entretien de la callogénèse secondaire sur milieux solides

4-1-1- Protocole expérimental

Le protocole expérimental adopté durant la deuxième étape de culture, dont l'objectif est l'entretien et la multiplication des cals initialement induits est décrit au niveau de la figure 08.

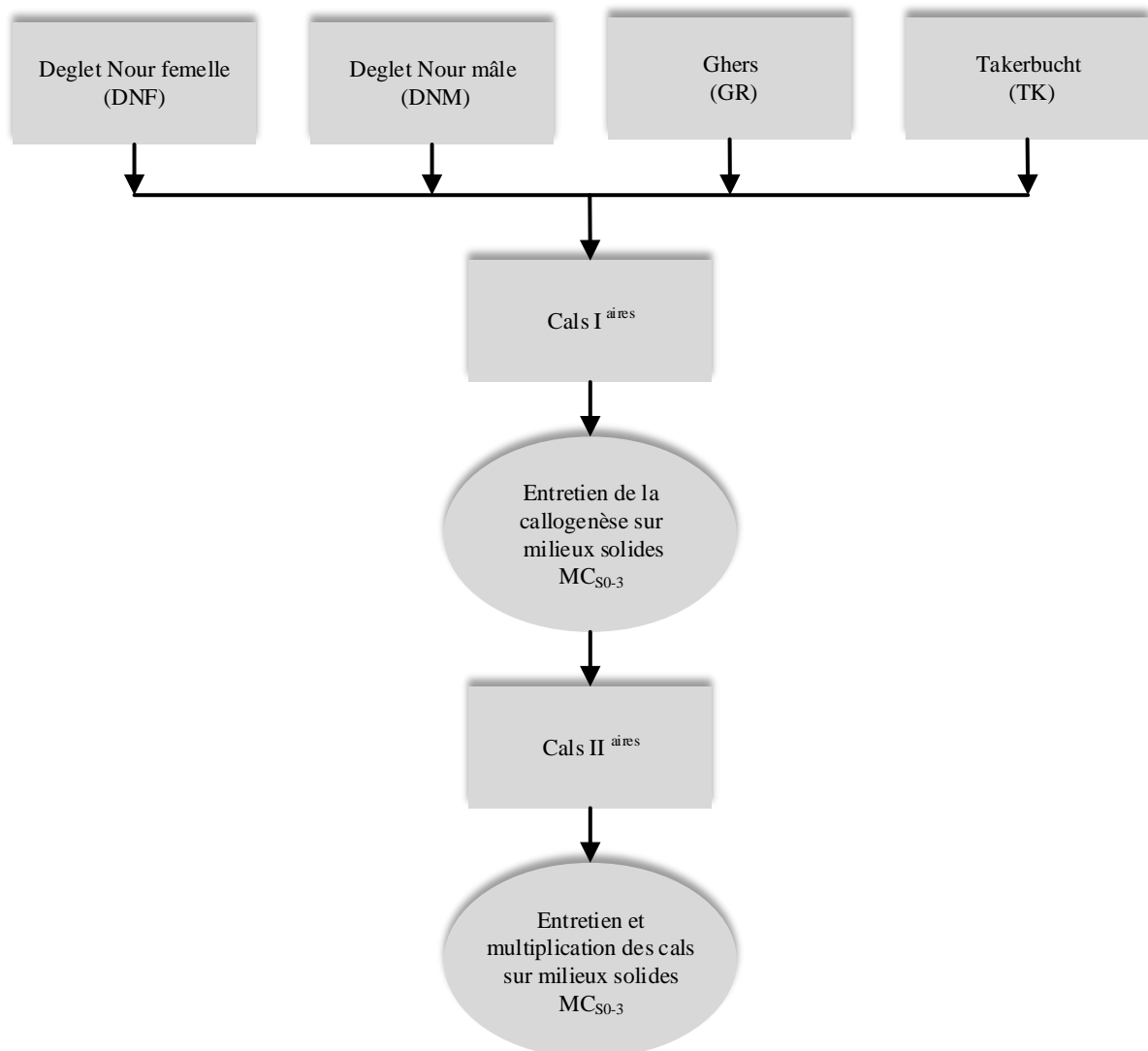


Figure 08: Protocole adopté lors de l'entretien des cals secondaires induits au niveau des explants des quatre (04) cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) sur milieux solides

4-1-2- Conditions de culture

L'ensemble des explants, avec ou sans callogénèse, issus de la phase précédente sont repiqués sur milieux frais tous les (02) deux mois avec à chaque fois :

- Fragmentation des cals lorsque leur volume recouvre la totalité de la surface du milieu contenu dans les tubes à essais standard utilisés (160 x 24 x 1,2 mm).
- Elimination des explants nécrosés résultant d'une absence ou d'un arrêt de développement.
- Elimination des tubes contaminés.

L'ensemble des cultures est soumis aux mêmes conditions hormonales et nutritionnelles de culture (milieux de culture solides MC_S) et environnementales (température et obscurité) décrits précédemment avec transfert sur milieux frais tous les deux (02) mois.

4-1-3- Paramètres considérés

Les observations réalisées durant quinze (15) subcultures ayant succédé à la phase de l'induction (30 mois) ont permis l'établissement d'un bilan avant chaque transfert portant sur le nombre d'explants caractérisés par une callogenèse nodulaire (secondaire) potentiellement embryogène pour chaque balance hormonale testée et pour tous les cultivars étudiés.

4-2- Multiplication des cals secondaires en milieu liquide agité

4-2-1- Protocole expérimental

L'objectif de cette phase de culture est d'accroître la multiplication de la masse de cals nodulaires en milieu liquide agité. Le protocole expérimental adopté est décrit au niveau de la figure 09.

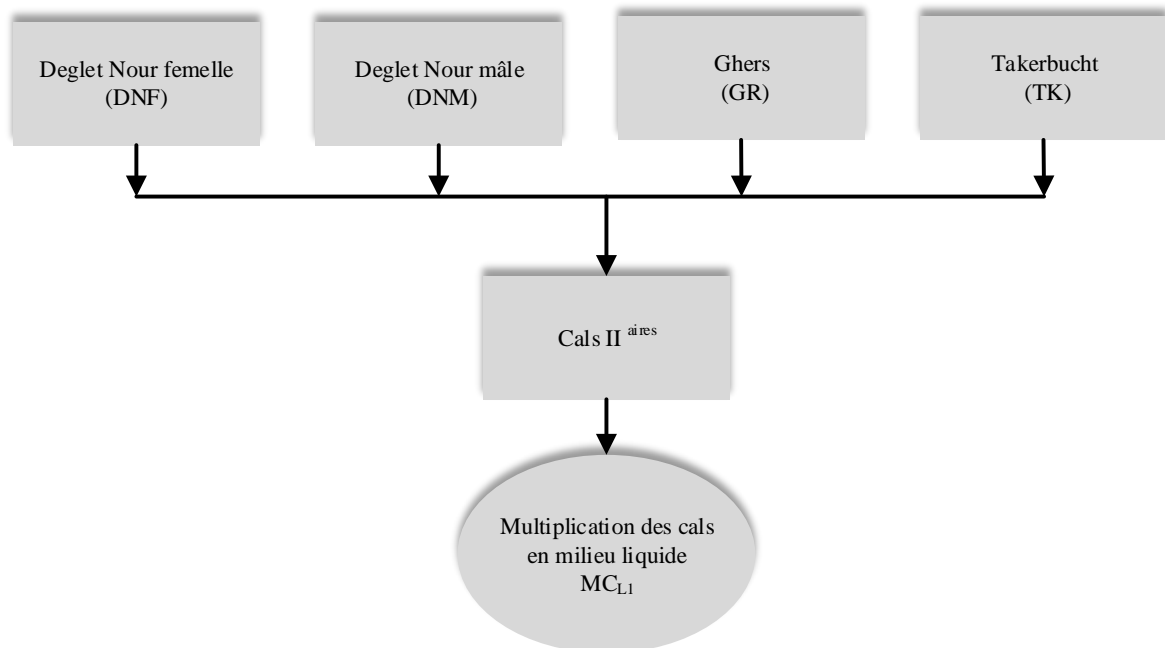


Figure 09 : Protocole adopté lors de la multiplication des cals secondaires induits sur les explants issus de quatre (04) cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) en milieu liquide agité

4-2-2- Conditions de culture

Au terme de douze (12) mois de culture sur le milieu solide de callogenèse (MCs) et afin d'accroître la multiplication de la masse de cals nodulaires, l'utilisation d'un milieu liquide agité (MC_L) est retenue. Ce dernier est de même composition de base que celle ayant permis l'induction des cals nodulaires mais avec des modifications. Celles-ci sont détaillées dans le tableau 08.

Tableau 08 : Modifications apportées à la composition du milieu de culture pour la multiplication des cals en milieu liquide agité (MC_L).

Composition	MC _L
Macroéléments modifiés (MS)	½ MS
Microéléments (MS)	½ MS
Fe-EDTA (MS)	½ Fe-EDTA
Charbon actif (mg/L)	300
2,4-D /BAP (mg/L)	1/0
Agar (g/L)	0

La mise en culture a été réalisée comme suit :

- Peser 0,5 g de cals présentant une nodulation réactive (intense) obtenus en milieu solide.
- Fragmenter légèrement les cals nodulaires dans des boîtes de Pétri stériles à l'aide d'un scalpel.
- Introduire les cals fragmentés dans des Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu liquide d'amplification (MC_L). Quatre flacons pour chacun des cultivars étudiés ont été lancés (Planche-B).
- Placer l'ensemble sur un agitateur horizontal réglé à une vitesse de 100 rotations par minute (rpm), sous une photopériode de type jours longs et une température de 27°C ±2.
- Renouveler le milieu liquide au bout de 4 semaines de culture.
- Retransférer au bout de huit semaines de culture les cals nodulaires amplifiés après dessiccation d'une durée de deux heures sous hotte à flux laminaire, sur le milieu solide (MCS) ayant permis leur initiation et placer l'ensemble à l'obscurité et à une température de 27°C ± 2.

4-2-3- Paramètres considérés

Des pesées sont effectuées à l'introduction, au renouvellement du milieu (après un mois) et avant le retour sur milieux solides (après deux mois). Les données ainsi collectées ont permis de calculer le facteur de multiplication (poids final/poids initial) pour chacun des cultivars étudiés.

5- Embryogenèse somatique

Dans le but d'améliorer les différentes phases de l'embryogenèse somatique chez les quatre cultivars de palmier dattier étudiés, notre travail expérimental s'est déroulé comme suit :

5-1- Application de l'acide salicylique au cours de l'embryogenèse somatiques chez le cultivar Deglet Nour

L'objectif durant cette première étude est d'étudier l'effet d'acide salicylique (AS) sur l'embryogenèse somatique du palmier dattier du cultivar Deglet Nour femelle (DNF) tout en déterminant la dose optimale pouvant être généralisée à l'ensemble des cultivars étudiés mis en culture précédemment.

5-1-1- Matériel végétal

Le matériel de départ utilisé pour la réalisation de cette étape consiste en des cals du cultivar DNF obtenus sur milieu solide MC_{S1} (Souche 14) (5mg/L de 2,4-D et 1mg/L de BAP).

Les cals ayant toutes les caractéristiques des cals embryogènes (cals nodulaires plus ou moins friables de couleur blanche ou beige) sont sélectionnés puis transférés séparément dans des tubes à essais standard (160 x 24 x 1,2 mm) contenant du milieu frais de même composition et ceci trois (03) semaines avant leur utilisation pour l'induction de l'embryogenèse somatique. Cette opération permet d'évaluer la réactivité des cals lors de la mise en place des suspensions.

5-1-2- Protocole expérimental

Le protocole expérimental adopté lors de l'étude de l'application de l'AS sur les différentes phases de l'embryogenèse somatique chez la variété Deglet Nour est décrit dans la figure 10.

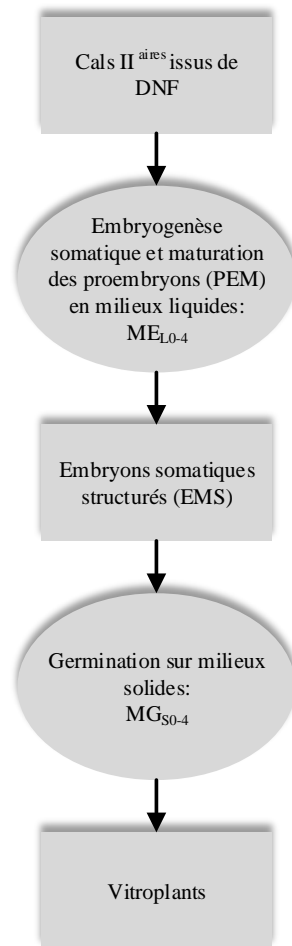


Figure 10 : Protocole adopté lors de l'étude de l'application de l'AS sur les différentes phases de l'embryogenèse somatique du cultivar Deglet Nour

5-1-3- Induction de l'embryogenèse et maturation des PEM en milieu liquide agité

5-1-3-1- Conditions de culture

L'induction de l'embryogenèse somatique et maturation des proembryons (PEM) sont réalisées en milieu liquide agité de même composition de base que le milieu ayant permis l'induction des cals nodulaires (MC_S) mais avec des modifications. Celles-ci sont détaillées dans le tableau 09.

Cinq (05) concentrations d'AS sont retenues pour la réalisation de notre travail expérimental (Tableau 10).

Tableau 09 : Modifications apportées à la composition du milieu pour l'induction de l'embryogenèse somatique et la maturation des PEM en milieu liquide agité (ME_L).

Composition	ME _L
Macroéléments modifiés (MS)	½ MS
Microéléments (MS)	½ MS
Fe-EDTA (MS)	½ Fe-EDTA
Charbon actif (mg/L)	300
2,4-D /BAP (mg/L)	0/0
Agar (g/L)	0

Tableau 10 : Traitements à l'AS testés pour l'initiation de l'embryogenèse somatique chez le cultivar DNF.

Traitements	Concentrations en AS (mg/L)
ME _{L0}	0
ME _{L1}	1
ME _{L2}	5
ME _{L3}	10
ME _{L4}	15

La mise en culture a été effectuée comme suit :

- Peser un (01) g de cal nodulaire.
- Hacher le cal nodulaire dans une boîte de Pétri à l'aide d'un scalpel.
- Déposer un entonnoir sur un Erlenmeyer vide de 250 mL.
- Déposer sur l'entonnoir une passoire stérile de 500 µM de maille.
- Transférer et écraser le cal haché sur la passoire.
- Verser progressivement 50 mL de milieu liquide afin de bien faire passer tous les fragments de cals à travers le tamis de la passoire. Quatre (04) répétitions ont été lancées pour chacun des traitements testés.
- Placer la suspension obtenue sur agitateur horizontal réglé à une vitesse de 120 rpm sous une photopériode de type jours longs et à une température de 27°C ± 2.
- Renouveler le milieu liquide à la fin de chaque semaine de culture et ceci pendant deux mois (08 semaines). Le renouvellement des milieux de culture est réalisé après décantation durant deux (02) heures des suspensions obtenues. Durant cette étape, les Erlenmeyer sont inclinés de 45° par rapport au plan de travail horizontal afin d'aboutir à une meilleure décantation des suspensions.

5-1-3-2- Paramètres considérés

Les observations au cours de cette étape ont porté sur :

- l'évolution des suspensions cellulaires en milieux liquides agités à travers l'observation visuelle de la réactivité des suspensions et de la présence du phénomène de brunissement pour l'ensemble des concentrations d'AS testées.
- l'évolution du poids frais des suspensions cellulaires durant les huit (08) semaines de culture réalisées pour l'ensemble des traitements en AS testés. Des pesées sont effectuées à l'introduction et à la fin de chaque subculture réalisée (intervalle de 5 à 7 jours).
- le nombre des proembryons (PEM) ayant évolué vers l'état structuré obtenu en milieu liquide agité après deux (02) mois de culture et ceci pour l'ensemble des traitements en AS testés.

5-1-4- Germinations des EMS issus du milieu liquide agité

5-1-4-1- Conditions de culture

Les embryons somatiques structurés (EMS) obtenus à partir de la mise en suspension de cals nodulaires sont mis en germination séparément dans des tubes à essais standard (160 x 24 x 1,2 mm) contenant des milieux solides de germination (MG_S) de même composition que les milieux liquides d'induction testés (ME_L) additionnés de 7 g/L d'Agar et en présence des quatre traitements en AS testés (0, 1, 5, 10 et 15 mg/L) ayant permis l'obtention des EMS.

Les cultures ainsi réalisées sont mises en condition de jours longs (16 heures) et à une température de 27°±2°C.

Après quatre (04) semaines de culture, les pousses qui en résultent sont repiquées sur un milieu semi-solide afin de favoriser l'enracinement.

5-1-4-2- Paramètres considérés

Les observations réalisées au cours de cette étape ont porté sur :

- le nombre d'EMS obtenus au niveau de chacun des quatre traitements en AS testés.
- les taux de germination des EMS mis en culture sur milieu solide de germination.

5-2- Effets du milieu de culture et de l'acide salicylique sur l'embryogenèse somatique des quatre cultivars

L'objectif de cette seconde étude est d'étudier les effets de la modification du type de milieu et de l'apport d'AS sur les phases de l'embryogenèse somatique chez quatre (04) cultivars de palmier dattier.

5-2-1- Matériel végétal

Le matériel végétal de départ consiste en des cals embryogènes obtenus sur milieu solide (MC_S) issus de quatre (04) cultivars de palmier dattier : Deglet Nour femelle (DNF), Deglet Nour mâle (DNM), Ghers (GR) et Takerbucht (TK) (Tableau 11).

Les cals sélectionnés (toutes origines confondues) pour la réalisation de cette étape présentent toutes les caractéristiques de cals embryogènes (nodulaires plus ou moins friables, de couleur blanche ou beige).

Ils sont transférés séparément dans des tubes à essais standard contenant du milieu frais (MC_S) trois (03) semaines avant leur utilisation pour l'induction de l'embryogenèse somatique. Cette opération permet de s'assurer de la réactivité des cals lors de la mise en suspension.

Tableau 11 : Origine des cals nodulaires utilisés pour l'induction de l'embryogenèse somatique.

Cultivars	Milieux d'obtention	Souches	2,4-D / BAP (mg/L)	Charbon actif (mg/L)
DNF	MC _{S1}	14	5/1	150
DNM	MC _{S3}	11	50/1	1500
GR	MC _{S2}	1	10/1	300
TK	MC _{S3}	1	50/1	1500

5-2-2- Protocole expérimental

Le protocole expérimental adopté lors de l'étude des effets de la modification du type de milieu et de l'AS durant les phases de l'embryogenèse somatique chez les quatre (04) cultivars de palmier dattier étudiés est décrit au niveau de la figure 11.

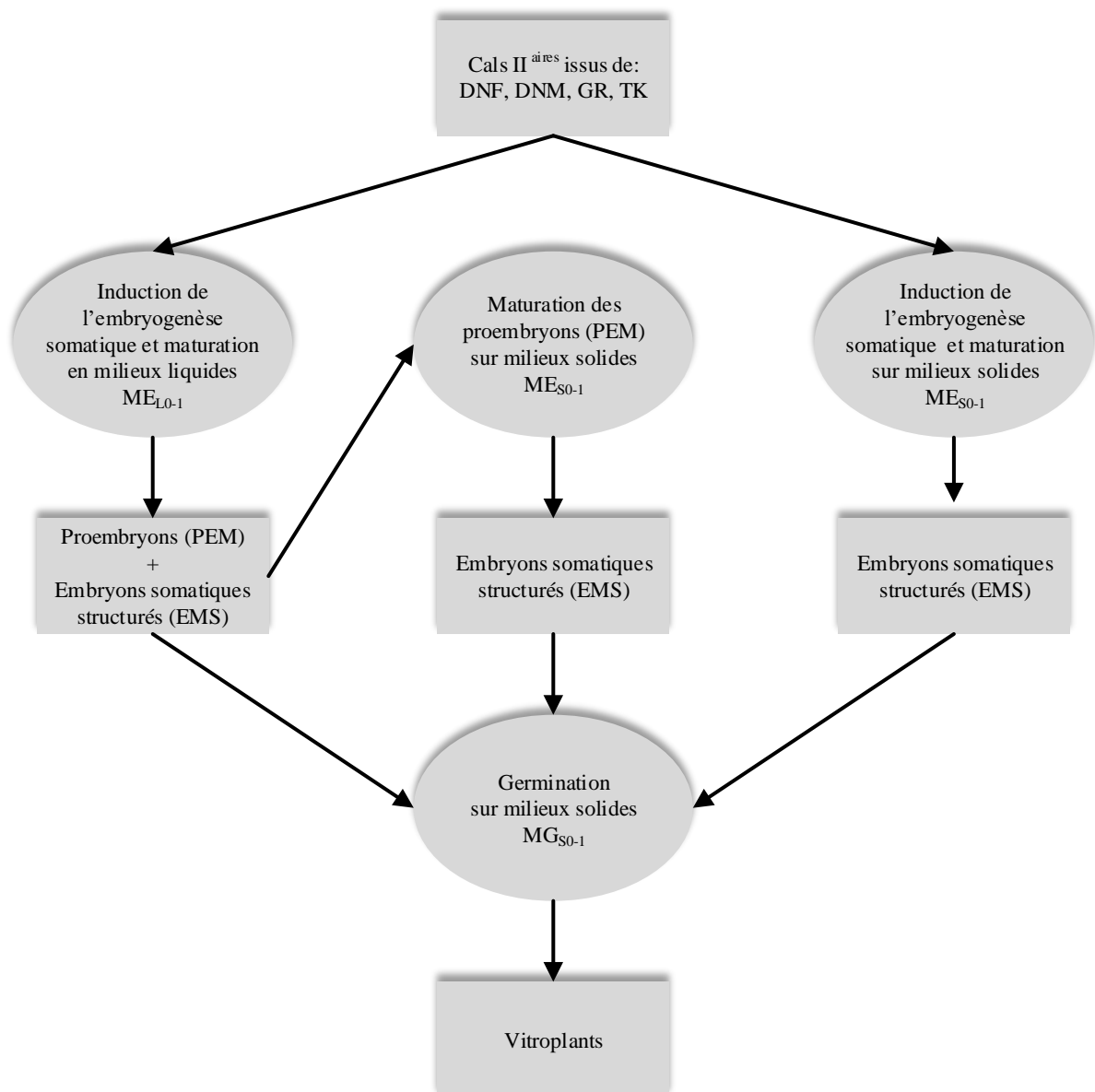


Figure 11: Protocole adopté lors de l'étude des effets de la modification du type de milieu et de la concentration d'acide salicylique et sur les différentes phases de l'embryogenèse somatique chez quatre cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)

5-2-3- Induction de l'embryogenèse somatique et maturation des PEM en milieux liquides agités

5-2-3-1- Conditions de culture

L'induction de l'embryogenèse somatique est réalisée en milieu liquide (ME_L) de même composition de base ayant permis l'induction des cals nodulaires (MC_S) mais avec des modifications (Tableau 12).

Deux (02) concentrations d'AS sont retenues pour la réalisation de notre travail expérimental sur les quatre (04) cultivars étudiés (Tableau 13).

La procédure de mise en culture ainsi que les conditions de culture sont identiques à celles décrites lors de la précédente expérimentation portant sur le cultivar DNF. Quatre (04) répétitions sont lancées pour chacune des concentrations testées et pour chaque cultivar étudié.

Tableau 12 : Modifications apportées à la composition du milieu pour l'induction de l'embryogenèse somatique en milieu liquide agité (ME_L).

Composition	ME _L
Macroéléments modifiés (MS)	½ MS
Microéléments (MS)	½ MS
Fe-EDTA (MS)	½ Fe-EDTA
Charbon actif (mg/L)	300
2,4-D /BAP (mg/L)	0/0
Agar (g/L)	0

Tableau 13 : Traitements à l'AS testés pour l'initiation de l'embryogenèse somatique chez les quatre (04) cultivars étudiés.

Cultivars	Traitements	Concentrations en AS (mg/L)
DNF	ME _{L0}	0
	ME _{L1}	1
DNM	ME _{L0}	0
	ME _{L1}	1
GR	ME _{L0}	0
	ME _{L1}	1
TK	ME _{L0}	0
	ME _{L1}	1

5-2-3-2- Paramètres considérés

Les observations durant cette étape ont porté sur :

- l'évolution des suspensions en milieux liquides agités à travers l'observation visuelle de la réactivité des suspensions et de la présence du phénomène de brunissement au niveau des traitements d'AS testés et des cultivars étudiés.
- l'évolution du poids frais des suspensions durant les neuf (09) semaines de culture réalisées pour l'ensemble des concentrations en AS testées et des cultivars étudiés. Des

pesées sont effectuées à l'introduction et à la fin de chaque subculture réalisée (intervalle de 5 à 7 jours).

- le nombre d'EMS obtenus en milieu liquide agité après les neuf (09) semaines de culture et ceci pour l'ensemble des traitements d'AS testés et des cultivars étudiés.

5-2-4- Maturation sur milieux solides des PEM issus des milieux liquides

5-2-4-1- Conditions de culture

Les PEM n'ayant pas atteint la maturité durant la phase liquide, sont étalés dans des bocaux de culture de 250 mL contenant 50 mL de milieu solide de maturation (ME_S) de même composition que le milieu liquide d'induction de l'embryogenèse (ME_L) additionnés de 7 g/L d'Agar et en présence des deux traitements à l'AS testés (0 ou 1 mg/L).

Les cultures obtenues sont mises pendant quatre (04) semaines sous une photopériode de 16 heures et à une température de 27°C ± 2. Quatre (04) répétitions pour chacune des concentrations testées et pour chacun des cultivars étudiés sont mis en culture.

5-2-4-2- Paramètres considérés

Les observations réalisées au cours de cette étape ont porté sur :

- le nombre d'EMS obtenus au niveau des traitements d'AS testés et des cultivars étudiés.
- la teneur en protéines solubles totales (PT) des PEM au niveau des traitements d'AS testés et cultivars étudiés (les cultures GR sont éliminées pour cause de contaminations fongiques). L'extraction des protéines s'est faite à partir de 0,25 g de matière végétale fraîche (MF) d'amas proembryonnaires selon le protocole décrit par Lecona-Guzmán et al. (2012). Le dosage colorimétrique des PT est réalisé selon la méthode de Bradford (1976) qui est une méthode d'analyse spectroscopique basé sur le changement d'absorbance des protéines en solution à une longueur d'onde de 595 nm.

5-2-5- Induction de l'embryogenèse somatique et maturation des PEM sur milieux solides

5-2-5-1- Conditions de culture

Un travail expérimental sur l'induction de l'embryogenèse et maturation des PEM a été lancé sur milieu solide (ME_S) de même composition que le milieu liquide d'induction (ME_L) additionnés de 7 g/L d'Agar et en présence des deux traitements en AS testés (0 ou 1 mg/L).

La mise en culture dans le but d'obtenir des EMS est réalisée comme suit :

- Peser un (01) g de cal nodulaire.
- Hacher les cals nodulaires dans une boîte de Pétri à l'aide d'un scalpel.

- Étaler avec une spatule les cals fragmentés dans des boîtes de culture d'un volume de 250 mL et contenant 50 mL de milieu solide d'induction de l'embryogenèse. Quatre (04) répétitions ont été lancées pour chacune des concentrations testées et pour chacun des cultivars étudiés.
- Placer les cultures obtenues sous une photopériode de 16 heures et à une température de $27^{\circ}\text{C} \pm 2$.
- Renouveler les milieux de cultures solides toutes les quatre (04) semaines pendant les deux (02) mois de culture.

5-2-5-2- Paramètres considérés

Les observations réalisées au cours de cette étape ont porté sur :

- l'évolution des cals nodulaires fragmentés sur milieux solides à travers l'observation visuelle de la réactivité et de la présence de brunissements au niveau des traitements d'AS testés et des cultivars étudiés.
- le nombre d'EMS obtenus au niveau des traitements d'AS testés et des cultivars étudiés.
- la teneur en PT des PEM au niveau des traitements d'AS testés et des cultivars étudiés (les cultures GR sont éliminées pour cause de contaminations fongiques). L'extraction des protéines a été réalisée à partir de 0,25 g de matière végétale fraîche (MF) d'amas proembryonnaires selon le protocole décrit par Lecona-Guzmán et al. (2012) suivie par le dosage colorimétrique (à 595 nm) des PT en solution selon la méthode de Bradford (1976).

5-2-6- Germination des embryons somatiques sur milieux solides

5-2-6-1- Conditions de culture

Les embryons somatiques obtenus (toutes origines confondues) sont placés séparément en germination dans des tubes à essais contenant 15 mL de milieux solides de germination (MG_S) de même composition que les milieux liquides d'induction testés (ME_L) additionnés de 7 g/L d'Agar et en présence des deux traitements en AS testés (0 ou 1 mg/L).

Les embryons somatiques issus des milieux liquides agités sont mis en germination après dessiccation (à l'obscurité sous une température de $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ pendant 48 heures) alors que les embryons somatiques obtenus après étalement ou produits sur milieux solides sont mis directement en germination.

Après quatre (04) semaines de culture à une photopériode de 16 heures et à une température de $27^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, les pousses résultantes sont repiquées dans un milieu semi-solide afin de favoriser l'enracinement.

5-2-6-2- Paramètres considérés

Les observations réalisées au cours de cette étape ont porté sur les taux de germination, d'embryogenèse secondaire et de nécrose au niveau des EMS mis en culture sur milieu solide de germination au niveau des traitements d'AS testés et cultivars étudiés et ceci en fonction des types de milieux de culture d'obtention.

6- Analyses statistiques

Selon le type de données obtenues, les analyses statistiques effectuées peuvent être résumées comme suit :

- Données qualitatives (binaires): le test d'indépendance χ^2 est réalisé à partir des tables de contingences puis complété par la comparaison des proportions de colonnes par le test bilatéral d'égalité (tests-z). Le seuil de signification a été fixé à 5%. Ces tests statistiques sont exécutés à l'aide du logiciel SPSS (version 25).
- Données quantitatives où les conditions de validité des tests paramétriques ne sont pas vérifiées : le test non-paramétrique de Friedman sur k échantillons appariés au seuil de 5 % est réalisé puis complétée par la comparaison multiple par paires suivant la procédure de Nemenyi. Ces procédures statistiques sont exécutées à l'aide du logiciel XLSTAT (version 2016).
- Données quantitatives où les conditions de validité des tests paramétriques sont vérifiées : l'analyse de la variance (ANOVA) à mesures répétées (dans le temps) ou bien ANOVA à un ou deux facteurs sont réalisées puis complétée par une comparaison multiple par paires selon la méthode de Fisher-LSD dans le cas de différence significative au seuil de 5 %. Ces procédures statistiques sont exécutées à l'aide du logiciel XLSTAT (version 2016).

CHAPITRE III :

RESULTATS

CHAPITRE III : RESULTATS

1- Contaminations initiales

Au terme des deux premiers mois de culture, l'apparition de quelques contaminations est décelée. En effet, sur les 216 explants mis en culture seulement 10 contaminations sont enregistrées, ce qui équivaut à un taux moyen de 4,62 % (pour l'ensemble des explants mis en culture). Au-delà de cette période, l'apparition des contaminations est ponctuelle et limitée (erreurs de manipulation). Cependant, les explants du cultivar Takerbucht montrent un taux de contamination initiale de 17,31%, qui s'explique par la mauvaise qualité physiologique initiale du rejet source (Figure 12).

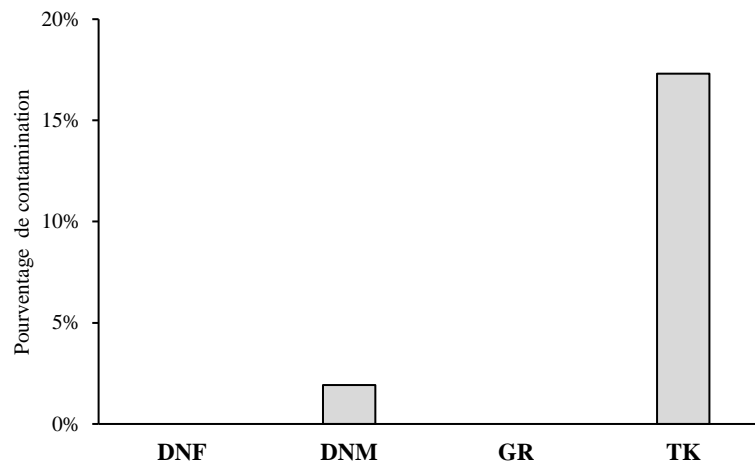


Figure 12 : Variation du taux de contamination initiale après deux (02) mois de culture

2- Callogenèse primaire

2-1- Variation du pourcentage de brunissement des explants en fonction des milieux de culture et des cultivars

Le phénomène de brunissement (indicateur de la présence de polyphénols) au niveau des cultures est constaté dès la fin de la première semaine de culture. Ce phénomène s'accompagne par un ralentissement, un arrêt de la réactivité ou même la nécrose de quelques explants.

L'apparition du phénomène de brunissement/nécrose pendant les deux (02) premiers mois de culture est observée sur l'ensemble des milieux de culture testés. Le plus fort taux de brunissement (58,33%) est noté sur le milieu MC_{S0} dépourvu d'hormones de croissance et de charbon actif, où presque la moitié des explants (46,43%) brunis se nécrosent. Pour les milieux MC_{S1} , MC_{S2} et MC_{S3} des taux plus faibles de brunissement sont notés avec respectivement 14,81%, 12% et 14,81%. Les nécroses constatées sur ces milieux sont dues essentiellement à des fragments de jeunes feuilles. La réalisation du test Khi-carré révèle une différence significative entre milieux de culture ($\chi^2(3, N = 206) = 39,649, p = 0,000$) indiquant ainsi que le phénomène de brunissement est lié à la composition des milieux de culture au seuil de 5%. La comparaison des proportions par le test bilatéral d'égalité (tests-z) permet l'identification deux (02) groupes (Annexe I).

Tous les cultivars étudiés présentent un brunissement au niveau des explants avec, cependant, des taux variables. En effet, le plus fort taux de brunissement (58,33%) est enregistré au niveau du cultivar GR, où la totalité (100%) des explants se sont nécrosés. Le plus faible taux de brunissement (1,96 %) est enregistré au niveau du cultivar DNM sans présenter de nécrose durant les deux premiers mois de culture. Les explants issus des cultivars DNF et TK présentent des taux de brunissement intermédiaires avec respectivement 26,56% et 9,30%. La réalisation du test Khi-carré révèle une différence significative entre cultivars (χ^2 (3, N = 206) = 49,534, $p = 0,000$) ce qui implique que le phénomène de brunissement varie aussi en fonction des cultivars étudiés au seuil de 5%. La comparaison des proportions par le test bilatéral d'égalité (tests-z) permet l'identification de quatre (04) groupes (Annexe I).

Par ailleurs, l'apparition du phénomène de brunissement observée au niveau de chacun des cultivars étudiés varie en fonction des milieux de culture aboutissant à des différences d'intensité (Figures 13). Ceci confirme l'existence d'une relation entre la composition du milieu de culture et le cultivar dans l'expression du phénomène de brunissement. Afin d'identifier les combinaisons (Cultivars-Milieus de culture) les plus sujettes au brunissement, une comparaison des proportions par le test bilatéral d'égalité (tests-z) est réalisée dans les cas où l'application du test Khi-carré révèle une différence significative (Tableau 14 ; Annexe I).

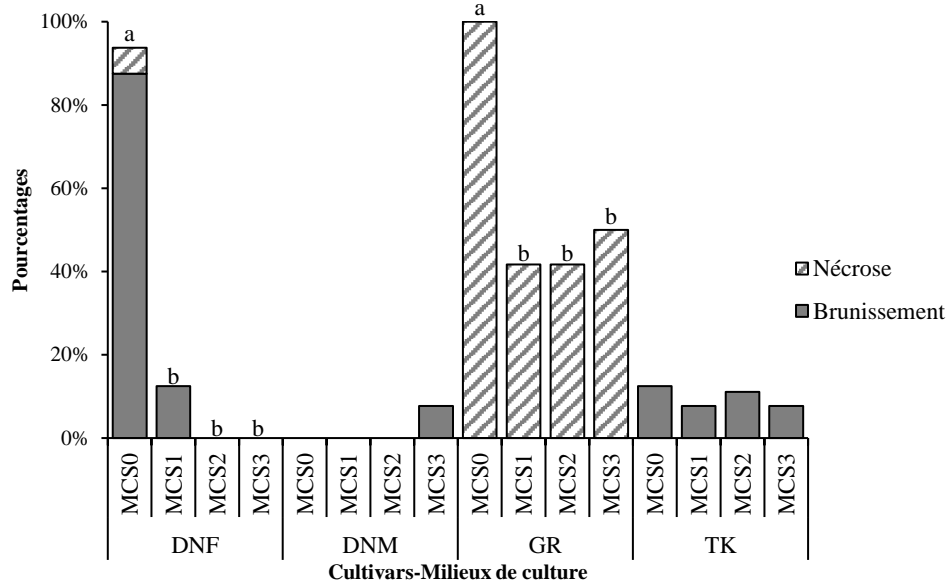


Figure 13 : Variation du phénomène de brunissement-nécrose en fonction des cultivars et des milieux de culture après deux (02) mois de culture

Tableau 14 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur les combinaisons (Cultivars-Milieus de culture) lors de l'apparition du phénomène de brunissement.

Cultivars-Milieu de culture	Valeur du χ^2	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)	Comparaison des proportions	Meilleure combinaison
DNF- Milieu	50,223	3	0,000	(02) groupes	DNF- MC _{S0}
DNM- Milieu	2,982	3	0,394	(01) groupes	-
GR- Milieu	11,657	3	0,009	(02) groupes	GR-MC _{S0}
TK-Milieu	0,212	3	0,976	(01) groupes	-

2-2- Variation du pourcentage de callogenèse primaire en fonction des milieux de culture et des cultivars

L'évolution des explants mis en culture durant les deux (02) premiers mois se déroule comme suit : un gonflement total ou partiel des explants dont un certain nombre émet dès les deux premières semaines de culture, des structures de couleur blanchâtre, indiquant ainsi l'initiation de la différenciation cellulaire. Cette dernière évolue par la suite pour les explants les plus réactifs en cals proprement dits.

La callogenèse induite ou callogenèse primaire au niveau des explants se manifeste toujours sous forme de cals hyperhydriques friables ou compacts (Planche 02) dont l'intensité de d'apparition est évaluée à travers les pourcentages notés à la fin des deux (02) premiers mois de culture.

Tous les milieux de culture permettent d'aboutir à l'induction de la callogenèse primaire. On note le plus faible taux de callogenèse (6,25%) sur le milieu dépourvu d'hormone MC_{S0} . Les milieux MC_{S1} et MC_{S3} aboutissent à un taux identique de 53,70% suivis par le milieu MC_{S2} où on enregistre un taux de 44 %. L'application du test Khi-carré révèle une différence significative entre les milieux de culture ($\chi^2 (3, N = 206) = 31,4833, p = 0,000$) indiquant que l'induction de la callogenèse primaire dépend (au seuil de 5%) des milieux de culture testés. La comparaison des proportions par le test bilatéral d'égalité (tests-z) permet d'identifier deux (02) groupes (Annexe I).

L'induction de la callogenèse primaire est observé au niveau des quatre (04) cultivars étudiés. Cependant des différences par rapport à l'intensité de la callogenèse sont relevées. En effet, les explants issus des cultivars DNM et DNF sont les premiers à montrer une callogenèse et présentent à la fin des deux (02) premiers mois de culture les plus forts taux de callogenèse primaire avec respectivement 67,30 % et 51,56 %. Les explants issus des cultivars TK et GR sont plus lents à réagir et montrent des taux faibles de callogenèse primaire, respectivement de 12,5 % et de 13, 24 % (Figures 14). La réalisation du test Khi-carré révèle une différence significative entre cultivars ($\chi^2 (3, N = 206) = 51,606, p = 0,000$) indiquant que l'induction de la callogenèse primaire dépend aussi (au seuil de 5%) des cultivars étudiés. La comparaison des proportions par le test bilatéral d'égalité (tests-z) permet l'identification de deux (02) groupes (Annexe I).

Des différences par rapport à l'intensité de la callogenèse sont constatées entre cultivars mais aussi au niveau de chacun des cultivars et ceci en fonction des milieux de culture testés. Ainsi et afin d'identifier les combinaisons (Cultivars-Milieux de culture) les plus réactives, une comparaison des proportions par le test bilatéral d'égalité (tests-z) est réalisée dans les cas où l'application du test Khi-carré révèle une différence significative (Tableau 15 ; Annexe I).

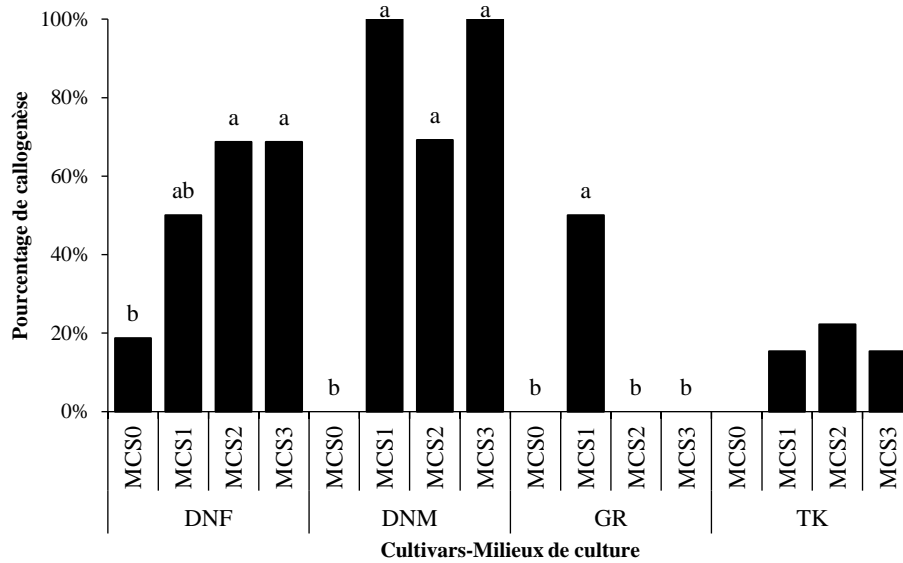


Figure 14 : Variation de la callogénèse primaire en fonction des cultivars et des milieux de culture après deux (02) mois de culture

Tableau 15 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur les combinaisons (Cultivars-Milieux de culture) pour l'induction de la callogénèse primaire.

Cultivars-Milieux de culture	Valeur du χ^2	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)	Comparaison des proportions	Meilleure combinaison
DNF- Milieux	16,762	3	0,001	(03) groupes	DNF- MCS ₂ DNF- MCS ₃
DNM- Milieux	38,138	3	0,000	(02) groupes	DNM- MCS ₁ DNM- MCS ₂ DNM- MCS ₃
GR- Milieux	20,571	3	0,000	(02) groupes	GR-MCS ₁
TK-Milieux	1,854	3	0,603	(01) groupes	-

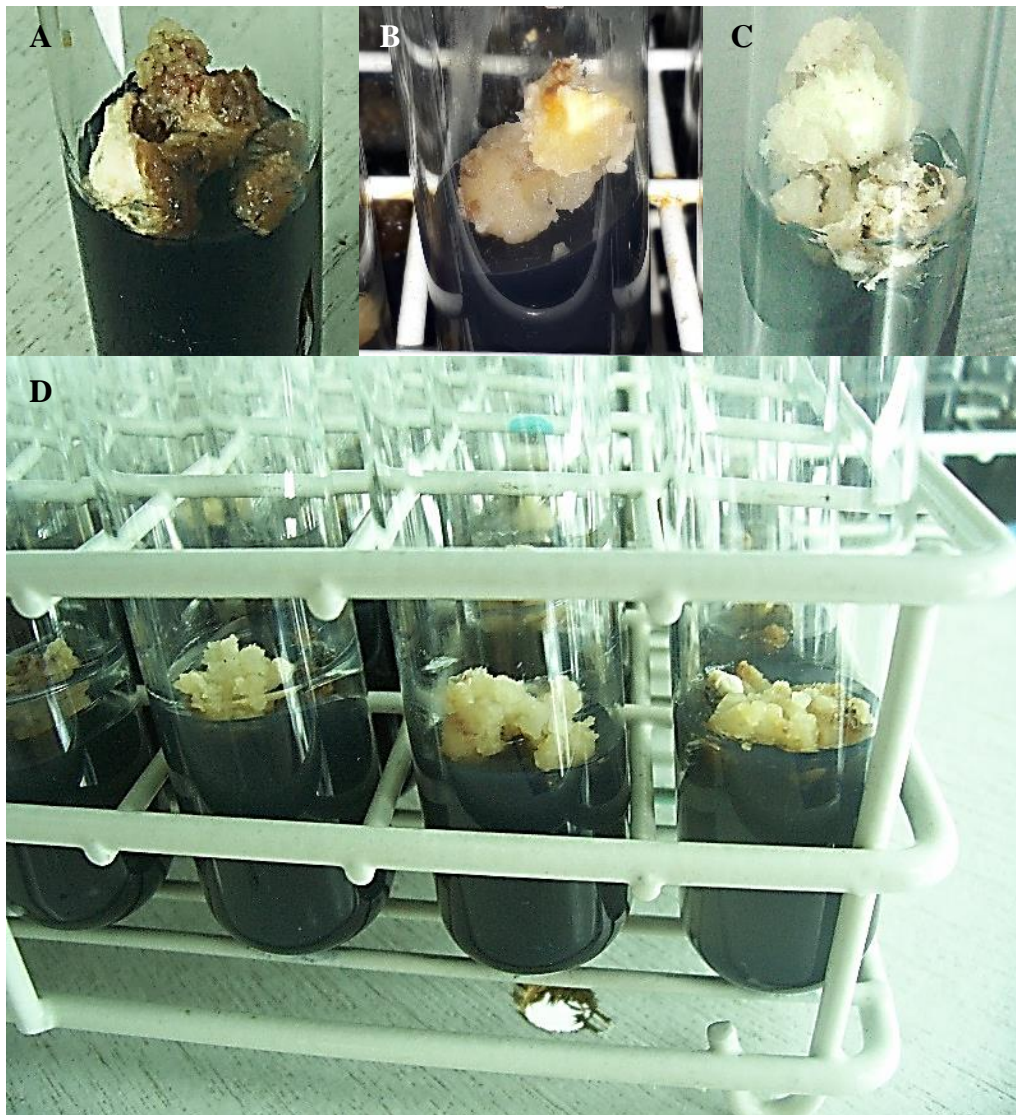


Planche 02 : Callogenèse primaire.

A: Brunissement modéré des explants au stade gonflement (G x2).

B: Cal hyperhydrique compacte (G x2)

C: Cal hyperhydrique friable (G x2).

D: Callogenèse primaire en développement (G x2).

3- Callogenèse secondaire

3-1- Variation de la callogenèse secondaire sur milieux solides

Issue du développement de la callogenèse primaire plus au moins compacte, l'apparition de la callogenèse nodulaire (secondaire) survient à partir du 4^{ème} mois de culture pour les explants les plus réactifs. Elle se poursuit tout au long des vingt-huit (28) mois suivants.

L'évolution vers l'état de callogenèse secondaire se manifeste par la formation de cals qui se distinguent par leur structure nodulaire plus au moins friable et par leur couleur blanche ou beige (avec peu ou pas de brunissement). Ces cals secondaires sont conventionnellement considérés comme étant des cals potentiellement embryogènes (Planche 03).

Il est à signaler, que l'induction de la callogenèse primaire observée durant les premiers mois de culture se poursuit tout au long des subcultures réalisées. Dans un premier temps, elle a pour origine les explants de départ (issus de la partie apicale du rejet) puis par la suite les nodules néoformés (phénomène de réversion). Durant cette étape de culture, et afin d'évaluer l'évolution de la callogenèse, des observations sont réalisées durant les 30 mois (équivalent à 15 subcultures) avec un bilan avant chaque transfert des cals sur milieux frais. L'unité de mesure est l'explant présentant une nodulation contenue dans un tube à essai.

Les milieux testés contenant des hormones de croissance à savoir MCS₁, MCS₂ et MCS₃ permettent d'initier, d'entretenir et de multiplier, par la suite, la callogenèse secondaire. Cependant, c'est le milieu MCS₃ qui permet d'entretenir et de multiplier le plus grand nombre de cals secondaires sur une période de 30 mois de culture (15 subcultures).

La réalisation du test de Friedman sur k échantillons appariés révèle un effet significatif du milieu de culture (Test de Friedman (3, N = 15) = 39,171, $p < 0,0001$) indiquant que l'évolution du nombre de cals nodulaires dépend (au seuil de 5%) du milieu de culture testé. Les comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Nemenyi, met en évidence quatre (04) groupes (Annexe I).

Le développement de la callogenèse primaire vers l'état secondaire caractérisé par l'apparition de nodules est observé sur les explants issus des quatre (04) cultivars étudiés. Cependant des différences par rapport au temps de réponse et de l'intensité de multiplication de la callogenèse nodulaire sont constatées. En effet, les cals de type primaire obtenus au niveau du cultivar DNF sont plus réactifs et sont les premiers à évoluer en cals nodulaires et ceci à partir du 4^{ème} mois, suivis par les cals des cultivars DNM, TK puis ceux de GR dont l'évolution vers le stade nodulaire est plus tardive (au-delà du 5^{ème} mois) et moins intense.

Par la suite, le transfert des cals nodulaires sur milieux frais tous les deux (02) mois permet leur maintien et leur multiplication. Ainsi au terme de 30 mois de culture (15 subcultures), c'est au niveau du cultivar GR que nous avons enregistré le plus grand nombre de cals nodulaires. Le plus faible nombre de cals est noté au niveau du cultivars TK. Les cultivars DNF et DNM donnent des nombres intermédiaires de cals nodulaires. L'application du test de Friedman sur

k échantillons appariés révèle un effet significatif du cultivar (Test de Friedman (3, N = 15) = 10,9927, $p = 0,0118$) indiquant que l'évolution du nombre de cals nodulaire dépend également du cultivar étudié au seuil de 5%. La comparaison multiple par paires suivant la procédure de Nemenyi, met en évidence trois (03) groupes (Annexe I).

Des différences significatives sont constatées par rapport à l'initiation et la multiplication de la callogenèse nodulaire au niveau de chacun des cultivars étudiés et ceci en fonction des milieux de culture (Figure 15). Ainsi, dans le but d'identifier le milieu de culture le plus adéquat pour chaque cultivar, le test de Friedman sur k échantillons appariés est réalisé suivi par la comparaison multiple par paires de moyennes selon la procédure de Nemenyi, (Tableau 16 et Annexe I).

Tableau 16 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur les combinaisons (Cultivars-Milieux de culture) lors de l'étape de l'entretien et multiplication de la callogenèse nodulaire.

Cultivars-Milieux de culture	Test de Friedman	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)	Comparaison des moyennes des rangs	Meilleure combinaison
DNF- Milieux	38,396	3	< 0,0001	(04) groupes	DNF- MC _{S1}
DNM- Milieux	40,886	3	< 0,0001	(04) groupes	DNM - MC _{S3}
GR- Milieux	42,000	3	< 0,0001	(02) groupes	GR - MC _{S2}
TK-Milieux	37,144	3	< 0,0001	(02) groupes	TK - MCS ₃

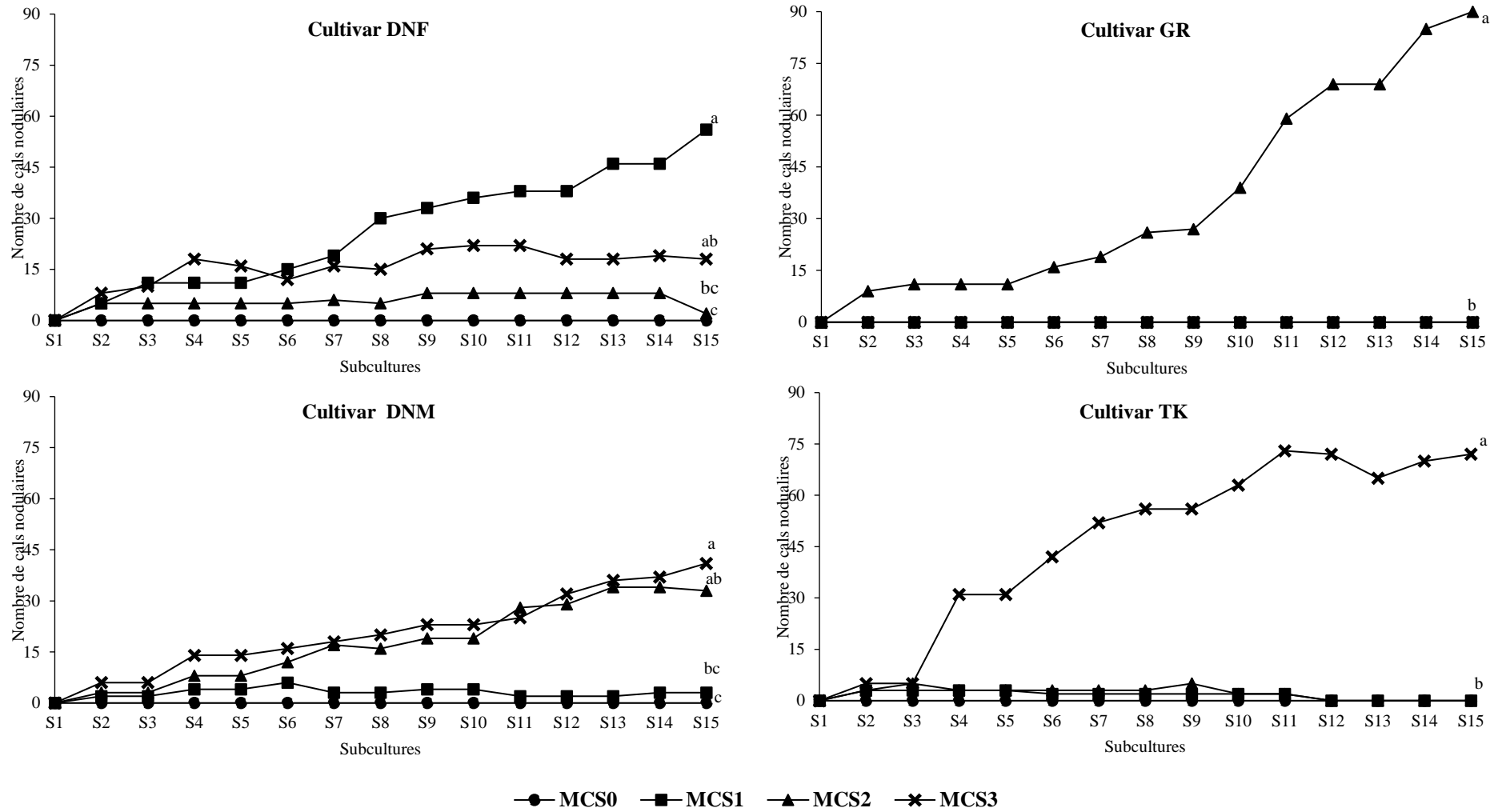


Figure 15 : Variation du nombre d'explants présentant une callogénèse de type nodulaire en fonction des cultivars et des milieux de culture au cours de 30 mois de culture (15 subcultures)

3-2- Variation de la callogenèse secondaire en milieu liquide agité

Au terme de douze (12) mois de culture sur les milieux solides (MC_{S1-3}), l'utilisation d'un milieu liquide (MC_{L1}) contenant uniquement 1 mg/L de 2,4-D est retenue afin d'accroître la multiplication de la callogenèse nodulaire obtenue (Planche 03-H). L'évolution de la masse de cals nodulaires, observée à l'œil nu, en milieu liquide agité correspond à trois (03) phases :

- Période de latence d'environ dix (10) jours durant laquelle les cals légèrement fragmentés ne présentent aucun développement apparent.
- Démarrage plus au moins visible à l'œil nu jusqu'au renouvellement du milieu liquide (entre le 10^{ème} et le 30^{ème} jour de culture) caractérisé par l'apparition de nodules néoformés.
- Augmentation rapide du volume des suspensions avec des signes d'hyperhydrie observés après renouvellement du milieu liquide (au-delà d'un mois de culture).

L'estimation de l'accroissement de la masse de cals nodulaires en milieu liquide agité est basée sur le calcul du facteur de multiplication (poids frais final/poids frais initial) pour chacun des cultivars étudiés. Ainsi, à la fin des deux (02) mois de culture réalisés (correspondant à 08 semaines), une différence entre cultivars est observée.

Le plus fort taux de multiplication (9,33) est obtenu avec le cultivar DNF alors que le plus faible taux de multiplication (4,01) est enregistré sur le cultivar DNM. Les cultivars GR et TK ont présentés des taux de multiplication intermédiaires respectivement : 6,39 et 5,72 (Figure 16). L'analyse de variance à mesures répétées (répétées dans le temps) révèle des effets significatifs des cultivars étudiés et du temps de culture, respectivement : ($F_{ddl\ 3-36} = 10,315$; $p < 0,0001$) et ($F_{ddl\ 2-36} = 515,942$; $p < 0,0001$) ainsi qu'un effet très hautement significatif de l'interaction cultivars*temps ($F_{ddl\ 6-36} = 310,91$; $p < 0,000$) sur l'évolution des cultures. La comparaison multiple des moyennes de l'interaction cultivars*temps selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % met en évidence cinq groupes homogènes (Annexe I).

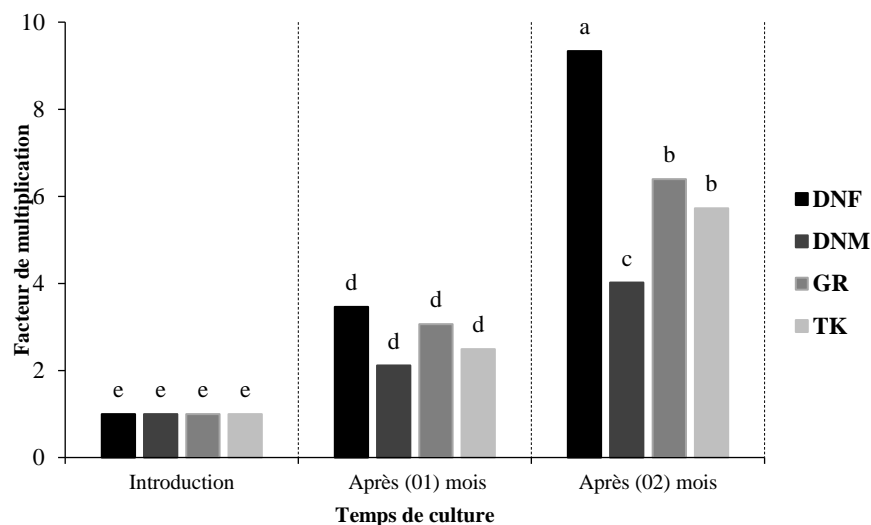


Figure 16 : Evolution du facteur de multiplication en fonction du temps pour chacun des cultivars étudiés. F Anova cultivars*temps $ddl\ 6-36 = 310,91$; $p < 0,0001$.

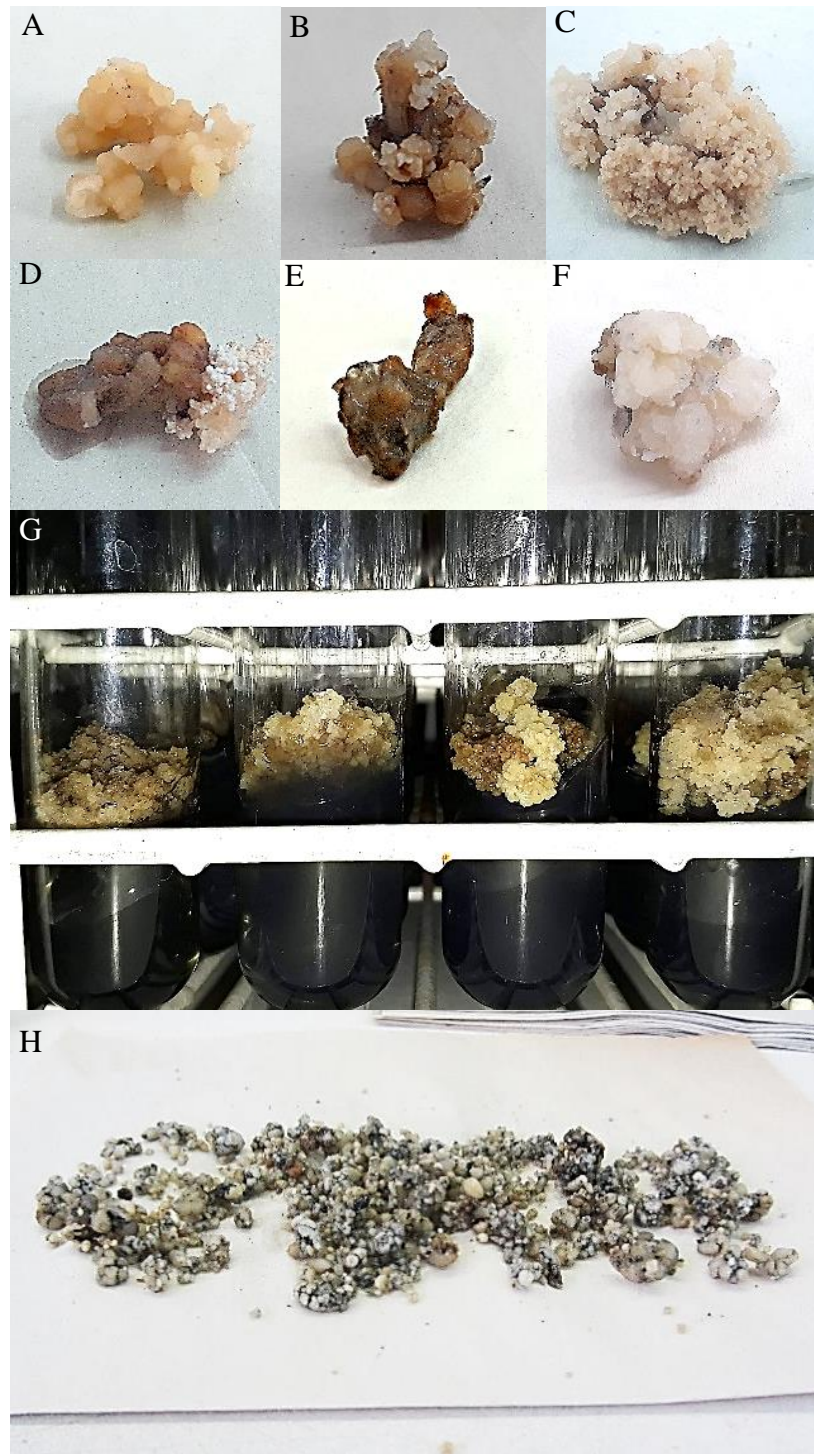


Planche 03 : Callogenèse secondaire.

- A:** Cal nodulaire beige chez le cultivar Deglet Nour Femelle (DNF) (G x4).
- B:** Cal nodulaire avec brunissement modéré chez le cultivar Deglet Nour mâle (DNM) (G x4).
- C:** Cal nodulaire friable chez le cultivar Ghers (GR) (G x4).
- D:** Cal nodulaire avec brunissement marqué chez le cultivar Takerbucht (TK) (G x4).
- E:** Cal nécrosé (G x4).
- F:** Cal hyperhydrique compact (phénomène de réversion) (G x4).
- G:** Entretien de la callogenèse secondaire friable sur milieu solide (MC_s) (G x2).
- H:** Multiplication de la callogenèse secondaire en milieu liquide (MC_L) (G x1).

4- Embryogenèse somatique

4-1- Effet de l'acide salicylique sur l'embryogenèse somatique de DNF en milieu liquide agité

4-1-1- Evolution générale des cultures en suspension

L'établissement des suspensions cellulaires consiste à mettre en culture un (01) gramme de cals nodulaires issus du cultivar DNF dans 150 mL de milieux de culture liquide ME_L contenant l'AS. Cinq (05) concentrations d'AS (0,1,5,10 et 15 mg/L) sont testées et chacune avec quatre (04) répétitions. Les cultures cellulaires ainsi établies sont placées sous agitation à 120 rpm et sous une photopériode de 16h et à une température de 27°C ± 2.

L'ensemble des suspensions cellulaires montre une réactivité visible à l'œil nu à travers l'augmentation du volume et l'apparition de petits nodules embryogènes à différents stades de développement de la culture. Le renouvellement des milieux de culture ainsi que les pesées effectuées permettent au terme de huit (08) semaines de culture de déceler quatre (04) phases d'évolution distinctes (Figure 17 ; Planche 04 A, B, C, D et E) :

- 1- Phase de latence**, d'une durée d'une semaine. Cette phase se caractérise par une absence de croissance visible à l'œil nu et une perte en poids frais des suspensions cellulaires constatée au renouvellement des milieux liquides. Ces observations révèlent l'existence d'un processus d'adaptation qui fait suite aux différents stress subis (hachage, tamisage, mise en suspension en milieux liquides agités).
- 2- Phase de croissance**, d'une durée de trois (03) semaines (de la 2^{ème} à la 4^{ème} semaine de culture). Durant cette phase de culture, les fragments de cals en suspension montrent une réactivité visible à l'œil nu caractérisée par la manifestation de l'embryogenèse somatique secondaire (néoformation de petits nodules embryogènes au cours des différents stades de développement des embryons somatiques) et à l'apparition des premiers proembryons (PEM) au stade globulaire. Ainsi, durant cette 2^{ème} phase de culture, une augmentation importante du poids frais est notée avant chaque renouvellement des milieux liquides. Parallèlement à la réactivité relevée, l'apparition d'une coloration brunâtre au niveau des suspensions est observée indiquant la présence de polyphénols. Ce phénomène de brunissement persiste durant les phases de culture ultérieures.
- 3- Phase de ralentissement (ou stationnaire)**, d'une durée de deux (02) semaines, (5^{ème} et 6^{ème} semaine de culture). Durant cette troisième phase de culture, les fragments de cals en suspension montrent une réactivité visible à l'œil nu caractérisée par la présence d'un certain nombre de PEM aux stades globulaire et post-globulaire et une faible augmentation du poids frais notée avant chaque renouvellement des milieux liquides. Il est à signaler ici, que durant cette phase de culture, apparaissent des pseudoembryons filiformes chétifs flottant à la surface au niveau des milieux liquides.

4- Phase de déclin (ou de sénescence), au-delà de la 6^{ème} semaine de culture. Durant cette dernière phase de culture, une diminution du poids frais des fragments de cals en suspension est notée lors du renouvellement des milieux liquides. Cependant, l'évolution des fragments de cals mis en suspension se poursuit aboutissant après huit (08) semaines à des PEM à différents stades de maturation : globulaire, post-globulaire et embryons somatiques structurés (EMS).

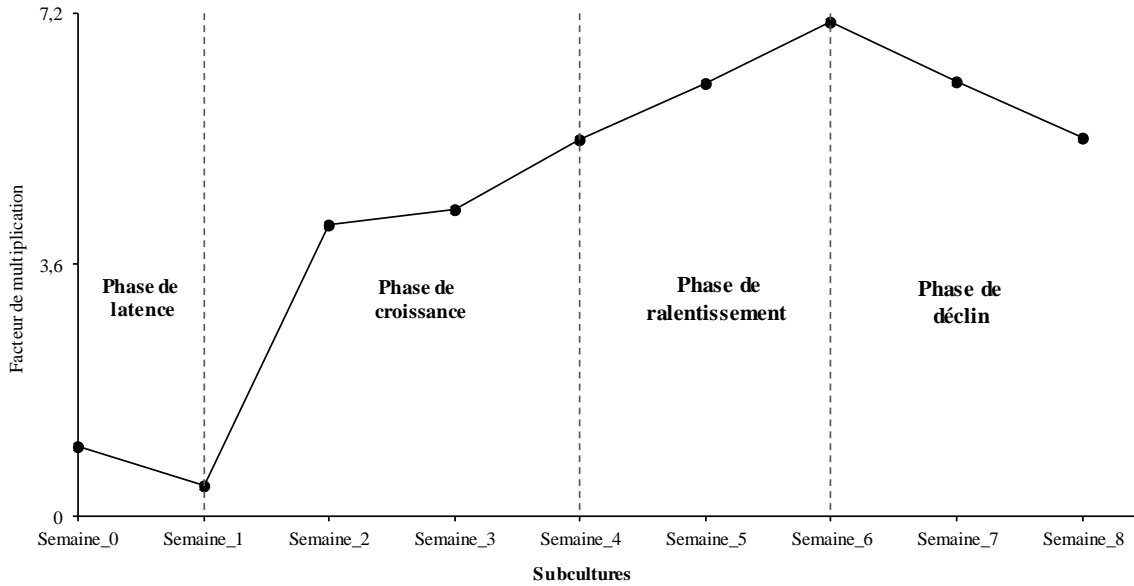


Figure 17 : Courbe de croissance des suspensions cellulaires obtenue à partir des poids frais pendant huit (08) semaines de culture

Comme décrit précédemment, le brunissement au niveau des suspensions est observé à l'œil nu dès la 2^{ème} semaine, mais avec, une intensité variable en fonction des traitements à l'AS testés (Tableau 17).

Tableau 17 : Réactivité et intensité de brunissement évaluées à l'œil nu en présence des traitements à l'AS.

Traitements	Intensité de la réactivité	Intensité du brunissement
ME _{L0} (0 mg/L d'AS)	+++	+
ME _{L1} (1 mg/L d'AS)	+++	+
ME _{L2} (5 mg/L d'AS)	+++	++
ME _{L3} (10 mg/L d'AS)	++	+++
ME _{L4} (15 mg/L d'AS)	+	++

Faible intensité ++ moyenne intensité +++ forte intensité

4-1-2- Variation du poids frais des suspensions cellulaires en milieux agités

L'évaluation de l'accroissement en poids frais des suspensions cellulaires en milieux liquides agités se base sur le calcul du facteur de multiplication (poids frais final/poids frais initial) durant les huit (08) semaines de culture, et ceci, pour les cinq (05) traitements à l'AS. L'ensemble des suspensions montrent le même schéma de développement avec quatre (04) phases : phase de latence, phase de croissance, phase de ralentissement et phase de déclin. Cependant des différences entre traitements testés sont constatées.

En effet, le traitement ME_{L0} (0 mg/L d'AS) manifeste la plus forte augmentation du poids frais pour atteindre la phase de ralentissement à partir de la 5^{ème} semaine de culture. Par la suite, et au-delà de la 6^{ème} semaine, c'est le traitement ME_{L1} (1 mg/L d'AS) qui montre la plus forte augmentation en poids frais. Les traitements ME_{L2} (5 mg/L d'AS), ME_{L3} (10 mg/L d'AS) et ME_{L4} (15 mg/L d'AS) donnent de faibles accroissements en poids frais (Figure 18).

L'analyse de variance à mesures répétées dans le temps révèle des effets significatifs ; des traitements à l'AS ($F_{ddl\ 4-135} = 7,965$; $p < 0,0012$), du facteur temps de culture ($F_{ddl\ 8-135} = 224,015$; $p < 0,0001$) et de l'interaction traitements*temps ($F_{ddl\ 32-135} = 4,471$; $p < 0,0001$) sur l'évolution en poids frais des cultures. La comparaison multiple des moyennes de traitements selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % identifie quatre (04) groupes homogènes après huit (08) semaines de culture (Annexe I).

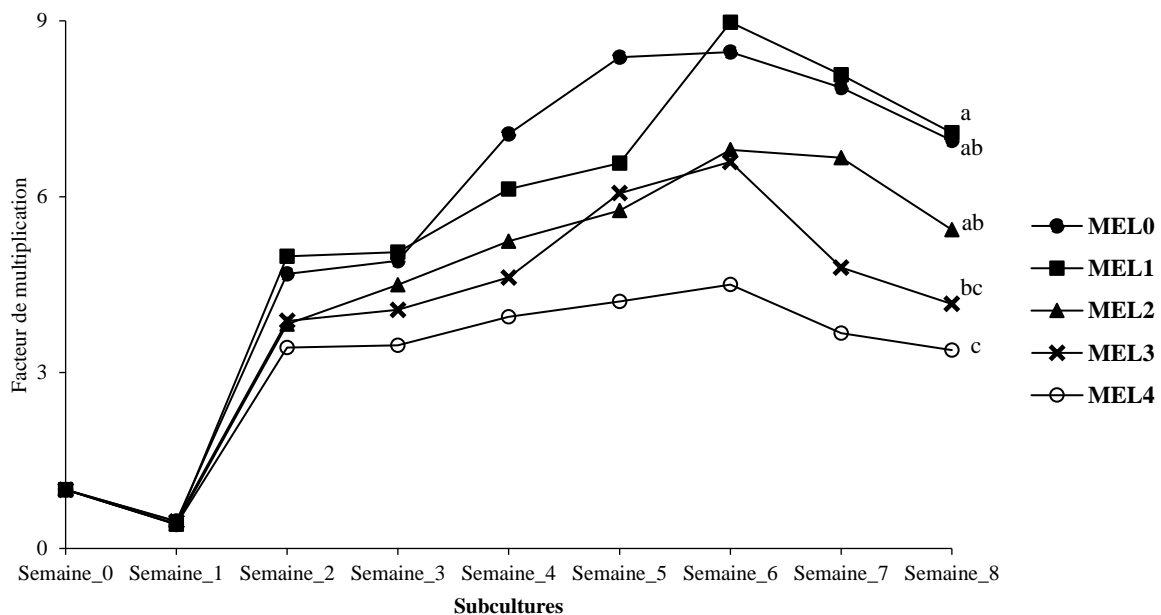


Figure 18 : Variation du poids frais des suspensions en fonction des traitements à l'AS au cours des huit (08) semaines de culture ($F_{traitements\ ddl\ 4-135} = 7,965$; $p < 0,0012$)

4-1-3- Variation du nombre d'EMS obtenus en milieux liquides agités

L'utilisation des milieux liquides agités permet l'initiation de l'embryogenèse somatique aboutissant à la formation d'un grand nombre de PEM à différents stades de développement, mais aussi à la maturation d'un certain nombre d'EMS individualisés au bout de huit (08) semaines de culture. Ainsi, le comptage des EMS produits permet de mettre en évidence des différences entre les traitements testés. En effet, c'est le traitement MEL₁ (1 mg/L d'AS) qui donne le plus grand nombre d'EMS individualisés (15 embryons) suivi par les traitements MEL₂ (5 mg/L d'AS) et MEL₀ (1 mg/L d'AS). Les traitements MEL₃ (10 mg/L d'AS) et MEL₄ (15 mg/L d'AS) ne permettent pas la formation d'embryons structurés (Figure 19).

L'analyse de la variance à un facteur révèle un effet significatif des traitements appliqués ($F_{(2,9)} = 5,1872$; $p = 0,0317$). La comparaison multiple des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % montre deux (02) groupes de traitements (Annexe I).

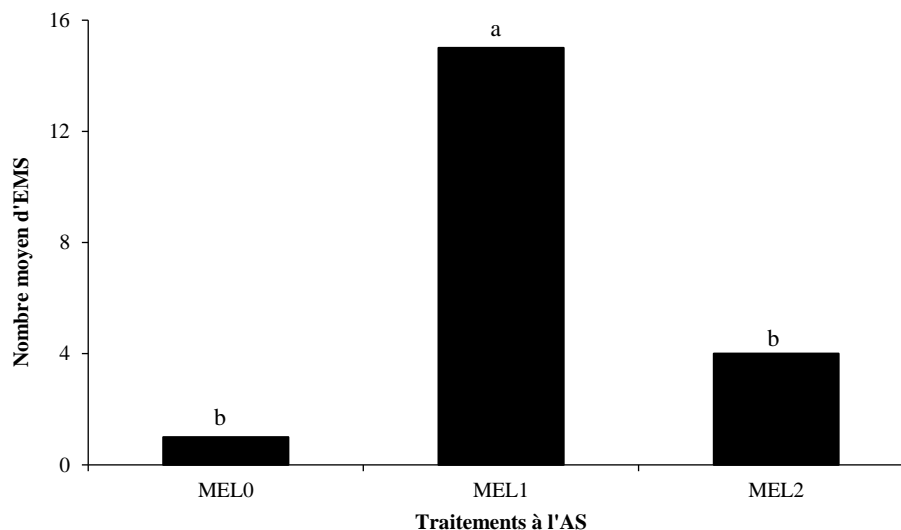


Figure 19 : Effet des traitements à l'AS sur le nombre moyen d'EMS obtenus en milieu liquide agité chez le cultivar DNF après huit (08) semaines de culture. $F_{ddl\ 2-9} = 5,1872$; $p = 0,0317$

4-1-4- Variation du pourcentage de germination des EMS obtenus en milieux agités

L'utilisation du milieu liquide agité en présence de cinq (05) traitements à l'AS permet d'obtenir des EMS. En effet, les fragments de cal tamisés (sur tamis de 500 μ m de maille) se développent en petits nodules embryogènes puis en PEM de forme globulaire (stade globulaire) durant les quatre (04) premières semaines de culture. Par la suite, les PEM au stade globulaire évoluent vers des formes sphériques montrant une légère invagination (stade post-globulaire) pour aboutir vers la formation des EMS individualisés de forme allongée de 6 à 7 mm au terme de huit (08) semaines de culture.

Des signes d'hyperhydrie se manifestent au niveau des EMS ainsi obtenus nécessitant le recours à une légère dessiccation sous hotte à flux laminaire pendant deux (02) heures avant de les ensemercer séparément dans des tubes à essais contenant les milieux solides de germination (MG_{S0-4}) (Planche 04-F).

Au terme de (08) semaines de culture, 25 % de l'ensemble EMS entrent en germination dès la première semaine de culture qui se traduit par l'émergence en premier de la partie aérienne (feuille cotylédonaire) suivie par l'apparition d'une radicelle qui se développe ultérieurement en un système racinaire pivotant (Planche 04-G et H). Le reste des EMS mis en germination (correspondant à 75 % de l'ensemble des EMS ensemenés) montre une absence de réactivité accompagnée en plus d'un brunissement intense indiquant leur nécrose.

Des différences entre traitements à l'AS testés par rapport au type de réponses sont enregistrées. En effet, c'est le traitement MG_{S1} (1 mg/L d'AS) qui génère le plus fort taux de germination (28 %) suivi par les traitements MG_{S0} (0 mg/L d'AS) et MG_{S2} (5 mg/L d'AS) avec respectivement 25% et 14%. (Figure 20).

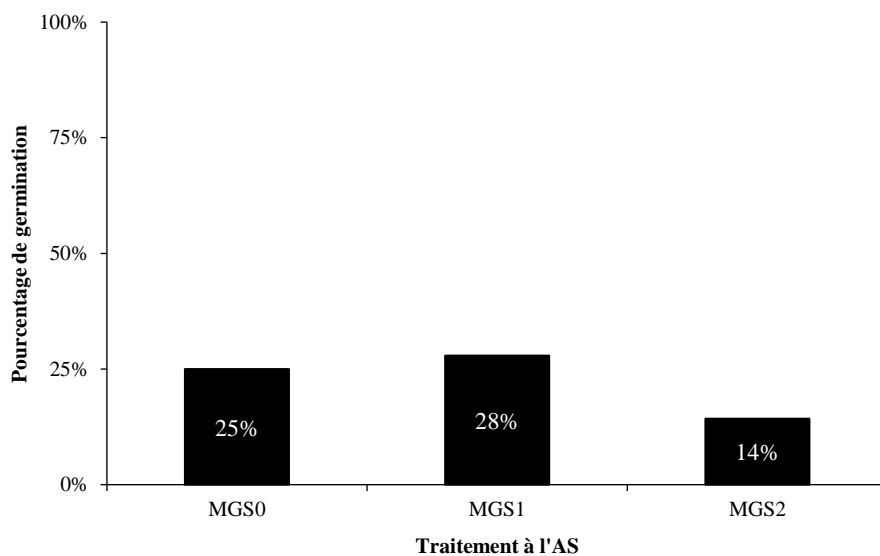


Figure 20 : Variation du pourcentage de germination observé en fonction la concentration d'AS.

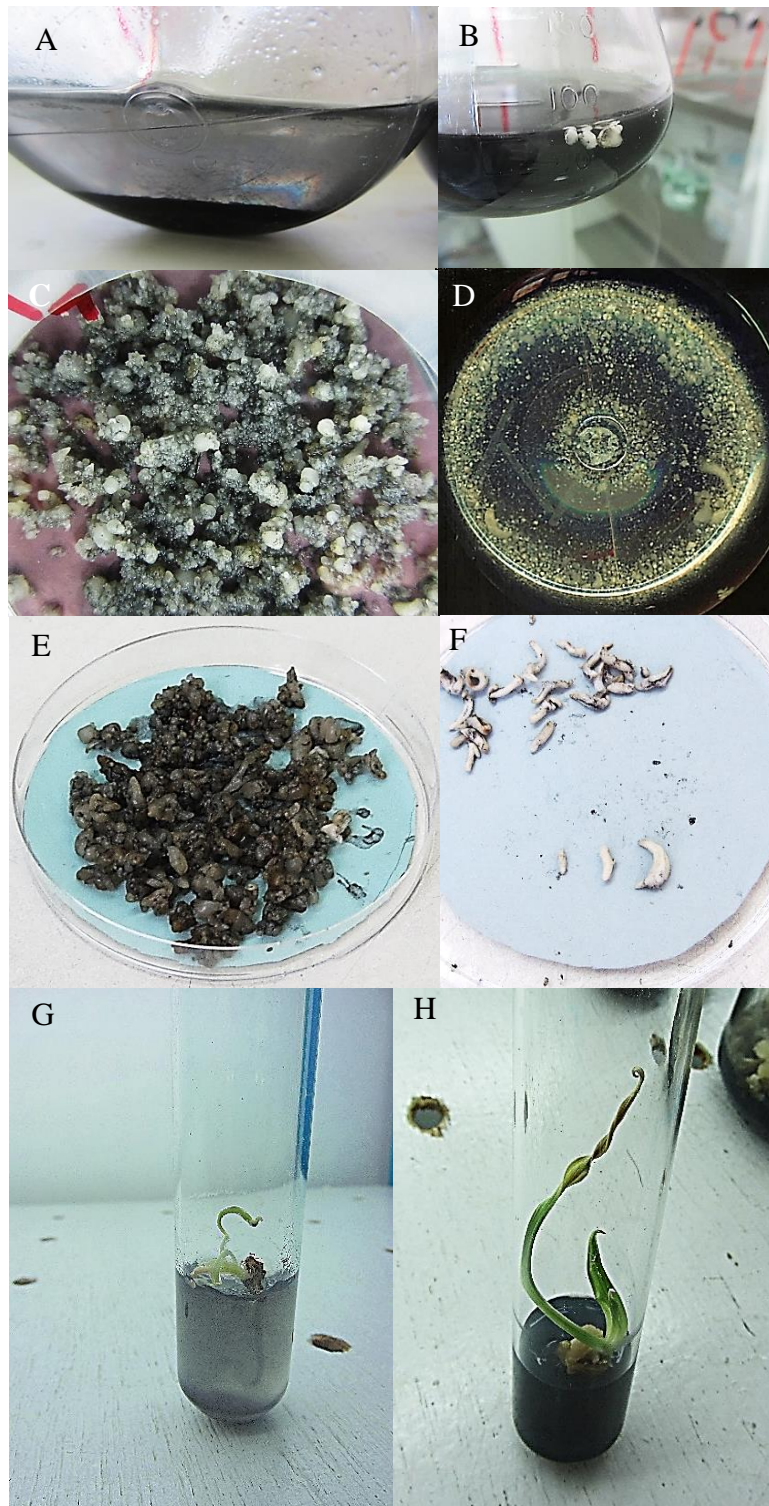


Planche 04 : Effet de l'AS sur l'embryogenèse somatique du cultivar Deglet Nour (DNF) en milieu liquide (ME_L).

- A** : Aspect initial de la suspension lors de la mise en culture (G x1).
- B** : Embryons chétifs en suspension (G x1).
- C** : Début de l'embryogenèse au stade globulaire après quatre (04) semaines (G x2)
- D** : Apparition des premiers EMS en développement en présence de 1 mg/L d'AS (G x1).
- E** : Amas preembryonnaires avec formation d'EMS après huit (08) semaines en présence de 1 mg/L d'AS (G x1).
- F** : EMS issus du milieu liquide agité après dessiccation (G x1,2).
- G et H** : Vitroplants en développement (G x0,8).

4-2- Effets du milieu de culture et de l'AS sur l'embryogenèse somatique et maturation des PEM

4-2-1- Induction et maturation des PEM en milieux liquides agités

4-2-1-1- Evolution générale des suspensions

Le matériel végétal de départ consiste en des cals sélectionnés qui présentent toutes les caractéristiques de cals embryogènes. Ces derniers sont issus des (04) cultivars étudiés : DNF, DNM, GR et TK.

L'établissement des suspensions cellulaires consiste à mettre en culture un (01) gramme de cals nodulaires dans 150 mL de milieux de culture liquides ME_{L0-1}.

L'ensemble des suspensions cellulaires montrent une réactivité visible à l'œil nu à travers l'augmentation de leur volume et l'apparition de petits nodules embryogènes de différents stades de développement.

L'entretien des suspensions cellulaires durant neuf (09) semaines permet de déceler trois (03) phases de culture (Figure 21 ; Planche 05) :

- 1- Phase de latence ou d'adaptation :** d'une durée d'une semaine. Cette phase se caractérise par une absence de croissance visible à l'œil nu et une perte en poids frais des fragments de cals en suspension. Ce phénomène est constaté lors du renouvellement des milieux liquides.
- 2- Phase de croissance :** elle est d'une durée de sept (07) semaines correspondant à la période s'étalant de la 2^{ème} à la 8^{ème} semaine de culture au cours de laquelle on note, avant chaque renouvellement des milieux liquides, une augmentation importante du poids frais. Durant cette deuxième phase de culture, les fragments de cals en suspension montrent une réactivité visible à l'œil nu, et qui se caractérise par l'apparition d'une embryogenèse somatique secondaire et l'apparition de PEM à différents stades de développement (globulaire et post globulaire). Il est à noter l'apparition durant cette phase de pseudoembryons filiformes flottant à la surface du milieu de culture.
- 3- Phase de ralentissement (ou stationnaire) :** elle dure une (01) semaine, et correspond à la 9^{ème} semaine de culture. Durant cette troisième phase de culture, les suspensions cellulaires montrent une réactivité qui reste toujours visible à l'œil nu. Celle-ci se caractérise par la présence d'EMS et une faible augmentation du poids frais noté à la fin de la semaine de culture.

Parallèlement à la réactivité décrite précédemment, l'apparition du phénomène de brunissement au niveau des suspensions s'observe dès la 2^{ème} semaine de culture et se poursuit tout au long

des subcultures ultérieures. Cependant, des différences sont constatées entre les traitements à l'AS.

En effet, c'est au niveau du traitement ME_{L1}(1 mg/L d'AS) que l'apparition du phénomène de brunissement est le plus intense pour l'ensemble des cultivars étudiés mais sans incidence néfaste sur le développement ultérieur des suspensions (Tableau 18).

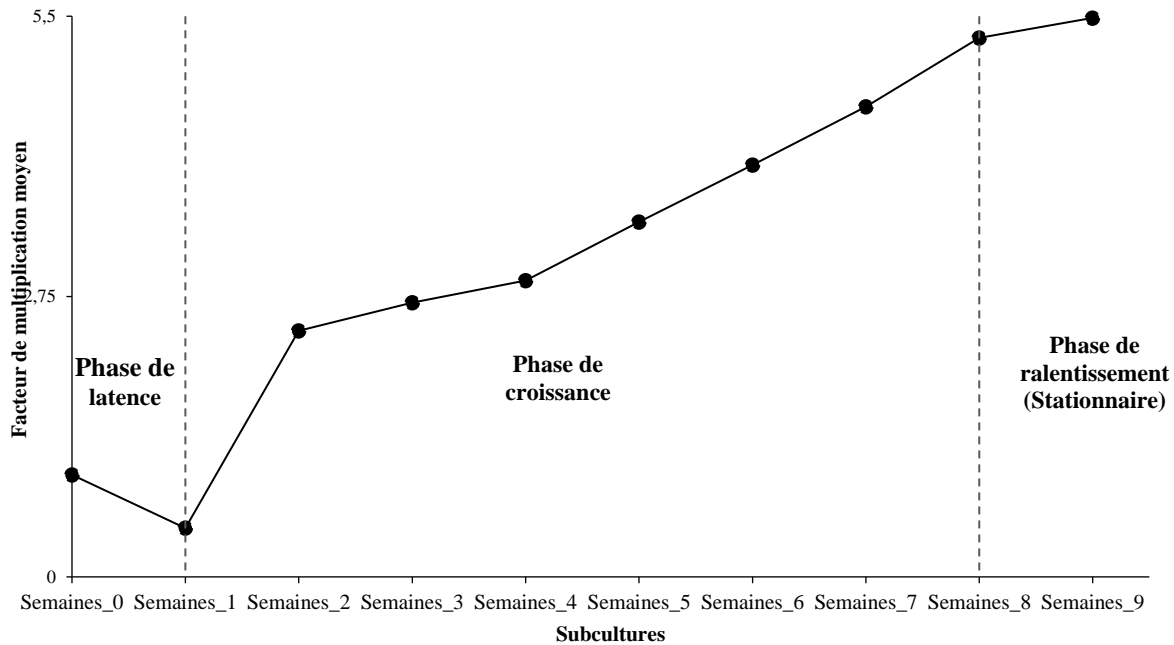


Figure 21 : Courbe de croissance des suspensions cellulaires obtenue à partir des facteurs de multiplication moyens durant les neuf (09) semaines de culture réalisées

Tableau 18 : Variation de l'intensité de la réactivité et du brunissement des suspensions en fonction des traitements à l'AS testés et des cultivars étudiés.

Cultivars	Traitements	Intensité de la réactivité	Intensité du brunissement
DNF	ME _{L0} (0 mg/L d'AS)	+++	++
	ME _{L1} (1 mg/L d'AS)	+++	++++
DNM	ME _{L0} (0 mg/L d'AS)	++	+++
	ME _{L1} (1 mg/L d'AS)	+++	++++
GR	ME _{L0} (0 mg/L d'AS)	+	+
	ME _{L1} (1 mg/L d'AS)	+++	++
TK	ME _{L0} (0 mg/L d'AS)	+++	+++
	ME _{L1} (1 mg/L d'AS)	++	++++

+ : Faible intensité ; ++ : Moyenne intensité ; +++ : Forte intensité ; ++++ : Très forte intensité

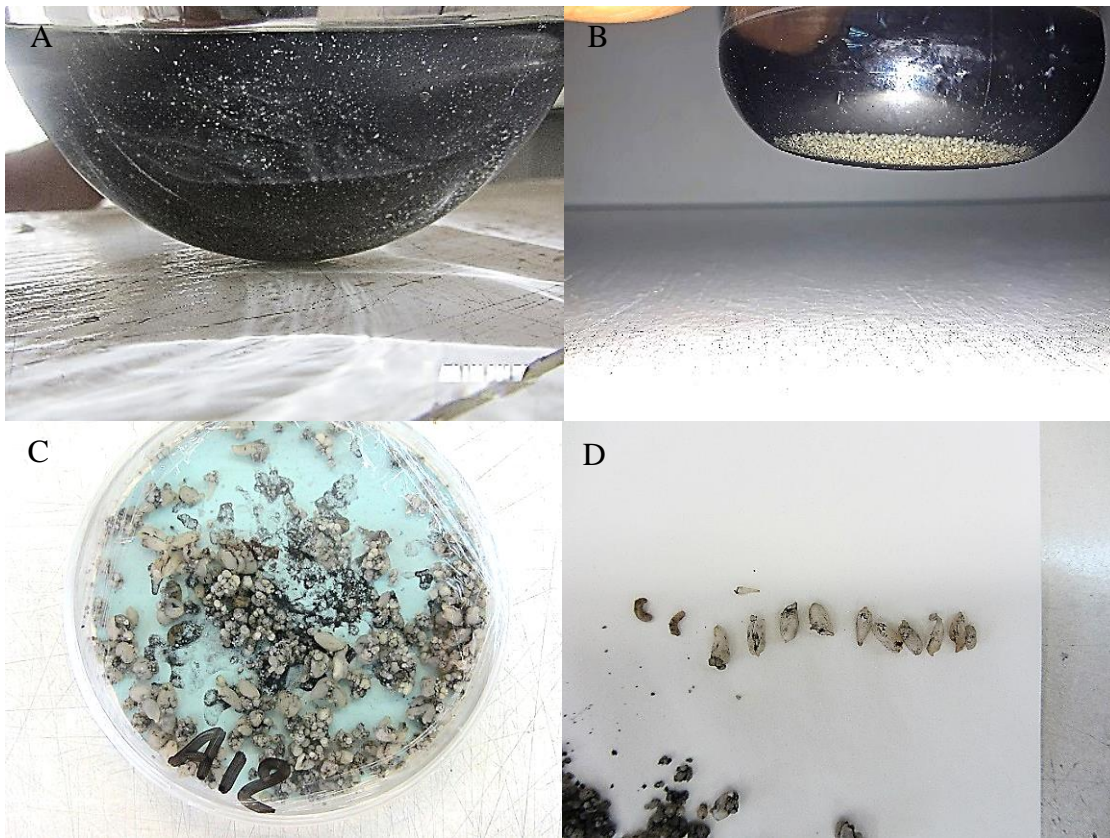


Planche 05 : Initiation de l'embryogenèse et maturation des PEM en milieux liquides agités.

- A :** Aspect de la suspension en milieu liquide agités lors de la mise en culture (G x1).
- B :** Aspect de la suspension après quatre (04) semaines de culture (G x0,6).
- C :** Amas proembryonnaires avec avec formation d'EMS obtenus après neuf (09) semaines de culture en présence de 1 mg/L d'AS (G x0,8).
- D :** EMS obtenus en milieu liquide agité après neuf (09) semaines de culture (G x1).

4-2-1-2- Variation du poids frais des culture en suspension

L'évaluation de l'accroissement du poids frais des suspensions en milieux liquides agités repose sur le calcul des facteurs de multiplication au cours des neuf (09) semaines de culture. L'accroissement du poids frais des suspensions en milieux liquides agités au cours des subcultures, est évalué à travers les facteurs de multiplication (poids frais final/poids frais initial).

Les cultures en absence ou en présence d'AS présentent une période de latence d'une semaine suivie par une augmentation identique en poids frais, et ce, jusqu'à la 7^{ème} semaine de culture. Au-delà, c'est le traitement ME_{L1} (1 mg/L d'AS) qui montre la plus forte augmentation en poids frais. L'analyse de la variance à mesures répétées ne révèle pas d'effet significatif des traitements testés ($F_{ddl\ 1-30} = 0,6484$; $p=0,4250$). Cependant, l'évolution du poids frais des culture présente un effet significatif du temps ($F_{ddl\ 9-250} = 98,7252$; $p < 0,0001$) et de l'interaction traitements*temps ($F_{ddl\ 9-250} = 2,2091$; $p = 0,0218$) (Annexe I).

L'ensemble des suspensions issue des quatre (04) cultivars étudiés présente une augmentation du poids frais précédée par une phase de latence ou d'adaptation d'une durée d'une semaine. Par la suite, des différences entre cultivars sont constatées. En effet, les suspensions issues du cultivar DNM montrent la plus forte évolution en poids frais sans atteindre la phase de croissance stationnaire après neuf (09) semaines de culture, alors que les suspensions issues des cultivars DNF, TK présentent une évolution en poids frais moins importante atteignant la phase de croissance ralentie respectivement à la 8^{ème} et 7^{ème} semaine de culture. L'analyse de la variance à mesures répétées révèle un effet significatif des cultivars étudiés ($F_{ddl\ 3-28} = 13,6129$; $p < 0,0001$) sur l'évolution du poids frais des cultures avec un effet significatif du temps ($F_{ddl\ 9-252} = 125,2449$; $p < 0,0001$) et de l'interaction traitements*temps ($F_{ddl\ 25-252} = 4,5046$; $p < 0,0001$). La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % permet d'identifier deux (02) groupes homogènes de cultivars à l'issue de neuf (09) semaines de culture (Annexe I)

L'évolution du poids frais des suspensions varie entre cultivars mais aussi au niveau de chacun des cultivars étudiés et ceci en fonction des traitements à l'AS appliqués. En effet, une évolution identique entre traitements est enregistrée au niveau des cultivars DNF, DNM et TK à la fin des neuf (09) semaines de culture contrairement au cultivar GR où c'est le traitement ME_{L1} (1 mg/L d'AS) qui présente la plus forte augmentation par rapport au traitement ME_{L0} (0 mg/L d'AS) et ceci dès la 4^{ème} semaine de culture (Figure 22).

Afin d'identifier les combinaisons (Cultivars-Traitements à l'AS) les plus favorables à l'augmentation en poids frais des suspensions, une analyse de la variance à mesures répétées est réalisée au niveau de chacun des quatre cultivars étudiés suivie par une comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % dans le cas de l'existence d'un effet significatif (Annexe I). Le Tableau 19 résume les résultats obtenus.

Tableau 19 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur les poids frais obtenus au niveau des combinaisons (Cultivars-Traitements) lors de l'étape de l'induction de l'embryogenèse somatique en milieux liquides agités.

Cultivars-Traitements à l'AS	Test d'Anova à mesures répétées	Signification asymptotique (bilatérale)	Comparaison des moyennes	Meilleure combinaison
DNF- Traitements	0,0055	0,9434	-	-
DNM- Traitements	0,0521	0,8217	-	-
GR- Traitements	20,9145	0,0038	(02) groupes	GR – ME _{L1}
TK- Traitements	0,7610	0,4166	-	-

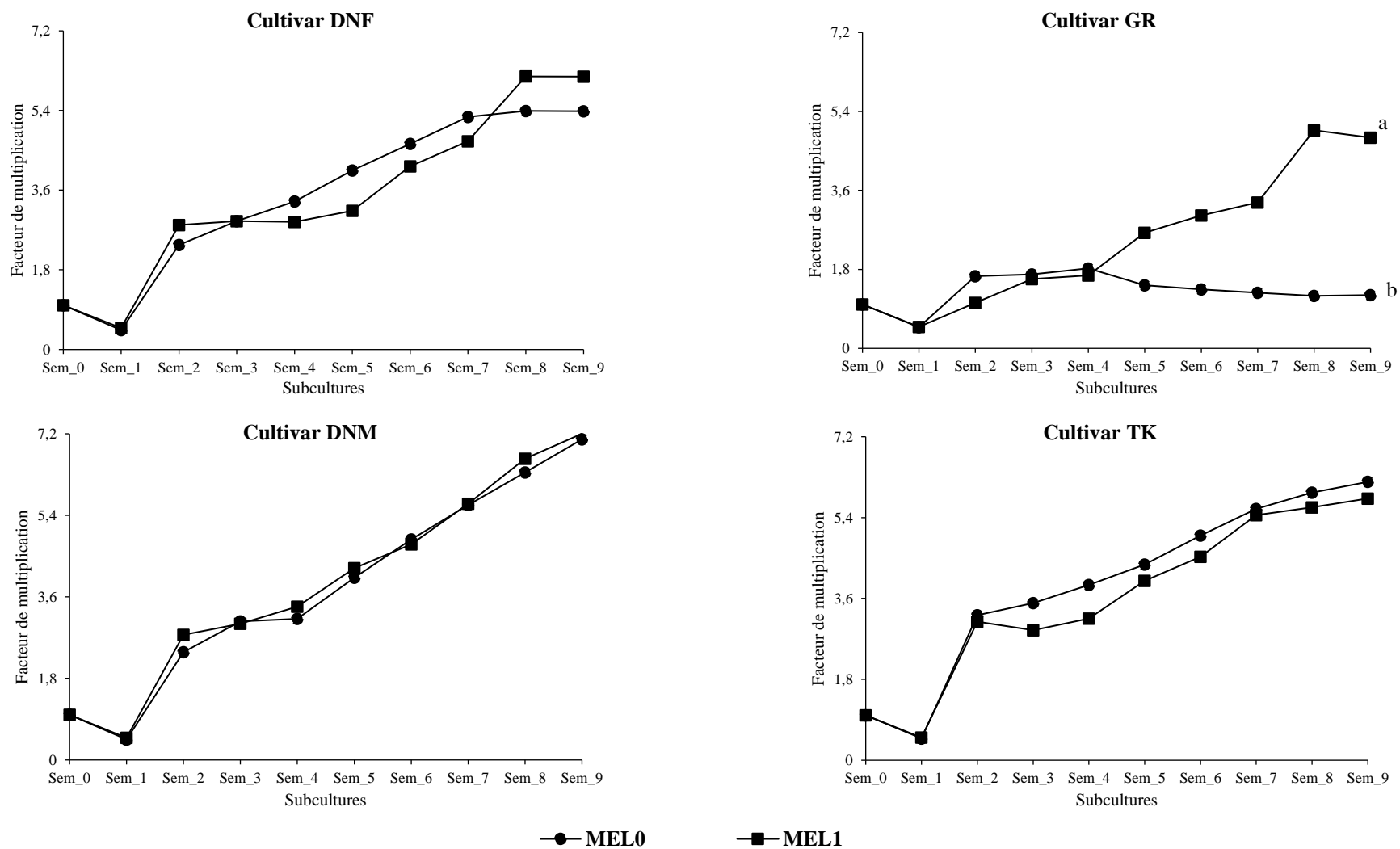


Figure 22 : Variation du poids frais des suspensions en fonction des cultivars et des traitements à l'AS au cours des neuf (09) semaines de culture

4-2-1-3- Variation du nombre d'EMS obtenus en milieux liquides agités

L'utilisation du milieu liquide agité permet l'initiation de l'embryogenèse aboutissant au bout de neuf (09) semaines de culture à la formation d'un certain nombre d'EMS individualisés.

Ainsi, l'absence ou la présence de l'AS conduisent à l'obtention d'EMS en milieu liquide agité. Cependant, c'est le traitement ME_{L1} (1 mg/L d'AS) qui génère le plus grand nombre moyen d'EMS avec 8 embryons à la fin des neuf (09) semaines de culture. Cependant, L'analyse de la variance à un facteur ne révèle pas d'effet significatif des traitements testés ($F_{ddl\ 1-30} = 0,9150$; $p = 0,3464$) sur le nombre d'EMS obtenus en milieux liquides agités (Annexe I).

L'ensemble des suspensions issue des quatre (04) cultivars étudiés aboutit à la formation d'EMS mais avec des variations constatées. En effet, c'est au niveau du cultivar DNF que le plus grand nombre moyen d'EMS est produit (12 embryons). Les cultivars DNM et TK génèrent respectivement des nombres moyens d'EMS de 9 et 6. Le cultivar GR produit seulement ≈ 2 embryons. L'analyse de la variance à un facteur atteste d'un effet significatif des cultivars étudiés ($F_{ddl\ 3-28} = 5,6964$; $p = 0,0036$) sur le nombre d'EMS obtenus en milieux liquides agités. La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % permet d'identifier trois (03) groupes homogènes (Annexe I).

Le nombre moyen d'EMS produits en milieux liquides agités varie entre cultivars mais aussi au niveau de chacun des cultivars étudiés et ceci en fonction des traitements à l'AS appliqués. En effet, pour les cultivars DNF et TK c'est le traitement ME_{L1} (1 mg/L d'AS) qui génère le plus grand nombre d'embryons contrairement au cultivar DNM où c'est le traitement ME_{L0} (0 mg/L d'AS) qui favorise le développement des PEM vers l'état structuré. Pour le cultivar GR, seul le traitement ME_{L1} (1 mg/L d'AS) aboutit à la formation d'EMS (Figure 23).

Afin d'identifier les combinaisons (Cultivars-Traitements à l'AS) les plus favorables à la formation d'EMS, une analyse de la variance à un facteur est réalisée au niveau de chacun des quatre cultivars étudiés suivie par une comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % dans le cas de l'existence d'un effet significatif. Le Tableau 20 résume les résultats obtenus (Annexe I).

Tableau 20 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur le nombre moyen d'EMS obtenus en milieux liquides agités au niveau des combinaisons (Cultivars-Traitements)

Cultivars- Traitements à l'AS	Test d'Anova à un facteur	Signification asymptotique (bilatérale)	Comparaison des moyennes	Meilleure combinaison
DNF- Traitements	6,1084	0,0484	(02) groupes	DNF– MEL1-
DNM- Traitements	6,0119	0,0497	(02) groupes	DNM– MEL0
GR- Traitements	7,7368	0,0319	(02) groupes	GR – MEL1
TK- Traitements	38,5714	0,0008	(02) groupes	TK – MEL1-

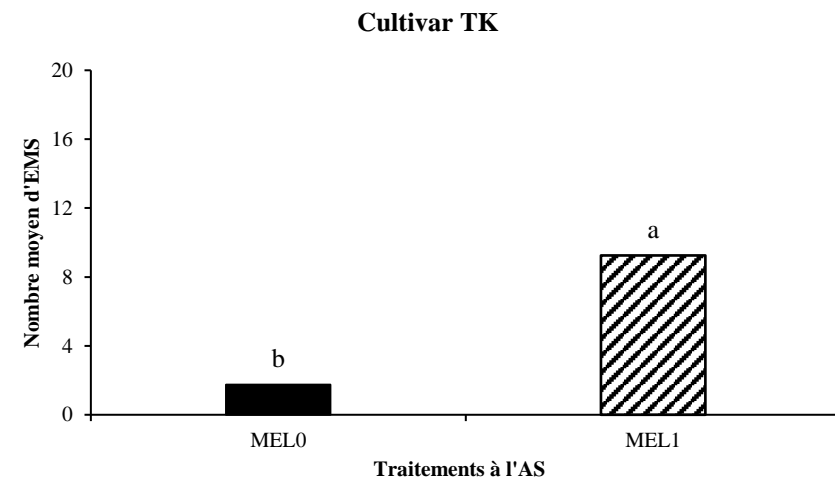
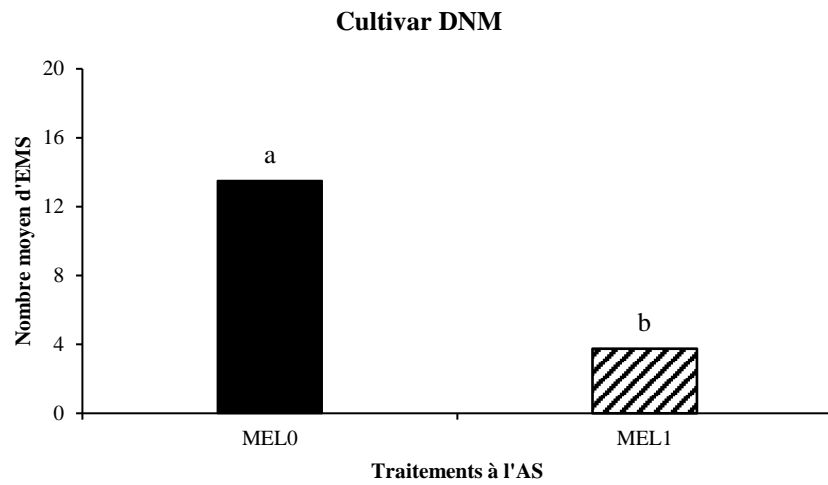
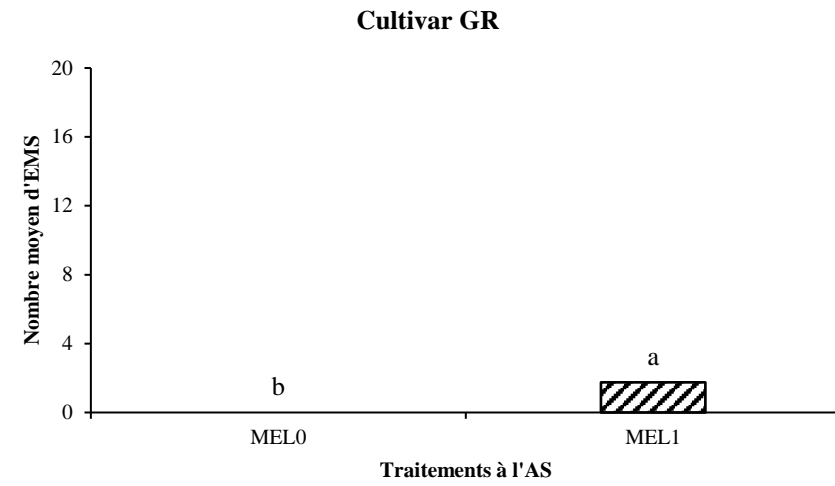
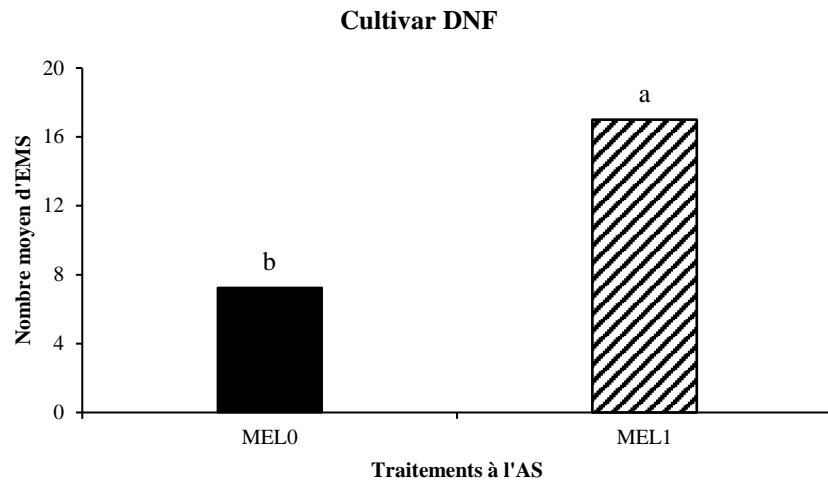


Figure 23 : Variation du nombre moyen d'EMS en fonction des cultivars et des traitements à l'AS après neuf (09) semaines de culture en milieu liquide agité

4-2-2- Induction des PEM en milieux liquides et maturation sur milieux solides

4-2-2-1- Evolution générale des PEM issus des cultures en suspension étalés sur milieu solide

Comme décrit précédemment, l'emploi du milieu liquide ME_L en agitation permet l'obtention d'EMS mais également d'un grand nombre de PEM qui n'ont pas achever leur développement vers l'état structuré au terme de neuf (09) semaines de culture (Planche 06-A). Ainsi et afin de favoriser la maturation des PEM, les amas cellulaires sont étalés dans des bocaux de culture de 250 mL contenant 50 mL de milieux solides (ME_S) de même composition que les milieux liquides testés (ME_{L0-1}) additionnés de 7 g/L d'Agar (Planche 06-B).

La réactivité des amas proembryonnaires étalés est décelé à l'œil nu dès la 1^{ère} semaine de culture et aboutissent au bout de quatre (04) semaines à la formation d'EMS individualisés (Planche 06-C et D).

Le phénomène d'embryogenèse secondaire, observé lors de la phase liquide, se poursuit, même après l'étalement des PEM sur milieu solides donnant naissance à de nouvelles générations d'amas proembryonnaires.

4-2-2-2- Variation du nombre d'EMS issus de l'étalement des PEM issus des cultures en suspension sur milieux solides

L'absence ou la présence de l'AS aboutissent la production d'EMS individualisés mais c'est au niveau des étalements de PEM contenant 1 mg/L d'AS que le plus grand nombre moyen d'EMS est noté (25 embryons). L'analyse de la variance à un facteur confirme l'existence d'un effet significatif des traitements à l'AS ($F_{ddl\ 1-30} = 4,3281$; $p = 0,0461$) sur le nombre d'EMS obtenus après étalement des PEM sur milieux solides. La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % identifie deux (02) groupes homogènes (Annexe I).

Une production d'EMS individualisés est obtenue au niveau des quatre (04) cultivars étudiés après étalement des PEM sur milieux solides mais avec des variations. Le plus grand nombre moyen d'EMS est obtenu au niveau du cultivar DNF avec environ 33 embryons. Pour les cultivars DNM et TK, un nombre moyen équivalent (≈ 25 embryons) d'EMS est produit. Le plus faible nombre moyen d'EMS est noté au niveau du cultivar GR (≈ 9 embryons). L'analyse de la variance à un facteur confirme l'existence d'un effet significatif des cultivars étudiés ($F_{ddl\ 3-28} = 8,2975$; $p = 0,0004$) sur le nombre d'EMS produits après étalement des PEM sur milieux solides. La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % permet de distinguer deux (02) groupes homogènes (Annexe I).

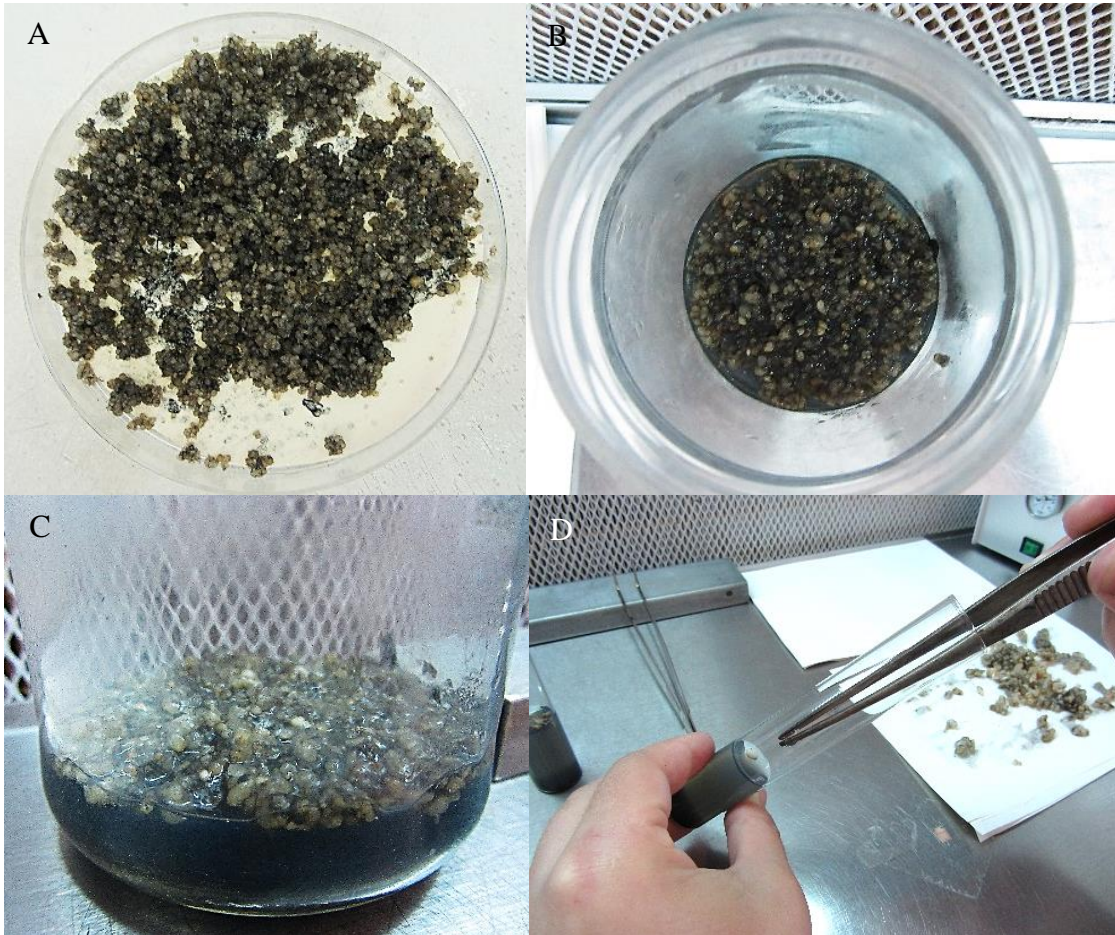


Planche 06: Initiation de l'embryogenèse somatique en milieux liquides et maturation des PEM en milieux solides.

- A : Aspect des amas proembryonnaires issus des milieux liquides (G x1).
- B : Etalement des amas proembryonnaires issus des milieux liquides sur milieux solides (G x0,5).
- C : Maturation des PEM sur milieux solides (G x0,8).
- D : Mise en germination des EMS obtenus lors de l'alternance (liquide/solide) (G x1).

Le nombre moyen d'EMS produits après étalement des PEM sur milieux solides varie entre cultivars mais aussi au niveau de chacun des cultivars étudiés et ceci en fonction des traitements à l'AS appliqués. En effet, l'absence ou la présence de l'AS au niveau des cultivars étudiés (à l'exception du cultivar GR) aboutissent à la production d'un nombre d'EMS. En effet, pour les cultivars DNF et TK, c'est le milieu contenant 1 mg/L d'AS qui génère le plus grand nombre d'embryons contrairement au cultivar DNM où le développement des PEM vers l'état structuré est favorisé en absence d'AS. Pour le cultivar GR, seul le traitement ME_{L1} (1 mg/L d'AS) aboutit à la formation d'EMS (Figure 24).

Afin d'identifier les combinaisons (Cultivars-Traitements à l'AS) les plus favorables à la formation d'EMS après étalement, une analyse de la variance à un facteur est réalisée au niveau de chacun des quatre cultivars étudiés suivie par une comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % dans le cas de l'existence d'un effet significatif (Annexe I). Le Tableau 21 résume les résultats obtenus.

Tableau 21 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur le nombre moyen d'EMS obtenus après étalement des des PEM issus des suspensions sur milieux solides au niveau des combinaisons (Cultivars-Traitements)

Cultivars- Traitements à l'AS	Test d'Anova à un facteur	Signification asymptotique (bilatérale)	Comparaison des moyennes	Meilleure combinaison
DNF- Traitements	39,8936	0,0007	(02) groupes	DNF– ME _{L1}
DNM- Traitements	17,8516	0,0055	(02) groupes	DNM– ME _{L0}
GR- Traitements	51,9382	0,0004	(02) groupes	GR – ME _{L1}
TK- Traitements	43,0299	0,0006	(02) groupes	TK – ME _{L1}

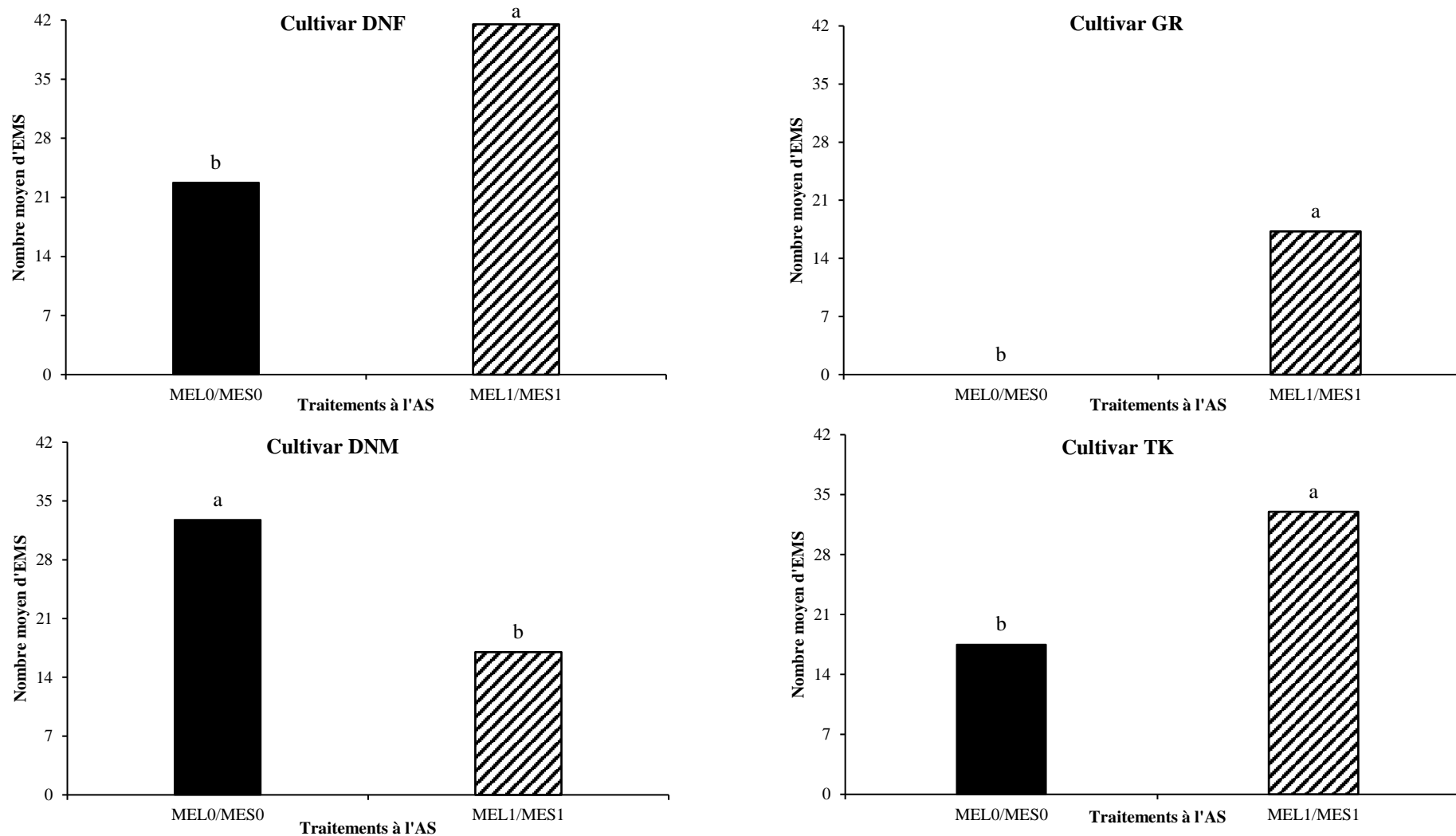


Figure 24 : Variation du nombre moyen d'EMS issus des étalements des suspensions cellulaires sur milieu solide en fonction des cultivars et des traitements à l'AS après quatre (04) semaines de culture.

4-2-2-3- Variation de la teneur en PT

Des deux traitements testés lors de l'étalement des amas proembryonnaires, c'est le traitement contenant 1 mg/L d'AS qui produit la plus forte teneur moyenne en PT (8,33 mg/g de MF). L'analyse de la variance à un facteur atteste d'un effet significatif des traitements testés ($F_{ddl\ 1-16} = 5,8628$; $p = 0,0257$) sur la teneur en PT des amas proembryonnaires obtenus après étalement des PEM obtenus en milieu liquide sur milieux solides. La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % identifie deux (02) groupes homogènes (Annexe I).

Les teneurs en PT dosées montrent une différence entre cultivars étudiés. En effet, c'est au niveau du cultivar DNF que la plus forte teneur moyenne en PT (8,6 mg/g de MF) est produite. Les cultivars TK et DNM présentent des teneurs moyennes en PT moins importantes respectivement 7,92 et 7,44 mg/g de MF. L'analyse de la variance à un facteur confirme l'existence d'un effet significatif entre des cultivars étudiés ($F_{ddl\ 2-15} = 8,1499$; $p = 0,0040$) sur la teneur en PT des amas proembryonnaires obtenus après étalement des PEM issus des milieux liquides sur milieux solides. La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % identifie deux (02) groupes homogènes (Annexe I).

La teneur en PT des amas embryonnaires issus des étalements des PEM varie entre cultivars mais aussi au niveau de chacun des cultivars étudiés et ceci en fonction des traitements à l'AS appliqués. Cependant, c'est le traitement contenant 1 mg/L d'AS qui stimule la production des plus fortes teneurs en PT au niveau de chacun des cultivars étudiés (Figure 25).

Afin d'identifier les combinaisons (Cultivars-Traitements à l'AS) ayant permis la production des plus fortes teneurs en PT, une analyse de la variance à un facteur est réalisée au niveau de chacun des cultivars étudiés suivie par une comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % dans le cas de l'existence d'un effet significatif (Annexe I). Le tableau 22 résume les résultats obtenus.

Tableau 22 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur les teneurs en PT des amas embryonnaires issus des étalements PEM obtenus en milieu liquide au niveau des combinaisons (Cultivars-Traitements).

Cultivars-Traitements à l'AS	Test d'Anova à un facteur	Signification asymptotique (bilatérale)	Comparaison des moyennes	Meilleure combinaison
DNF- Traitements	9,6745	0,0359	(02) groupes	DNF-ME _{L1} /ME _{S1}
DNM- Traitements	2,2879	0,2049	-	-
TK- Traitements	92,8759	0,0006	(02) groupes	TK-ME _{L1} /ME _{S1}

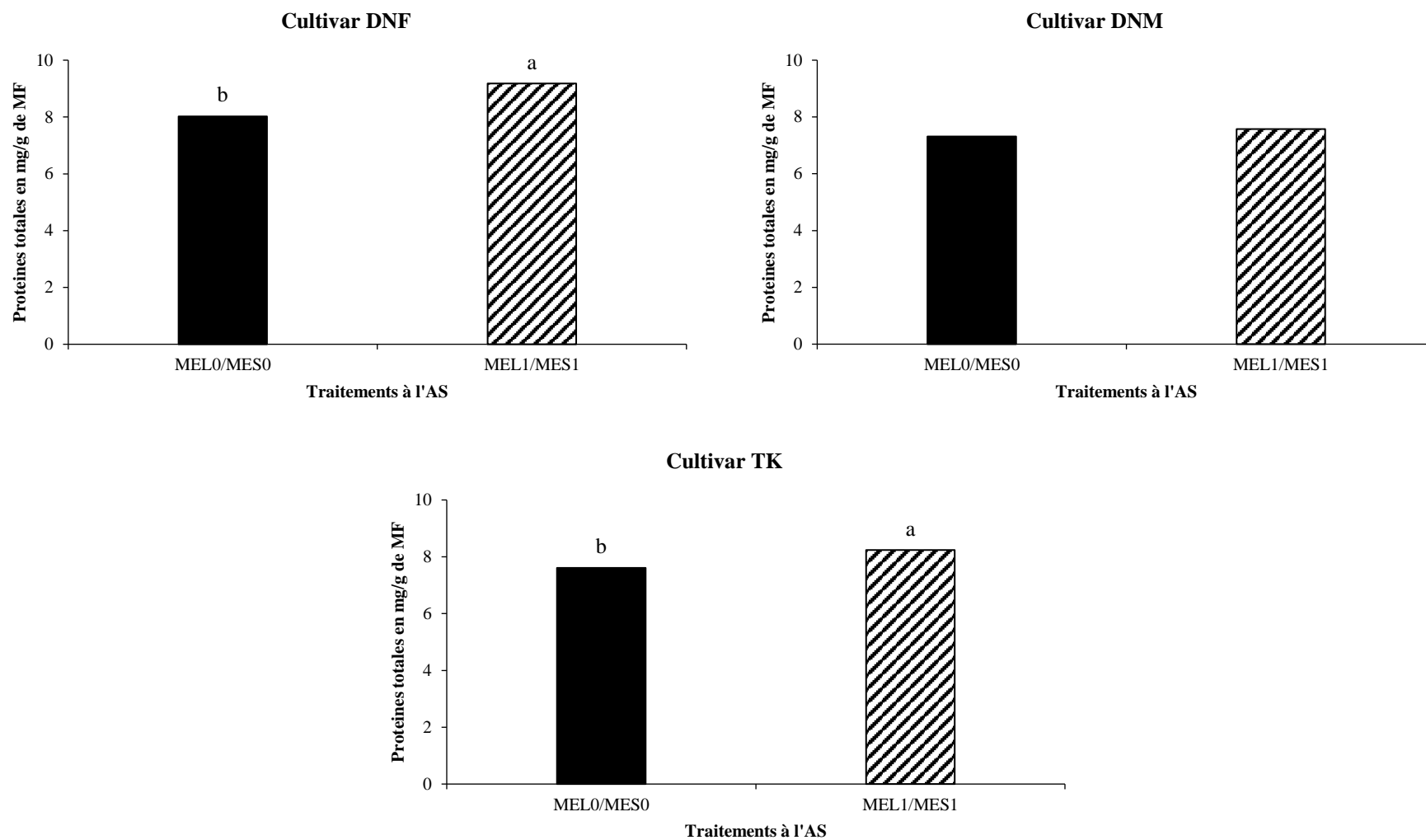


Figure 25 : Variation de la teneur en PT des amas embryonnaires après étalement des suspensions cellulaires sur milieu solide en fonction des cultivars et des traitements à l'AS

4-2-3- Induction et maturation sur milieux solides

4-2-3-1- Evolution générale des cultures

Comme pour l'initiation de l'embryogenèse somatiques en milieux liquides agités, le matériel végétal de départ consiste en des cals présentant toutes les caractéristiques de cals embryogènes issus de quatre (04) cultivars de palmier dattier : DNF, DNM, GR et TK. Ces derniers, sont étalés dans des boîtes de culture le milieu solide d'induction de l'embryogenèse et de maturation (ME_S) (Planche-07-A).

Au terme des neuf (09) semaines de culture, l'ensemble des cultures présente une réactivité observable à l'œil nu à travers l'augmentation du volume des cals étalés et l'apparition de petits nodules embryogènes accolés ou rarement individualisés dont certains évoluent vers des embryons structurés (Planche 07-B, C et D).

Parallèlement à la réactivité observée, un brunissement important causant la nécrose de certaines cultures est observé principalement en présence de 1 mg/L d'AS (Tableau 23).

Tableau 23 : Variation de l'intensité de la réactivité et du brunissement des cals étalés sur milieux solides évalués à l'œil nu en fonction des traitements à l'AS testés et des cultivars étudiés.

Cultivars	Traitements	Intensité de la réactivité	Intensité du brunissement
DNF	ME _{L0} (0 mg/L d'AS)	++++	+
	ME _{L1} (1 mg/L d'AS)	++	++
DNM	ME _{L0} (0 mg/L d'AS)	+++	++
	ME _{L1} (1 mg/L d'AS)	++	++++
GR	ME _{L0} (0 mg/L d'AS)	+	+
	ME _{L1} (1 mg/L d'AS)	0	+
TK	ME _{L0} (0 mg/L d'AS)	++	++++
	ME _{L1} (1 mg/L d'AS)	++	++++

0 : Absence ; + : Faible intensité ; ++ : Moyenne intensité ; +++ : Forte intensité ; ++++ : Très forte intensité.

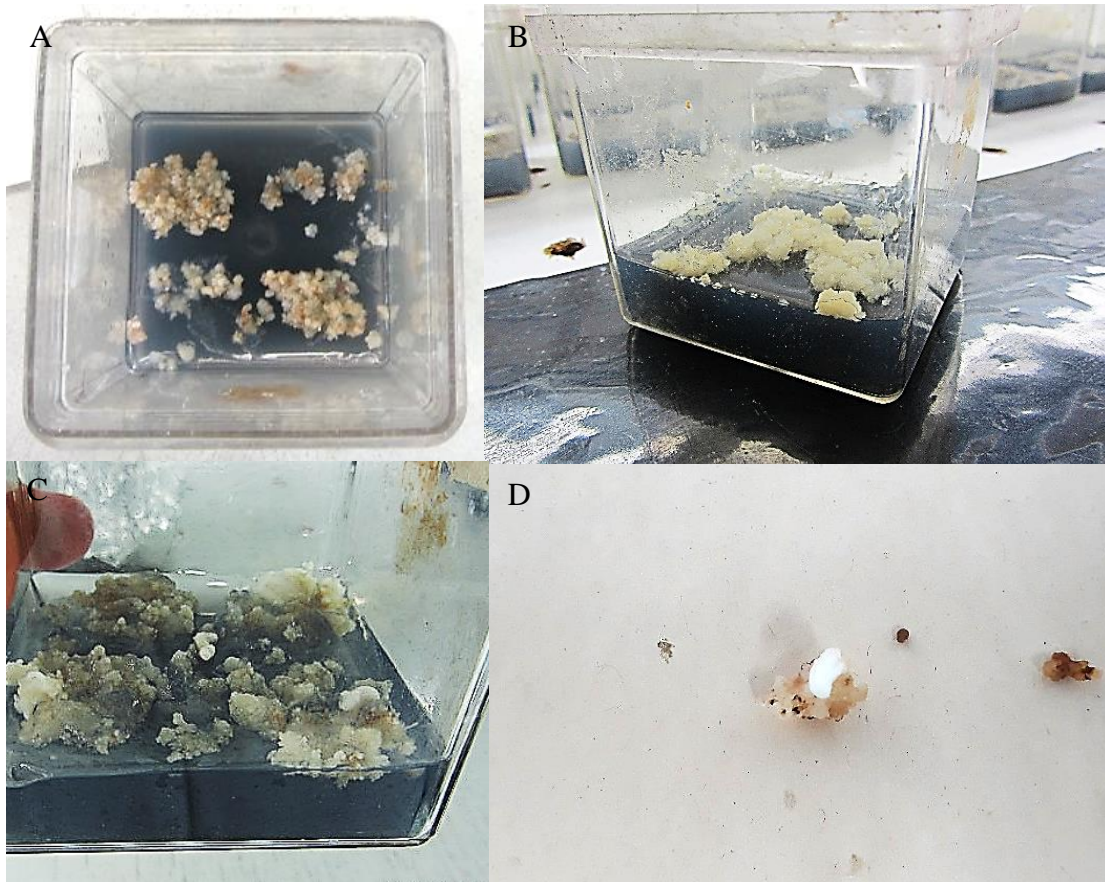


Planche 07 : Initiation de l'embryogenèse somatique et maturation des PEM en milieux solides.

- A :** Etalement des cals nodulaires lors de l'initiation de l'embryogenèse en milieux solides (G x0,8).
- B :** Début de la réactivité des amas de cals après deux semaines de culture en milieux solides (G x0,8).
- C :** Début de formation de proembryons au stade globulaire après un quatre semaines de culture (G x1).
- D :** Formation d'un Embryons somatique directement sur un cals nodulaire embryogène (G x0,5).

4-2-3-2- Variation du nombre d'EMS obtenus sur milieux solides

L'ensemble des cultures montre une réactivité observable à l'œil nu. Cependant, le nombre moyen d'EMS produits varie. En effet, c'est le traitement ME_{S0} (0 mg/L d'AS) qui génère le plus grand nombre moyen d'EMS (≈ 15 embryons). L'analyse de la variance à un facteur confirme l'existence d'un effet significatif de l'AS ($F_{ddl\ 1-30} = 9,5256$; $p = 0,0043$) sur le nombre d'EMS obtenus sur milieux solides. La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % permet d'identifier deux (02) groupes homogènes (Annexe I).

La production d'EMS individualisés est obtenue sur milieux solides au niveau des cultivars étudiés, mais à degrés différents. Ainsi, le plus grand nombre d'EMS est produit par le cultivar DNF avec environ 15 embryons suivi par les cultivars DNM et TK avec respectivement un nombre moyen d'EMS de 13 et 11 embryons. Pour le cultivar GR, un nombre moyen très faible est obtenu (01 embryon). L'analyse de la variance à un facteur révèle un effet significatif des cultivars étudiés ($F_{ddl\ 3-28} = 6,4737$; $p = 0,0018$) sur le nombre d'EMS obtenus sur milieux solides. La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % permet d'identifier deux (02) groupes homogènes (Annexe I).

Le nombre moyen d'EMS produits varie entre cultivars, mais aussi, au niveau de chacun des cultivars étudiés, et ceci, en fonction des traitements à l'AS appliqués. En effet, des deux traitements testés sur milieux solides au niveau des cultivars étudiés, c'est le traitement ME_{S0} (0 mg/L d'AS) qui permet d'obtenir le plus grand nombre moyen d'EMS à l'exception du cultivar GR où seul le traitement ME_{S1} (1 mg/L d'AS) permet une très faible production d'EMS (Figure 26).

Afin d'identifier les combinaisons (Cultivars-Traitements à l'AS) les plus favorables à la formation d'EMS sur milieu solide, une analyse de la variance à un facteur est réalisée au niveau de chacun des quatre cultivars étudiés suivie par une comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % dans le cas de l'existence d'un effet significatif (Annexe I). Le tableau 24 résume les résultats obtenus.

Tableau 24 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur le nombre moyen d'EMS obtenus sur milieux solides au niveau des combinaisons (Cultivars-Traitements).

Cultivars-Traitements à l'AS	Test d'Anova à un facteur	Signification asymptotique (bilatérale)	Comparaison des moyennes	Meilleure combinaison
DNF- Traitements	10,6232	0,0173	(02) groupes	DNF- ME_{S0}
DNM- Traitements	153	< 0,0001	(02) groupes	DNM- ME_{S0}
GR- Traitements	2	0,2070	-	-
TK- Traitements	7,7368	0,0319	(02) groupes	TK- ME_{S0}

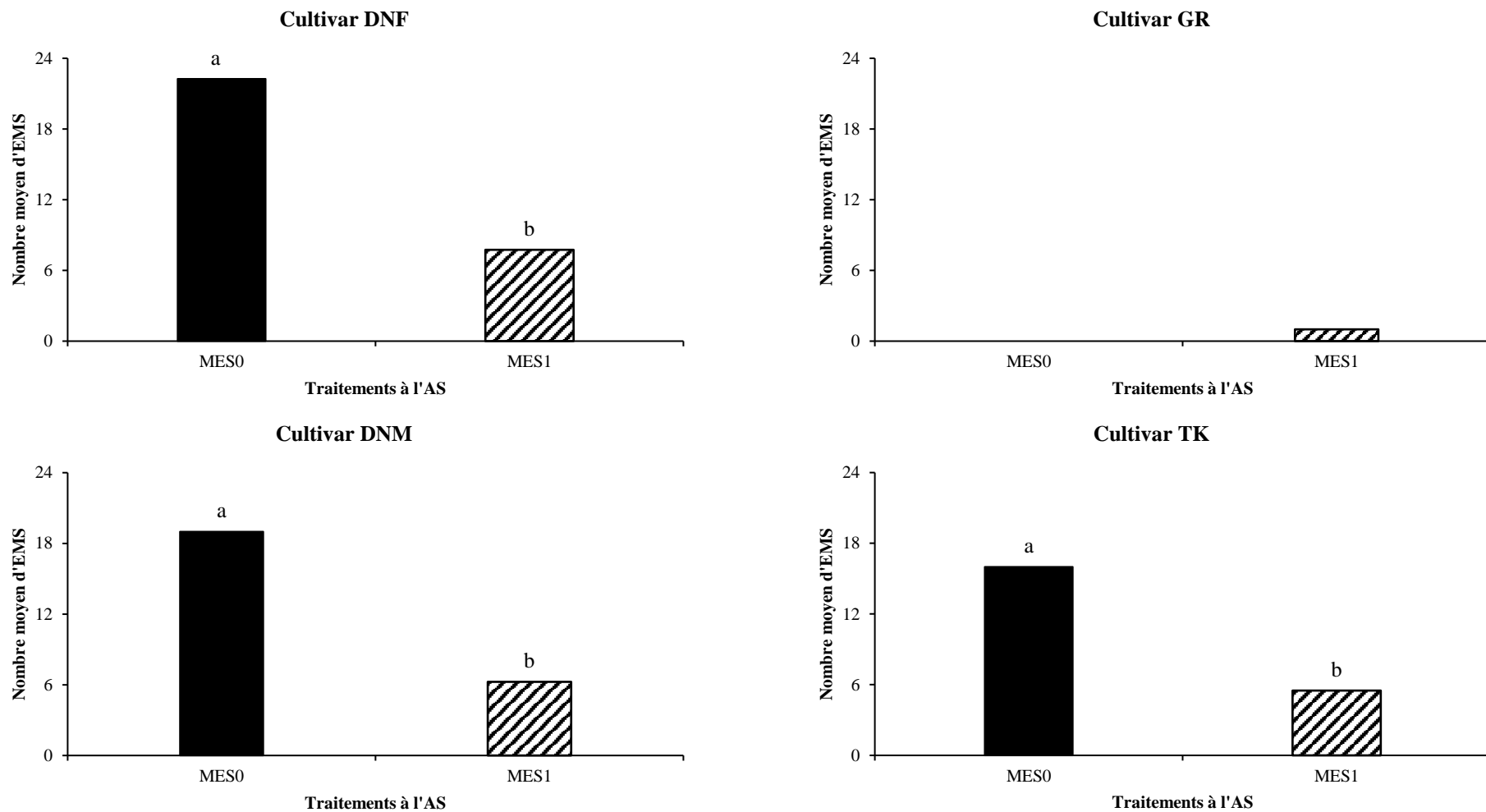


Figure 26 : Variation du nombre moyen d'EMS obtenus sur milieu solide en fonction des cultivars et des traitements à l'AS

4-2-3-3- Variation de la teneur en PT

La teneur en PT des amas embryonnaires issus des milieux solides varie. Ainsi, des deux traitements testés lors de l'initiation et la maturation des PEM en milieu solide, c'est le traitement contenant 1 mg/L d'AS qui génère la plus forte teneur moyenne en PT (7,18 mg/g de MF). L'analyse de la variance à un facteur a révélé un effet significatif des traitements testés ($F_{ddl\ 1-16} = 5,0512$; $p = 0,0391$) sur la teneur en PT des PEM obtenus sur milieux solides. La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % a permis d'identifier deux (02) groupes homogènes (Annexe I).

Les teneurs en PT ont montré une différence entre cultivars étudiés. C'est au niveau du cultivar DNM que la plus forte teneur moyenne en PT a été obtenue (7,67 mg/g de MF). L'analyse de la variance à un facteur a révélé un effet significatif des cultivars étudiés ($F_{ddl\ 2-5} = 15,0781$; $p = 0,0003$) sur la teneur en PT des PEM obtenus sur milieux solides. La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % a permis d'identifier trois (03) groupes homogènes (Annexe I).

La teneur en PT des amas embryonnaires issus des milieux liquides varie entre cultivars mais aussi au niveau de chacun des cultivars étudiés et ceci en fonction des traitements à l'AS appliqués. C'est le traitement ME_{S0} (0 mg/L d'AS) qui produit les plus fortes teneurs moyennes en PT (Figure 27).

Afin d'identifier les combinaisons (Cultivars-Traitements à l'AS) ayant permis la production des plus fortes teneurs en PT, une analyse de la variance à un facteur a été réalisée au niveau de chacun des quatre cultivars étudiés suivie par une comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % dans le cas de l'existence d'un effet significatif (Annexe I). Le Tableau 25 résume les résultats obtenus.

Tableau 25 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur les teneurs en PT des amas embryonnaires obtenus sur milieux solides au niveau des combinaisons (Cultivars-Traitements).

Cultivars- Traitements à l'AS	Test d'Anova à un facteur	Signification asymptotique (bilatérale)	Comparaison des moyennes	Meilleure combinaison
DNF- Traitements	14,6174	0,0187	(02) groupes	DNF- ME_{S0}
DNM- Traitements	1039,2936	< 0,0001	(02) groupes	DNM- ME_{S0}
TK- Traitements	83,8965	0,0008	(02) groupes	TK- ME_{S0}

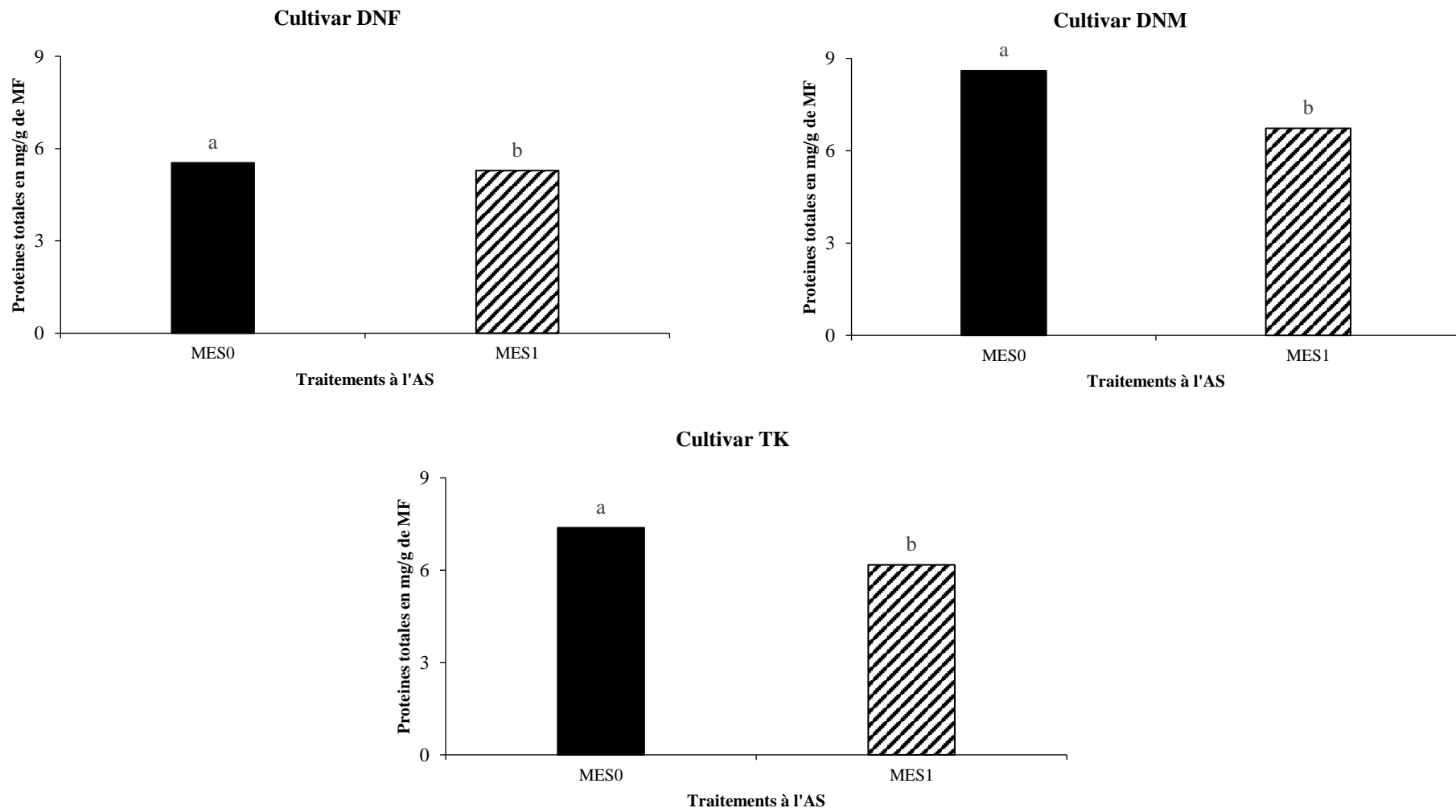


Figure 27 : Variation de la teneur en PT des amas embryonnaires issus du milieu solide en fonction des cultivars et des traitements à l'AS

4-2-4- Effet du milieu de culture sur l'évolution des PEM vers l'état structuré

Lors de l'induction et de l'embryogenèse somatique et maturation des PEM chez les quatre (04) cultivars étudiés, trois (03) types de milieux ont été utilisés à savoir : milieu liquide (ME_L), alternance liquide/solide (ME_L/ME_S) et milieu solide (ME_S) et ceci en absence ou en présence de l'AS.

Afin d'évaluer l'impact du type de milieux de culture sur l'évolution des PEM vers l'état structuré ou EMS, deux (02) paramètres sont retenus : le nombre moyen d'EMS produits et la teneur moyenne en protéines.

4-2-4-1- Variation du nombre moyen d'EMS

La comparaison du nombre moyen d'EMS (cultivars et traitements confondus) produits au niveau des trois (03) types de milieux de culture expérimentés (correspondant à 03 origines différentes) permet de noter des différences significatives. En effet, c'est l'alternance liquide /solide (ME_L/ME_S) qui favorise la production du plus grand nombre d'EMS (≈ 23 embryons). L'analyse de la variance à un facteur confirme l'existence d'un effet très hautement significatif du type de milieux de culture ($F_{ddl\ 2-93} = 24,5543$; $p < 0,0001$) sur le nombre d'EMS obtenus. La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % permet d'identifier deux (02) groupes homogènes (Annexe I).

L'absence ou la présence de l'AS aboutissent à la formation d'EMS sur les trois (03) types de milieux utilisés mais avec des différences notées. En effet, pour les cultures en milieu liquide agité (ME_L) et celles issues de l'alternance liquide /solide (ME_L/ME_S), la présence de 1 mg d'AS favorise la production d'EMS alors qu'au niveau des cultures sur milieu solide (ME_S), c'est l'absence d'AS qui permet la production du plus grand nombre moyen d'EMS. L'analyse de la variance à deux facteurs révèle un effet hautement significatif de l'interaction traitements*milieux de culture d'origine ($F_{ddl\ 5-90} = 7,2597$; $p = 0,0012$) sur le nombre d'EMS obtenus. La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % identifie cinq (05) groupes homogènes (Annexe I).

La production d'EMS individualisés est obtenue avec les quatre (04) cultivars étudiés tout en gardant le même classement (DNF, DNM, TK puis GR) et ceci quel que soit le type de milieu utilisé. Cependant, les plus grands nombres d'EMS sont produits au niveau des cultures issues de l'alternance liquide /solide (ME_L/ME_S). L'analyse de la variance à deux facteurs ne révèle pas d'effet significatif de l'interaction cultivars* milieux de culture d'origine ($F_{ddl\ 11-84}$; $p = 0,3136$) sur le nombre d'EMS obtenus (Annexe I).

Le nombre moyen d'EMS obtenu varie entre cultivars, mais aussi, au niveau de chacun des cultivars étudiés, et ceci, en fonction du type de milieu de culture d'origine et du traitement à l'AS appliqué. Ainsi, pour les cultivars DNF, GR et TK le plus grand nombre moyen d'EMS est produit au niveau des cultures issues de l'alternance liquide /solide (ME_L/ME_S) contenant 1 mg/L d'AS, et ce, à la différence du cultivar DNM où c'est l'absence de l'AS qui favorise

l'évolution des PEM vers l'état structuré au niveau des cultures issues de l'alternance liquide/solide (ME_L/ME_S) (Figure 28).

Afin d'identifier la meilleure combinaison (Milieux d'origine-Traitements) ayant permis la production du plus grand nombre d'EMS, une analyse de la variance à deux facteurs est réalisée au niveau de chacun des quatre cultivars étudiés par une comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % dans le cas de l'existence d'un effet significatif de l'interaction origine*traitements (Annexe I). Le Tableau 26 résume les résultats obtenus.

Tableau 26 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur le nombre moyen d'EMS obtenus au niveau des combinaisons (Cultivars-Origines-Traitements).

Cultivars-Origines-Traitements	Test d'Anova à deux facteurs	Signification asymptotique (bilatérale)	Comparaison multiple par paires	Meilleure combinaison
DNF-Origines-Traitements	20,0901	< 0,0001	(03) groupes	DNF- ME _{L1} /ME _{S1}
DNM-Origines-Traitements	0,8775	0,4329	-	DNM-(ME _{L0} /ME _{S0})*
GR-Origines-Traitements	38,1038	< 0,0001	(02) groupes	GR-ME _{L1} /ME _{S1}
TK-Origines-Traitements	13,5021	0,0003	(06) groupes	TK-ME _{L1} /ME _{S1}

* En l'absence d'interaction significative, l'alternance liquide /solide (ME_L/ME_S) contenant 0 mg d'AS a permis d'aboutir au plus grand nombre d'EMS.

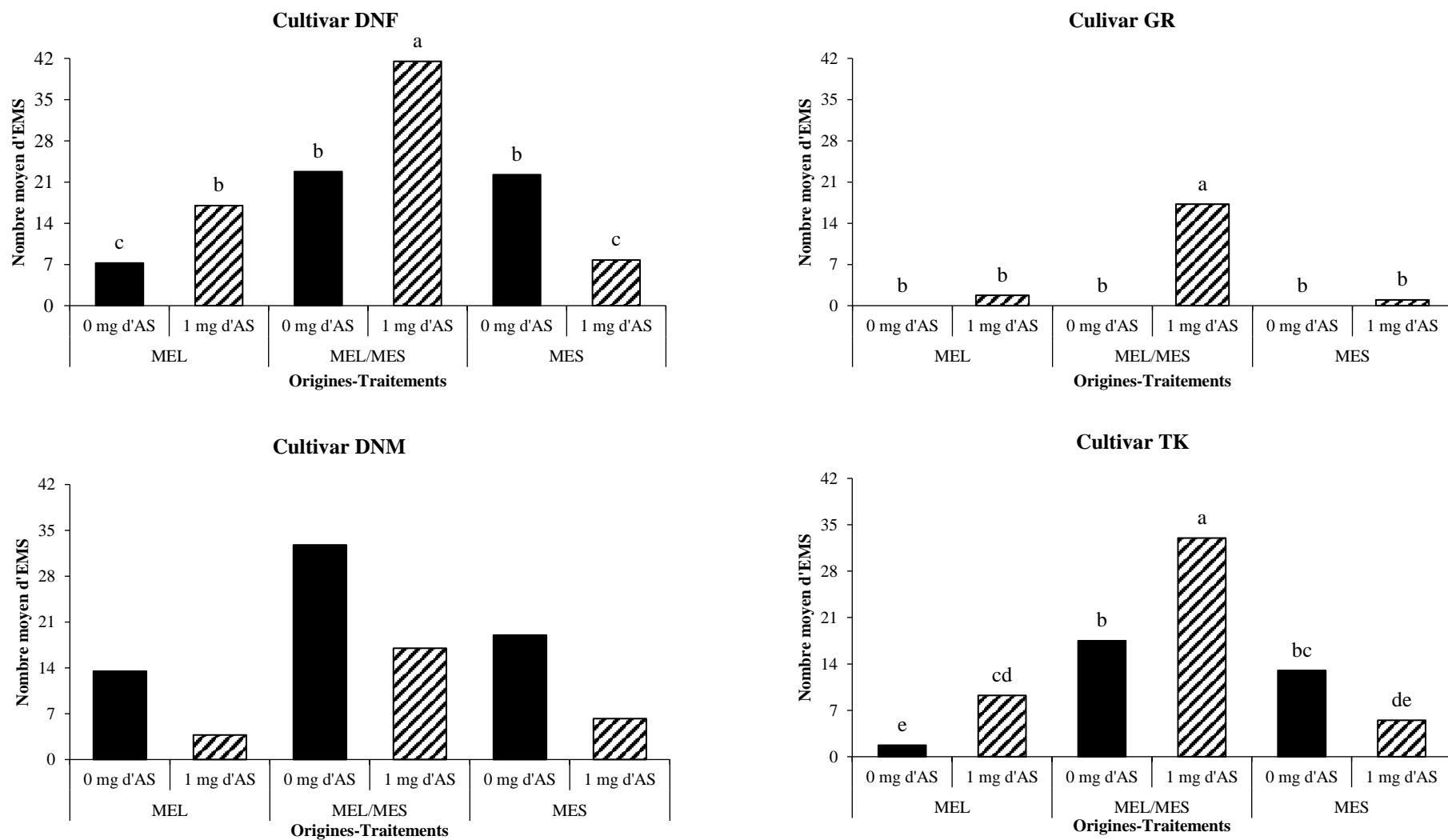


Figure 28 : Variation du nombre moyen d'EMS obtenus en fonction des cultivars, des traitements à l'AS et du type de milieu de culture d'origine.

4-2-4-2- Variation de la teneur moyenne en PT

La comparaison de la teneur en PT (cultivars et traitements confondus) au niveau des amas proembryonnaires issus de l'alternance liquide /solide (ME_L/ME_S) et ceux issus du milieu solide permet de constater une différence lisible. En effet, c'est l'alternance liquide/solide (ME_L/ME_S) qui génère la plus forte teneur en PT (≈ 8 mg/g de MF). L'analyse de la variance à un facteur révèle un effet très hautement significatif des milieux de culture d'origine ($F_{ddl\ 1-34} = 18,6$; $p = 0,0001$) sur la teneur en PT des amas proembryonnaires. La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % identifie deux (02) groupes homogènes (Annexe I).

Les teneurs en PT montrent une différence entre traitements testés en fonction des types de milieux utilisés. Ainsi, la plus forte teneur en PT est obtenue en présence de 1 mg d'AS lors de l'alternance liquide/solide (ME_L/ME_S) (8,33 mg/g de MF) à la différence des cultures sur milieux solides (ME_S) où c'est l'absence d'AS qui génère la plus forte teneur en PT (7,18 mg/g de MF). L'analyse de la variance à deux facteurs révèle un effet hautement significatif de l'interaction : traitements*milieux de culture d'origine ($F_{ddl\ 3-32} = 9,928$; $p = 0,0035$) sur la teneur en PT des amas embryonnaires. La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % permet d'identifier trois (03) groupes homogènes (Annexe I).

Les teneurs en PT montrent également une différence entre cultivars étudiés en fonction du type de milieu. En effet, au niveau des cultures issues de l'alternance liquide/solide (ME_L/ME_S), c'est le cultivar DNF qui produit la plus forte teneur moyenne en PT (8,6 mg/g de MF) contrairement aux cultures sur milieu solide (ME_S) où c'est le cultivar DNM qui génère la plus forte teneur moyenne en PT (7,67 mg/g de MF). L'analyse de la variance à deux facteurs révèle un effet très hautement significatif de l'interaction : cultivars*milieux de culture d'origine ($F_{ddl\ 5-30} = 23,21$; $p < 0,0001$) sur la teneur en PT des amas proembryonnaires. La comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % permet d'identifier quatre (04) groupes homogènes (Annexe I).

La teneur en PT varie entre cultivars, mais aussi, au niveau de chacun des cultivars étudiés, et ceci, en fonction du type de milieu de culture d'origine et du traitement en AS appliqué. Effectivement, pour les cultivars DNF et TK la plus forte teneur en PT est enregistrée en présence de 1 mg d'AS lors de l'alternance liquide/solide (ME_L/ME_S) alors que pour le cultivar DNM la plus forte teneur en PT est générée en absence d'AS au niveau des cultures sur milieu solide (ME_S) (Figure 29).

Une analyse de la variance à deux facteurs est réalisée au niveau de chacun des quatre cultivars étudiés par une comparaison des moyennes selon la méthode de Fisher-LSD au seuil de 5 % dans le cas de l'existence d'un effet significatif de l'interaction origine* traitements sur la teneur en PT (Annexe I). Le Tableau 27 résume les résultats obtenus.

Tableau 27 : Récapitulatif des tests statistiques réalisés sur les teneurs en PT des amas proembryonnaires obtenus au niveau des combinaisons (Cultivars-Origines - Traitements).

Cultivars-Origines-Traitements	Test d'Anova à deux facteurs	Signification asymptotique (bilatérale)	Comparaison multiple par paires	Meilleure combinaison
DNF-Origines-Traitements	13,9607	0,0057	(03) groupes	DNF-ME _{L1} /ME _{S1}
DNM-Origines-Traitements	137,2293	< 0,0001	(03) groupes	DNM-ME _{S0}
TK-Origines-Traitements	155,7017	< 0,0001	(03) groupes	TK-ME _{L1} /ME _{S1}

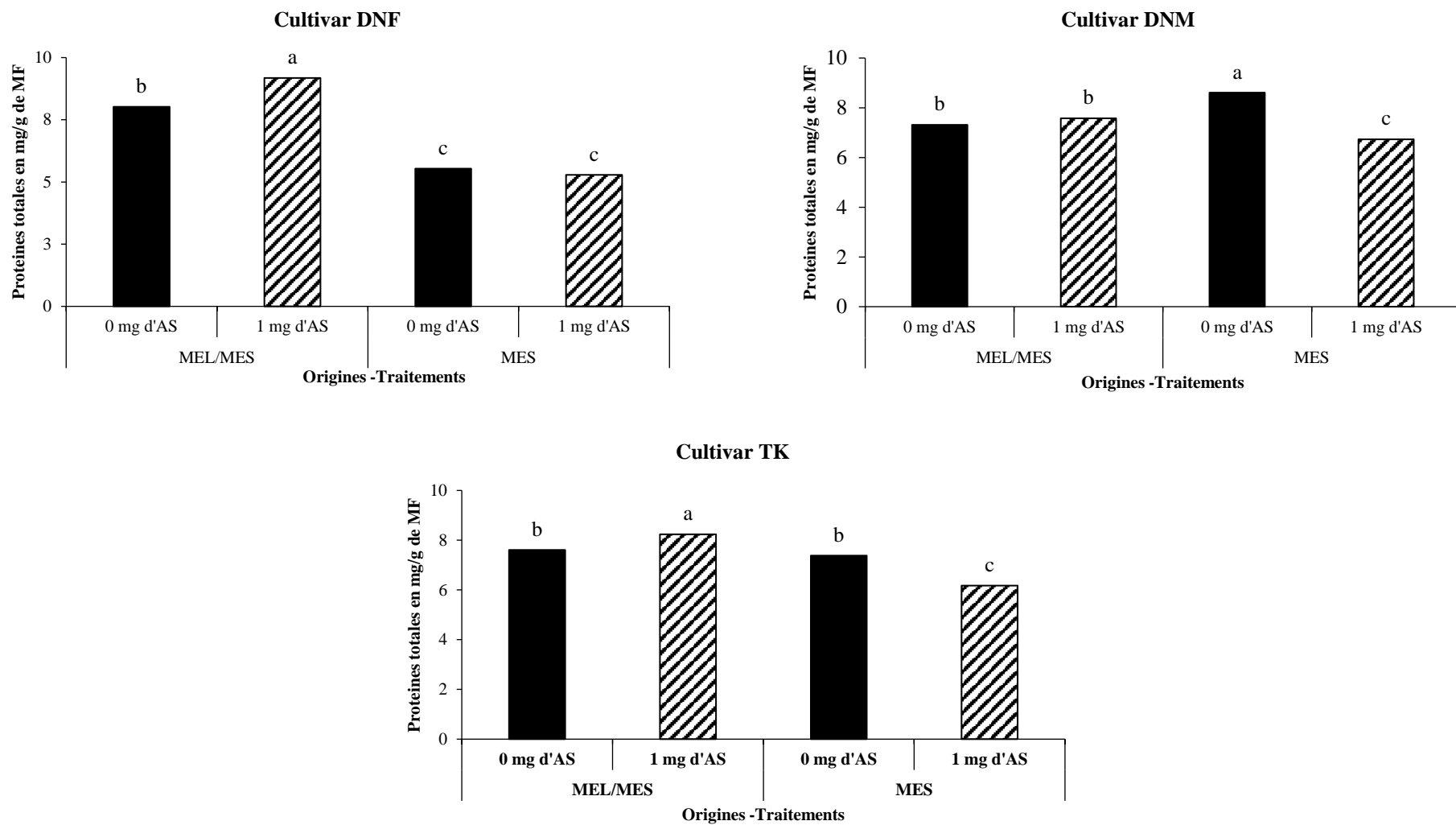


Figure 29 : Variation de la teneur en PT des amas embryonnaires obtenus en fonction des cultivars, des traitements à l'AS et du type de milieu de culture d'origine

4-3- Effets du milieu de culture et de l'AS sur la conversion des EMS placés sur milieux solides de germination

4-3-1- Evolution générale des EMS mis en germination

Les EMS de l'ensemble des cultivars étudiés obtenus sur les différents milieux de maturation (ME_L , ME_L/ME_S et ME_S) sont placés dans des tubes à essais contenant les milieux de germination solides MG_{S0} ou MG_{S1} afin d'initier leur germination.

Ainsi, au bout de huit (08) semaines de culture, les embryons mis en milieux de germination présentent deux (02) formes de réaction (Planche 08) :

- **Germination:** qui se traduit par l'émergence de la partie aérienne (feuille cotylédonaire) suivie par l'apparition d'une radicule qui se développera ultérieurement en un système racinaire pivotant. Ce type de réaction est décelé dès la première semaine de culture par 24 % de l'ensemble des embryons mis en culture.
- **Embryogenèse secondaire :** qui se manifeste à travers la poursuite de la formation tout au long des stades de conversion des EMS en vitroplants, de petits nodules néoformés accolés les uns aux autres. Ce phénomène est observé sur 12 % de l'ensemble des embryons mis en culture.

Parallèlement aux deux formes de réactivité observée, le reste des EMSensemencés (64% dont environ le tiers émet une racine pivotante) se nécrosent.

4-3-2- Variation de la réactivité des EMS issus des milieux liquides agités

Les embryons ayant atteint leur maturité structurale en milieux liquides agités (ME_L) montrent une variation du comportement. Ainsi, le traitement ou non à l'AS lors de la phase de germination des EMS produits en milieu liquide agité permet d'induire des taux de réactivité identiques de 60%. Cependant, l'expression varie selon la présence ou l'absence de l'AS. En effet, le milieu MG_{S1} contenant 1 mg d'AS génère le plus fort taux de germination (32%) contrairement au milieu MG_{S0} dépourvu d'AS dont le taux de germination n'est que de 13 % et au niveau duquel le phénomène de l'embryogenèse secondaire est plus marqué représentant un taux de 25%.

Les EMS issus des quatre (04) cultivars montrent une réactivité variable. En effet, le plus fort taux (36%) est enregistré au niveau du cultivar DNF suivi par le cultivar GR avec un taux de 20%. Les cultivars DNM et TK manifestent des taux de germination identiques ($\approx 15\%$). Par ailleurs, l'apparition de l'embryogenèse secondaire n'est présente que chez les cultivars DNF et DNM avec respectivement 21% et 16% des EMSensemencés.

La réactivité des EMS issus du milieu liquide agité varie en fonction des cultivars mais aussi au sein de chaque cultivar selon la présence ou l'absence de l'AS. En effet, le milieu MG_{S1} contenant 1 mg/L d'AS favorise la germination au niveau de chacun des cultivars étudiés alors

que l'embryogenèse secondaire n'est présente que chez les cultivars DNF et DNM où l'absence d'AS permet de générer les plus forts taux avec respectivement 44% et 17% des EMS ensemencés (Figure 30).

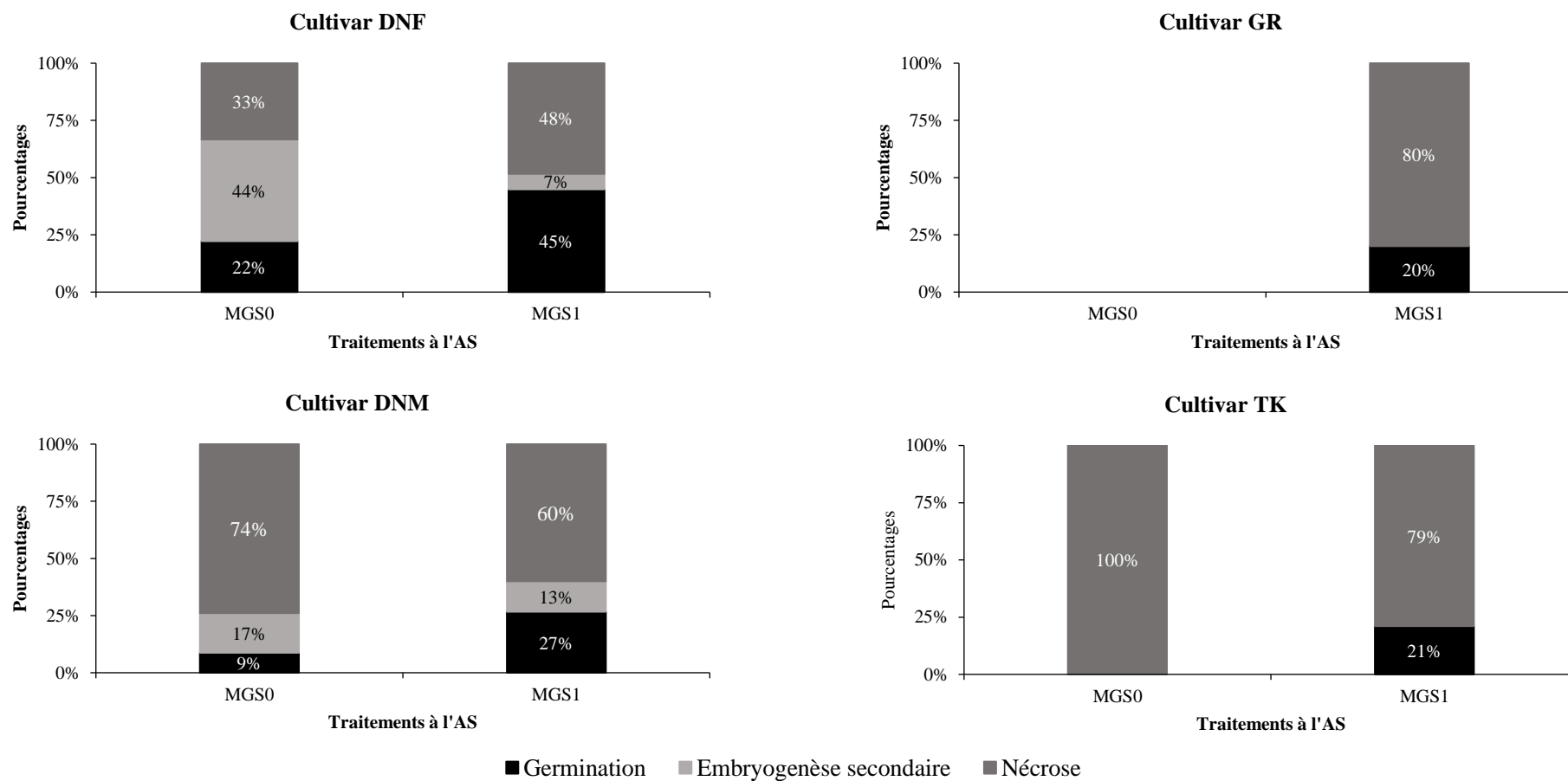


Figure 30 : Variation de la réactivité des EMS issus du milieu liquide agité en fonction des cultivars et des traitements à l'AS.

4-3-3- Variation de la réactivité des EMS issus de l'étalement sur milieux solides

La réactivité des embryons produits à partir de l'étalement sur milieux solides varie considérablement. En effet, la présence ou l'absence de l'AS dans le milieu de culture lors de la phase de germination des EMS issus de l'étalement permet d'induire des taux de germination différents. Ainsi, c'est le milieu MG_{S1} contenant 1 mg d'AS qui génère le plus fort taux de germination (35%) alors que l'absence d'AS (MG_{S0}) présente que 19% de germination. L'embryogenèse secondaire est présente au niveau des deux traitements avec des taux similaires ($\approx 5\%$).

Les EMS issus des quatre (04) cultivars étudiés montrent également une réactivité variable où se sont les embryons issus de DNF qui présentent les plus forts taux de germination (38%) et d'embryogenèse secondaire (14%). Les embryons issus des cultivars DNM et GR présentent des taux de germination identiques (23%) sans manifestation du phénomène de l'embryogenèse somatique. Le cultivar TK génère le plus faible taux de germination (17%) et uniquement 6% des EMS ensemencés montrent une embryogenèse secondaire.

La réactivité des EMS issus des étalements sur milieu solide varie en fonction des cultivars, mais aussi, au sein des cultivars selon la présence ou pas de l'AS. En effet, la présence de 1 mg d'AS génère les plus forts taux de germination au niveau de chacun des cultivars étudiés (Figure 59). L'apparition de l'embryogenèse secondaire n'est constatée que chez le cultivar DNF en présence de 1 mg/L d'AS et chez le cultivar TK en absence d'AS (Figure 31).

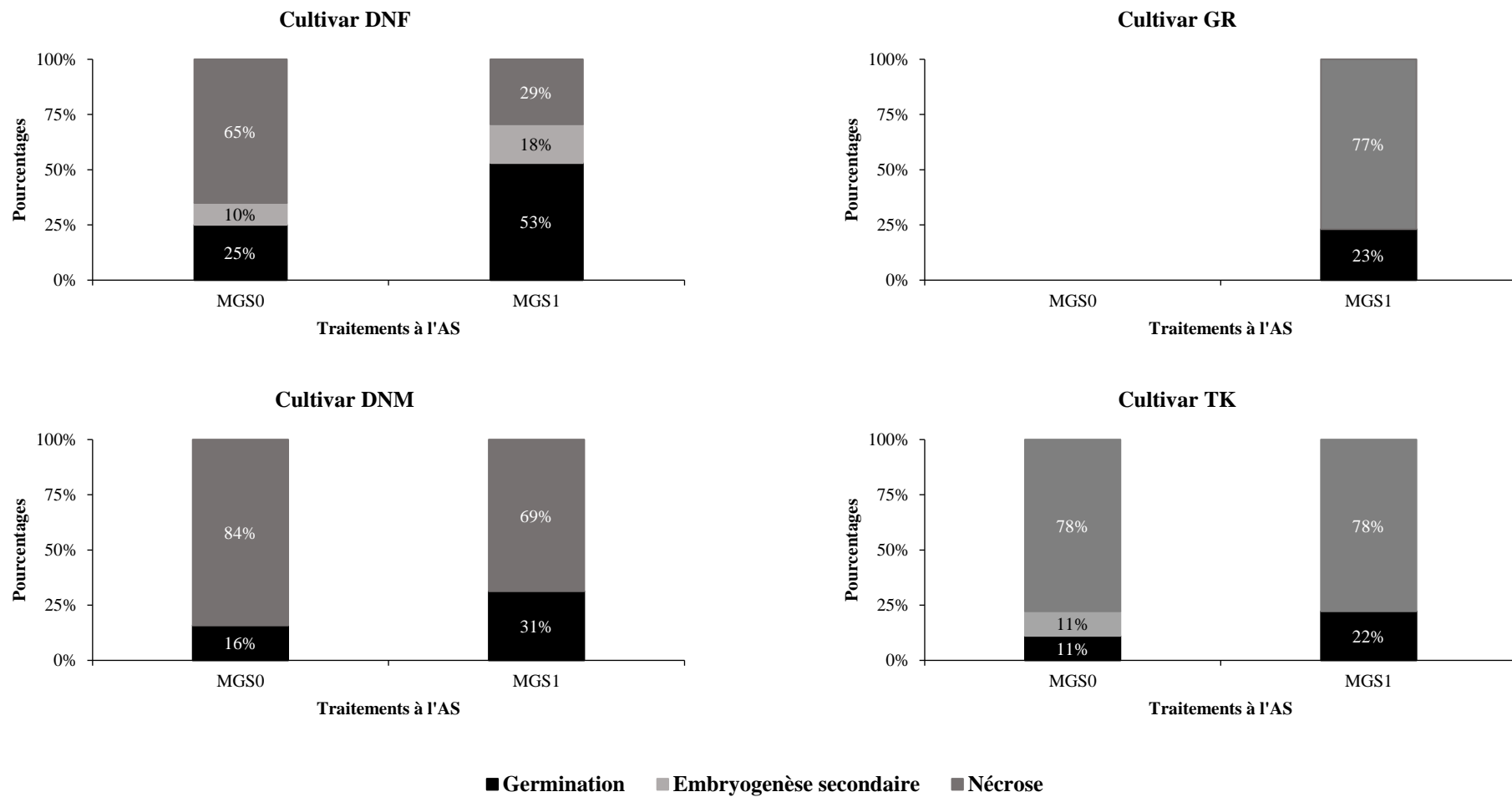


Figure 31 : Variation de la réactivité des EMS issus de l'étalement des suspensions cellulaires sur milieu solide en fonction des cultivars et des traitements à l'AS.

4-3-4- Variation de la réactivité des EMS issus des milieux solides

La réactivité des EMS issus des milieux solides (ME_S) varie lors de leur mise en germination. Ainsi, la présence ou pas de l'AS dans le milieu de culture lors de la phase de germination des EMS produits sur milieux solides permet d'induire une réactivité mais, c'est en absence d'AS (MG₅₀) que les plus forts taux de germination (24%), d'embryogenèse secondaire (24%) sont notés.

Les EMS issus des quatre (04) cultivars étudiés montrent des taux variables de réactivité, à l'exception du cultivar GR où l'ensemble des EMS ensemencés se sont nécrosés. Les plus forts taux de germination (26%) et d'embryogenèse secondaire (26%) sont notés chez le cultivar TK suivi par le cultivar DNF dont les EMS présentent des taux de germination et d'embryogenèse secondaire respectivement de 18% et de 24%. Pour le cultivar DNM, de faibles taux de germination (15%) et d'embryogenèse secondaire (5%) sont enregistrés.

La réactivité des EMS issus des milieux solides varie en fonction des cultivars, mais aussi, au sein des cultivars selon la présence ou pas de l'AS, sauf pour le cultivar GR où la totalité des EMS ensemencés se sont nécrosés. En effet, les plus forts taux de germination sont obtenus en absence d'AS chez les cultivars DNF, DNM et TK avec respectivement 24%, 23 et 27%. L'apparition de l'embryogenèse somatique est plus intense en absence d'AS chez les cultivars DNF et DNM et en présence de 1 mg/L d'AS chez le cultivar TK (Figure 32).

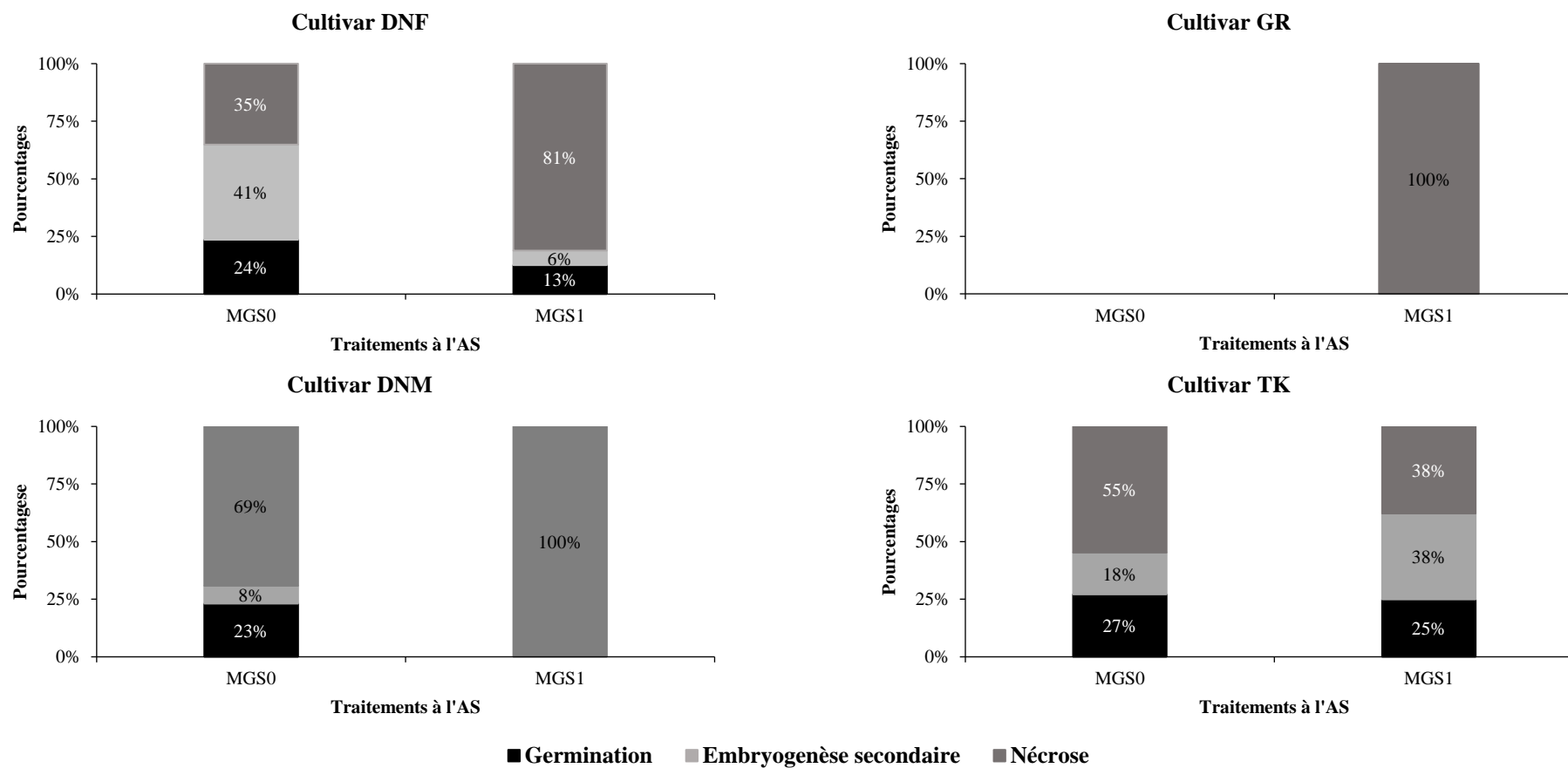


Figure 32: Variation de la réactivité des EMS issus du milieu solide en fonction des cultivars et des traitements à l'AS

4-3-5- Conversion des EMS en vitroplants en fonction du milieu de culture d'obtention

L'évaluation de l'impact du type de milieux de culture d'obtention (ME_L , ME_L/ME_S et ME_S) sur la germination sur milieux solides (MG_S) des EMS produits (tous cultivars et traitements confondus), permet de constater des différences évidentes. En effet, se sont les EMS issus des étalements (ME_L/ME_S) qui présentent le plus fort taux de germination (28%) suivis par les EMS issus des milieux liquides (ME_L) qui manifestent un taux de germination de 24%. Le plus faible taux a été noté au niveau des EMS issus des milieux solides (ME_S).

Les taux de germination des EMS produits varient selon le type de milieux de culture d'obtention en fonction du traitement ou non à l'AS. En effet, les EMS ayant pour origine l'étalement (ME_L/ME_S) et les milieux liquides (ME_L), génèrent les plus forts taux de germination en présence de 1 mg/L d'AS avec respectivement 35% et 33% ; contrairement aux EMS ayant pour origine les milieux solides (ME_S) au niveau desquels le plus fort taux de germination (24%) est obtenu en absence d'AS.

Les EMS issus des quatre (04) cultivars présentent des taux de germination variables en fonction du type de milieux de culture ayant permis leur obtention. Ainsi, pour les cultivars DNF, DNM et GR les plus forts taux de germination (respectivement 38%, 23% et 23%) sont enregistrés au niveau des EMS ayant pour origine les étalements (ME_L/ME_S) contrairement au cultivar TK dont le plus fort taux de germination (26%) est noté au niveau des EMS ayant pour origine les milieux solides (MG_S).

Par ailleurs, les taux de germination enregistrés varient entre cultivars, mais aussi, au sein de chacun des cultivars selon le type de milieu de culture d'origine et de la présence ou pas de l'AS. En effet, pour les cultivars DNF, DNM et GR les plus forts taux de germination sont notés au niveau des EMS ayant pour origine les étalements (ME_L/ME_S) en présence de 1 mg/L d'AS contrairement au cultivar TK qui génère le plus fort taux de germination au niveau des EMS ayant pour origine les milieux solides (ME_S) et ceci en l'absence d'AS (Figure 33).

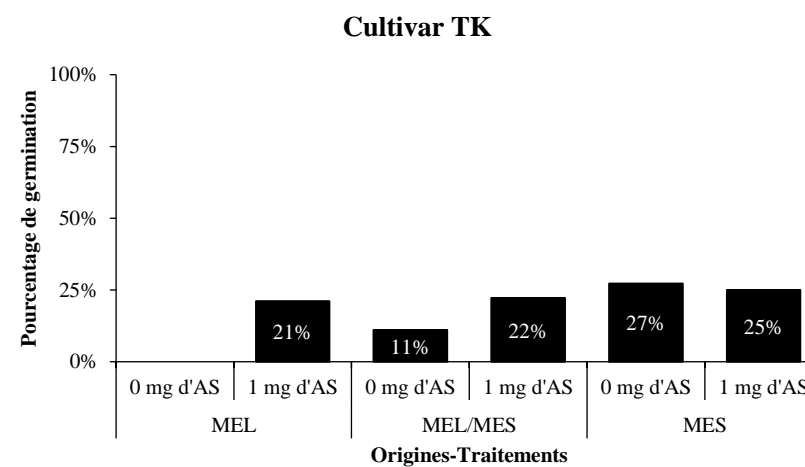
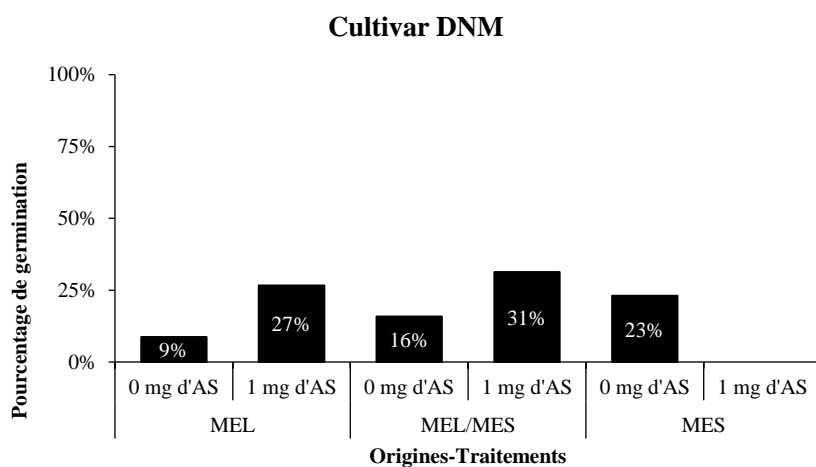
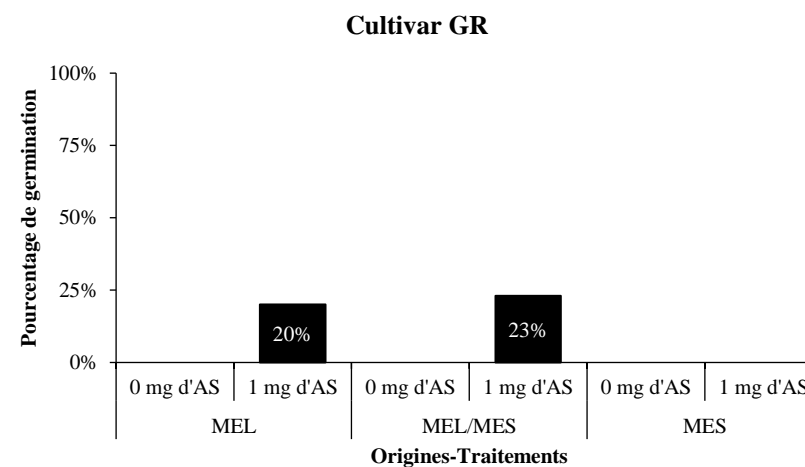
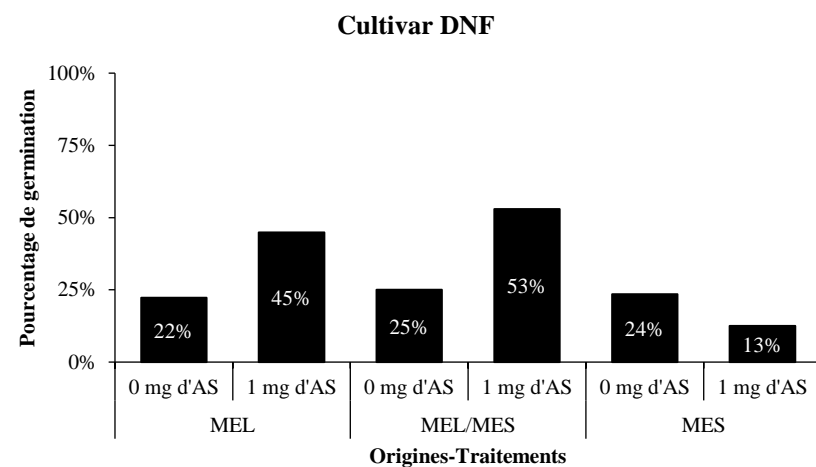


Figure 33: Variation du pourcentage de conversion des EMS en vitroplants en fonction des cultivars, des traitements à l'AS et du type de milieu de culture d'origine



Planche 08 : Germination des EMS et conversion en vitroplants en milieux solides.

A : Embryons somatique nécrosé.

B : Embryogenèse secondaire.

C : Début germination d'un embryon somatique.

D : Différentes phases de conversion en vitroplant.

E : Vitroplants en développement.

F : Vitroplant en phase d'endurcissement.

CHAPITRE IV :

DISCUSSION

CHAPITRE IV : DISCUSSION

1- Callogenèse

Le présent travail est initié à partir de rejets de quatre cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : Deglet Nour femelle (DNF), Deglet Nour mâle (DNM), Ghers (GR) et Takerbucht (TK).

Préalablement désinfectés à l'aide du HgCl₂, les explants utilisés ont pour origine les sommets du cœur de rejets qui renferment le méristème apical, les ébauches foliaires, les bourgeons axillaires ainsi que la base des jeunes feuilles des quatre cultivars.

Les explants ainsi obtenus sont mis en culture sur milieux solides en présence de quatre balances hormonales (2,4-D/BAP) afin d'initier la callogenèse.

Dès la deuxième semaine de culture deux phénomènes sont constatés avec une apparition quasi simultanée :

- Un brunissement au niveau des explants et des milieux de culture indiquant la présence de polyphénols qui va entraîner un ralentissement, un arrêt de la réactivité ou même dans les cas les plus extrêmes la nécrose des explants (Al Khateeb, 2008 ; El Hadrami et al., 2009 ; Fki et al., 2011 ; Abahmane, 2011 ; Bhojwani et al., 2013 ; Bhatia et al., 2015).
- Un gonflement total ou partiel des explants dont certains émettront des structures de couleur blanchâtre, indiquant ainsi l'initiation de la dédifférenciation cellulaire qui évoluera pour les explants les plus réactifs vers un cal primaire friable ou compact (Tisserat, 1979; Sharma et al., 1980; Zaid et al., 1983 ; Mater, 1986 ; Chabane et al., 1995 ; Chabane, 1996; Veramendi et al., 1997; Yadav et al., 2001; Eke et al., 2005 ; Sané et al. 2012).

Des différences entre cultivars étudiés et milieux de culture testés sont notées. En effet, les explants des cultivars DNM et DNF mis en culture sur milieux solides contenant les hormones de croissance (2,4-D/BAP) combinés au charbon actif présentent les plus forts taux de callogenèse primaire et montrent moins de brunissement que les cultivars GR et TK qui présentent une faible callogenèse et un fort brunissement.

Ces résultats viennent confirmer le fait que la réussite de la mise en place d'un processus de régénération *in vitro* du palmier dattier *via* la callogenèse nécessite un apport exogène de régulateurs de croissance principalement les auxines et l'incorporation aux milieux de culture d'un adsorbant comme le charbon actif pour atténuer l'impact des polyphénols largués dans le milieu sur la croissance des cultures (Zaid et al., 2002 ; Al Khateeb, 2008 ; El Hadrami et al., 2009 ; Gueye et al., 2009 a et b ; Zaid et al., 2011 ; Fki et al., 2011 ; Ahmad et al., 2013 ; Mazri et al., 2015 ; Meziani et al., 2016 ; Al Khayri et al., 2017).

En effet, la faible aptitude des explants à se différencier ainsi que le brunissement précoce constituent les facteurs limitant à la réussite de la mise en place de la culture *in vitro* chez le palmier dattier et restent fortement liées à l'âge et à l'état physiologique et au génotype de la plante (Loutfi et al., 2005 ; Al Khateeb, 2008 ; El Hadrami et al., 2009 ; Fki et al., 2011 ; Zaid et al., 2011 ; Bhojwani et al., 2013 ; Bhatia et al., 2015 ; ; Mazri et al., 2015 ; Saleh et al., 2016 ; Al Khayri et al., 2017, Gantait et al., 2018).

Il est à signaler, qu'au niveau du cultivar GR, plus de la moitié des explants mis en culture se sont nécrosés aboutissant à un faible taux de callogenèse induite uniquement sur le milieu MC_{S2} (10 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP). Ceci peut être expliqué par l'hétérogénéité cellulaire des explants multicellulaires utilisés (Loyola-Vargas et al., 2008 ; George et al., 2008 ; Bhojwani, 2013). En effet, afin d'initier notre travail expérimental la partie apicale du cœur du rejet utilisé comme source d'explants renferme le méristème apical, les ébauches foliaires, les bourgeons axillaires ainsi que la base des jeunes feuilles.

Aussi, l'ensemble des explants mis sur milieu de culture solide (MC_{S0}) dépourvu d'hormones de croissance et de charbon actif, exhibe un fort brunissement avec une faible callogenèse. Cette dernière est présente exclusivement chez le cultivar DNF mais sans évolution ultérieure (nécrose des cals cicatriciels). L'existence de faibles concentrations d'auxines endogènes serait à l'origine d'une induction de la callogenèse (Gueye et al., 2009 a et b ; Ikeuchi et al., 2017 ; Fehér, 2019). Il s'agirait dans ce cas plus d'un phénomène de cicatrisation que de callogenèse proprement dite.

Durant la première étape de notre travail expérimental, la callogenèse primaire initiée à partir d'explants issus de la partie apicale du rejet de palmier dattier évolue vers une callogenèse secondaire caractérisée par l'apparition de structures nodulaires plus au moins friables avec peu ou pas de brunissement. Cette évolution est observée dès le 4^{ème} mois de culture pour les explants les plus réactifs et au-delà du 5^{ème} mois pour les moins réactifs. Ces résultats vont dans le sens de ceux déjà obtenus par d'autres travaux (Tisserat, 1979; Sharma et al., 1980 ; Tisserat, 1982 ; Zaid et al., 1983 ; Mater, 1986 ; Chabane et al., 1995 ; Chabane, 1996 ; Veramendi et al., 1997; El Hadrami et al., 2009 ; Mazri et al., 2015 ; Saleh et al., 2016 ; Al Khayri et al., 2017).

Le transfert à intervalles réguliers (tous les deux mois) des cals nodulaires obtenus sur milieux solides frais de même composition initiale permet d'initier et de multiplier durant plus de 30 mois la masse callogène. Cependant, des différences entre les cultivars étudiés et les milieux de culture testés sont constatées, et ceci, par rapport au temps de réponse et à l'intensité de multiplication de la callogenèse nodulaire. En effet, pour le cultivar DNF dont les explants sont les plus réactifs, l'initiation ainsi que la multiplication sont favorisées sur le milieu solide MC_{S1} contenant 5mg/L de 2,4-D et 150 mg de charbon actif. La présence d'auxines endogènes favoriserait une induction rapide de la callogenèse et sa multiplication en présence de faibles doses de 2,4-D (Mujib et al., 2005 ; Zouine et al., 2005 ; Othmani et al., 2009b). De nombreux travaux ont déjà rapporté des résultats similaires. En effet, El Hadrami (1995) a obtenu des taux élevés de callogenèse en présence de 5mg/l de 2,4-D. Sane et al. (2006 ; 2012) ainsi que

Chabane et al. (2007) ont obtenu une callogenèse en présence de seulement 2 mg/l de 2,4-D. Fki et al. (2003) sont parvenus à initier une bonne callogenèse en présence de doses encore plus faibles de 2,4-D (moins de 0,5mg/l).

Pour les cultivars DNM et TK, l'initiation et la multiplication de la callogenèse nodulaire sont favorisées sur le milieu solide MC_{S3} contenant de fortes doses de 2,4-D (50 mg/L) et de charbon actif (1500 mg). Par ailleurs, malgré la nécrose lors de la phase d'induction de la callogenèse primaire sur plus de la moitié des explants issus du cultivar GR, des cals nodulaires sont obtenus et multipliés sur le milieu solide MG_{S2} contenant 10 mg/L de 2,4-D combinée à 300 mg/L.

Ces résultats viennent réaffirmer le fait que l'obtention d'une bonne callogenèse nodulaire ainsi que son entretien nécessite une pression auxinique afin de maintenir la concentration intracellulaire en auxines endogènes élevée (Jiménez et al., 2005 ; Victor et al., 2005 ; Zouine et al., 2005). De nombreux auteurs ont abouti à une callogenèse secondaire consécutive en présence de fortes doses de 2,4-D (10, 50 mg/L) combinées à de fortes doses de charbon actif (300, 1500 mg/L) (Tisserat, 1979 ; Sharma et al., 1980 ; Tisserat, 1982 ; Zaid et al., 1983 ; Mater, 1986; Chabane., 1995; Veramendi, et al., 1997; and Gueye et al., 2009 a et b).

Afin d'augmenter la masse des cals nodulaires préalablement obtenus sur milieux solides chez les quatre cultivars étudiés, l'utilisation d'un milieu liquide (MC_{L1}) contenant 1 mg/L de 2,4-D sous agitation est retenue.

Notre choix est dicté par les nombreux avantages que présente la culture cellulaire en milieu liquide agité : absorption uniforme et rapide avec une assimilation plus efficace de l'eau, des éléments nutritifs ainsi que les régulateurs de croissance mais aussi une réduction plus ou moins importante de l'effet inhibiteur sur la croissance de certains composés sécrétés tels que les polyphénols. Ceci permettrait d'assurer ainsi une croissance optimale des cellules mises en culture. Par conséquent, l'utilisation du milieu liquide agité permettra d'aboutir à des taux de multiplication et de croissance importants en un temps réduit (Ascough et al., 2004 ; Gupta et al., 2005 ; Hvoslef-Eide et al., 2005 ; Mehrotra et al., 2007 ; Othmani et al., 2009b ; Jain et al., 2011 ; Mustapha et al., 2011; Ibraheem et al., 2013).

Ceci est vérifié dans le cadre de cette recherche malgré l'existence de différences entre les quatre cultivars étudiés, un facteur de multiplication moyen de 6,3 est obtenu après seulement deux mois (8 semaines) de culture en milieu liquide agité contenant une faible dose d'auxine (1 mg/L de 2,4-D) (Fki et al., 1998 ; Fki et al., 2003 ; Ibraheem et al., 2012 ; Ibraheem et al., 2013).

2- Embryogenèse somatique

Dans le but d'améliorer les différentes phases de l'embryogenèse somatique chez les quatre cultivars de palmier dattier étudiés, le travail expérimental s'est déroulé en deux phases portant sur:

2-1- Effet de l'acide salicylique sur l'embryogenèse somatique en milieu liquide agité chez le cultivar Deglet Nour

L'objectif durant cette première phase d'étude est d'évaluer l'effet de l'apport en acide salicylique (AS) sur l'embryogenèse somatique du palmier dattier chez le cultivar Deglet Nour femelle (DNF) tout en déterminant la dose optimale pour la généraliser par la suite à l'ensemble des cultivars étudiés. Pour ce faire, cinq traitements en AS (0 ; 1, 5, 10, 15 mg/L) ont été testés au niveau de suspensions établies à partir de cals nodulaires du cultivar DNF obtenus sur milieux solides.

Comme cité précédemment, l'utilisation du milieu liquide agité favorise une croissance optimale et rapide des suspensions. Elle représente ainsi la technique la plus avantageuse car elle permet l'observation des différentes phases de développement de l'embryogenèse somatique parallèlement à l'étude de l'impact des modifications apportées aux milieux de culture sur le développement des suspensions embryogènes (Ascough et al., 2004; Gupta et al., 2005; Hvoslef-Eide et al., 2005; Mehrotra et al., 2007 ; Othmani et al., 2009b; Mustapha et al., 2011 ; Jain et al., 2011 ; Ibraheem et al., 2013).

Au cours de l'étude, l'utilisation du milieu liquide agité s'est montré favorable à la formation d'EMS, ce qui permet de distinguer les différents stades de développement de l'embryons somatiques: stade nodulaire, stade globulaire, stade post-globulaire et stade embryonnaire somatique structuré. Ces stades caractéristiques du palmier dattier (espèce monocotylédone) ont déjà été décrits par Fki et al. (2003); Sané et al. (2006) ; Sghair et al. (2008) ; Othmani et al. (2011).

Les pesées effectuées avant chaque renouvellement des milieux de culture ainsi que les observations réalisées nous ont amené à constater, pour l'ensemble des traitements en AS testés, le même schéma de développement. Ce dernier est divisé en quatre phases d'évolution distinctes :

- Phase de latence, d'une durée d'une (01) semaine. Cette phase est caractérisée par une absence de croissance visible à l'œil nu et une perte en poids frais des fragments de cals en suspension indiquant ainsi une adaptation des suspensions aux nouvelles conditions de culture (Al Khayri, 2012 ; Ibraheem et al., 2013 ; Bhatia et al., 2013).
- Phase de croissance, d'une durée de trois (03) semaines; correspondant à la 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} semaine de culture. Durant cette phase de culture, une augmentation importante du poids frais est notée. Elle serait due à l'apparition des premiers proembryons (PEM) au

stade globulaire mais aussi à l'apparition de l'embryogenèse somatique secondaire. Cette dernière se manifeste à travers la néoformation de petits nodules embryogènes au cours des différents stades de développement de l'embryogenèse somatique primaire. Ces nodules se détachent sous l'effet de l'agitation du milieu liquide et se développent de nouveau en embryons structurés. (Veramendi et al., 1996; Fki et al., 2003 ; Hvoslef-Eide et al., 2005 ; Sané et al., 2006 ; Mustafa et al., 2011 ; Jain et al., 2011 ; Ibraheem et al., 2013).

- Phase de ralentissement (ou stationnaire), d'une durée de deux (02) semaines, correspondant à la 5^{ème} et 6^{ème} semaine de culture. Durant cette troisième phase de culture, les suspensions en culture présentent une faible accumulation du poids frais avec l'évolution d'un certain PEM vers des formes sphériques légèrement aplaties atteignant ainsi le stade post-globulaire.
- Phase de déclin (ou de sénescence), au-delà de la 6^{ème} semaine de culture. Durant cette dernière phase de culture, une diminution du poids frais des suspensions est notée parallèlement à la poursuite de développement des PEM. Ainsi, après huit (08) semaines de culture, un certain nombre d'embryons somatiques structurés (EMS) de forme allongée de 6 à 7 mm sont observés. Il est à signaler le manque de synchronisation lors de l'émergence et le développement des PEM en suspensions, c'est-à-dire qu'à partir de la 6^{ème} semaine de culture tous les stades de l'embryogenèse somatique sont simultanément présents avec une présence importante de nodules néoformées résultant de l'embryogenèse secondaire. Cette asynchronisation peut être résolue par la filtration régulière lors du renouvellement du milieu de culture (Veramendi et al., 1997 ; Hvoslef-Eide et al., 2005).

L'initiation de l'embryogenèse somatique et la production d'EMS individualisés sont obtenues après le transfert des cals nodulaires (hachés et filtrés sur un tamis de 500 µm de maille) dans un milieu liquide agité en absence d'hormones de croissance exogènes (ME_{L0}). Ce résultat rejoint ceux obtenus par plusieurs auteurs (Veramendi et al., 1996 ; Fki et al., 2003; Zouine et al., 2004; Sané et al., 2006 ; Saker et al., 2007; Zouine et al., 2007 ; Zavattieri et al., 2010 ; Mazri et al., 2015). En effet, l'initiation de l'embryogenèse somatique fait suite à la réaction des cals à l'action des différents stress physiques exercés comme le hachage, le tamisage et la mise en suspension en milieux liquides agités mais aussi en réponse aux modifications apportées à la composition nutritionnelle et/ou hormonale du milieu de culture (Tisserat, 1979 ; Tisserat, 1982 ; Taha et al., 2001 ; Fehér et al., 2003; Mujib et al., 2005 ; Victor et al., 2005 ; Fehér, 2005 ; Zavattieri et al., 2010, Quiroz-Figueroa et al. 2006 ; Othmani et al., 2009b ; Yang et al., 2010 ; Féher, 2015 ; Ochatt et al., 2016 ; Féher, 2019).

Par ailleurs, l'apport exogène de l'AS présente un effet bénéfique sur l'induction de l'embryogenèse somatique et la maturation des PEM ainsi que sur la germination des EMS. En effet, l'AS est reconnu comme étant une puissante biomolécule de signalisation phénolique et un régulateur de croissance végétale à multiples facettes car il intervient dans les réponses de défense locales et systémiques lors de stress biotiques et abiotiques, mais il joue aussi un rôle

crucial dans la régulation des processus physiologiques et biochimiques tout au long de la vie de la plante (Vlot et al., 2009 ; Rivas-San Vicente et al., 2011 ; Hayat et al., 2013 ; Sharma, 2013 ; El Esawi, 2017 ; Maruri-López et al., 2019 ; Pasternak et al., 2019 ; Arif et al., 2020 ; Koo et al., 2020).

Le milieu liquide ME_{L1} contenant 1 mg/L d'AS présente la plus forte augmentation en poids frais et génère le plus grand nombre d'EMS individualisés suivi par les milieux liquides ME_{L0} ne contenant pas d'AS et ME_{L2} contenant 5 mg/L d'AS dont l'augmentation en poids frais et la production d'EMS individualisés est moins importante. Les milieux de culture liquides ME_{L3} et ME_{L4} contenant respectivement 10 et 15 mg/L d'AS montrent de faibles augmentations en poids frais sans formation d'EMS individualisés, avec un brunissement intense des suspensions. Par la suite, le meilleur taux de conversion en vitroplants (germination) est obtenu sur le milieu solide MG_{S1} contenant 1 mg/L d'AS.

En résumé, les apports ≥ 5 mg/L d'AS durant les phases d'induction, de maturation et même lors de la germination entraîne un ralentissement, voire, un arrêt de la croissance cellulaire. Ce phénomène s'accompagne d'un brunissement intense conduisant à la nécrose des suspensions ou des EMS mis en germination, alors qu'un apport de 1 mg/L d'AS permet d'améliorer l'embryogenèse somatique chez le cultivar Deglet Nour objet de notre étude.

Les résultats obtenus confortent ce qui est généralement constaté car cela dépend de l'espèce, du stage de développement cellulaire et des conditions expérimentales, sur l'effet stimulateur de l'application de faibles concentrations d'AS sur l'embryogenèse somatique chez de nombreuses espèces (Arif et al. 2020 ; Koo et al. 2020). Nous pouvons citer à titre d'exemple les travaux de Roustan et al. (1990) sur la carotte en présence de 0,183-18,31 mg/L d'AS, de Quiroz-Figueroa et al. (2001) sur le caféier d'Arabie en présence de 1,83 ng/L d'AS, de Komaraiah et al. (2004) sur la dentelaire d'Inde en présence de 1,48 mg/L d'acide acétylsalicylique (ASA), de Hong et al. (2008) sur la variété d'orchidée "Sweet Sugar" en présence de 1,83 mg/L d'AS, de Mulgund et al. (2012) sur les conifères en présence de 1 mg/L d'AS et de Hosseini et al. (2015) sur la variété de carotte "Nante" en présence de 0,91 mg/L d'AS.

Ainsi, l'amélioration de l'embryogenèse somatique observée peut être expliquée par le rôle qu'a l'AS dans la régulation de l'état redox cellulaire, car des concentrations élevées en AS exogène stimulent une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dont le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) provoquant un stress oxydatif et la mort cellulaire. En revanche, de faibles concentrations en AS induisent un faible niveau de production des ERO qui constituent en même temps des signaux secondaires pour activer d'autres processus biologiques (Vlot et al., 2009 ; Ahmad et al. 2013 ; Ahmad et al. 2020). Par ailleurs, les mécanismes par lesquels l'AS endogène régule les processus végétaux non-immunes ne sont pas bien compris actuellement. Toutefois ils semblent impliquer des effets coordonnés ou antagonistes de l'AS endogène avec d'autres hormones végétales dont l'acide indole-3-acétique (AIA) endogène. Cette dernière qui est une auxine participe avec l'AS à la régulation du métabolisme et de la croissance ainsi qu'à

la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Vlot et al., 2009 ; Sharma, 2013 ; El-Esawi, 2017; Dempsey et al., 2017 ; Ahmed et al., 2020 ; Arif et al., 2020 ; Koo et al., 2020).

2-2- Effets de la modification du milieu de culture et de l'acide salicylique sur l'embryogenèse somatique des quatre cultivars

L'objectif de cette seconde phase de l'étude est de déterminer les effets de la modification du type de milieu et de l'apport d'AS sur les phases de développement de l'embryogenèse somatique des quatre (04) cultivars de palmier dattier : Deglet Nour femelle (DNF), Deglet Nour mâle (DNM), Ghers (GR) et Takerbucht (TK).

Lors de l'induction de l'embryogenèse somatique et la maturation des PEM chez les quatre (04) cultivars étudiés, trois (03) types de milieux sont utilisés à savoir milieu liquide (ME_L), alternance liquide/solide (ME_L/ME_S) et milieu solide (ME_S), et ceci, en absence ou en présence de 1 mg/L l'AS.

Par la suite, les EMS de l'ensemble des cultivars étudiés produits à partir des trois types de milieux expérimentés (ME_L, ME_L/ME_S et ME_S) sont mis en germination séparément sur milieu solide de germination (MG_S) contenant les mêmes traitements à l'AS ayant permis leur obtention.

2-2-1- Embryogenèse somatique obtenue en milieux liquides agités

L'emploi du milieu liquide agité pour l'induction de l'embryogenèse somatique et la maturation des PEM conduit à la formation d'EMS à différents stades d'évolution, ce qui permet d'identifier, distinctement, les différents stades de développement de l'embryogenèse. Ces stades caractéristiques du palmier dattier sont observés chez les quatre (04) cultivars étudiés parallèlement à la présence de brunissement dont l'effet néfaste (nécrose) sur la croissance des suspensions est réduit. Ainsi, en dépit du manque de synchronisation du développement des agrégats cellulaires mis en suspensions dû essentiellement au phénomène de l'embryogenèse secondaire, le recours à la technique de culture en milieux liquides agités chez le palmier dattier reste avantageux (Fki et al., 2003; Ascough et al., 2004 ; Gupta et al., 2005 ; Hvoslef-Eide et al. 2005 ; Sané et al., 2006 ; Mehrotra et al., 2007 ; Sghair et al., 2008 ; Othmani et al., 2009b ; Jain et al., 2011 ; Mustapha et al. 2011 ; Ibraheem et al. 2013).

L'évaluation de l'embryogenèse somatique en milieux liquides agités chez les quatre cultivars étudiés est réalisée à travers l'évolution du poids frais des suspensions, le nombre d'EMS produits ainsi que les taux de germination générés. Cela permet de constater un effet positif de l'apport de 1 mg/L d'AS sur l'accroissement du poids frais et sur la production d'EMS malgré des différences entre les cultivars DNF, GR et TK alors que pour le cultivar DNM un accroissement similaire en poids frais des suspensions entre traitements est noté mais avec une production plus importante d'EMS en absence d'AS. Par la suite, les meilleurs taux de germination sont enregistrés en présence de 1 mg/L d'AS. Cette variation de réponses entre cultivars corrobore ce qui est déjà rapporté sur l'effet de l'apport exogène de l'AS en culture *in*

vitro. En effet, selon Rivas-San Vicente et al. (2011) ; Arif et al. (2020) ; Koo et al. (2020) l'obtention d'un effet stimulateur de l'AS sur l'embryogenèse somatique dépend fortement de l'espèce, du stade de développement cellulaire et des conditions expérimentales.

2-2-2- Embryogenèse somatique obtenue par alternance de milieux (liquides/solides)

Comme décrit précédemment, l'emploi des milieux de culture liquides agités (ME_L) durant neuf (09) semaines abouti à la formation d'EMS mais aussi à un grand nombre de proembryons à différents stades de développement. Ces derniers, et afin de favoriser la poursuite de leur maturation, sont étalés sur un milieu solide (ME_s) en présence des mêmes traitements en AS ayant permis leur obtention et ceci pour l'ensemble des cultivars étudiés.

Au terme de quatre (04) semaines de culture dans les nouvelles conditions, un grand nombre d'EMS individualisés s'est développé. Ces résultats rejoignent ceux de Taha et al. (2001), de Sané et al. (2012) qui ont montré que la réduction de moitié de la fraction minérale du milieu de culture et l'utilisation d'agar favorisent la maturation des EMS ainsi que leur développement ultérieur en plantules chez le palmier dattier. Effectivement, l'utilisation de l'agar (agent gélifiant) représenterait une solution à l'hyperhydratation des cultures en suspension et ceci, à travers son action de dessiccation équivalente à l'ajout d'agents osmotiques (mannitol, sorbitol ou le polyéthylène glycol) seuls ou combinés avec de l'acide abscissique (Ascough et al., 2004 ; Al Khateeb ; 2008 ; Al Khayri et al., 2012; Mazri et al., 2019a et b).

Le nombre moyen d'EMS issus des étalements sur milieux solides, varie entre cultivars mais aussi au sein des cultivars étudiés en fonction des traitements à l'AS appliqués. Ainsi, pour les cultivars DNF, GR et TK, c'est le milieu contenant 1 mg/L d'AS qui produit le plus grand nombre d'embryons et les plus forts taux de germination. Le dosage des protéines totales solubles (PT) au niveau des amas embryonnaires de ces trois cultivars a permis de mettre en évidence une teneur plus importante en PT au niveau des cultures contenant 1mg/L d'AS consolidant le fait que l'apport exogène en AS permet d'orienter favorablement l'évolution de l'embryogenèse somatique vers la formation d'EMS puis leur conversion en vitroplants.

Pour le cultivar DNM, le développement des PEM vers l'état structuré est plus important en absence d'AS. Le dosage des PEM révèle une légère différence entre traitements en faveur de la présence de 1 mg/L d'AS indiquant ainsi un déficit en protéines au niveau des EMS produits en absence d'AS. Ceci est vérifié par la suite puisque le meilleur taux de germination est généré en présence d'AS. En effet, l'embryogenèse somatique est un processus complexe par lequel des reprogrammations métabolique, génétique, épigénétique et développementale des cellules (morphologiques) s'effectuent permettant par la suite la conversion des EMS produits en vitroplants (Fehér et al., 2003 ; Zavattieri et al. 2010 ; Fehér, 2015 ; Ochatt et al., 2016). Chez le palmier dattier, des travaux traitant des aspects biochimiques lors de l'embryogenèse somatique rapportent des taux plus élevés en PT chez les cultures les plus réactives au cours des différents stades de développement de l'embryogenèse somatique (El Hadrami et al, 1995; Masmoudi et al., 1999 ; Sghaier-Hammami et al., 2010 ; Aslam et al, 2011 ; Fki et al., 2011 ; Zein El Din et al., 2021).

2-2-3- Embryogenèse somatique obtenue sur milieux solides

Le transfert des cals nodulaires issus des milieux solides de callogenèse (MCs) sur milieux solides (MEs) dépourvus d'auxine et dont la fraction minérale est réduite de moitié permet de générer des EMS individualisés. Ce résultat vient attester de ce qui est couramment adopté chez le palmier dattier à savoir l'utilisation de milieux gélosés lors de l'induction et la maturation des EMS depuis les premiers travaux publiés de Tisserat (1979 ;1982).

En dépit d'une variation inter-cultivars, c'est en absence de l'AS que le plus grand nombre d'EMS est produit à l'exception du cultivar GR où seule la présence de 1 mg/L d'AS génère une très faible production d'EMS pour cause de contamination des cultures. Ces résultats sont consolidés lors du dosage des PT et de la mise en germination des EMS où les plus forts taux sont générés en absence d'AS (El Hadrami et al, 1995; Masmoudi et al., 1999 ; Sghaier-Hammami et al., 2010 ; Aslam et al, 2011 ; Fki et al., 2011 ; Zein El Din et al., 2021).

Les différences notées lors de l'induction et maturation des PEM sur milieux solides, nous amènent à évoquer l'existence d'une addition de signaux des stress causés par la présence de l'AS ainsi que par les nouvelles conditions de culture (lumière et modifications de la composition des milieux de cultures solides) amorçant ainsi les mécanismes de résistance au niveau cellulaire dont la manifestation visuelle lors de notre expérimentation se traduit par l'apparition intense de brunissement en présence de 1 mg/L d'AS indiquant ainsi une oxydation intense des polyphénols accumulés (Vlot et al., 2009 ; Ahmad et al., 2013 ; Ahmad et al. 2020). Nous pouvons citer ici à titre indicatif le travail de Dihazi et al. (2003) qui ont démontré que le traitement à l'AS de plantules de deux cultivars de palmier dattier augmenterait la synthèse des produits phénoliques en absence ou en présence du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* l'agent causal de la maladie du Bayoud.

2-2-4-Embryogenèse somatique obtenue en fonction du type de milieu

De l'ensemble des résultats obtenus durant notre deuxième phase d'étude sur l'embryogenèse somatique chez quatre (04) cultivars de palmier dattier, il ressort une influence marquée du changement du type de milieu au cours des différents stades de développement de l'embryogenèse somatique à savoir l'initiation de l'embryogenèse somatique, la maturation des PEM et la conversion des EMS en vitroplants.

Ainsi, des trois types de milieu expérimentés, c'est l'alternance liquide /solide (ME_L/ME_S) qui produit le plus grand nombre moyen d'EMS et qui génère le plus fort taux de germination des EMS. Ce résultat est la conséquence de l'amélioration de l'induction et de la multiplication des amas proembryonnaires en milieux liquides agités complétée par une amélioration de la maturation des PEM sur milieux solides. En effet, l'un des problèmes récurrents en culture *in vitro* et particulièrement lors de l'utilisation des milieux liquides est le phénomène de vitrification ou d'hyperhydricité des cultures. Ce dernier peut affecter sérieusement le développement des cultures. Afin d'y remédier, l'étalement ou le transfert des suspensions sur

milieux gélosés constitue une des solutions adoptées chez le palmier dattier (Abahmane, 2011 ; Alkhateeb, 2008 ; Isah, 2015 ; Mazri et al., 2015 ; Khokhar et al., 2017).

Au cours de notre expérimentation, le nombre d'EMS moyen produit en absence d'AS sur milieux solides est plus élevé que celui obtenu en milieux liquides malgré un plus fort taux de multiplication en poids frais enregistré au niveau de ces derniers. Ce résultat qui paraît contradictoire est dû à l'importance de l'inoculum initial (cals haché et tamisé) par rapport au volume des Erlen et à la quantité de milieux liquides utilisés (1 g de cals/ Erlen de 250 ml /50 mL de milieu de culture liquide) ce qui a engendré, selon toute vraisemblance, un effet de concurrence au niveau des suspensions amplifiant ainsi le stress subit.

L'apport exogène de 1 mg/L d'AS lors de l'alternance liquide /solide (ME_L/ME_S) favorise l'embryogenèse somatique chez les cultivars étudiés et ceci à travers l'augmentation du nombre d'EMS produits et des taux de germination relevés. Cette amélioration, en dépit de la variation inter-cultivars constatée, peut être expliquée en partie par l'augmentation des taux de PT au niveau des étalements, ce qui est vérifié lors de notre expérimentation. En effet, l'accumulation de réserves (glucides, lipides et protéines) lors de la maturation constitue une des conditions préalables à la réussite de la conversion des EMS en vitroplants (Fehér et al., 2003 ; Sghaier-Hammami et al., 2010; Zavattieri et al., 2010 ; Aslam et al, 2011 ; Fki et al., 2011 ; Fehér, 2015 ; Ochatt et al., 2016 ; Zein El Din et al., 2021).

CONCLUSION GENERALE

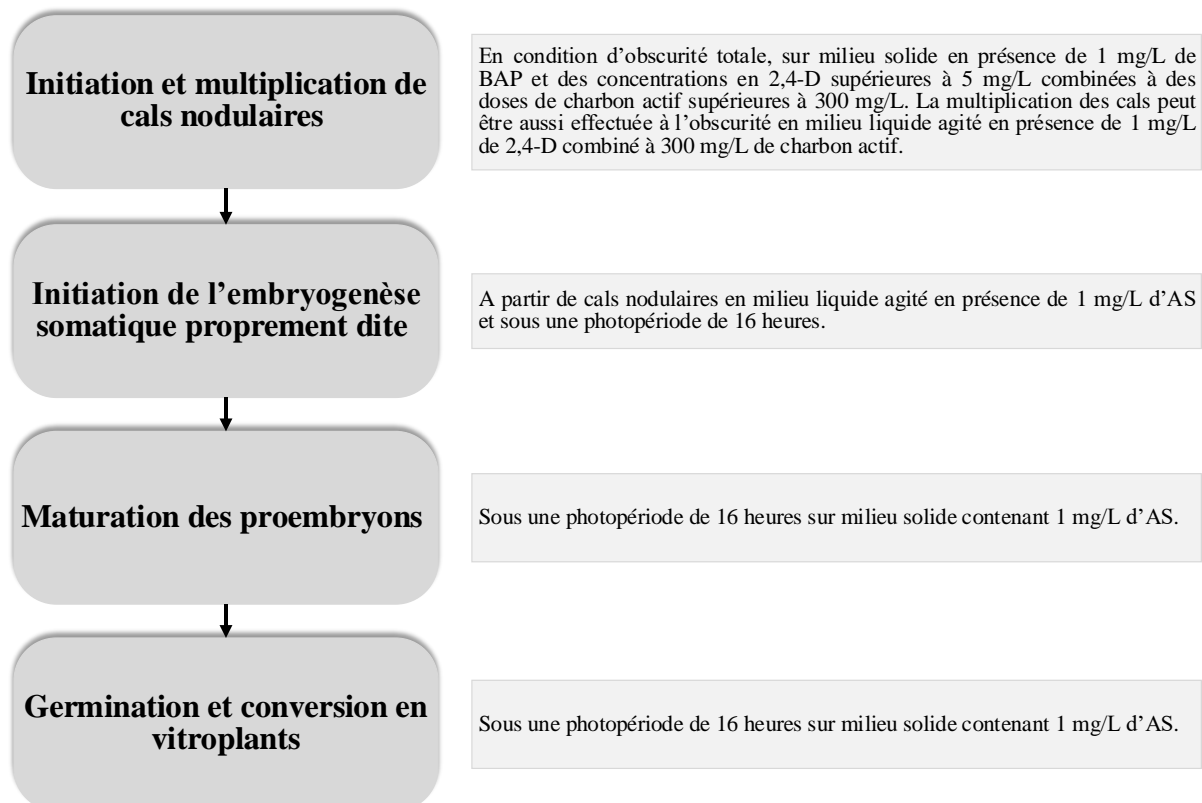
CONCLUSION GENERALE

Face aux nombreuses contraintes auxquelles est confrontée la culture du palmier dattier en Algérie, la maîtrise de la micropropagation par l'embryogenèse somatique peut avoir un rôle déterminant dans la préservation, la valorisation et l'amélioration du patrimoine phoenicicole national. C'est dans cette perspective que notre travail de recherche a été engagé, dont la démarche générale consiste à apporter des modifications sur les composantes du milieu de culture ainsi que sur les conditions environnementales au cours des différentes étapes de l'embryogenèse somatique chez quatre (04) cultivars algériens de palmier dattier.

Initié à partir de rejets de Deglet Nour femelle, Deglet Nour mâle, Ghers et Takerbucht, le présent travail de recherche a permis de produire des vitroplants à partir d'embryons somatiques.

De l'ensemble des résultats obtenus, il en ressort une variation inter-cultivars assez marquée par rapport à la rapidité et à l'intensité de la réactivité de leurs tissus *in vitro*. Ainsi, le cultivar Deglet Nour femelle est le plus réactif suivi par les cultivars Deglet Nour mâle et Takerbucht alors que le cultivar Ghers reste récalcitrant pour l'embryogenèse somatique.

En dépit de la variabilité inter-cultivars, un schéma de régénération par embryogenèse peut être potentiellement adopté chez les cultivars algériens de palmier dattier. Celui-ci se décompose en quatre (04) étapes qu'on peut décrire comme suit :



Le phénomène de brunissement (issus de l'oxydation des polyphénols) est constaté au niveau de l'ensemble des cultivars au cours des différentes étapes de culture. Il se manifeste dès la dissection-stérilisation des rejets. Afin de réduire l'impact de la sécrétion des polyphénols, essentiellement sur l'étape de l'initiation de la callogenèse, la collecte de rejets au niveau des palmeraies serait plus indiquée durant la période de repos végétatif (ce qui correspond au mois de décembre en Algérie). Dans notre cas, la collecte des rejets pour la réalisation de notre travail expérimental a été faite au printemps ce qui pourrait expliquer, en partie, la forte teneur en polyphénols de notre matériel végétal initial.

Dans nos conditions expérimentales, le temps nécessaire à l'obtention d'embryons somatiques structurés pourrait être estimé à sept (07) mois dont quatre (04) mois pour induire une callogenèse nodulaire potentiellement embryogène pour les explants les plus réactifs. Le temps nécessaire ainsi que l'intensité de réponse à l'induction de l'embryogenèse pourraient être réduits à travers l'identification, la sélection et la multiplication de souches de cal plus réactives. C'est l'approche que nous avons adoptée lors de la réalisation de notre travail de recherche.

Chez le palmier dattier comme pour de nombreuses espèces pérennes l'emploi d'explants multicellulaires (issus de rejets) entraîne une variabilité intra-souche ce qui a été vérifié lors de notre expérimentation. Afin de remédier à cette variabilité, l'exploitation de l'embryogenèse secondaire représente une solution potentielle qui permettrait de constituer une banque de souches embryogènes accessibles à n'importe quel moment.

Enfin, notre travail de recherche conduit à la proposition d'un schéma de production d'embryons somatiques structurés viables, ce qui contribuera, à la mise en œuvre de protocoles fiables, simples et de reproductibilité élevée de régénération *via* l'embryogenèse somatique des cultivars algériens de palmier dattier. Néanmoins, des recherches complémentaires sont toutefois indispensables. Elles doivent porter sur les aspects suivants :

- Utilisation des techniques d'analyses métabolomique et protéomique au cours des différents stades de développement des embryons zygotiques/embryons somatiques pour une meilleure compréhension des bases moléculaires de l'embryogenèse chez le palmier dattier permettant ainsi une optimisation du processus de régénération *in vitro*.
- Maîtrise des facteurs physico-chimiques favorisant le transfert des vitroplants issus d'un processus de propagation *in vitro* vers des conditions environnementales et nutritionnelles naturelles (*ex vitro*).
- Maîtrise des modalités de conservation de la diversité variétale existante ou induite en *in vitro* à moyen et à long termes.
- Mise en place de tests moléculaires précoces permettant d'appréhender le phénomène de la variation somaclonale tout en assurant une meilleure traçabilité du matériel végétal régénéré.

- Actualisation des connaissances sur la diversité variétale existante au niveau de l'aire de culture du palmier dattier en Algérie en intégrant la diversité liée au pieds mâles.
- Création de souchothèques de cals hautement embryogènes et/ou organogènes pour une utilisation rapide en cas de besoins exprimés par le secteur économique
- Création de vitrothèques conformément à la diversité variétale existante permettant une utilisation rapide aussi bien pour la propagation que pour les études de caractérisation et d'amélioration génétiques.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abahmane, L. (2011). Date palm micropropagation via organogenesis. *Date palm biotechnology*, 69-90.
2. Abdelouahhab, Z., & Arias-Jimenez, E. (2002). Date palm cultivation. *FAO Plant Production and Protection Paper* (156).
3. Abul-Soad, A. (2011). Micropropagation of date palm using inflorescence explants. *Date palm biotechnology*, 91-117.
4. Abul-Soad, A. A., Jain, S. M., & Jatoi, M. A. (2017). Biodiversity and conservation of date palm. *Biodiversity and conservation of woody plants*, 313-353.
5. Ahmad, I., Hussain, T., Ashraf, I., Nafees, M., Maryam, R. M., & Iqbal, M. (2013). Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 13(4), 539-547.
6. Ahmed, A., Tariq, A., & Habib, S. (2020). Interactive biology of auxins and phenolics in plant environment. *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture: Volume 1*, 117-133.
7. Al Kaabi, H., Zaid, A., & Ainsworth, C. (2006). *Plant-off-types in tissue culture-derived date palm (Phoenix dactylifera L) plants*. Paper presented at the III International Date Palm Conference 736.
8. Al Khateeb, A. (2008). The problems facing the use of tissue culture technique in date palm (*Phoenix dactylifera L.*). *Sci J King Faisal Univ*, 9, 85-104.
9. Al-Mahmoud, M. E., Al-Dous, E. K., Al-Azwani, E. K., & Malek, J. A. (2012). DNA-based assays to distinguish date palm (Arecaceae) gender. *American Journal of Botany*, 99(1), e7-e10.
10. Al-Ghamdi, A. (2000). *Date palm (Phoenix dactylifera L.) germplasm bank in King Faisal University, Saudi Arabia. Survival and adaptability of tissue cultured plantlets*. Paper presented at the IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 560.
11. AlKhateeb, A., & Alturki, S. (2014). A comparison of liquid and semi-solid cultures on shoot multiplication and rooting of three date palm cultivars (*Phoenix dactylifera L.*) in vitro. *Advances in Environmental Biology*, 8(16), 263-269.
12. Al-Khayri, J. M., & Al-Bahrany, A. M. (2012). Effect of abscisic acid and polyethylene glycol on the synchronization of somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera L.*). *Biotechnology*, 11(6), 318-325.
13. Al-Khayri, J. M., & Naik, P. M. (2017). Date palm micropropagation: Advances and applications. *Ciência e Agrotecnologia*, 41, 347-358.
14. Al-Khayri, J. M., Naik, P. M., Jain, S. M., & Johnson, D. V. (2018). Advances in date palm (*Phoenix dactylifera L.*) breeding. *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits: Volume 3*, 727-771.
15. Al-Najm, A., Brauer, S., Trethowan, R., Merchant, A., & Ahmad, N. (2021). Optimization of in vitro pollen germination and viability testing of some Australian selections of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) and their xenic and metaxenic effects on the tissue culture derived female cultivar Barhee. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 57, 771-785.
16. Arif, Y., Sami, F., Siddiqui, H., Bajguz, A., & Hayat, S. (2020). Salicylic acid in relation to other phytohormones in plant: A study towards physiology and signal transduction under challenging environment. *Environmental and Experimental Botany*, 175, 104040.
17. Ascough, G., & Fennell, C. (2004). The regulation of plant growth and development in liquid culture. *South African Journal of Botany*, 70(2), 181-190.

18. Ashraf, Z., & Hamidi-Esfahani, Z. (2011). Date and date processing: a review. *Food reviews international*, 27(2), 101-133.
19. Baaziz, M., Aissam, F., Brakez, Z., Bendiab, K., El Hadrami, I., & Cheikh, R. (1994). Electrophoretic patterns of acid soluble proteins and active isoforms of peroxidase and polyphenoloxidase typifying calli and somatic embryos of two reputed date palm cultivars in Morocco. *Euphytica*, 76, 159-168.
20. Battesti, V. (2005). *Jardins au désert : Evolution des pratiques et savoirs oasiens: Jérid tunisien*: IRD Editions.
21. Battesti, V. (2011). The Power of a Disappearance: Water in the Jerid region of Tunisia *Water, Cultural Diversity, and Global Environmental Change: Emerging Trends, Sustainable Futures?* (pp. 77-96): Springer.
22. Bedjaoui, H., & Benbouza, H. (2020). Assessment of phenotypic diversity of local Algerian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(1), 65-75.
23. Bekheet, S. (2011). In vitro conservation of date palm germplasm. *Date palm biotechnology*, 337-360.
24. Bekheet, S. (2013). Direct organogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) for propagation of true-to-type plants. *Scientia Agriculturae*, 4(3), 85-92.
25. Bekheet, S. A., & Taha, H. S. (2013). Complementary strategy for conservation of date palm germplasm. *Global Journal of Biodiversity Science and Management*, 3(1), 96-107.
26. Benmehaia, M., & Benmehaia, R. (2018). Socioeconomic analysis of date palm sector: The case of Biskra region (Algeria). Paper presented at the Sixth International Date Palm Conference. Abu Dhabi, United Arab Emirates.
27. Benziouche, S. E., & Cheriet, F. (2012). Structure et contraintes de la filiere dattes en Algerie. [Article]. *New Medit*, 11(4), 49+.
28. Benzohra, I. E., Mégateli, M., Djillali, K., Benouis, S., & Makhloufi, S. (2022). Epidémiologie du Bayoud du palmier dattier en Algérie : Facteurs de progression et mesures de protection de palmeraies des oasis contaminées. *Journal Algérien des Régions Arides*, 14(2), 68-72.
29. Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., & Tanmoy, B. (2015). *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences*: Academic Press.
30. Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). *Plant tissue culture: an introductory text* (Vol. 318): Springer.
31. Bouguedoura, N., Bennaceur, M., Babahani, S., & Benziouche, S. E. (2015). Date palm status and perspective in Algeria. *Date Palm Genetic Resources and Utilization: Volume 1: Africa and the Americas*, 125-168.
32. Bouguedoura, N., Bennaceur, M., & Benkhalifa, A. (2010). Le palmier dattier en Algérie: situation, contraintes et apports de la recherche. *Biotechnologies du palmier dattier*. IRD Editions, Paris, 16-22.
33. Brukhin, V., & Morozova, N. (2011). Plant growth and development-basic knowledge and current views. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*, 6(2), 1-53.
34. Chabane, D. (1995). *Etude des aptitudes morphogénétiques de divers explants des rejets du palmier dattier Phoenix dactylifera L. chez deux variétés Takerbucht et Deglet nour pour induire une embryogenèse somatique* (Doctoral dissertation).
35. Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., & Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology letters*, 32, 1199-1205.
36. Chao, C. T., & Krueger, R. R. (2007). The date palm (*Phoenix dactylifera* L.): overview of biology, uses, and cultivation. *HortScience*, 42(5), 1077-1082.

37. Chase, M., Christenhusz, M., Fay, M., Byng, J., Judd, W., Soltis, D., . . . Stevens, P. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical journal of the Linnean Society*, 181(1), 1-20.
38. Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., & Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant signaling & behavior*, 4(6), 493-496.
39. Cherif, E., Zehdi, S., Castillo, K., Chabrilange, N., Abdoukader, S., Pintaud, J.-C., . . . Aberlenc-Bertossi, F. (2013). Male-specific DNA markers provide genetic evidence of an XY chromosome system, a recombination arrest and allow the tracing of paternal lineages in date palm. *New Phytologist*, 197(2), 409-415.
40. Davies, P. J. (2010). *The plant hormones: their nature, occurrence, and functions*: Springer.
41. Dempsey, D., & Klessig, D. F. (2017). How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC biology*, 15(1), 1-11.
42. Dharmasiri, S., Jayaweera, T., & Dharmasiri, N. (2013). Plant hormone signalling: current perspectives on perception and mechanisms of action. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*, 42(1).
43. Dihazi, A., Jaiti, F., El Hadrami, I., El Hassni, M., & Zouine, J. (2003). Effect of salicylic acid on phenolic compounds related to date palm resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Phytopathologia Mediterranea*, 42(1).
44. Djerbi, M. (1994). *Précis de phoeniciculture* (Vol. 24): Ed. FAO, Rome.
45. Djerbi, M. (2000). *Abnormal fruiting of the date palm derived from tissue culture*. Paper presented at the Proc. Date Palm Inter. Symposium, Windhoek, Namibia.
46. El Hadrami, A., & Al-Khayri, J. M. (2012). Socioeconomic and traditional importance of date palm. *Emirates Journal of food and Agriculture*, 24(5), 371.
47. El Hadrami, A., Daayf, F., Elshibli, S., Jain, S. M., & EL Hadrami, I. (2011). Somaclonal variation in date palm. *Date palm biotechnology*, 183-203.
48. El Hadrami, I., & Baaziz, M. (1995). Somatic embryogenesis and analysis of peroxidases in *Phoenix dactylifera* L. *Biologia plantarum*, 37, 197-203.
49. El Hadrami, I., & El Hadrami, A. (2009). Breeding date palm. *Breeding plantation tree crops: tropical species*, 191-216.
50. El-Dawayati, M. M., & Zayed, Z. E. (2017). Controlling hyperhydricity in date palm in vitro culture by reduced concentration of nitrate nutrients. *Date Palm Biotechnology Protocols Volume I: Tissue Culture Applications*, 175-183.
51. El-Esawi, M. A. (2017). Introductory chapter: Hormonal regulation in plant development and stress tolerance. *Phytohormones-Signaling Mechanisms and Crosstalk in Plant Development and Stress Responses*.
52. El-Juhany, L. I. (2010). Degradation of date palm trees and date production in Arab countries: causes and potential rehabilitation. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(8), 3998-4010.
53. El-Sherif, N. (2018). Impact of Plant Tissue Culture on Agricultural Sustainability. Sustainability of Agricultural Environment in Egypt: Part II: United States: Springer.
54. Etienne, H., Guyot, R., Beulé, T., Breitler, J.-C., & Jaligot, E. (2016). Plant fidelity in somatic embryogenesis-regenerated plants. *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*, 121-150.
55. Faci, M., Benziouche, S. E., Madureira, H., & Oubadi, M. (2021). Variability of meteorological drought and some consequences on date palm cultivation in Biskra (Algeria).

56. FAO, F. (2018). Food and agriculture organization of the United Nations. *Rome*, URL: <http://faostat.fao.org>.
57. Fehér, A., Pasternak, T. P., & Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant cell, tissue and organ culture*, 74, 201-228.
58. Fehér, A. (2005). Why somatic plant cells start to form embryos? *Somatic embryogenesis*, 85-101.
59. Fehér, A. (2008). The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biologica Szegediensis*, 52(1), 53-56.
60. Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4), 385-402.
61. Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, 10, 536.
62. Ferry, M. (2011). Potential of date palm micropropagation for improving small farming systems. *Date palm biotechnology*, 15-28.
63. Fki, L. (1998). Embryogénèse somatique et régénération de plants de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à partir de cultures en suspension. *National Engineering School of Sfax, Sfax*.
64. Fki, L., Bahloul, M., Masmoudi, R., & Drira, N. (2001). Etude des capacités germinatives des embryons somatiques chez le palmier dattier : dessiccation, corrélations morphogénétiques et investigations biochimiques.
65. Fki, L., Masmoudi, R., Drira, N., & Rival, A. (2003). An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Reports*, 21, 517-524.
66. Fki, L., Masmoudi, R., Kriaa, W., Mahjoub, A., Sghaier, B., Mzid, R., . . . Drira, N. (2011). Date palm micropropagation via somatic embryogenesis. *Date palm biotechnology*, 47-68.
67. Gaj, M. D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 43, 27-47.
68. Gantait, S., El-Dawayati, M. M., Panigrahi, J., Labrooy, C., & Verma, S. K. (2018). The retrospect and prospect of the applications of biotechnology in *Phoenix dactylifera* L. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 8229-8259.
69. George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008). Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. *The Netherland, The Back Ground Springer*.
70. Gros-Balthazard, M. (2012). *Sur les origines, l'histoire évolutive et biogéographique du palmier-dattier*. Université Montpellier 2.
71. Gros-Balthazard, M. (2013). Hybridization in the genus *Phoenix*: A review. *Emirates Journal of food and Agriculture*, 831-842.
72. Gros-Balthazard, M., Newton, C., Ivorra, S., Pintaud, J.-C., & Terral, J.-F. (2013). Origines et domestication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). État de l'art et perspectives d'étude. *Revue d'ethnoécologie* (4).
73. Gueye, B., Morcillo, F., Collin, M., Gargani, D., Overvoorde, P., Aberlenc-Bertossi, F., . Borgel, A. (2009). Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2, 4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 99, 35-45. A
74. Gueye, B., Saïd-Ahmed, H., Morcillo, F., Borgel, A., Sané, D., Hilbert, J.-L., . . . Blervacq, A.-S. (2009). Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways? *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 98, 47-58. B

75. Gupta, P. K., & Timmis, R. (2005). Mass propagation of conifer trees in liquid cultures—progress towards commercialization. *Plant cell, tissue and organ culture*, 81, 339-346.
76. Haj-Amor, Z., Tóth, T., Ibrahim, M.-K., & Bouri, S. (2017). Effects of excessive irrigation of date palm on soil salinization, shallow groundwater properties, and water use in a Saharan oasis. *Environmental Earth Sciences*, 76, 1-13.
77. Hannachi, S. (1998). *Inventaire variétal de la palmeraie algérienne*. Sélection et Impression Anep Rouiba.
78. Hassan, M. M., Ibrahim, I. A., Fathy, N. M., Ebrahim, M. K., & Komor, E. (2014). Protocol for micropropagated date palm acclimatization: effect of micropropagated plantlet type, soil composition, and acclimatization season. *International Journal of Fruit Science*, 14(2), 225-233.
79. Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., & Ahmad, A. (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1), 14-25.
80. Hazarika, B. N., da Silva, J. T., & Talukdar, A. (2006). Effective acclimatization of in vitro cultured plants: methods, physiology and genetics. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*, 2, 427-438.
81. Hong, P., Chen, J., & Chang, W. (2008). Effects of salicylic and acetylsalicylic acid on direct somatic embryogenesis in *Oncidium*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 17, 149-153.
82. Hosseini, S., Mashayekhi, K., Alizadeh, M., & Ebrahimi, P. (2015). Effect of salicylic acid on somatic embryogenesis and chlorogenic acid levels of carrot (*Daucus carota* cv. Nantes) explants. *Journal of Ornamental Plants*, 1(2), 105-113.
83. Huang, T., Pang, Z., Chen, Y., & Kong, Y. (2013). Groundwater circulation relative to water quality and vegetation in an arid transitional zone linking oasis, desert and river. *Chinese Science Bulletin*, 58, 3088-3097.
84. Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: current status and opportunities. *Recent advances in plant in vitro culture*, 6(10), 1-28.
85. Hvoslef-Eide, A. K., & Preil, W. (2005). *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*: Springer Science & Business Media.
86. Ibraheem, Y., Pinker, I., & Böhme, M. (2013). A comparative study between solid and liquid cultures relative to callus growth and somatic embryo formation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cv. Zaghloom. *Emirates Journal of food and Agriculture*, 889-898.
87. Ibrahim, I. A., Hassan, M. M., & Taha, R. A. (2012). Partial desiccation improves plant regeneration of date palm in vitro cultures. *Wudpecker J Agric Res*, 1, 208-214.
88. Ikeuchi, M., Iwase, A., Rymen, B., Lambolez, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., . . . Sugimoto, K. (2017). Wounding Triggers Callus Formation via Dynamic Hormonal and Transcriptional Changes *Plant Physiol*, 175(3), 1158-1174. doi: 10.1104/pp.17.01035
89. Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The plant cell*, 25(9), 3159-3173.
90. Intha, N., & Chaiprasart, P. (2018). Sex determination in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by PCR based marker analysis. *Scientia Horticulturae*, 236, 251-255. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.039>
91. Jain, S. M. (2011). Prospects of in vitro conservation of date palm genetic diversity for sustainable production. *Emirates Journal of food and Agriculture*, 110-119.
92. Jain, S. M. (2012). Date palm biotechnology: Current status and prospective—an overview. *Emirates Journal of food and Agriculture*, 386-399. A

93. Jain, S. M. (2012). In vitro mutagenesis for improving date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Emirates Journal of food and Agriculture*, 400-407. B
94. Jaradat, A. A. (2011). Biodiversity of date palm. *Encyclopedia of life support systems: Land use, land cover and soil sciences*. Oxford, UK: Eolss Publishers, 31.
95. Jaradat, A. A. (2013). Date palm: production. *Dates: Postharvest science, processing technology and health benefits*, 29-55.
96. Jaradat, A. A. (2015). Biodiversity, genetic diversity, and genetic resources of date palm. *Date Palm Genetic Resources and Utilization: Volume 1: Africa and the Americas*, 19-71.
97. Jaradat, A. A. (2016). Genetic erosion of *Phoenix dactylifera* L.: perceptible, probable, or possible. *Genetic Diversity and Erosion in Plants: Case Histories*, 131-213.
98. Jiménez, V. M. (2001). Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13, 196-223.
99. Jiménez, V. M. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47, 91-110.
100. Johnson, D. (2011). Introduction: date palm biotechnology from theory to practice. *Date palm biotechnology*, 1-11.
101. Johnson, D. V., Al-Khayri, J. M., & Jain, S. M. (2015). Introduction: Date production status and prospects in Africa and the Americas. *Date Palm Genetic Resources and Utilization: Volume 1: Africa and the Americas*, 3-18. A
102. Johnson, D. V., Al-Khayri, J. M., & Jain, S. M. (2015). Introduction: Date production status and prospects in Asia and Europe. *Date Palm Genetic Resources and Utilization: Volume 2: Asia and Europe*, 1-16. B
103. Kawano, T., Furuichi, T., & Muto, S. (2004). Controlled salicylic acid levels and corresponding signaling mechanisms in plants. *Plant Biotechnology*, 21(5), 319-335.
104. Khokhar, M. I., & Teixeira da Silva, J. (2017). Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) biotechnology: a mini-review. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 98(2).
105. Komaraiah, P., Jogeswar, C., Ramakrishna, S., & Kavi Kishor, P. (2004). Acetylsalicylic acid and ammonium-induced somatic embryogenesis and enhanced plumbagin production in suspension cultures of *Plumbago rosea* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40, 230-234.
106. Koo, Y. M., Heo, A. Y., & Choi, H. W. (2020). Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator. *The plant pathology journal*, 36(1), 1.
107. Kumar, N., Modi, A. R., Singh, A. S., Gajera, B. B., Patel, A. R., Patel, M. P., & Subhash, N. (2010). Assessment of genetic fidelity of micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants by RAPD and ISSR markers assay. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16, 207-213.
108. Kumar, P. P., & Loh, C. S. (2012). Plant tissue culture for biotechnology *Plant biotechnology and agriculture* (pp. 131-138): Elsevier.
109. Kunert, K., Baaziz, M., & Cullis, C. (2003). Techniques for determination of true-to-type date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants: a literature review. *Emirates Journal of food and Agriculture*, 1-16.
110. Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and applied genetics*, 60, 197-214.

111. Lecona-Guzmán, C. A., Solís-Marroquín, D., Aviles-Viñas, S., De los Santos-Briones, C., & Santana-Buzzy, N. (2012). Changes in the protein profile of Habanero pepper (*Capsicum chinense* J.) somatic embryos during development. *African Journal of Biotechnology*, *11*(47), 10761-10768.
112. Loutfi, K., & El-Hadrami, I. (2005). *Phoenix dactylifera* date palm *Biotechnology of fruit and nut crops* (pp. 144-156): CAB International Wallingford UK.
113. Loyola-Vargas, V. M., De-la-Peña, C., Galaz-Avalos, R. M., & Quiroz-Figueroa, F. R. (2008). Plant tissue culture. *Molecular biotechnology handbook*, 875-904.
114. MADRP. (2015). *Statistiques agricoles, Série B*.
115. Manickavasagan, A., Essa, M. M., & Sukumar, E. (2012). *Dates: production, processing, food, and medicinal values*: CRC Press.
116. Maruri-López, I., Aviles-Baltazar, N. Y., Buchala, A., & Serrano, M. (2019). Intra and extracellular journey of the phytohormone salicylic acid. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 423.
117. Masmoudi, R., Rival, A., Nato, A., Lavergne, D., Drira, N., & Ducreux, G. (1999). Carbon metabolism in in vitro cultures of date palm: the role of carboxylases (PEPC and RubisCO). *Plant cell, tissue and organ culture*, *57*, 139-143.
118. Mater, A. A. (1986). In vitro propagation of *Phoenix dactylifera* L. *Date palm J*, *4*(2), 137-152.
119. Mazri, M., & Meziani, R. (2015). Micropropagation of date palm: a review. *Cell Dev Biol*, *4*(3), 160.
120. Mazri, M. A., Meziani, R., Belkoura, I., Elmaataoui, S., Mokhless, B., & Souad, N. (2019). Maturation and germination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic embryos. *Notulae Scientia Biologicae*, *11*(1), 86-93.
121. Mehrotra, S., Goel, M. K., Kukreja, A. K., & Mishra, B. N. (2007). Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology*, *6*(13).
122. Meziani, R., Jaiti, F., Mazri, M. A., Hassani, A., Salem, S. B., Anjarne, M., . . . Alem, C. (2016). Organogenesis of *Phoenix dactylifera* L. cv. Mejhoul: Influences of natural and synthetic compounds on tissue browning, and analysis of protein concentrations and peroxidase activity in explants. *Scientia Horticulturae*, *204*, 145-152.
123. Moghaieb, R. E., Abdel-Hadi, A.-H. A., & Ahmed, M. R. A. (2011). Genetic stability among date palm plantlets regenerated from petiole explants. *African Journal of Biotechnology*, *10*(65), 14311-14318.
124. Mohammadi, N., Rastgoo, S., & Izadi, M. (2017). The strong effect of pollen source and pollination time on fruit set and the yield of tissue culture-derived date palm (*Phoenix dactylifera* L.) trees cv. Barhee. *Scientia Horticulturae*, *224*, 343-350.
125. Mohammed, I. A., & Mohamed, I. A. (2019). Validation of RAPD and ISSR Markers Used for Sex Determination in Date Palm Grown under Sudan Conditions. *Advanced Research in Life Sciences*, *3*(1), 17-22.
126. Moussouni, S., Pintaud, J.-C., Vigouroux, Y., & Bouguedoura, N. (2017). Diversity of Algerian oases date palm (*Phoenix dactylifera* L., Arecaceae): Heterozygote excess and cryptic structure suggest farmer management had a major impact on diversity. *PLoS One*, *12*(4), e0175232.
127. Mujib, A., & Šamaj, J. (2006). *Somatic embryogenesis* (Vol. 2): Springer Science & Business Media.
128. Mulgund, G. S., Meti, N. T., Malabadi, R. B., Nataraja, K., & Kumar, S. V. (2012). Role of salicylic acid on conifer somatic embryogenesis. *Research in Biotechnology*, *3*(2).

129. Munier, P. (1973). *Le palmier dattier-techniques agricoles et productions tropicales*: France: Maisonneuve et Larousse.
130. Mustafa, N. R., De Winter, W., Van Iren, F., & Verpoorte, R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature protocols*, 6(6), 715-742.
131. Ochatt, S. J., & Revilla, M. A. (2016). From stress to embryos: some of the problems for induction and maturation of somatic embryos. *In vitro embryogenesis in higher plants*, 523-536.
132. Osborne, D. J., & McManus, M. T. (2005). *Hormones, signals and target cells in plant development* (Vol. 41): Cambridge University Press.
133. Othmani, A., Bayouhd, C., Drira, N., Marrakchi, M., & Trifi, M. (2009). Regeneration and molecular analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plantlets using RAPD markers. *African Journal of Biotechnology*, 8(5). A
134. Othmani, A., Bayouhd, C., Drira, N., Marrakchi, M., & Trifi, M. (2009). Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 97, 71-79. B
135. Othmani, A., Mzid, R., Bayouhd, C., Trifi, M., & Drira, N. (2011). Bioreactors and automation in date palm micropropagation. *Date palm biotechnology*, 119-136.
136. Othmani, A., Rhouma, S., Bayouhd, C., Mzid, R., Drira, N., & Trifi, M. (2010). Regeneration and analysis of genetic stability of plantlets as revealed by RAPD and AFLP markers in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Deglet Nour. *Int Res J Plant Sci*, 1(3), 48-55.
137. Pasternak, T., Groot, E. P., Kazantsev, F. V., Teale, W., Omelyanchuk, N., Kovrizhnykh, V., . . . Mironova, V. V. (2019). Salicylic acid affects root meristem patterning via auxin distribution in a concentration-dependent manner. *Plant Physiol*, 180(3), 1725-1739.
138. Pauls, S. U., Nowak, C., Bálint, M., & Pfenninger, M. (2013). The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular ecology*, 22(4), 925-946.
139. Quiroz-Figueroa, F., Méndez-Zeel, M., Larqué-Saavedra, A., & Loyola-Vargas, V. (2001). Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Reports*, 20, 679-684.
140. Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant cell, tissue and organ culture*, 86, 285-301.
141. Rai, M. K., Shekhawat, N., Gupta, A. K., Phulwaria, M., Ram, K., & Jaiswal, U. (2011). The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106, 179-190.
142. Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual review of plant biology*, 43(1), 439-463.
143. Raskin, I., Skubatz, H., Tang, W., & Meeuse, B. J. (1990). Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. *Annals of Botany*, 66(4), 369-373.
144. Rivas-San Vicente, M., & Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of experimental botany*, 62(10), 3321-3338.
145. Roustan, J.-P., Latche, A., & Fallot, J. (1990). Inhibition of ethylene production and stimulation of carrot somatic embryogenesis by salicylic acid. *Biologia plantarum*, 32(4), 273-276.

146. Sahijram, L., & Bahadur, B. (2015). Somatic embryogenesis. *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology*, 315-327.
147. Saker, M., Adawy, S., Mohamed, A., & El-Itriby, H. (2006). Monitoring of cultivar identity in tissue culture-derived date palms using RAPD and AFLP analysis. *Biologia plantarum*, 50, 198-204.
148. Saker, M., Bekheet, S., Taha, H., Fahmy, A., & Moursy, H. (2000). Detection of somaclonal variations in tissue culture-derived date palm plants using isoenzyme analysis and RAPD fingerprints. *Biologia plantarum*, 43, 347-351.
149. Saker, M. M., Allam, A., Goma, H., & Abd El-Zaher, M. (2007). Development of suspension culture system for in vitro propagation of date palm. *J. Genet. Eng. Biotech*, 5(1), 51-56.
150. Saleh, E. O. L., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2016). Advances in somatic embryogenesis of palm trees (Arecaceae): fundamentals and review of protocols. *Somatic embryogenesis in ornamentals and its applications*, 231-254.
151. Sané, D., Aberlenc-Bertossi, F., Diatta, L. I. D., Guèye, B., Daher, A., Sagna, M., . . . Borgel, A. (2012). Influence of growth regulators on callogenesis and somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian cultivars. *The Scientific World Journal*, 2012.
152. Sané, D., Aberlenc-Bertossi, F., Gassama-Dia, Y., Sagna, M., Trouslot, M.-F., Duval, Y., & Borgel, A. (2006). Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Annals of Botany*, 98(2), 301-308.
153. Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A., & Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol*, 5(5), 301-307.
154. Sghaier, B., Kriaa, W., Bahloul, M., Novo, J. V. J., & Drira, N. (2009). Effect of ABA, arginine and sucrose on protein content of date palm somatic embryos. *Scientia Horticulturae*, 120(3), 379-385.
155. Sghaier-Hammami, B., Jorrín-Novo, J. V., Gargouri-Bouزيد, R., & Drira, N. (2010). Abscisic acid and sucrose increase the protein content in date palm somatic embryos, causing changes in 2-DE profile. *Phytochemistry*, 71(11-12), 1223-1236.
156. Shabana, H., Al-Ani, B., & Zaid, A. (2010). *On the status of chromosomes of the date palm (Phoenix dactylifera L.)*. Paper presented at the IV International Date Palm Conference 882.
157. Shabani, F., Kumar, L., & Taylor, S. (2012). Climate change impacts on the future distribution of date palms: a modeling exercise using CLIMEX. *PLoS One*, 7(10), e48021.
158. Shareef, H. J., Al-Mayahi, A. M., & Alhamd, A. D. (2016). Effect of desiccation and cold hardening on germination of somatic embryos in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Berhi cultivar in vitro. *Adv Appl Sci Res*, 7(3), 58-64.
159. Sharma, D., Kumari, R., & Chowdhury, J. (1980). In vitro culture of female date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues. *Euphytica*, 29, 169-174.
160. Sharma, P. (2013). Salicylic acid: a novel plant growth regulator—role in physiological processes and abiotic stresses under changing environments. *Climate change and plant abiotic stress tolerance*, 939-990.
161. Siddiq, M., & Greiby, I. (2013). Overview of date fruit production, postharvest handling, processing, and nutrition. *Dates: Postharvest science, processing technology and health benefits*, 1-28.

162. Sidky, R., & Gadalla, E. (2013). Somatic embryogenesis in *Phoenix dactylifera*: maturation, germination and reduction of hyperhydricity during embryogenic cell suspension culture. *Arab J Biotech*, 16(1), 119-130.
163. Singh, A. (2015). Micropropagation of plants. *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology*, 329-346.
164. Smith, R. J., & Aynsley, J. S. (1995). Field performance of tissue cultured date palm (*Phoenix dactylifera*) clonally produced by somatic embryogenesis.
165. Smith, S. M., Li, C., & Li, J. (2017). Hormone function in plants.
166. Solís-Ramos, L. Y., Andrade-Torres, A., Sáenz-Carbonell, L., Oropeza-Salín, C., & Castaño de la Serna, E. (2012). Somatic embryogenesis in recalcitrant plants. *Embryogenesis*, 597-618.
167. Taha, H., Bekheet, S., & Saker, M. (2001). Factors affecting in vitro multiplication of date palm. *Biologia plantarum*, 44(3), 431-434.
168. Tengberg, M. (2012). Beginnings and early history of date palm garden cultivation in the Middle East. *Journal of Arid Environments*, 86, 139-147.
169. Tengberg, M., Newton, C., & Battesti, V. (2013). «L'arbre sans rival». Palmiers dattiers et palmeraies au Moyen-Orient et en Égypte de la préhistoire à nos jours. *Revue d'ethnoécologie*(4).
170. Thorpe, T. A. (1990). Organogenesis: structural, physiological and biochemical aspects. *Plant Aging: Basic and Applied Approaches*, 191-197.
171. Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology*, 37, 169-180.
172. Tisserat, B. (1979). Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. *Journal of experimental botany*, 30(6), 1275-1283.
173. Tisserat, B. (1982). Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures. *Euphytica*, 31(1), 201-214.
174. Titouh, K., Boufis, N., & Khelifi, L. (2017). Microcalli induction in protoplasts isolated from embryogenic callus of date palm. *Date Palm Biotechnology Protocols Volume I: Tissue Culture Applications*, 227-237.
175. Titouh, K., Khelifi, L., Slaoui, M., Boufis, N., Morsli, A., Moussa, K. T. H., & Makhzoum, A. (2015). A simplified protocol to induce callogenesis in protoplasts of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Iranian Journal of Biotechnology*, 13(1), 26.
176. Vasil, I. K. (2008). A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, 27, 1423-1440.
177. Veramendi, J., & Navarro, L. (1996). Influence of physical conditions of nutrient medium and sucrose on somatic embryogenesis of date palm. *Plant cell, tissue and organ culture*, 45, 159-164.
178. Veramendi, J., & Navarro, L. (1997). Influence of explant sources of adult date palm (*Phoenix dactylifera* L.) on embryogenic callus formation. *Journal of Horticultural Science*, 72(5), 665-671.
179. Viñas, M., & Jiménez, V. (2011). Factors affecting in vitro somatic embryogenesis of palms (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 229-242.
180. Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology*, 47, 177-206.
181. Wales, N., & Blackman, B. K. (2017). Plant domestication: wild date palms illuminate a crop's sticky origins. *Current Biology*, 27(14), R702-R704.
182. WCV. (2022). World checklist of vascular plants, version 2.0. facilitated by the royal botanic gardens, kew. *Published on the Internet*.

183. Zaid, A., El-Korchi, B., & Visser, H. (2011). Commercial date palm tissue culture procedures and facility establishment. *Date palm biotechnology*, 137-180.
184. Zaid, A., & Tisserat, B. (1983). In vitro shoot tip differentiation in *Phoenix dactylifera* L. *Date palm J*, 2(2), 163-182.
185. Zavattieri, M. A., Frederico, A. M., Lima, M., Sabino, R., & Arnholdt-Schmitt, B. (2010). Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1), 12-13.
186. Zehdi-Azouzi, S., Cherif, E., Moussouni, S., Gros-Balthazard, M., Abbas Naqvi, S., Ludena, B., . . . Bennaceur, M. (2015). Genetic structure of the date palm (*Phoenix dactylifera*) in the Old World reveals a strong differentiation between eastern and western populations. *Annals of Botany*, 116(1), 101-112.
187. Zein El Din, A. F., Abd Elbar, O. H., Al Turki, S. M., Ramadan, K. M., El-Beltagi, H. S., Ibrahim, H. A., . . . Farag, R. (2021). Morpho-Anatomical and Biochemical Characterization of Embryogenic and Degenerative Embryogenic Calli of *Phoenix dactylifera* L. *Horticulturae*, 7(10), 393.
188. Zouine, J., Bellaj, M. E., Meddich, A., Verdeil, J.-L., & Hadrami, I. E. (2005). Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension cultures in *Phoenix dactylifera*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 82(1), 83-92.
189. Zouine, J., & El Hadrami, I. (2004). Somatic embryogenesis in *Phoenix dactylifera* L: Effect of exogenous supply of sucrose on proteins, sugars, phenolics and peroxidases activities during the embryogenic cell suspension culture. *Biotechnology (Pakistan)*.
190. Zouine, J., & El Hadrami, I. (2007). Effect of 2, 4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae*, 112(2), 221-226.

ANNEXE I

ANNEXE I

1-Initiation de la callogenèse primaire

1-1-1- Variation du brunissement des explants en fonction des milieux et des cultivars

1-1-1- Effet des milieux de culture testés

Tests du khi-carré :

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
khi-carré de Pearson	39,649 ^a	3	,000
Rapport de vraisemblance	35,824	3	,000
N d'observations valides	206		

a. 0 cellules (0,0%) ont un effectif théorique inférieur à 5. L'effectif théorique minimum est de 11,65.

Comparaison des proportions :

Tableau croisé Brunissement * Milieux							
			Milieux				Total
			MCS0	MCS1	MCS2	MCS3	
Brunissement	Brunissement	Effectif	28 _a	8 _b	6 _b	8 _b	50
		% dans Milieux	58,3%	14,8%	12,0%	14,8%	24,3%
		% du total	13,6%	3,9%	2,9%	3,9%	24,3%
	Pas de Brunissement	Effectif	20 _a	46 _b	44 _b	46 _b	156
		% dans Milieux	41,7%	85,2%	88,0%	85,2%	75,7%
		% du total	9,7%	22,3%	21,4%	22,3%	75,7%

Chaque lettre en indice indique un sous-ensemble de Milieux catégories dont les proportions de colonne ne diffèrent pas de manière significative les unes des autres au niveau ,05.

1-1-2- Effet des cultivars étudiés

Tests du khi-carré :

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
khi-carré de Pearson	49,534 ^a	3	,000
Rapport de vraisemblance	52,572	3	,000
N d'observations valides	206		

a. 0 cellules (0,0%) ont un effectif théorique inférieur à 5. L'effectif théorique minimum est de 10,44.

Comparaison des proportions :

Tableau croisé Brunissement * Génotype							
			Génotype			Total	
			Deglet Nour Femelleemelle	Deglet Nour Male	Ghers		Takerbucht
Brunissement	Brunissement	Effectif	17 _b	1 _c	28 _a	4 _{b,c}	50
		% dans Génotype	26,6%	2,0%	58,3%	9,3%	24,3%
		% du total	8,3%	0,5%	13,6%	1,9%	24,3%
	Pas de Brunissement	Effectif	47 _b	50 _a	20 _c	39 _{b,c}	156
		% dans Génotype	73,4%	98,0%	41,7%	90,7%	75,7%
		% du total	22,8%	24,3%	9,7%	18,9%	75,7%

Chaque lettre en indice indique un sous-ensemble de Génotype catégories dont les proportions de colonne ne diffèrent pas de manière significative les unes des autres au niveau ,05.

1-1-3- Effet des milieux de culture testés au niveau des cultivars étudiés

Tests du khi-carré :

Génotype		Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Takerbucht	khi-carré de Pearson	,212	3	,976
	Rapport de vraisemblance	,206	3	,977
	N d'observations valides	43		
Ghers	khi-carré de Pearson	11,657	3	,009
	Rapport de vraisemblance	15,966	3	,001
	N d'observations valides	48		
Deglet Nour Male	khi-carré de Pearson	2,982	3	,394
	Rapport de vraisemblance	2,793	3	,425
	N d'observations valides	51		
Deglet Nour Femelle	khi-carré de Pearson	50,223	3	,000
	Rapport de vraisemblance	54,556	3	,000
	N d'observations valides	64		

Comparaison des proportions :

Tableau croisé Brunissement * Milieux * Génotype								
Génotype				Milieux				Total
				MCS0	MCS1	MCS2	MCS3	
Takerbucht	Brunissement	Brunissement	Effectif	1a	1a	1a	1a	4
			% dans Milieux	12,5%	7,7%	11,1%	7,7%	9,3%
			% du total	2,3%	2,3%	2,3%	2,3%	9,3%
		Pas de Brunissement	Effectif	7a	12a	8a	12a	39
			% dans Milieux	87,5%	92,3%	88,9%	92,3%	90,7%
			% du total	16,3%	27,9%	18,6%	27,9%	90,7%
Ghers	Brunissement	Brunissement	Effectif	12a	5b	5b	6b	28
			% dans Milieux	100,0%	41,7%	41,7%	50,0%	58,3%
			% du total	25,0%	10,4%	10,4%	12,5%	58,3%
		Pas de Brunissement	Effectif	0a	7b	7b	6b	20
			% dans Milieux	0,0%	58,3%	58,3%	50,0%	41,7%
			% du total	0,0%	14,6%	14,6%	12,5%	41,7%
Deglet Nour Male	Brunissement	Brunissement	Effectif	0a	0a	0a	1a	1
			% dans Milieux	0,0%	0,0%	0,0%	7,7%	2,0%
			% du total	0,0%	0,0%	0,0%	2,0%	2,0%
		Pas de Brunissement	Effectif	12a	13a	13a	12a	50
			% dans Milieux	100,0%	100,0%	100,0%	92,3%	98,0%
			% du total	23,5%	25,5%	25,5%	23,5%	98,0%
Deglet Nour Femelle	Brunissement	Brunissement	Effectif	15a	2b	0b	0b	17
			% dans Milieux	93,8%	12,5%	0,0%	0,0%	26,6%
			% du total	23,4%	3,1%	0,0%	0,0%	26,6%
		Pas de Brunissement	Effectif	1a	14b	16b	16b	47
			% dans Milieux	6,3%	87,5%	100,0%	100,0%	73,4%
			% du total	1,6%	21,9%	25,0%	25,0%	73,4%

Chaque lettre en indice indique un sous-ensemble de Milieux catégories dont les proportions de colonne ne diffèrent pas de manière significative les unes des autres au niveau ,05.

1-2- Variation de la callogénèse primaire en fonction des milieux et des cultivars

1-2-1- Effet des milieux de culture testés

Tests du khi-carré :

Tests du khi-carré			
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
khi-carré de Pearson	31,483 ^a	3	,000
Rapport de vraisemblance	37,596	3	,000
N d'observations valides	206		

a. 0 cellules (0,0%) ont un effectif théorique inférieur à 5. L'effectif théorique minimum est de 19,34.

Comparaison des proportions :

Tableau croisé Callo_iaire * Milieux							
			Milieux				Total
			MCS0	MCS1	MCS2	MCS3	
Callo_iaire	Callogénèse	Effectif	3 _a	29 _b	22 _b	29 _b	83
		% dans Milieux	6,3%	53,7%	44,0%	53,7%	40,3%
		% du total	1,5%	14,1%	10,7%	14,1%	40,3%
	Pas de callogénèse	Effectif	45 _a	25 _b	28 _b	25 _b	123
		% dans Milieux	93,8%	46,3%	56,0%	46,3%	59,7%
		% du total	21,8%	12,1%	13,6%	12,1%	59,7%

Chaque lettre en indice indique un sous-ensemble de Milieux catégories dont les proportions de colonne ne diffèrent pas de manière significative les unes des autres au niveau ,05.

1-2-2- Effet des cultivars étudiés

Tests du khi-carré :

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
khi-carré de Pearson	51,606 ^a	3	,000
Rapport de vraisemblance	55,667	3	,000
N d'observations valides	206		

a. 0 cellules (0,0%) ont un effectif théorique inférieur à 5. L'effectif théorique minimum est de 17,33.

Comparaison des proportions :

Tableau croisé Callo_iaire * Génotype							
			Génotype				Total
			Deglet Nour Femelle	Deglet Nour Male	Ghers	Takerbucht	
Callo_iaire	Callogénèse	Effectif	36 _a	35 _a	6 _b	6 _b	83
		% dans Génotype	56,3%	68,6%	12,5%	14,0%	40,3%
		% du total	17,5%	17,0%	2,9%	2,9%	40,3%
	Pas de callogénèse	Effectif	28 _a	16 _a	42 _b	37 _b	123
		% dans Génotype	43,8%	31,4%	87,5%	86,0%	59,7%
		% du total	13,6%	7,8%	20,4%	18,0%	59,7%

Chaque lettre en indice indique un sous-ensemble de Génotype catégories dont les proportions de colonne ne diffèrent pas de manière significative les unes des autres au niveau ,05.

1-2-3- Effet des milieux de culture testés au niveau des cultivars étudiés :

Tests du khi-carré :

Génotype		Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Takerbucht	khi-carré de Pearson	1,854	3	,603
	Rapport de vraisemblance	2,895	3	,408
	N d'observations valides	43		
Ghers	khi-carré de Pearson	20,571	3	,000
	Rapport de vraisemblance	19,534	3	,000
	N d'observations valides	48		
Deglet Nour Male	khi-carré de Pearson	38,138	3	,000
	Rapport de vraisemblance	47,401	3	,000
	N d'observations valides	51		
Deglet Nour Femelle	khi-carré de Pearson	16,762	3	,001
	Rapport de vraisemblance	18,166	3	,000
	N d'observations valides	64		

Comparaison des proportions :

Tableau croisé Callo_Iaire * Milieux * Génotype								
Génotype				Milieux				Total
				MCS0	MCS1	MCS2	MCS3	
TK	Callo_Iaire	Callogénèse	Effectif	0 _a	2 _a	2 _a	2 _a	6
			% dans Milieux	0,0%	15,4%	22,2%	15,4%	14,0%
			% du total	0,0%	4,7%	4,7%	4,7%	14,0%
		Pas de callogénèse	Effectif	8 _a	11 _a	7 _a	11 _a	37
			% dans Milieux	100,0%	84,6%	77,8%	84,6%	86,0%
			% du total	18,6%	25,6%	16,3%	25,6%	86,0%
GR	Callo_Iaire	Callogénèse	Effectif	0 _a	6 _b	0 _a	0 _a	6
			% dans Milieux	0,0%	50,0%	0,0%	0,0%	12,5%
			% du total	0,0%	12,5%	0,0%	0,0%	12,5%
		Pas de callogénèse	Effectif	12 _a	6 _b	12 _a	12 _a	42
			% dans Milieux	100,0%	50,0%	100,0%	100,0%	87,5%
			% du total	25,0%	12,5%	25,0%	25,0%	87,5%
DNM	Callo_Iaire	Callogénèse	Effectif	0 _a	13 _b	9 _b	13 _b	35
			% dans Milieux	0,0%	100,0%	69,2%	100,0%	68,6%
			% du total	0,0%	25,5%	17,6%	25,5%	68,6%
		Pas de callogénèse	Effectif	12 _a	0 _b	4 _b	0 _b	16
			% dans Milieux	100,0%	0,0%	30,8%	0,0%	31,4%
			% du total	23,5%	0,0%	7,8%	0,0%	31,4%
DNF	Callo_Iaire	Callogénèse	Effectif	3 _a	8 _{a,b}	11 _b	14 _b	36
			% dans Milieux	18,8%	50,0%	68,8%	87,5%	56,3%
			% du total	4,7%	12,5%	17,2%	21,9%	56,3%
		Pas de callogénèse	Effectif	13 _a	8 _{a,b}	5 _b	2 _b	28
			% dans Milieux	81,3%	50,0%	31,3%	12,5%	43,8%
			% du total	20,3%	12,5%	7,8%	3,1%	43,8%

Chaque lettre en indice indique un sous-ensemble de Milieux catégories dont les proportions de colonne ne diffèrent pas de manière significative les unes des autres au niveau ,05.

2- Callogénèse secondaire induite

2-1- Variation de la callogénèse secondaire induite en fonction des milieux et des cultivars

2-1-1- Effet des milieux de culture testés

Test de Friedman :

Q (Valeur observée)	39,171
Q (Valeur critique)	7,815
DDL	3
p-value (bilatérale)	< 0,0001
alpha	0,05

Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Nemenyi / Test bilatéral

Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes		
MCS3	15	55,500	3,700	A		
MCS2	15	47,500	3,167	A	B	
MCS1	15	30,500	2,033		B	C
MCS0	15	16,500	1,100			C

2-1-2- Effet des cultivars étudiés

Test de Friedman :

Q (Valeur observée)	10,993
Q (Valeur critique)	7,815
DDL	3
p-value (bilatérale)	0,012
alpha	0,05

Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Nemenyi / Test bilatéral :

Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes	
GR	15	27,000	1,800	A	
DNM	15	33,000	2,200	A	B
DNF	15	43,000	2,867	A	B
TK	15	47,000	3,133		B

2-1-3- Effet des milieux de culture testés au niveau des cultivars étudiés

DNF :

Test de Friedman :

Q (Valeur observée)	38,396
Q (Valeur critique)	7,815
DDL	3
p-value (unilatérale)	< 0,0001
alpha	0,05

Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Nemenyi / Test bilatéral

Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes		
DNF_MCS1	15	55,000	3,667	A		
DNF_MCS3	15	47,500	3,167	A	B	
DNF_MCS2	15	31,000	2,067		B	C
DNF_MCS0	15	16,500	1,100			C

DNM :

Test de Friedman :

Q (Valeur observée)	40,886
Q (Valeur critique)	7,815
DDL	3
p-value (unilatérale)	< 0,0001
alpha	0,05

Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Nemenyi / Test bilatéral :

Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes		
DNM_MCS3	15	57,500	3,833	A		
DNM_MCS2	15	45,500	3,033	A	B	
DNM_MCS1	15	30,500	2,033		B	C
DNM_MCS0	15	16,500	1,100			C

GR :

Test de Friedman :

Q (Valeur observée)	42
Q (Valeur critique)	7,815
DDL	3
p-value (unilatérale)	< 0,0001
alpha	0,05

Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Nemenyi / Test bilatéral :

Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes		
GR_MCS2	15	58,500	3,900	A		
GR_MCS0	15	30,500	2,033		B	
GR_MCS1	15	30,500	2,033		B	
GR_MCS3	15	30,500	2,033		B	

TK :

Test de Friedman :

Q (Valeur observée)	37,144
Q (Valeur critique)	7,815
DDL	3
p-value (unilatérale)	< 0,0001
alpha	0,05

Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Nemenyi / Test bilatéral :

Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes	
TK_MCS3	15	58,000	3,867	A	
TK_MCS2	15	38,500	2,567		B
TK_MCS1	15	33,000	2,200		B
TK_MCS0	15	20,500	1,367		B

2-2- Multiplication en milieu liquide agité

Tests de type III des effets fixes :

Effets	Num DDL	Den DDL	F	Pr > F
Temps_Mois	2	36	68,9863	< 0,0001
Cultivars	3	36	8,4962	0,0002
Temps_Mois*Cultivars	6	36	3,0682	0,0158

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% / Fisher (LSD) :

Temps :

Modalité	Moyennes estimées	Groupes		
Temps_Mois-2	5,9084	A		
Temps_Mois-1	2,8541		B	
Temps_Mois-0	1,0000			C

Cultivars :

Modalité	Moyennes estimées	Groupes		
Cultivars-DNF	4,7332	A		
Cultivars-GR	2,9919		B	
Cultivars-TK	2,7675		B	
Cultivars-DNM	2,5241		B	

Cultivars*Temps:

Modalité	Moyennes estimées	Groupes			
Temps_Mois-2*Cultivars-DNF	8,7884	A			
Temps_Mois-2*Cultivars-GR	5,7126		B		
Temps_Mois-2*Cultivars-TK	5,0344		B		
Temps_Mois-1*Cultivars-DNF	4,4113		B	C	
Temps_Mois-2*Cultivars-DNM	4,0980		B	C	
Temps_Mois-1*Cultivars-DNM	2,4742			C	D
Temps_Mois-1*Cultivars-TK	2,2681			C	D
Temps_Mois-1*Cultivars-GR	2,2629			C	D
Temps_Mois-0*Cultivars-DNF	1,0000				D
Temps_Mois-0*Cultivars-TK	1,0000				D
Temps_Mois-0*Cultivars-GR	1,0000				D
Temps_Mois-0*Cultivars-DNM	1,0000				D

3- Embryogenèse somatique indirecte

3-1- Effet de l'acide salicylique sur l'embryogenèse somatique en milieu liquide agité chez le cultivar Deglet Nour

3-1-1- Variation du poids frais des suspensions

Tests de type III des effets fixes :

Effets	Num DDL	Den DDL	F	Pr > F
Traitements	4	15	7,9647	0,0012
Répétition	8	120	224,0146	< 0,0001
Traitements*Répétition	32	120	4,4713	< 0,0001

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% :

Traitements :

Modalité	Moyennes estimées	Groupes		
Traitements-MEL1	6,8033	A		
Traitements-MEL0	6,4571	A	B	
Traitements-MEL2	5,9904	A	B	
Traitements-MEL3	5,0655		B	C
Traitements-MEL4	4,1405			C

Répétition :

Modalité	Moyennes estimées	Groupes			
Répétition-Semaine_6	8,9857	A			
Répétition-Semaine_7	7,8888	A	B		
Répétition-Semaine_5	7,8863	A	B		
Répétition-Semaine_8	6,8645		B		
Répétition-Semaine_4	6,8573		B		
Répétition-Semaine_3	5,6117			C	
Répétition-Semaine_2	5,2862			C	
Répétition-Semaine_0	1,2869				D
Répétition-Semaine_1	0,5548				D

Traitements*Répétition :

Modalité	Moyennes estimées	Groupes															
Traitements-MEL1*Répétition-Semaine_6	11,3658	A															
Traitements-MEL1*Répétition-Semaine_7	10,2468	A	B														
Traitements-MEL0*Répétition-Semaine_6	9,9155	A	B	C													
Traitements-MEL0*Répétition-Semaine_5	9,8090	A	B	C	D												
Traitements-MEL2*Répétition-Semaine_6	9,2552		B	C	D	E											
Traitements-MEL0*Répétition-Semaine_7	9,1427		B	C	D	E											
Traitements-MEL2*Répétition-Semaine_7	9,0635		B	C	D	E	F										
Traitements-MEL1*Répétition-Semaine_8	8,9998		B	C	D	E	F										
Traitements-MEL3*Répétition-Semaine_6	8,4103			C	D	E	F	G									
Traitements-MEL1*Répétition-Semaine_5	8,3405			C	D	E	F	G									
Traitements-MEL0*Répétition-Semaine_4	8,2377			C	D	E	F	G									
Traitements-MEL0*Répétition-Semaine_8	8,1065				D	E	F	G	H								
Traitements-MEL2*Répétition-Semaine_5	7,9015					E	F	G	H	I							
Traitements-MEL1*Répétition-Semaine_4	7,7813					E	F	G	H	I	J						
Traitements-MEL3*Répétition-Semaine_5	7,7665					E	F	G	H	I	J						
Traitements-MEL2*Répétition-Semaine_8	7,3495						F	G	H	I	J	K					
Traitements-MEL2*Répétition-Semaine_4	7,0942							G	H	I	J	K	L				
Traitements-MEL1*Répétition-Semaine_3	6,4033								H	I	J	K	L	M			
Traitements-MEL1*Répétition-Semaine_2	6,3003									I	J	K	L	M	N		
Traitements-MEL3*Répétition-Semaine_7	6,1073										J	K	L	M	N	O	
Traitements-MEL2*Répétition-Semaine_3	6,0937										J	K	L	M	N	O	
Traitements-MEL4*Répétition-Semaine_6	5,9818											K	L	M	N	O	
Traitements-MEL3*Répétition-Semaine_4	5,9278											K	L	M	N	O	
Traitements-MEL0*Répétition-Semaine_3	5,7580											K	L	M	N	O	
Traitements-MEL4*Répétition-Semaine_5	5,6140											K	L	M	N	O	
Traitements-MEL0*Répétition-Semaine_2	5,4270												L	M	N	O	
Traitements-MEL3*Répétition-Semaine_8	5,3793													L	M	N	O

3-1-2- Variation du nombre d'EMS obtenus en milieux liquides agités

Analyse de la variance:

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	412,6667	206,3333	5,1872	0,0317
Erreur	9	358,0000	39,7778		
Total corrigé	11	770,6667			

Synthèse des comparaisons multiples par paires pour Traitements (Fisher (LSD)):

Modalité	Moyennes estimées	Groupes	
MEL1	14,5	A	
MEL2	3,5		B
MEL0	1		B

3-2- Effets du type de milieu et de l'AS sur l'induction de l'embryogenèse somatique et maturation des PEM

3-2-1- Induction et maturation des PEM en milieux liquides

3-2-1-1- Variation du poids frais des suspensions

Effet des traitements testés

Tests de type III des effets fixes :

Effets	Num DDL	Den DDL	F	Pr > F
Traitement	1	30	0,6484	0,4270
Répétition	9	270	98,7252	< 0,0001
Traitement*Répétition	9	270	2,2091	0,0218

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyennes estimées	Groupes
Traitement-MEL1	3,7017	A
Traitement-MEL0	3,3685	A

Effet des cultivars étudiés

Effets	Num DDL	Den DDL	F	Pr > F
Cultivars	3	28	13,6129	< 0,0001
Répétition	9	252	127,2449	< 0,0001
Cultivars*Répétition	27	252	4,5046	< 0,0001

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyennes estimées	Groupes	
Cultivars-DNM	4,2704	A	
Cultivars-TK	4,1293	A	
Cultivars-DNF	3,6880	A	
Cultivars-GR	2,0527		B

Effet des traitements testés au niveau des cultivars étudiés

DNF

Tests de type III des effets fixes :

Effets	Num DDL	Den DDL	F	Pr > F
Traitement	1	6	0,0055	0,9434
Répétition	9	54	15,5408	< 0,0001
Traitement*Répétition	9	54	0,4134	0,9225

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyennes estimées	Groupes
Traitement-MEL1	3,7193	A
Traitement-MEL0	3,6566	A

DNM

Tests de type III des effets fixes :

Effets	Num DDL	Den DDL	F	Pr > F
Traitement	1	6	0,0521	0,8271
Répétition	9	54	158,7115	< 0,0001
Traitement*Répétition	9	54	0,2131	0,9914

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyennes estimées	Groupes
Traitement-MEL1	4,3210	A
Traitement-MEL0	4,2197	A

GR

Tests de type III des effets fixes :

Effets	Num DDL	Den DDL	F	Pr > F
Traitement	1	6	20,9145	0,0038
Répétition	9	54	20,3948	< 0,0001
Traitement*Répétition	9	54	19,2215	< 0,0001

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyennes estimées	Groupes
Traitement-MEL1	2,7558	A
Traitement-MEL0	1,3496	B

TK

Tests de type III des effets fixes :

Effets	Num DDL	Den DDL	F	Pr > F
Traitement	1	6	0,7610	0,4166
Répétition	9	54	207,8152	< 0,0001
Traitement*Répétition	9	54	0,7994	0,6183

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyennes estimées	Groupes
Traitement-MEL0	4,2478	A
Traitement-MEL1	4,0108	A

3-2-1-2- Variation du nombre d'EMS obtenus en milieux liquides agités

Effet des traitements testés

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	42,7813	42,7813	0,9150	0,3464
Erreur	30	1402,6875	46,7563		
Total corrigé	31	1445,4688			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes
MEL1	7,9375	A
MEL0	5,6250	A

Effet des cultivars étudiés

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	547,8438	182,6146	5,6964	0,0036
Erreur	28	897,6250	32,0580		
Total corrigé	31	1445,4688			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes
DNF	12,1250	A
DNM	8,6250	A
TK	5,5000	B
GR	0,8750	C

Effet des traitements testés au niveau des cultivars étudiés

DNF

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	190,1250	190,1250	6,1084	0,0484
Erreur	6	186,7500	31,1250		
Total corrigé	7	376,8750			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL1	17,0000	A	
MEL0	7,2500		B

DNM

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	190,1250	190,1250	6,0119	0,0497
Erreur	6	189,7500	31,6250		
Total corrigé	7	379,8750			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL0	13,5000	A	
MEL1	3,7500		B

GR

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	6,1250	6,1250	7,7368	0,0319
Erreur	6	4,7500	0,7917		
Total corrigé	7	10,8750			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL1	1,7500	A	
MEL0	0,0000		B

TK**Analyse de la variance :**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	112,5000	112,5000	38,5714	0,0008
Erreur	6	17,5000	2,9167		
Total corrigé	7	130,0000			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL1	9,2500	A	
MEL0	1,7500		B

3-2-2- Induction en milieux liquides et maturation sur milieux solides**3-2-2-1- Variation du nombre d'EMS issus de l'étalement sur milieux solides****Effet des traitements testés****Analyse de la variance :**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	639,0313	639,0313	4,3281	0,0461
Erreur	30	4429,4375	147,6479		
Total corrigé	31	5068,4688			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL1/MES1	27,1875	A	
MEL0/MES0	18,2500		B

Effet des cultivars étudiés**Analyse de la variance :**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	2385,3438	795,1146	8,2975	0,0004
Erreur	28	2683,1250	95,8259		
Total corrigé	31	5068,4688			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
DNF	32,1250	A	
TK	25,2500	A	
DNM	24,8750	A	
GR	8,6250		B

Effet des traitements testés au niveau des cultivars étudiés

DNF

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	703,1250	703,1250	39,8936	0,0007
Erreur	6	105,7500	17,6250		
Total corrigé	7	808,8750			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL1/MES1	41,5000	A	
MEL0/MES0	22,7500		B

DNM

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	496,1250	496,1250	17,8516	0,0055
Erreur	6	166,7500	27,7917		
Total corrigé	7	662,8750			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL0/MES0	32,7500	A	
MEL1/MES1	17,0000		B

GR

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	595,1250	595,1250	51,9382	0,0004
Erreur	6	68,7500	11,4583		
Total corrigé	7	663,8750			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL1/MES1	17,2500	A	
MEL0/MES0	0,0000		B

TK

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	480,5000	480,5000	43,0299	0,0006
Erreur	6	67,0000	11,1667		
Total corrigé	7	547,5000			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL1/MES1	33,0000	A	
MEL0/MES0	17,5000		B

3-2-2-2- Variation de la teneur en PTs

Effet des traitements testés

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	2,0889	2,0889	5,8628	0,0277
Erreur	16	5,7007	0,3563		
Total corrigé	17	7,7896			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL1/MES1	8,3308	A	
MEL0/MES0	7,6494		B

Effet des cultivars étudiés

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	4,0565	2,0283	8,1499	0,0040
Erreur	15	3,7330	0,2489		
Total corrigé	17	7,7896			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
DNF	8,6014	A	
TK	7,9248		B
DNM	7,4441		B

Effet des traitements testés au niveau des cultivars étudiés

DNF

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	2,0091	2,0091	9,6745	0,0359
Erreur	4	0,8307	0,2077		
Total corrigé	5	2,8397			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL1/MES1	9,1801	A	
MEL0/MES0	8,0228		B

DNM

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	0,1024	0,1024	2,2879	0,2049
Erreur	4	0,1791	0,0448		
Total corrigé	5	0,2815			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes
MEL1/MES1	7,5748	A
MEL0/MES0	7,3135	A

TK

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	0,5865	0,5865	92,8759	0,0006
Erreur	4	0,0253	0,0063		
Total corrigé	5	0,6118			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL1/MES1	8,2374	A	
MEL0/MES0	7,6121		B

3-2-3- Induction et maturation sur milieux solides

3-2-3-1- Nombre d'embryons structurés obtenus sur milieux solides

Effet des traitements testés

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	569,5313	569,5313	9,5256	0,0043
Erreur	30	1793,6875	59,7896		
Total corrigé	31	2363,2188			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL0/MES0	13,5625	A	
MEL1/MES1	5,1250		B

Effet des cultivars étudiés

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	967,8438	322,6146	6,4737	0,0018
Erreur	28	1395,3750	49,8348		
Total corrigé	31	2363,2188			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
DNF	15,0000	A	
DNM	12,6250	A	
TK	9,2500	A	
GR	0,5000		B

Effet des traitements testés au niveau des cultivars étudiés

DNF

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	420,5000	420,5000	10,6232	0,0173
Erreur	6	237,5000	39,5833		
Total corrigé	7	658,0000			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL0/MES0	22,2500	A	
MEL1/MES1	7,7500		B

DNM

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	325,1250	325,1250	153,0000	< 0,0001
Erreur	6	12,7500	2,1250		
Total corrigé	7	337,8750			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL0/MES0	19,0000	A	
MEL1/MES1	6,2500		B

GR

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	2,0000	2,0000	2,0000	0,2070
Erreur	6	6,0000	1,0000		
Total corrigé	7	8,0000			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes
MEL1/MES1	1,0000	A
MEL0/MES0	0,0000	A

TK

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	220,5000	220,5000	7,7368	0,0319
Erreur	6	171,0000	28,5000		
Total corrigé	7	391,5000			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL0/MES0	16,0000	A	
MEL1/MES1	5,5000		B

2-2-3-2- Variation du nombre d'EMS obtenus sur milieux solides

Effet des traitements testés

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	5,5573	5,5573	5,0512	0,0391
Erreur	16	17,6032	1,1002		
Total corrigé	17	23,1606			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MES0	7,1742	A	
MES1	6,0629		B

Effet des cultivars étudiés

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	15,4671	7,7335	15,0781	0,0003
Erreur	15	7,6935	0,5129		
Total corrigé	17	23,1606			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes		
DNM	7,6667	A		
TK	6,7762		B	
DNF	5,4126			C

Effet des traitements testés au niveau des cultivars étudiés

DNF

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	0,0976	0,0976	14,6174	0,0187
Erreur	4	0,0267	0,0067		
Total corrigé	5	0,1243			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MES0	5,5402	A	
MES1	5,2850		B

DNM

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	5,2682	5,2682	1039,2936	< 0,0001
Erreur	4	0,0203	0,0051		
Total corrigé	5	5,2884			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MES0	8,6038	A	
MES1	6,7297		B

TK

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	2,1769	2,1769	83,8965	0,0008
Erreur	4	0,1038	0,0259		
Total corrigé	5	2,2807			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MES0	7,3785	A	
MES1	6,1738		B

3-2-4- Evolution des PEM vers l'état structuré en fonction du milieu de culture utilisé

3-2-4-1- Variation du nombre moyen d'EMS

Effet de l'origine

Analyse de la variance :

Source	DDL		Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2		4687,5833	2343,7917	24,5543	< 0,0001
Erreur	93		8877,1563	95,4533		
Total corrigé	95		13564,7396			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL/MES	22,7188	A	
MES	9,3438		B
MEL	6,7812		B

Effet des cultivars étudiés

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	8588,6146	780,7831	13,1801	< 0,0001
Erreur	84	4976,1250	59,2396		
Total corrigé	95	13564,7396			

Analyse Type III Sum of Squares:

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Origines	2	4687,5833	2343,7917	39,5646	< 0,0001
Cultivars	3	3473,9479	1157,9826	19,5474	< 0,0001
Origines*Cultivars	6	427,0833	71,1806	1,2016	0,3136

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):

Origines

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL/MES	22,7188	A	
MES	9,3438		B
MEL	6,7813		B

Cultivars

Modalité	Moyenne	Groupes		
DNF	19,7500	A		
DNM	15,3750	A	B	
TK	13,3333		B	
GR	3,3333			C

Effet des traitements testés

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	5	5938,9271	1187,7854	14,0183	< 0,0001
Erreur	90	7625,8125	84,7313		
Total corrigé	95	13564,7396			

Analyse Type III Sum of Squares:

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Origines	2	4687,5833	2343,7917	27,6615	< 0,0001
Traitements	1	21,0938	21,0938	0,2489	0,6190
Origines*Traitements	2	1230,2500	615,1250	7,2597	0,0012

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Origines

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL/MES	22,7188	A	
MES	9,3438		B
MEL	6,7813		B

Traitements

Origines * traitements

Modalité	Moyenne	Groupes			
Origines-MEL/MES*Traitements-1mg	27,1875	A			
Origines-MEL/MES*Traitements-0 mg	18,2500		B		
Origines-MES*Traitements-0 mg	13,5625		B	C	
Origines-MEL*Traitements-1mg	7,9375			C	D
Origines-MEL*Traitements-0 mg	5,6250				D
Origines-MES*Traitements-1mg	5,1250				D

Effet des traitements testés au niveau des cultivars

DNF

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	5	3184,5000	636,9000	21,6306	< 0,0001
Erreur	18	530,0000	29,4444		
Total corrigé	23	3714,5000			

Analyse Type III Sum of Squares:

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Origines	2	1870,7500	935,3750	31,7675	< 0,0001
Traitements	1	130,6667	130,6667	4,4377	0,0494
Origines*Traitements	2	1183,0833	591,5417	20,0901	< 0,0001

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):

Origines

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL/MES	32,1250	A	
MES	15,0000		B
MEL	12,1250		B

Traitements

Modalité	Moyenne	Groupes	
1mg	22,0833	A	
0 mg	17,4167		B

Origines * traitements

Modalité	Moyenne	Groupes		
Origines-MEL/MES*Traitements-1mg	41,5000	A		
Origines-MEL/MES*Traitements-0 mg	22,7500		B	
Origines-MES*Traitements-0 mg	22,2500		B	
Origines-MEL*Traitements-1mg	17,0000		B	
Origines-MES*Traitements-1mg	7,7500			C
Origines-MEL*Traitements-0 mg	7,2500			C

DNM

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	5	2158,3750	431,6750	21,0431	< 0,0001
Erreur	18	369,2500	20,5139		
Total corrigé	23	2527,6250			

Analyse Type III Sum of Squares:

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Origines	2	1147,0000	573,5000	27,9567	< 0,0001
Traitements	1	975,3750	975,3750	47,5471	< 0,0001
Origines*Traitements	2	36,0000	18,0000	0,8775	0,4329

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):

Origines

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL/MES	24,8750	A	
MES	12,6250		B
MEL	8,6250		B

Traitements

Modalité	Moyenne	Groupes	
0 mg	21,7500	A	
1mg	9,0000		B

GR

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	5	939,8333	187,9667	42,5585	< 0,0001
Erreur	18	79,5000	4,4167		
Total corrigé	23	1019,3333			

Analyse Type III Sum of Squares:

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Origines	2	336,5833	168,2917	38,1038	< 0,0001
Traitements	1	266,6667	266,6667	60,3774	< 0,0001
Origines*Traitements	2	336,5833	168,2917	38,1038	< 0,0001

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):

Origines

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL/MES	8,6250	A	
MEL	0,8750		B
MES	0,5000		B

Traitements

Modalité	Moyenne	Groupes	
1mg	6,6667	A	
0 mg	0,0000		B

Origines * traitements

Modalité	Moyenne	Groupes	
Origines-MEL/MES*Traitements-1mg	17,2500	A	
Origines-MEL*Traitements-1mg	1,7500		B
Origines-MES*Traitements-1mg	1,0000		B
Origines-MEL/MES*Traitements-0 mg	0,0000		B
Origines-MES*Traitements-0 mg	0,0000		B
Origines-MEL*Traitements-0 mg	0,0000		B

TK

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	5	2465,8333	493,1667	24,4209	< 0,0001
Erreur	18	363,5000	20,1944		
Total corrigé	23	2829,3333			

Analyse Type III Sum of Squares:

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Origines	2	1760,3333	880,1667	43,5846	< 0,0001
Traitements	1	160,1667	160,1667	7,9312	0,0114
Origines*Traitements	2	545,3333	272,6667	13,5021	0,0003

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Origines

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL/MES	25,2500	A	
MES	9,2500		B
MEL	5,5000		B

Traitements

Modalité	Moyenne	Groupes	
1mg	15,9167	A	
0 mg	10,7500		B

Origines * traitements

Modalité	Moyenne	Groupes			
Origines-MEL/MES*Traitements-1mg	33,0000	A			
Origines-MEL/MES*Traitements-0 mg	17,5000		B		
Origines-MES*Traitements-0 mg	13,0000		B	C	
Origines-MEL*Traitements-1mg	9,2500			C	D
Origines-MES*Traitements-1mg	5,5000				D
Origines-MEL*Traitements-0 mg	1,7500				E

3-2-4-2- Variation de la teneur moyenne en PTs

Effet de l'origine

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	16,9315	16,9315	18,6000	0,0001
Erreur	34	30,9501	0,9103		
Total corrigé	35	47,8817			

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL/MES	7,9901	A	
MES	6,6185		B

Effet des traitements testés

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	24,5778	8,1926	11,2497	< 0,0001
Erreur	32	23,3039	0,7282		
Total corrigé	35	47,8817			

Analyse Type III Sum of Squares:

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Origines	1	16,9315	16,9315	23,2497	< 0,0001
Traitements	1	0,4160	0,4160	0,5712	0,4553
Origines*Traitements	1	7,2302	7,2302	9,9283	0,0035

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Origines

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL/MES	7,9901	A	
MES	6,6185		B

Traitements

Modalité	Moyenne	Groupes
0 mg	7,4118	A
1 mg	7,1968	A

Origines * traitements

Modalité	Moyenne	Groupes		
Origines-MEL/MES*Traitements-1 mg	8,3308	A		
Origines-MEL/MES*Traitements-0 mg	7,6494	A	B	
Origines-MES*Traitements-0 mg	7,1742		B	
Origines-MES*Traitements-1 mg	6,0629			C

Effet des cultivars étudiés

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	5	36,4551	7,2910	19,1423	< 0,0001
Erreur	30	11,4265	0,3809		
Total corrigé	35	47,8817			

Analyse Type III Sum of Squares:

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Origines	1	16,9315	16,9315	44,4532	< 0,0001
Cultivars	2	1,8429	0,9214	2,4192	0,1062
Origines*Cultivars	2	17,6807	8,8403	23,2100	< 0,0001

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Origines

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL/MES	7,9901	A	
MES	6,6185		B

Cultivars

Modalité	Moyenne	Groupes	
DNM	7,5554	A	
TK	7,3505	A	B
DNF	7,0070		B

Origines * Cultivars

Modalité	Moyenne	Groupes			
Origines-MEL/MES*Cultivars-DNF	8,6014	A			
Origines-MEL/MES*Cultivars-TK	7,9248	A	B		
Origines-MES*Cultivars-DNM	7,6667		B		
Origines-MEL/MES*Cultivars-DNM	7,4441		B	C	
Origines-MES*Cultivars-TK	6,7762			C	
Origines-MES*Cultivars-DNF	5,4126				D

Effet des traitements testés au niveau des cultivars

DNF

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	32,6125	10,8708	101,4340	< 0,0001
Erreur	8	0,8574	0,1072		
Total corrigé	11	33,4699			

Analyse Type III Sum of Squares:

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Origines	1	30,5058	30,5058	284,6451	< 0,0001
Traitements	1	0,6105	0,6105	5,6963	0,0441
Origines*Traitements	1	1,4962	1,4962	13,9607	0,0057

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Origines

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL/MES	8,6014	A	
MES	5,4126		B

Traitements

Modalité	Moyenne	Groupes	
1 mg	7,2326	A	
0 mg	6,7815		B

Origines * traitements

Modalité	Moyenne	Groupes		
Origines-MEL/MES*Traitements-1 mg	9,1801	A		
Origines-MEL/MES*Traitements-0 mg	8,0228		B	
Origines-MES*Traitements-0 mg	5,5402			C
Origines-MES*Traitements-1 mg	5,2850			C

DNM

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	5,5193	1,8398	73,8230	< 0,0001
Erreur	8	0,1994	0,0249		
Total corrigé	11	5,7186			

Analyse Type III Sum of Squares:

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Origines	1	0,1487	0,1487	5,9656	0,0404
Traitements	1	1,9507	1,9507	78,2740	< 0,0001
Origines*Traitements	1	3,4199	3,4199	137,2293	< 0,0001

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Fischer-LSD):

Origines

Modalité	Moyenne	Groupes	
MES	7,6667	A	
MEL/MES	7,4441		B

Traitements

Modalité	Moyenne	Groupes	
0 mg	7,9586	A	
1 mg	7,1522		B

Origines * traitements

Modalité	Moyenne	Groupes		
Origines-MES*Traitements-0 mg	8,6038	A		
Origines-MEL/MES*Traitements-1 mg	7,5748		B	
Origines-MEL/MES*Traitements-0 mg	7,3135		B	
Origines-MES*Traitements-1 mg	6,7297			C

TK

Analyse de la variance :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	6,7212	2,2404	138,8826	< 0,0001
Erreur	8	0,1291	0,0161		
Total corrigé	11	6,8503			

Analyse Type III Sum of Squares:

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Origines	1	3,9577	3,9577	245,3395	< 0,0001
Traitements	1	0,2518	0,2518	15,6065	0,0042
Origines*Traitements	1	2,5117	2,5117	155,7017	< 0,0001

Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Ficher-LSD):
Origines

Modalité	Moyenne	Groupes	
MEL/MES	7,9248	A	
MES	6,7762		B

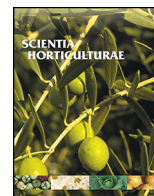
Traitements

Modalité	Moyenne	Groupes	
0 mg	7,4953	A	
1 mg	7,2056		B

Origines * traitements

Modalité	Moyenne	Groupes		
Origines-MEL/MES*Traitements-1 mg	8,2374	A		
Origines-MEL/MES*Traitements-0 mg	7,6121		B	
Origines-MES*Traitements-0 mg	7,3785		B	
Origines-MES*Traitements-1 mg	6,1738			C

ARTICLE



Effects of growth regulators and types of culture media on somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. Degla Beida)



Nazim Boufis^{a,b}, Majda Khelifi-Slaoui^a, Zakia Djillali^a, Djamila Zaoui^a,
Abdelkader Morsli^a, Mark A. Bernards^c, Abdullah Makhzum^c, Lakhdar Khelifi^{a,*}

^a Laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologies, ENSA, Algiers, Algeria

^b Division Biotechnologies et Amélioration des Plantes, INRAA, Algiers, Algeria

^c Department of Biology, The University of Western Ontario, London, ON, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 October 2013

Received in revised form 6 April 2014

Accepted 7 April 2014

Keywords:

Phoenix dactylifera L.

Date palm

Growth regulators

Somatic embryogenesis

ABSTRACT

In the present study, we aim to develop a complete production scheme for the propagation of Algerian date palm *Phoenix dactylifera* L. (cv. Degla Beida) by somatic embryogenesis. The scheme consists of four main steps: induction of callus, multiplication of nodules on solid and liquid media, initiation of somatic embryogenesis in agitated liquid medium and maturation and germination of proembryos on solid media. Our results showed that hormonal treatments (10 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP) and (50 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP) combined with 300 and 1500 mg/L of activated charcoal, respectively, promoted initiation and multiplication of nodular calli on solid media. The best multiplication factor (9.75) was obtained from these calli when they were further cultivated in liquid medium containing 1 mg/L 2,4-D. Moreover, liquid medium without growth regulators promoted the development of relatively homogeneous embryogenic suspensions. The return to solid medium without growth regulators during the maturation phase improved the yield of somatic embryos and their subsequent germination.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) is a perennial monocotyledonous species adapted to the local conditions of arid and semiarid areas. Date palm cultivation in Algeria is exclusively done for the harvest of date fruit, and is considered to be a highly important socioeconomic and ecological activity. However, the Algerian phoenicol heritage (characterized by a wide diversity of varieties) is subject to many threats, the most ominous one being Bayoud disease, caused by a telluric fungus, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* W.L. Gordon. Appearing in Algeria in 1898, this disease has already destroyed more than three million palm trees in south-western Algeria and continues to progress toward healthy palm groves of the southeast region of the country (Benkhalifa, 2006). This situation is compounded by genetic erosion caused by the extension of monovarietal cultivation imposed by market demand for high quality commercial varieties like Deglet Nour, which is unfortunately

sensitive to Bayoud (Açourene et al., 2007). Current measures for controlling Bayoud disease rely exclusively on preventive measures since no effective curative control method has been developed yet. Given this fact, genetic control is the best option to slow down and to stop the spreading of the Bayoud's agent from infected areas to non-infected ones (Zaid and Arias-Jimenez, 2002; El Hadrami et al., 2005; Sedra, 2005; Benkhalifa, 2006). The use of *in vitro* culture techniques can play a crucial role in Bayoud control. Indeed, *in vitro* plant regeneration via somatic embryogenesis is a powerful tool for a rapid large-scale production of healthy true-to-type clonal plants thus allowing the preserving of existing natural variability but also the micropropagation of variability outcome of genetic improvement programs (crossing, somaclonal variation, mutagenesis and somatic hybridization) (Jain et al., 2011). However, the date palm remains a recalcitrant species to *in vitro* techniques because of the influence of genotype factors that affect the responsiveness of explants in culture and the frequency of maturation and germination of embryos, thus hindering the establishment of simple, reliable, and reproducible protocols (Zaid and Arias-Jimenez, 2002; Jain et al., 2011).

The present study was carried out to optimize somatic embryo production from Algerian date palm cultivar "Degla Beida", which is sensitive to Bayoud but produces dried dates of good

Abbreviations: 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; BAP, 6-benzylaminopurine.

* Corresponding author.

E-mail address: khelifi.lakhdar@gmail.com (L. Khelifi).

nutritional and commercial value (Açourene et al., 2007; Mimouni and Siboubakeur, 2011). The approach adopted consists of making changes to the growing medium composition during the different steps of *in vitro* plant production.

2. Materials and methods

2.1. Initiation of callogenesis

The source of starting plant material was an offshoot of *P. dactylifera* L. cv. Degla Beïda. The offshoot, weighing 6 kg, was harvested from a palm grove of El Méniaa (north central region of Algerian Sahara). Only the apical part of the offshoot core was used to randomly collect explants of 0.5 cm³. This part include the apical meristem, the leaf primordia, axillary buds and the base of young leaves. The explants were disinfected with a solution of HgCl₂ (150 mg/L for one hour), rinsed 3 times with sterile distilled water and placed on the initiation solid medium (M) (Fig. 1). The growth regulators (mg/mL) were added in combined form: 2,4-D/BAP. Seven growth regulator combinations were applied: 0/0, 1/1, 5/1, 10/1, 50/1, 100/1 and 5/5. For each mg of 2,4-D, 30 mg of activated charcoal was added to the culture medium (Table 1). Each treatment done using in 12 replicates of explants. The cultures were incubated for 2 months at 25 °C in total darkness.

2.2. Calli maintenance and multiplication

Two media were tested for calli multiplication:

Solid medium “M”: This medium is identical to the callogenesis initiation medium (Table 1). The explants of the previous step with or without callogenesis, were subcultured on fresh media every two months. The cultures were submitted to the same growing and environmental conditions of the callogenesis initiation phase. Observations were carried out over a period of 20 months (10 sub-culture periods) (Fig. 1).

Liquid medium “MM”: After ten months of culture on the solid medium, liquid medium (MM) was used to multiply the mass of nodular calli (Table 1). During this step, only growth regulator combinations that resulted in callus on solid medium (M) (2,4-D/BAP: 5/1, 10/1, 50/1, 100/1 (mg/L)) and intense nodular callogenesis were selected. In addition, a new growth regulator combination (1/0) was introduced (Table 1). Nodular callus weighing 0.5 g were slightly fragmented and placed into 650 mL rectangular flasks Corning® Costar® each containing 150 mL of liquid medium MM. Four flasks/treatment were used. The medium was renewed every month. The liquid medium cultures were incubated on a rotary shaker (100 rpm) at 25 ± 2 °C under a 16 h, fluorescent light, 2000 Lx/8 h dark. For a more intense multiplication, callus produced on the medium MM were re-transferred again to the solid culture medium (M) at the end of the second month of culture in MM (Fig. 1).

2.3. Induction of embryogenesis, maturation and germination of somatic embryos

For the induction of embryogenesis and proembryo maturation, somatic embryogenesis was induced in liquid medium (ME) devoid of growth regulators and with a half mineral fraction (Table 1). The suspension preparation step consists of slight fragmentation and crushing with a scalpel 0.4 g of nodular callus in the presence of 150 mL of liquid medium followed by filtration through a sieve of 500 µm mesh size. Cell suspensions thus obtained into 500 mL Erlenmeyer flasks (3 suspensions) were placed on a rotary shaker (100 rpm). After decanting the cell suspension, the liquid culture medium was renewed every month. At this stage, the formation of somatic proembryos was accomplished through one of two ways: directly in the liquid medium, or after plating out the fraction of cells from suspension cultures that did not yield structured somatic embryos on a new solid (MG₁) or semi-solid (MG₂) medium (150 mL per 500 mL Erlenmeyer flask) to allow maturation (Table 1).

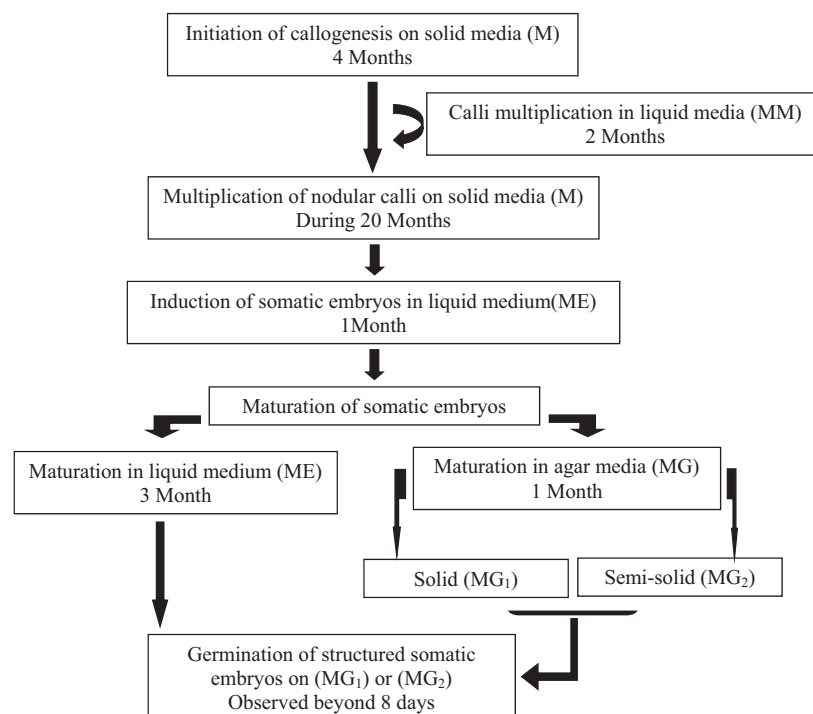


Fig. 1. Schematic representation of the experimental protocol.

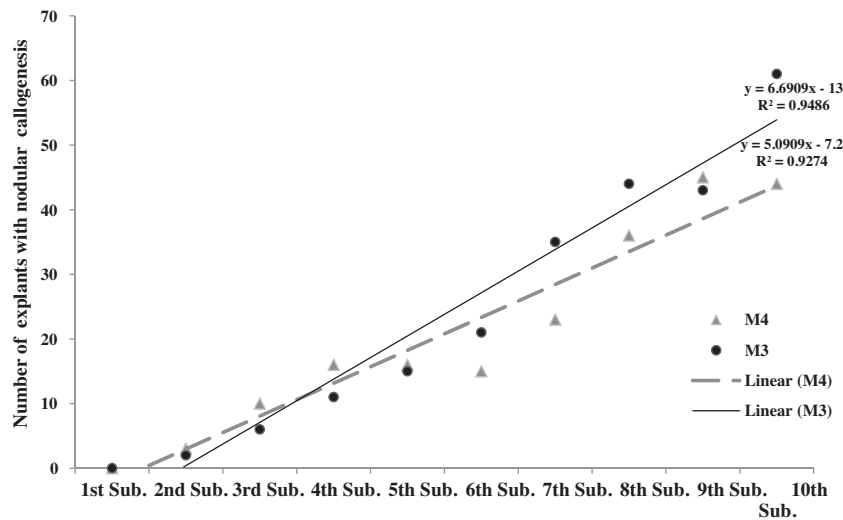


Fig. 2. Linear regression trend lines for the best nodular callus formation during the 20 performed subcultures noted on solid media M_3 (10 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP) and M_4 (50 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP). The plot shows that the difference between the two treatments was significant after the 5th subculture (10 months).

For the germination and development of somatic embryos, structured somatic embryos obtained directly from cell suspensions were germinated on one of the two agar media MG_1 and MG_2 , while those derived through maturation in agar media were isolated and transferred to the same media for germination (Fig. 1). Somatic embryos obtained (all origins) were placed in test tubes containing 20 mL of agar media (Table 1) renewed every 15 days. The induction of embryogenesis, maturation and germination of somatic embryos were finalized at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under 16 h, fluorescent light, 2000 Lx/8 h dark.

3. Results

3.1. Initiation of callogenesis

The reactivity of explants was manifested from the 10th day of culture and resulted in a total or partial swelling of explants.

Starting from the 20th day, whitish structures on the reactive explants were observed, indicating the initiation of cell dedifferentiation that subsequently developed into callus.

Induced callogenesis was manifested in the form of hyperhydric, compact or friable (Plate 1-A). The response time of explants and callogenesis intensity differ depending on the growth regulator treatments applied. Indeed, the treatments M_0 (0 mg/L 2,4-D, 0 mg/L BAP), M_1 (1 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP), M_2 (5 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP) and M_6 (5 mg/L 2,4-D, 5 mg/L BAP) were the first to induce a primary callogenesis. These treatments generated $(37.5\% \pm 18.29)$, $(69.23\% \pm 13.32)$, $(54.54\% \pm 15.74)$ and $(58.33\% \pm 14.86)$ callogenesis, respectively, at the end of the first two months of culture. The lowest rates were noted at the level of the treatments M_5 (100 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP), M_3 (10 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP) and M_4 (50 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP) with respectively $33.33\% \pm 14.08$, $(27.27\% \pm 13.05)$ and $(25\% \pm 14.21)$ of induced callogenesis.

Table 1
Culture media used for each stage of culture of *Phoenix dactylifera* L. cv. Degla Beïda *in vitro*.

Composition of culture medium	Solid medium (M)	Liquid medium (MM)	Liquid medium (ME)	Solid medium (MG_1)	Semi-solid medium (MG_2)
Macroelements MS ¹	×1	×1/2	×1/2	×1/2	×1/2
Microelements MS	×1	×1/2	×1/2	×1/2	×1/2
Fe-EDTA MS	×1	×1/2	×1/2	×1/2	×1/2
Vitamins MS	×1	×1	×1	×1	×1
Mineral additives					
• NH_4NO_3 (350 mg/L)	×1	×1/2	×1/2	×1/2	×1/2
• NaH_2PO_4 (170 mg/L)					
• K_2PO_4 (100 mg/L)					
Organic additives					
• Myo-inositol (100 mg/L)	×1	×1	×1	×1	×1
• L-Glutamine (100 mg/L)					
• Adenine (40 mg/L)					
Diverse					
• Sucrose (g/L)	45	30	30	30	30
• Agar	7	0	0	7	3.5
(Sigma–Aldrich®) (g/L)					
• Activated charcoal	30 mg/L	300	300	300	300
Growth regulators (mg/L)	0/0, 1/1, 5/1,	5/1, 10/1, 50/1,	0/0	0/0	0/0
2,4 D/BAP	10/1, 50/1, 100/1 and 5/5	100/1, 1/0			

¹ MS: Murashige and Skoog culture medium (based on Murashige and Skoog, 1962); 2,4 D, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid; BAP, 6-benzylaminopurine.



Plate 1. Illustration of the different somatic embryogenesis phases in Degla Beida, from primary callus to *in vitro* plantlets. (A) Primary calli (compact calli) after 8 weeks on medium "M". (B) Nodular calli, after 16 weeks on medium "M". (C) Secondary calli derived from primary calli after 40 weeks on medium "M". (D) General appearance of suspensions after three months of culture in liquid medium "ME". (E) Development of embryos on solid medium, after 4 weeks on solid medium "MG₁". (F) Cluster of proembryos isolated from solid media. (G) Structured somatic embryos after maturation on solid media. (H) Development of somatic embryos into *in vitro* plants. A, B and -C: 8×; D: 1/2×; E: 1×; F: 2×; G: 1×; H: 1/2×.

3.2. Nodular callogenesis on solid media

Resulting from the development of more or less compact primary callogenesis, the nodular callogenesis was observed from the 4th month (2nd subculture) and continued throughout the subsequent 18 months (Plate 1-B and C). In this phase of culture, the estimation of the hormonal balances effect on the evolution of

nodular callogenesis was based on the number of explants showing a nodular callogenesis during the 10 carried subcultures (20 months).

All the growth regulator combinations tested except the experimental control without growth regulator induced a nodular callogenesis. The time required for initiation and the intensity of subsequent nodular callogenesis development depends on the

Table 2
Callus characteristics after transferring from liquid media (MM) onto the solid medium (M).

Solid media (M)	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Growth regulators (mg/l)	1/0	5/1	10/1	50/1	100/1
2,4 D/BAP					
Browning intensity ¹	++	+	+	+	+
Nodular callogenesis intensity ²	+++	+++	+++	++	+

¹ : +Browning of callus, ++ Browning callus and media.

² : +presence of at least one nodule, ++nodules cover at least half of the callus, +++ nodules cover the entire callus volume.

applied treatments. The appearance of the first nodules was recorded at low concentrations of 2,4-D, but at the end of 20th month of culture the largest numbers of nodular callus (61 and 44 nodular calli) were noted at the treatment levels M₃ (10 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP) and M₄ (50 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP) where a linear increase has been observed in the formation of nodular calli through progressive subcultures (Fig. 2).

3.3. Nodular callogenesis in liquid media

The use of rectangular cell culture flasks was used to observe the behavior of nodular callus in agitated liquid media during the 2 months of culture. A latency period of 9 days was observed. Thereafter, a rapid increase or regression of calli volume was recorded with the appearance of signs of hyperhydricity. The mean multiplication factor obtained based on the weight gain of nodular calli in liquid medium for all treatments at the end of the 2nd month of culture was 3.57. The best multiplication factor (9.75) was obtained with the treatment MM₁ (1 mg/L 2,4-D, 0 mg/L BAP). For MM₂ treatment (5 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP), MM₃ (10 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP), MM₄ (50 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP) and MM₅ (100 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP), the multiplication factors were lower: 1.04, 2.22, 2.70 and 2.15, respectively, after two months of culture (Fig. 3).

After retransferring back to solid medium, all callus derived from liquid medium showed a latency period of 3–4 weeks during which a slight browning of the culture media was observed. Under these new conditions, nodulation resumes after the 4th month, wherein the development of new nodules was faster on media containing the lowest 2,4-D concentrations. Three treatments have shown a good recovery of nodulation with low browning intensity: M₁, M₂ and M₃ (Table 2).

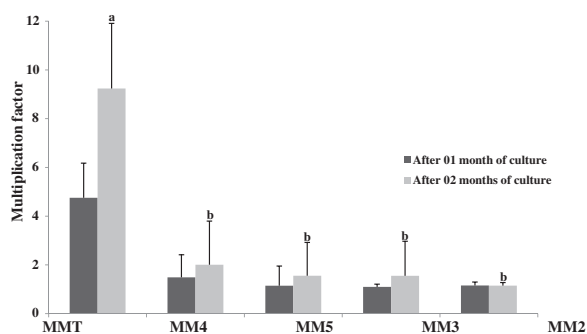


Fig. 3. Multiplication of nodular callus in liquid media (Fc = 4.31; n = 4 replicates; p = 0.016; *). The ANOVA test was performed at the end of two months of culture, and was completed by the least significant difference (LSD) at p ≤ 0.05. Fc = Calculated F-ratio; n = level of replication; p = calculated p-value; *significant effect of the callogenesis multiplication liquid media. Letters on the histograms indicate homogenous groups and vertical bars represent standard error.

3.4. Initiation of somatic embryogenesis

For carrying out this step, the starting material was selected at the level of the treatments with the highest number of viable nodular callus at the 10th month (4th subculture), i.e. strains of reactive nodular callus more or less friable, white or beige (exhibiting no browning). In our culture conditions, the average number of somatic embryos produced per gram of fresh nodular calli was 122 ± 14.24.

The use of a liquid medium without growth regulator (ME) under agitation has resulted in the observation of a latency period of 7–10 days after the establishment of suspensions. Thereafter and during the 2nd month of culture the appearance of the different stages of somatic embryogenesis has noted (nodular stage, globular stage, post-globular stage = spherical shapes slightly flattened). During this subculture the appearance of the secondary somatic embryogenesis has manifested itself through the neoformation of new small embryogenic nodules accompanying the various stages of proembryos. These nodules develop separately thereafter into structured somatic embryos (Plate 1–D). The development of suspensions continued until the formation of perfectly structured embryos of approximately 6–7 mm of an elongated shape that is slightly curved on one side and pointed on the other. All structured somatic embryos at the end of 3 months of culture have showed signs of hyperhydricity.

3.5. Maturation of proembryos

The proembryos that had not developed completely into structured embryos (an average of 101.2 g/g of introduced nodular calli) were again plated out on agar culture media.

At the end of one month in these new conditions, a large number of structured somatic embryos with slight signs of hyperhydricity have invaded the total area of the solid media (Plate 1–E–G). The reactivity of proembryos and average number of structured somatic embryos differs depending on the maturation medium. Indeed, on solid maturation medium MG₁, the reactivity of plated proembryos was visible from the 3rd day of culture leading to an average of 1300 ± 450.33 structured somatic embryos per gram of nodular calli, whereas on semi-solid medium MG₂, the reactivity was visible only from the 15th day and leading to an average of 727 ± 371.18 structured somatic embryos per gram of nodular calli.

3.6. Germination of somatic embryo structures

The germination of structured somatic embryos was detected from the 1st week of culture. It was manifested by the emergence of the aerial part (cotyledonary leaf) followed by the appearance of a radicle that will develop later into the taproot system.

The two agar media used during this phase led to the germination of a number of structured somatic embryos and promoted their

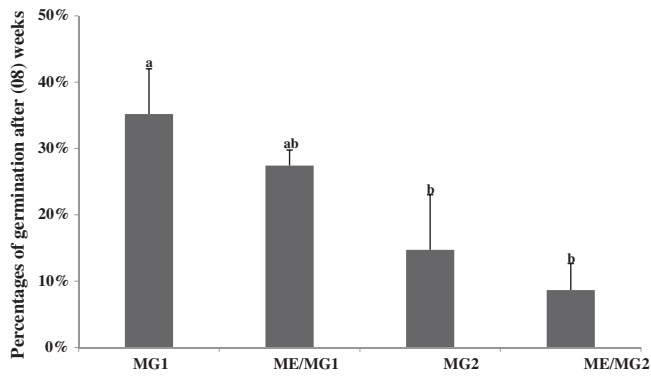


Fig. 4. Germination percentage obtained as a function of the maturation medium ($F_c = 4.22$; $n = 3$ replicates; $p = 0.046$; *). The ANOVA test is completed by the least significant difference (LSD) at $p \leq 0.05$. F_c = Calculated F-ratio; n = level of replication; p = calculated p -value; *significant effect of the maturation culture media. Letters on the histograms indicate homogenous groups and vertical bars represent standard error.

development into vigorous plantlets (Plate 1-H). The differences were observed depending on the origin of maturation medium of structured somatic embryos (maturation medium/germination medium).

At the end of eight weeks of observations, the highest rate of germination is to $35.2\% \pm 6.82$. It was recorded with embryos derived from the maturation on solid medium and placed for germination on the same medium (MG_1/MG_1) followed by embryos from the maturation in liquid medium and placed for germination on the solid medium (ME/MG_1) with a rate of $27.43\% \pm 2.34$. The lowest germination rates were observed with embryos derived from the maturation on semi-solid medium for germination and put on the same medium (MG_2/MG_2) and embryos derived from maturation in liquid medium and placed for the germination on the semi-solid medium (ME/MG_2) with germination rates of $14.72\% \pm 8.31$ and $8.66\% \pm 4$ respectively (Fig. 4).

4. Discussion

The appearance of the first calli occurred after the 20th day. The primary calli were of different kinds: hyperhydric, compact or friable. This corroborates the observations made by many authors (Tisserat, 1979; Sharma et al., 1980; Mater, 1986; Chabane, 1995; Zaid and Tisserat, 1983; Veramendi and Navarro, 1997; Eke et al., 2005). The existence of endogenous auxins at low doses is the reason for the fast callogenesis induction (Mujib and Samaj, 2005; Zouine et al., 2005). Similar results have been reported in other studies. For example, El Hadrami et al. (1995) obtained high levels of callogenesis in the presence of 5 mg/L 2,4-D. By contrast, Sané et al. (2006) and Chabane (2007) and Chabane et al. (2007) obtained callogenesis in presence of only 2 mg/L 2,4-D. Similarly, Fki et al. (2003) were able to initiate good callogenesis in the presence of even lower doses of 2,4-D (less than 0.5 mg/L).

Nodular callogenesis was developed on more or less compact primary calli. It appears in the 4th month of culture and continues beyond 20 months. These results are consistent with those obtained by other studies (Tisserat, 1979; Sharma et al., 1980; Tisserat, 1982; Zaid and Tisserat, 1983; Mater, 1986; Chabane, 1995; Veramendi and Navarro, 1997; Eke et al., 2005). All the hormonal balances tested except the experimental control without growth regulator induced a nodular callogenesis. However, the time required for initiation and the intensity of subsequent nodular callogenesis development differed from one treatment to another. The appearance of the first nodules was observed at low concentrations of 2,4-D, but at the end of 20 months the largest numbers of nodular callus were noted at the treatment levels (10 mg/L 2,4-D, 1 mg/L

BAP) and (50 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP). Indeed, according to Jiménez (2005) and Zouine et al. (2005), obtaining good nodular callogenesis requires auxinic pressure in order to maintain a high intra cellular concentration in endogenous auxin. Thus, the combination of high doses of 2,4-D (10, 50 mg/L) with high doses of activated charcoal (300, 1500 mg/L) has been suitable for the conversion of primary callus into nodular callus. Many authors have reached similar conclusions (Tisserat, 1979; Sharma et al., 1980; Tisserat, 1982; Zaid and Tisserat, 1983; Mater, 1986; Chabane, 1995; Veramendi and Navarro, 1997; Gueye et al., 2009a,b).

Agitation of liquid medium has allowed a faster multiplication of nodular calli previously obtained on solid media. In fact, one of the major interests of the culture in liquid medium was the ease of nutrient assimilation, therefore ensuring an optimal growth of the cells placed in culture (Margara, 1989; Augé et al., 1989; Hvoslef-Eide and Preil, 2005; Othmani et al., 2009; Jain et al., 2011). During this step, the best multiplication factor was obtained after two months of culture with the treatment (1 mg/L 2,4-D, 0 mg/L BAP) recommended for the cultivar Deglet Nour by Fki (1998 and 2003).

After retransferring back to solid medium, nodulation has resumed after the fourth month, wherein the development of new nodules was faster on media containing the lowest 2,4-D concentrations. The alternation of liquid and solid culture media helps to maintain a good level of nodular callus development, preferentially in the presence of low auxin concentrations (Fki, 1998; Mujib and Samaj, 2005; Othmani et al., 2009).

The initiation of somatic embryogenesis was achieved after the transfer of nodular calli (more or less friable before being hand chopped and filtered on a sieve of 500 μm mesh) into liquid medium with agitation. This result has supported those obtained by several authors (Veramendi and Navarro, 1996; Fki et al., 2003; Zouine and El Hadrami, 2004; Sané et al., 2006; Saker et al., 2007; Zouine and El Hadrami, 2007). Moreover, Tisserat (1979), Tisserat (1982), Bekheet et al. (2001), Mujib and Samaj (2005), Hvoslef-Eide and Preil (2005) and Jiménez (2005) consider that the initiation of somatic embryogenesis is a result of the reaction of calli in suspension to auxinic and nutritional stress exerted by the liquid medium. Our results have supported this hypothesis in so far as the best expression of embryogenic potential of calli obtained have been observed in growth regulator free liquid medium and those that had the mineral fraction reduced by half. Also, according to Othmani et al. (2009) the hashing and filtering of calli have allowed the physical separation of fragments, and broke links or existing physiological and biochemical interactions between cells, inducing *de novo* biosynthesis of molecules and thus ensuring the completion of the somatic embryogenesis cycle: maturation followed by the germination.

During the agitated liquid medium treatment the following somatic embryo developmental stages were observed: nodular stage, globular stage, post-globular stage and structured somatic embryo stage. These date palm (monocotyledonous species) characteristic stages have previously been described by Fki et al. (2003), Sané et al. (2006) and Sghaier et al. (2008). Our results have shown that the callus fragments (diameter less than or equal to 500 μm) placed in suspension have developed as follows: For the first seven to ten days after the establishment of the suspensions, no change in morphology could be detected. This stage corresponds to the latency phase of the date palm proembryos growth curve in agitated liquid medium described by Al-Khayri (2012). The appearance of the secondary somatic embryogenesis, manifested by the neoformation of new small embryogenic nodules accompanying the various stages of proembryos development. These nodules developed separately thereafter into structured somatic embryos. This phenomenon is promoted by the agitated liquid medium (Veramendi and Navarro, 1996; Hvoslef-Eide and Preil, 2005; Sané et al., 2006).

Generally, even if the use of agitated liquid medium was advantageous, the emergence and development of embryos in cell suspensions was not synchronized, which is to say that from the second month all stages of somatic embryogenesis were simultaneously present in the same suspension. This lack of synchronization is amplified by the phenomenon of secondary embryogenesis. However, this asynchronization can be solved by the regular filtration during the renewal of culture medium (Veramendi and Navarro, 1997; Hvoslef-Eide and Preil, 2005).

After three months of culture, the proembryos that had not developed completely into structured embryos in a liquid medium were plated out on agar culture media. At the end of one month in these new conditions, a large number of structured somatic embryos were present throughout the total area of the agar medium.

These results have confirmed those of Hvoslef-Eide and Preil (2005) who have shown that returning proembryos obtained in liquid medium onto agar medium have helped to complete their maturation. Our results also confirm those of Taha et al. (2001) who have shown that the reduction of the mineral fraction of the culture medium by half and the use of agar promotes embryogenesis and maturation of somatic embryos. For our cultivar Degla Beïda the solid medium was more efficient than the liquid and semi-solid medium.

All embryos (all origins) have showed signs of hyperhydricity. This phenomenon is inherent in the use of liquid medium and is due to culture conditions of low light, lack of ventilation, deficiency or imbalance of the mineral composition of the medium (Hvoslef-Eide and Preil, 2005).

The embryos that had completed their maturation and germination on solid medium have presented the highest germination percentage. It appears from this result that the transfer of cell suspensions to agar medium during the maturation phase has promoted reactivity and germination of the structured embryos obtained, as well as their subsequent development. Indeed, the alteration between liquid and solid media is an efficient way to optimize the maturation of somatic embryos and to reduce the negative impact of hyperhydricity on the germination and subsequent development of plantlets (Veramendi and Navarro, 1997; Hvoslef-Eide and Preil, 2005; Jain et al., 2011). Hyperhydricity could be further circumvented by dehydration of the embryos. For example, Fki et al. (2003) partially desiccated their embryos to reduce the level of hydration in structured embryos derived from liquid medium. According to the same authors, a 75–90% decrease in the water content of the embryos would raise the germination rate from 25 to 90%.

Similarly, Al-Khateeb (2006) suggests that improved the germination rates could be obtained by the incorporation to the culture media of osmotic agents such as polyethylene glycol. During the initiation and development of somatic embryogenesis, hyperhydration is a restraining factor for the viability of somatic embryos, which can be explained by a lack of desiccation but also by a low endogenous rate of ABA (abscisic acid). This growth regulator plays an important role as it promotes the accumulation and storage of sugars, proteins and lipids during embryogenesis, thus significantly improving the germination of somatic embryos and their development into vigorous *in vitro* plants (Jiménez, 2005; Zouine et al., 2005; Sghaier et al., 2009; Sghaier-Hammami et al., 2010; Rai et al., 2011).

5. Conclusions

This study led to the proposal of a scheme for somatic embryo production of the Algerian date palm cultivar Degla Beïda based on variation of the applied growth regulators and alternating culture

media nature (solid–liquid–solid) during the somatic embryogenesis process.

Our experimental conditions permitted reducing the average time to obtain structured somatic embryos to 10 months, and five months for nodular callus induction. The precocious selection of calli based on their responsiveness speed and the intensity of the induced primary callogenesis during the first two months of culture might substantially reduce the required time for embryo formation even further. The use of liquid media theoretically allows the initiation of an undefined number of proembryos. Transferring proembryos to solid agar media for maturation enhances the yield of structured somatic embryos, germination rate and subsequent development into vigorous *in vitro* plants.

More genomic studies have been conducted on *Phoenix dactylifera* L. such as the complete chloroplast genome sequence (Yang et al., 2010), the complete sequence and transcriptomic analyses of the mitochondrial genome (Fang et al., 2012), the identification of small subset of polymorphisms that could distinguish multiple cultivars and a region of the genome linked to gender (XY system of gender inheritance) (Al-Dous et al., 2011). Recently, Al-Mssallem et al. (2013) published the sequence of the genome, as well as a genomic study of stress resistance (LEA family) and sugar metabolism-related genes. These new genetic tools will help in the selection of genes for analysis and incorporation into new cultivars for crop improvement. Our somatic embryogenesis system could also be used for transgenic or mutagenesis (EMS) programs, and in combination with the available genomic data, to target some specific genes involved in immune system and its response to *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* to obtain new and more resistant cultivars.

The results of this study could contribute to the implementation of simple and reliable protocol of improved regeneration reproducibility, *via* somatic embryogenesis, of the Algerian date palm, thereby responding to the need for diversity preservation and providing a key tool for biotechnology breeding programs and the sustainability of induced genetic variability.

References

- Açourene, S., Allam, A., Taleb, B., Tama, M., 2007. Inventory of the different date palm (*Phoenix dactylifera*) cultivars in the regions of Oued-Righ and Oued-Souf (Algeria). *Science et changements planétaires/Sécheresse* 18, 135–142.
- Al-Dous, E.K., George, B., Al-Mahmoud, M.E., Al-Jaber, M.Y., Wang, H., Salameh, Y.M., Al-Azwani, E.K., Chaluvadi, S., Pontaroli, A.C., DeBarry, J., Arondel, V., Ohlrogge, J., Saie, I.J., Suliman-Elmeier, K.M., Bennetzen, J.L., Kruegger, R.R., Malek, J.A., 2011. *De novo* genome sequencing and comparative genomics of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Nat. Biotechnol.* 29, 521–527.
- Al-Khateeb, A.A., 2006. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Sukary in response to sucrose and polyethylene glycol. *Biotechnol.* 5, 466–470.
- Al-Khayri, J.M., 2012. Determination of the date palm cell suspension growth curve, optimum plating efficiency, and influence of liquid medium on somatic embryogenesis. *Emir. J. Food. Agric.* 24, 444–455.
- Al-Mssallem, I.S., Hu, S., Zhang, X., Lin, Q., Liu, W., Tan, J., Yu, X., Liu, J., Pan, L.T., Zhang, T., et al., 2013. Genome sequence of the date palm *Phoenix dactylifera* L. *Nat. Commun.* 4, 2274.
- Augé, R., Beauchesne, G.B., Boccon Gibod, L., Decourtye, L., Get, B., Jalouzot, R., Munier, R., Morand, J., Ci Reynold, J.P., Strullu, D.G., Vidallie, H., 1989. *La culture in vitro et ses applications horticoles*, 3ème ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris, pp. 207.
- Bekheet, S.A., Saker, M.M., Taha, H.S., Moursy, H.A., 2001. Plant regeneration via somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Arab. J. Biotechnol.* 4, 111–118.
- Benkhalifa, A., 2006. Situation de la lutte contre le Bayoud. In recueil des résumés de la Conférence Régionale sur (Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la Protection du Palmier Dattier Contre le Bayoud) projet AIEA-RAF/5/049 Alger, 17–18 Juin 2006.
- Chabane, D., (Dissertation) 1995. Etude des aptitudes morphogénétiques des divers explants des rejets de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) chez deux variétés Takerbucht et Deglet Nour pour induire une embryogénèse somatique. University of Science and Technology Houari Boumediene, Alger.
- Chabane, D., (Dissertation) 2007. Amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par fusion de protoplastes de deux cultivars Deglet Nour sensible et Takerboucht résistant au Bayoud. University of Science and Technology Houari Boumediene.

- Chabane, D., Assani, A., Bouguedoura, N., Haicour, R., Ducreux, G., 2007. Induction of callus formation from difficile date palm protoplasts by means of nurse culture. *C. R. Biol.* 330, 392–401.
- Eke, C.R., Akomeah, P., Asemota, O., 2005. Somatic embryogenesis in date palm *Phoenix dactylifera* L. from apical meristem tissues from 'zebia' and 'loko' landraces. *Afr. J. Biotechnol.* 4, 244–246.
- El Hadrami, A., El Idrissi-Tourane, A., El Hassni, M., Daayf, F., El Hadrami, I., 2005. Toxin-based in-vitro selection and its potential application to date palm for resistance to the bayoud Fusarium wilt. *C. R. Biol.* 328, 732–744.
- El Hadrami, I., Cheikh, R., Baaziz, M., 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from shoot-tip explants in *Phoenix dactylifera* L. *Biol. Plant* 37, 205–211.
- Fang, Y., Wu, H., Zhang, T., Yang, M., Yin, Y., Pan, L., Yu, X., Zhang, X., Hu, S., Al-Mssallem, I.S., Yu, J., 2012. A complete sequence and transcriptomic analyses of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) mitochondrial genome. *PLoS ONE* 7, e37164.
- Fki, L., (Dissertation) 1998. Embryogénese somatique et régénération de plants de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à partir de cultures en suspension. National Engineering School of Sfax, Sfax.
- Fki, L., Masmoudi, R., Drira, N., Rival, A., 2003. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant. Cell. Rep.* 21, 517–524.
- Gueye, B., Morcillo, F., Collin, M., Gargani, D., Overvoorde, P., Aberlenc-Bertossi, F., Tranbarger, T.J., Sane, D., Tregear, J.W., Borgel, A., Verdeil, J.-L., 2009a. Acquisition of callogenetic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell Tiss. Org.* 99, 35–45.
- Gueye, B., Saïd-Ahmed, H., Morcillo, F., Borgel, A., Sané, D., Hilbert, J.L., Verdeil, J.L., Blervacq, A.S., 2009b. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways? *Plant Cell Tiss. Org.* 98, 47–58.
- Hvoslef-Eide, A.K., Preil, W. (Eds.), 2005. Liquid culture systems for in vitro plant propagation, Springer, Netherlands, pp. 588.
- Jain, M.S., Al Khayri, J.M., D.V.F.J., 2011. Date Palm Biotechnology, 1st ed. Springer, Netherlands.
- Jiménez, V.M., 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* 47, 91–110.
- Margara, J., 1989. La multiplication végétative, le méristème et l'organogénèse. INRA, Paris.
- Mater, A.A., 1986. In vitro propagation of *Phoenix dactylifera* L. *Date Palm J.* 4, 137–152.
- Mimouni, Y., Siboubakeur, O., 2011. Etude des propriétés nutritives et diététiques des sirops de dattes extraits par diffusion, en comparaison avec les sirops à haute teneur en fructose (isoglucoses), issus de l'industrie de l'amidon *Annales des Sciences et Technologie*, vol. 3., pp. 1–11.
- Mujib, A., Samaj, J., 2005. Somatic embryogenesis. *Plant Cell Monographs*, vol. 2. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 15, 473–497.
- Othmani, A., Bayouhd, C., Drira, N., Marrakchi, M., Trifi, M., 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell Tiss. Org.* 97, 71–79.
- Rai, M., Shekhawat, N.S., Harish Gupta, A., Phulwaria, M., Ram, K., Jaiswal, U., 2011. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell Tiss. Org.* 106, 179–190.
- Saker, M.M., Allam, M.A., Goma, A.H., Abd El-Zaher, M.H., 2007. Development of suspension culture system for in vitro propagation of date palm. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 5, 51–56.
- Sané, D., Aberlenc-Bertossi, F., Gassama-Dia, Y.K., Sagna, M., Trouslot, M.F., Duval, Y., Borgel, A., 2006. Histochemical analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera* L. *Ann. Bot.* 98, 301–308.
- Sedra, M.Y., 2005. Caractérisation des clones sélectionnés du palmier dattier pour combattre la maladie du Bayoud Symposium international: développement agricole durable des systèmes oasiens Erfoud, 07–10 Mars.
- Sghaier, B., Bahloul, M., Gargouri Bouzid, R., Drira, N., 2008. Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour: comparative study. *Sci. Hortic.* 116, 169–175.
- Sghaier, B., Kriaa, W., Bahloul, M., Novo, J.V.J., Drira, N., 2009. Effect of ABA, arginine and sucrose on protein content of date palm somatic embryos. *Sci. Hortic.* 120, 379–385.
- Sghaier-Hammami, B., Jorin-Novo, J.V., Gargouri-Bouzid, R., Drira, N., 2010. Abscisic acid and sucrose increase the protein content in date palm somatic embryos, causing changes in 2-DE profile. *Phytochemistry* 71, 1223–1236.
- Sharma, D.R., Kumari, R., Chowdhury, J.B., 1980. In vitro culture of female date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues. *Euphytica* 29, 169–174.
- Taha, H.S., Bekheet, S.A., Saker, M.M., 2001. Factors affecting in vitro multiplication of date palm. *Biol. Plant.* 44, 431–433.
- Tisserat, B., 1982. Factors Involved in the Production of Plantlets From Date Palm Callus Cultures *Euphytica*, vol. 31., pp. 201–214.
- Tisserat, B., 1979. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. *J. Exp. Bot.* 30, 1275–1283.
- Veramendi, J., Navarro, L., 1996. Influence of physical conditions of nutrient medium and sucrose on somatic embryogenesis of date palm. *Plant Cell Tiss. Org.* 45, 159–164.
- Veramendi, J., Navarro, L., 1997. Influence of explant sources of adult date palm (*Phoenix dactylifera* L.) on embryogenic callus formation. *J. Hort. Sci.* 72, 665–671.
- Yang, M., Zhang, X., Liu, G., Yin, Y., Chen, K., Yun, Q., Zhao, D., Al-Mssallem, I.S., Yu, J., 2010. The complete chloroplast genome sequence of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *PLoS ONE* 5, e12762.
- Zaid, A., Arias-Jimenez, E.J., 2002. Date palm cultivation. FAO Plant production and protection paper 156 Rev.1. F.A.O., Rome.
- Zaid, A., Tisserat, B., 1983. In vitro shoot tip differentiation in *Phoenix dactylifera* L. *Date Palm J.* 2, 162–182.
- Zouine, J., El Hadrami, I., 2004. Somatic embryogenesis in *Phoenix dactylifera* L.: effect of exogenous supply of sucrose on protein, sugars, phenolics and peroxidases activities during the embryogenic cell suspension culture. *Biotechnology* 3, 114–118.
- Zouine, J., El Bellaj, M., Meddich, A., Verdeil, J., El Hadrami, I., 2005. Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension culture in *Phoenix dactylifera* L. *Plant Cell Tiss. Org.* 82, 83–92.
- Zouine, J., El Hadrami, I., 2007. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Sc. Hortic.* 112, 221–226.

Desiccation-Enhanced Maturation and Germination of Date Palm Somatic Embryos Derived from Cell Suspension Culture

Nazim Boufis, Khayreddine Titouh, and Lakhdar Khelifi

Abstract

In vitro plant regeneration via somatic embryogenesis is a powerful tool for rapid, large-scale production of healthy true-to-type plants. This approach is suitable to preserve existing natural genetic variability and propagation of variability generated from genetic improvement programs, including crossing, somaclonal variation, mutagenesis, and somatic hybridization. This chapter outlines a simplified protocol for date palm regeneration via somatic embryogenesis induced in cell suspension cultures. In this protocol, culture medium composition is manipulated, including plant growth regulators and solid (addition of agar) and liquid media to achieve reduction of production cycle of somatic embryogenesis, which increases the multiplication rate of embryogenic callus and improves the quantity and quality of somatic embryos.

Key words Cell suspension culture, Embryogenic callogenesis, In vitro regeneration, *Phoenix dactylifera*, Somatic embryogenesis

1 Introduction

The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is among the most important economic species in the Palm family (Arecaceae). It is a long-lived dioecious monocotyledon adapted to local conditions of arid and semiarid regions and represents a cornerstone of the economy in North Africa and the Middle East [1]. The world's date palm heritage is characterized by a wide diversity of cultivars, over 5000 cultivars more or less described [2], and the palm is subject to many biotic and abiotic threats. This situation is compounded by genetic erosion and likely exacerbated by global climate change [1, 3–5]. Therefore, in order to preserve and/or improve this varietal diversity, control of the date palm propagation is preminent. This objective can be achieved using plant tissue culture techniques to overcome the deficiencies in conventional propagation methods using either seeds or offshoots [4, 6].

Plant tissue culture techniques allow a rapid large-scale production of healthy true-to-type plants, regardless of the season of the year [7]. Two techniques of *in vitro* propagation are used for date palm regeneration. The direct-organogenesis based on shoot formation ability of different types of explants and somatic embryos formation from somatic cells [8]. Between these techniques, somatic embryogenesis is the most advantageous because it is time-saving and low in cost and gives high rates of regeneration despite a risk of somaclonal variation [9, 10]. However, date palm remains a recalcitrant species to *in vitro* regeneration because of genotypic factors that affect the explant response *in vitro* culture and the poor germination rate of somatic embryos [4, 6]. However, significant improvement was made in date palm somatic embryogenesis by using embryogenic cell suspension cultures [11–15], which has an advantage to promote the uniform absorption of nutrients and reduce the inhibitory effect of polyphenols on cell growth. It improves considerably the yield of viable somatic embryos [16] by maintaining genetic fidelity of regenerated plants and is useful in breeding programs [17–19].

This chapter describes a simplified protocol for date palm plant regeneration through somatic embryogenesis by using embryogenic cell suspension culture of Algerian date palm cultivars. The protocol consists of five main steps: induction and maintenance of embryogenic callus, multiplication of embryogenic cultures in agitated liquid medium, initiation of somatic embryogenesis in liquid medium, maturation, and germination of proembryos on solid media.

2 Materials

2.1 Plant Material and Surface Sterilization

1. Offshoots of date palm having an average weight 4–6 kg (Fig. 1a).
2. Disinfection solution: Mercuric chloride (HgCl_2), 150 mg/L.

2.2 Equipment

1. Explant isolation tools: Tree saw and hand pruner.
2. Surgical tools: Scalpels, forceps, and spatulas.
3. Glassware and culture vessels: Beakers, Erlenmeyer flasks, boiling flasks, graduated cylinders, glass laboratory bottles, glass funnels, graduated pipettes, test tubes (160 × 24 × 1.2 mm), sterile rectangular flasks (650 mL), glass, and sterile plastic Petri dishes (∅ 9 cm).
4. Instruments: Water distillation unit, autoclave, dry-heat sterilizer, laboratory ice machine, refrigerator, analytical balance, magnetic stirrer with heating, pH meter, rotary shaker, laminar flow bench, gas burners, and strainers (with sieves of 500 μm mesh size).



Fig. 1 Illustration of the different date palm regeneration stages via somatic embryogenesis induced in cell suspension culture: (a) offshoot of date palm, (b) offshoot core, (c) sterilization of offshoot core with HgCl_2 , (d) the sterilized apical part of offshoot, (e) explant in test tube cultures for callogenesis initiation, (f) initiation of embryogenic callogenesis, (g) embryogenic calli maintained on solid medium, (h) embryogenic calli after 8 weeks of multiplication in liquid medium, (i) general appearance of suspensions in liquid medium, (j) clusters of proembryos obtained in liquid medium, (k) development of somatic embryos on solid medium, (l) structured somatic embryos after maturation on solid media, (m) development of somatic embryos into in vitro plants. Source: Photos f, g, i, k, l, and m are taken from Boufis et al. [15]

5. Supplies: Absorbent paper, stretch cling film or parafilm, cotton, and aluminum foil.
6. Plant tissue culture room set at $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ and 16 h photoperiod provided by fluorescent lamps ($28\text{ }\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).

2.3 Culture Medium

1. Basal culture medium: Stock solutions of inorganic salts and organic elements of modified MS medium (Murashige and Skoog [20]) (*see* Table 1).
2. Hormonal stock solutions: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6-benzylaminopurine (BAP), each at 1 mg/mL.
3. Culture medium additives: Myoinositol, L-glutamine, adenine, sucrose, activated charcoal, polyphenols, and agar (*see* Table 2).
4. Culture media additives for each culture stage: Initiation and maintenance of embryogenic callus (CM), multiplication of embryogenic callus (AM), induction of embryogenesis (EM), maturation of proembryos (MM), and germination of somatic embryos (GM) (*see* Table 2).
5. pH adjustment solutions: 1 M NaOH and 1 M HCl.

Table 1
Composition of stock solutions based on modified Murashige and Skoog (MS) medium [20]

Components	Final concentration of culture medium (mg/L)	Stock solution strength ^a	Concentration of the stock solutions (mg/L)
<i>Macroelements</i>		× 20	
KNO ₃	1900		38,000
NH ₄ NO ₃	2000		40,000
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440		8800
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370		7400
KH ₂ PO ₄	270		5400
Na H ₂ PO ₄	170		3400
<i>Microelements</i>		× 100	
MnSO ₄ , 4H ₂ O	22.3		2230
ZnSO ₄ , 4H ₂ O	8.6		860
H ₃ BO ₃	6.2		620
KI	0.83		83
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.25		25
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025		2.5
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.025		2.5
<i>Fe-EDTA</i>		× 100	
Na ₂ EDTA	37.25		3725
FeSO ₄ , 7H ₂ O	27.85		2785
<i>Vitamins</i>		× 100	
Glycine	2		200
Pyridoxine	0.5		50
Nicotinic acid	0.5		50
Thiamine HCl	0.1		10

^aAll stock solutions are prepared with distilled water and are stored at 4 °C in total darkness

Table 2

Culture media and additives used for each stage of date palm tissue culture (amounts are per final volume to 1 L medium)

Components	Initiation and maintenance of embryogenic callus (CM)	Multiplication of embryogenic callus (AM)	Induction of somatic embryogenesis (EM)	Maturation of proembryos (MM)	Germination of somatic embryos (GM)
Macroelements (mL/L)	50	25	25	25	25
Microelements (mL/L)	10	5	5	5	5
Fe-EDTA (mL/L)	10	5	5	5	5
Vitamins (mL/L)	10	10	10	10	10
Myoinositol (mg/L)	100	100	100	100	100
L-Glutamine (mg/L)	100	100	100	100	100
Adenine (mg/L)	40	40	40	40	40
Sucrose (g/L)	45	30	30	30	30
Activated charcoal (mg/L)	300	300	300	300	300
2,4-D (mg/L)	10	1	0	0	0
BAP (mg/L)	1	0	0	0	0
Agar (g/L)	7	0	0	7	7

3 Methods

All plant tissue culture steps are carried out under aseptic conditions by sterilization of the culture media, containers and instruments, and surface disinfection under a laminar flow bench with 70% ethanol before use.

3.1 Preparation of Culture Medium

1. Prepare the culture media in distilled water as described in Table 2. The composition of the culture media used depends on culture stages: initiation and maintenance of embryogenic callus (CM), multiplication of embryogenic callus (AM), induction of embryogenesis (EM), maturation of proembryos (MM), and germination of somatic embryos (GM) (Table 2).
2. Adjust the pH of the media to 5.6–5.8 with either 1 M NaOH or 1 M HCl.
3. Distribute the media into suitable containers for each culture stage of the described protocol (Table 3) (*see Note 1*).

Table 3
Volumes of culture media and containers used for each stage of described protocol

Culture stage	Initiation and maintenance of embryogenic callus (CM)	Multiplication of embryogenic callus (AM)	Induction of somatic embryogenesis (EM)	Maturation of Proembryos (MM)	Germination of somatic embryos (GM)
Type of culture medium	Solid medium	Liquid medium	Liquid medium	Solid medium	Solid medium
Volume of culture medium	20 mL	150 mL	150 mL	150 mL	20 mL
Tissue culture containers	Test tubes (160 × 24 × 1.2 mm)	Sterile rectangular flasks (650 mL)	Erlenmeyer flasks (500 mL)	Erlenmeyer flasks (500 mL)	Test tubes (160 × 24 × 1.2 mm)

4. Sterilize the media by autoclaving at 121 °C for 20 min (*see Note 2*).
5. Store the culture medium at 25 °C in the dark for a few days or at 4 °C for a prolonged storage time (*see Note 3*).

3.2 Dissection and Disinfection of Plant Material

1. Use a tree saw and a hand pruner to remove the root parts, the spiny palm leaves, and their fibrous sheaths until the last two layers that protect the fleshy parts of the offshoot core (the meristematic area) (*see Note 4*).
2. Rinse extracted offshoot core with tap water (Fig. 1b).
3. Prepare the disinfection solution containing 150 mg/L HgCl₂ in sterile distilled water under a laminar flow bench (*see Note 5*).
4. Immerse the offshoot core in the sterilizing solution for 1 h on a laminar flow bench (Fig. 1c).
5. Clean and remove the last two apparent meristem layers with sterile forceps and scalpel.
6. Immerse the offshoot core in the sterilizing solution a second time for 1 h.
7. Rinse three consecutive times with sterile distilled water.
8. Remove necrotic tissue with forceps and scalpel, which is caused by HgCl₂ (*see Note 6*).

3.3 Initiation and Maintenance of Embryogenic Callus

1. Divide the sterilized apical part of offshoot core in small explants, 0.5 cm³ size, with forceps and scalpel (Fig. 1d).
2. Place the explants 0.5 cm³ with forceps in test tubes containing 20 mL solid medium (CM) containing 10 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BAP (*see Note 7*). The explants are cultured separately (1 explant per test tube) (Fig. 1e; *see Note 8*).
3. Incubate cultures in total darkness for the entire period of the initiation and maintenance of embryogenic callus at 25 °C ± 2.
4. Subculture explants on a fresh medium at 8-week intervals.
5. Eliminate brown or necrotic parts of explants during the subculture (*see Note 9*).
6. Excise explants showing prolific embryogenic callus growth during the renewal of solid medium (CM) (Fig. 1f, g; *see Note 10*).

3.4 Multiplication of Embryogenic Callus

1. Take 0.5 g explants embryogenic callus, and cut it into small pieces on a sterile Petri dish with a scalpel.
2. Transfer fragmented callus into sterile rectangular flasks (650 mL) containing 150 mL liquid medium (AM).
3. Incubate the suspension cultures on a rotary shaker, 100 rpm, at 25 ± 2 °C and 16 h photoperiod (28 μmol/m²/s).

4. Renew the liquid medium (AM) every 4 weeks of culture, after cell decanting.
5. After 8 weeks of culture, re-transfer embryogenic calli on the solid medium (CM) (Fig. 1h), and incubate at 25 °C in total darkness, after partial drying for 2 h under a laminar flow bench.

3.5 Induction of Somatic Embryogenesis

1. Cut 0.4 g embryogenic calli (*see Note 11*) into small pieces in a sterile Petri dish using a sterile scalpel.
2. Place a funnel over a sterile Erlenmeyer 500 mL flask.
3. Place over the funnel a sieve, 500 μm mesh size.
4. Transfer and crush the chopped embryogenic callus on the sieve with a spatula.
5. Add gradually 150 mL liquid medium (EM) in order to retrieve all cell aggregates.
6. Incubate the suspensions of cell aggregates in a rotary shaker set at a speed of 100 rpm, at 25 °C \pm 2 and 16 h photoperiod (28 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).
7. Renew the liquid medium (EM) at each 4-week interval after decanting the cell suspension cultures for 2 h.
8. The achievement of this stage requires 12 weeks of culture (Fig. 1i).

3.6 Maturation of Proembryos

1. Collect the proembryos after decanting (*see Note 12*).
2. Eliminate the excessive liquid medium (EM) using a sterile absorbent paper, and transfer proembryos onto a sterile Petri dish containing sterile absorbing paper (Fig. 1j).
3. Incubate the closed Petri dish for 24 h for desiccation in total darkness at 25 °C \pm 2.
4. Collect and plate with a spatula the desiccated proembryos into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 150 mL maturation solid medium (MM).
5. Incubate the plated proembryos at 25 °C \pm 2, 16-h provided by fluorescent lamps (28 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) for 4 weeks (Fig. 1k; *see Note 13*).

3.7 Germination of Somatic Embryos

1. Desiccate well-developed somatic embryos (*see Note 14*) with sterile absorbing paper for 2 h under a laminar flow bench (Fig. 1l).
2. Put the somatic embryos with forceps into test tubes containing 20 mL solid medium (GM).
3. Incubate the somatic embryos at 25 °C \pm 2 and a 16 h photoperiod (28 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) (*see Note 15*).

4. Transfer the cultured somatic embryos after 4 weeks to a fresh medium (Fig. 1m; see Note 16).

4 Notes

1. The test tubes and Erlenmeyer flasks are capped with cotton plugs and aluminum foil.
2. Autoclaved solid culture media contained in test tubes or Erlenmeyer flasks are stirred then cooled in ice to maintain the uniformity of activated charcoal in the solid culture media.
3. The storage of culture media in the dark at low temperature prevents the modification of their composition before use.
4. Only the apical part of the offshoot core is used. This part includes the apical meristem, leaf primordia, axillary buds, and base of young leaves.
5. As HgCl_2 is highly toxic to human health, while handling, take all appropriate precautions: glasses, mask, and gloves.
6. A good physiological and phytosanitary status of date palm offshoots is necessary for the success of callus initiation since the surface or contact sterilization is achieved gradually with apical part isolation.
7. For cultivars containing high levels of polyphenols, it is necessary to increase the quantity of activated charcoal in the culture medium. Thus, a culture medium containing 1.5 g/L activated charcoal combined with 50 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BAP is most appropriate.
8. The explants derived from the apical part of the offshoot core are grown separately in test tubes to reduce the risk of contamination.
9. The secretion of polyphenols induces browning of explants and culture media. This phenomenon occurs within the first week of culture. The unfavorable impact of polyphenols in the first step can be reduced by removing brown or necrotic portions of explants.
10. The initial response of explants is either complete or partial swelling followed by the appearance of the primary callus, which is hyperhydric, compact, or friable. The nodular or embryogenic callus is the result of the development of compact primary callus. The required time for obtaining embryogenic callus is around 16 weeks but may take even longer than 48 weeks for recalcitrant cultivars.
11. Nodular callus is a potentially embryogenic callus. Its texture is more or less friable, and its color is white without browning.

12. After 12 weeks in the liquid culture medium (EM), a number of structured somatic embryos are produced together with a large number of proembryos: somatic embryos at the globular and post-globular stage of somatic embryogenesis.
13. The plated proembryos are preliminarily incubated in total darkness during the first 48 h to promote adaptation to new growing conditions.
14. Well-developed somatic embryos have elongated and bipolar forms, approximately 6–7 mm long and a slightly curved shape on one side and pointed on the other.
15. Well-developed somatic embryo germination is manifested by the emergence of the aerial part (cotyledonary leaf) followed by the appearance of a radicle that will develop later into the taproot system. The germination somatic embryos can be observed from the first week of culture.
16. Transfer germinated somatic embryos to the same composition solid medium (GM) with reduced gelling agent concentration (3.5 g/L agar) to promote rooted in vitro plant growth.

References

1. El Hadrami A, Al-Khayri JM (2012) Socioeconomic and traditional importance of date palm. *Emir J Food Agric* 24:371–385
2. El Hadrami I, El Hadrami A (2009) Breeding date palm. In: Jain SM, Priyadarshan PM (eds) *Breeding plantation tree crops*. Springer, New York, pp 191–216
3. Chao CT, Krueger RR (2007) The date palm (*Phoenix dactylifera* L.): overview of biology, uses, and cultivation. *HortScience* 42 (5):1077–1082
4. Jain SM (2012) In vitro mutagenesis for improving date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *Emir J Food Agric* 24(5):400–407
5. Shabani F, Kumar L, Taylor S (2012) Climate change impacts on the future distribution of date palms: a modeling exercise using CLIMEX. *PLoS One* 7(10):e48021
6. Zaid A, de Wet PF (2002) Date palm propagation. In: Zaid A (ed) *Date palm cultivation*. Food and Agriculture Organization Plant Production and Protection Paper No, vol 156. FAO, Rome, Italy, pp 73–105
7. Bhojwani SS, Dantu PK (2013) *Plant tissue culture: an introductory text*. Springer, India
8. Loyola-Vargas VM, De-la-Peña C, Galaz-Avalos RM, Quiroz-Figueroa FR (2008) Plant tissue culture. In: Walker JM, Rapley R (eds) *Molecular biomethods handbook*, 2nd edn. Humana Press, Totowa, NJ, pp 875–904
9. Ree JF, Guerra MP (2015) Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Dev Plant* 51(6):589–602
10. Al-Khalifah NS, Askari E (2011) Growth abnormalities associated with micropropagation of date palm. In: Jain SM, Al-Khayri JM, Johnson DV (eds) *Date palm biotechnology*. Springer, The Netherlands, pp 205–219
11. Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A (2003) An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour. *Plant Cell Rep* 21(6):517–524
12. Sané D, Aberlenc-Bertossi F, Gassama-Dia YK, Sagna M, Trouslot MF, Duval Y, Borgel A (2006) Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *Ann Bot* 98(2):301–308
13. Othmani A, Bayoudh C, Drira N, Marrakchi M, Trifi M (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L. cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 97(1):71–79

14. Al-Khayri JM (2012) Determination of the date palm cell suspension growth curve, optimum plating efficiency, and influence of liquid medium on somatic embryogenesis. *Emir J Food Agric* 24(5):444–455
15. Boufis N, Khelifi-Slaoui M, Djillali Z, Zaoui D, Morsli A, Bernards MA, Khelifi L (2014) Effects of growth regulators and types of culture media on somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. Degla Beida). *Sci Hort* 172:135–142
16. Preil W (2005) General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture. In: Hvoslef-Eide AK, Preil W (eds) *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Springer, The Netherlands, pp 1–18
17. Aslam J, Khan SA, Azad MAK (2015) Agrobacterium-mediated genetic transformation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar “Khalasah” via somatic embryogenesis. *Plant Sci Today* 2(3):93–101
18. Titouh K, Khelifi L, Slaoui M, Boufis N, Morsli A, HadjMoussa K, Makhzoum A (2015) A simplified protocol to induce callogenesis in protoplasts of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Iran J Biotech* 13(1):26–35
19. El Hadrami A, Daayf F, Elshibli S, Jain SM, El Hadrami I (2011) Somaclonal variation in date palm. In: Jain SM, Al-Khayri JM, Johnson DV (eds) *Date palm biotechnology*. Springer, The Netherlands, pp 183–203
20. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497