

Étude des capacités germinatives des embryons somatiques chez le palmier dattier

Dessiccation, corrélations morphogénétiques
et investigations biochimiques

L. Fki¹

M. Bahloul¹

R. Masmoudi¹

N. Drira¹

Introduction

La phœniciculture occupe une place stratégique dans le développement oasien, non seulement par la production de dattes, mais aussi par ses rôles écologiques et socio-économiques inestimables (Rhoma, 1998).

Le palmier dattier est une espèce dioïque très hétérozygote. La reproduction par la voie sexuée conduit à une population très hétérogène, dont les plants sont composés pour moitié de sujets mâles et pour moitié de sujets femelles qui demeurent indiscernables jusqu'à

¹ Laboratoire des Biotechnologies végétales, faculté des Sciences de Sfax, 3018 Sfax, Tunisie.

leur floraison (Munier, 1973). Pour toutes ces raisons, la multiplication des cultivars intéressants est assurée par la voie végétative au moyen des rejets produits à la base du stipe. Cependant, ce mode de propagation s'avère très limité en raison du nombre restreint de rejets formés et se révèle insuffisant pour répondre aux besoins d'une demande accrue en plants de qualité. Ainsi, des recherches qui visent la maîtrise des processus morphogénétiques chez le dattier par le biais des techniques de culture *in vitro* peuvent contribuer à résoudre ce problème. L'embryogenèse somatique a suscité de l'intérêt (Tisserat et Demason, 1980 ; Daguin et Letouzé, 1988) car sa maîtrise représente un facteur très important dans les stratégies de clonage et d'amélioration de cette espèce. La phoeniculture rencontre de plus en plus de difficultés, en particulier en Afrique du Nord où les variétés les plus recherchées sont décimées par la maladie de la feuille cassante dont l'agent causal n'est pas encore identifié et le Bayoud causé par le *Fusarium oxysporum* f sp *albedinis*, champignon vasculaire difficile à combattre (Sedra, 1994). Cette étude a pour objectif la mise au point d'une méthode assurant la production de vitroplants de dattier cv. Deglet Nour en plus grand nombre, grâce à une meilleure maîtrise des conditions d'obtention et de germination des embryons somatiques formés et des processus morphogénétiques qui leurs sont associés.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Les cals embryogènes, à l'origine des suspensions cellulaires, sont issus de cœurs de rejets et des feuilles qui en dérivent en culture (Drira, 1983).

Milieux de culture

Les milieux solides utilisés sont constitués par la solution de Murashige et Skoog (1962) additionnée de saccharose (50 g.l⁻¹),

de L-glutamine (100 mg.l⁻¹), de KH₂PO₄ (120 mg.l⁻¹), d'adénine (25 mg.l⁻¹) et d'agar (8 g.l⁻¹). Pour les milieux liquides, les éléments minéraux de MS sont dilués deux fois et la concentration en saccharose est réduite à 30 g.l⁻¹.

Conditions de culture

La phase de callogenèse est conduite à l'obscurité totale dans des enceintes climatisées dont la température est de 28 °C. Après 6 à 8 mois, les cultures sont placées en conditions photopériodiques de 16 h dans une chambre de culture dont la température est de 28 ± 2 °C à la lumière (3 000 lux) et 21 ± 2 °C à l'obscurité. L'agitation des cultures en milieu liquide est assurée par un agitateur orbital (120 t.mn⁻¹).

Techniques histologiques

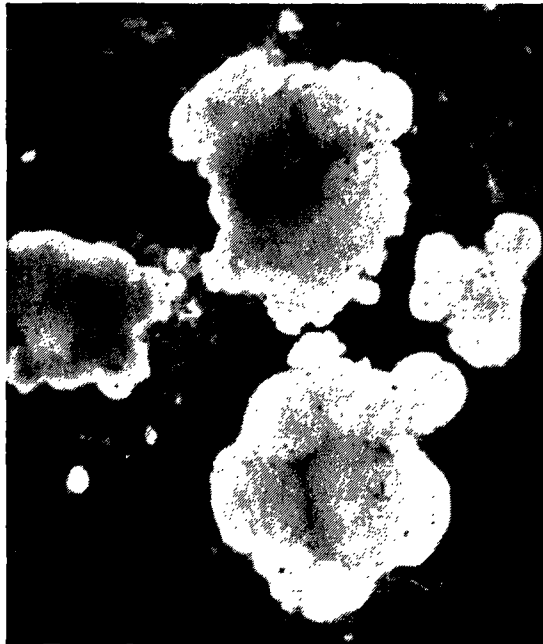
Les échantillons sont fixés au Navashine de Svaloff pendant au moins 48 h. Après fixation, les échantillons sont lavés, déshydratés, imprégnés dans un mélange de xylène-paraffine et finalement inclus dans la paraffine pure. Les pièces incluses dans les blocs de paraffine sont coupées à 10 µm d'épaisseur et ensuite colorées à l'hématoxyline ferrique de Regaud.

Techniques biochimiques

Le broyage des embryons somatiques (500 mg de matière fraîche) est effectué à 4 °C à l'aide d'un mortier dans 10 ml de tampon d'extraction (Tris maléate 0,1M pH 6,5). La teneur en protéines est estimée par la méthode de Bradford (1976). L'activité peroxydasique est mesurée sur les extraits enzymatiques bruts en utilisant la méthode spectrophotométrique décrite par El Hadrami et D'auzac (1992) où le guaicol est utilisé comme substrat.

■ Résultats

L'initiation de la callogenèse (fig. 1) sur des tissus de cœurs de rejets et des feuilles qui en dérivent en culture est possible en utilisant différentes doses de 2,4-D allant de 0,5 à 10 mg.l⁻¹. Les jeunes feuilles manifestent des capacités de prolifération nettement plus importantes, si bien qu'en présence de 1 mg.l⁻¹ de 2,4-D, le taux de callogenèse atteint 60 % sur les feuilles juvéniles après huit mois de culture contre 20 % sur les feuilles de taille supérieure à 5 mm. Ces résultats confirment les avantages procurés par l'utilisation du 2,4-D comme agent inducteur de l'embryogenèse somatique (Masmoudi, 1999). Toutefois, le 2,4-D est habituellement utilisé à de fortes doses (Tisserat, 1979), alors que nos expériences montrent qu'il est possible d'induire l'embryogenèse somatique à l'aide de doses ne dépassant pas 0,5 mg.l⁻¹. L'étude histologique montre que les cals embryogènes présentent, à leur surface, des masses sphériques correspondant à des embryons somatiques au stade globulaire (fig. 2).



■ Figure 1
Cals embryogènes
cv. Deglet Nour.



■ Figure 2
Coupe au niveau
d'un cal embryogène.

L'amplification des cultures embryogènes peut être assurée tant par la technique de hachage qui multiplie la masse de la matière fraîche par un facteur 6 après deux mois de culture en présence de 10 mg.l^{-1} de 2,4-D et de $0,5 \text{ g.l}^{-1}$ de charbon actif que par passage en milieu liquide agité. Cela est d'autant plus utile que la vitesse de croissance des cultures embryogènes en milieu liquide renfermant 1 mg.l^{-1} de 2,4-D et $0,3 \text{ g.l}^{-1}$ de charbon actif demeure importante (Fki, 1998).

Les cals embryogènes constituent donc un matériel de choix, très utile pour l'obtention de suspensions embryogènes à partir desquelles pourront être différenciés des embryons somatiques à l'état isolé. Une étude, au microscope inversé, de la suspension embryogène établie par filtration à travers des mailles de $500 \mu\text{m}$, montre l'hétérogénéité de cette suspension concernant la forme, la taille des cellules et le nombre de cellules par agrégat (fig. 3, tabl. 1). Ceci pourrait expliquer le développement asynchrone des embryons, les manifestations organogènes de certains tissus et la différenciation de pseudo-embryons incompetents à la germination. Les colonies représentées par des cellules de type arrondi, et dont le rapport nucléocytoplasmique est élevé, sont les plus compétentes à l'embryogenèse. Les autres types de cellules sont moins

sensibles aux conditions de l'environnement physico-chimique et leur dégénérescence est inéluctable.

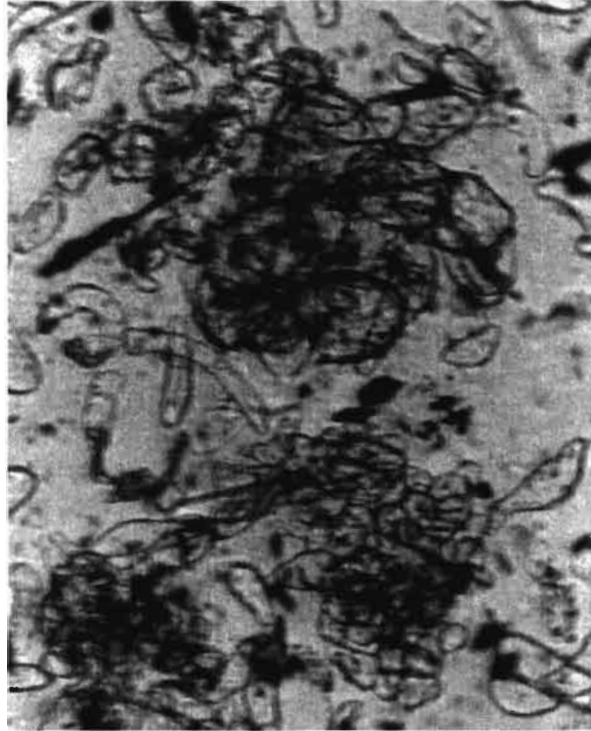


Figure 3
Suspension cellulaire
embryogène.

Type de cellules	Fréquence	Forme des cellules	Taille des cellules (μm)	Caractéristiques des cellules	Nombre de des cellules par agrégat
Type 1	50 %	Arrondie	~15	Noyau volumineux, cytoplasme dense.	1 à 30 cellules
Type 2	10 %	Ovale	~50	Noyau indiscernable, cytoplasme peu dense.	1 à 12 cellules
Type 3	40 %	Allongée	~100	Noyau de petite taille, cytoplasme diffus.	1 à 10 cellules

Tableau 1
Étude cytologique d'une suspension cellulaire
embryogène de palmier dattier.

Les essais réalisés sur les tissus indifférenciés de Deglet Nour, en vue de la mise au point d'un milieu de culture adéquat induisant une embryogenèse somatique active en milieu liquide agité, montrent que les substances hormonales et les éléments minéraux employés ainsi que le charbon actif influent, par leur nature et leur dose, tant sur la vitesse de différenciation des embryons somatiques formés que sur leur état physiologique ultérieur. Le milieu L₁ renfermant les éléments minéraux de MS 1/2 ; du 2,4-D à 1 mg.l⁻¹ et du charbon actif à 0,3 g.l⁻¹ est favorable à l'initiation, la croissance et la maturation des embryons (fig. 4, fig. 5, fig. 6). La réduction excessive de la concentration en éléments minéraux de MS (MS 1/4 correspondant à L₃ au lieu de MS 1/2 pour L₁) n'assure pas le développement des embryons d'une manière satisfaisante. C'est ainsi que la plupart des embryons restent bloqués au stade globulaire. Quant au milieu L₂ (MS), il est faiblement inducteur de l'embryogenèse secondaire, phénomène à la base du maintien de la souche. En effet, la proportion des embryons au stade globulaire baisse considérablement au terme de six semaines de culture. En absence totale de 2,4-D, un brunissement précoce affecte l'extrémité apicale et/ou basale des embryons.

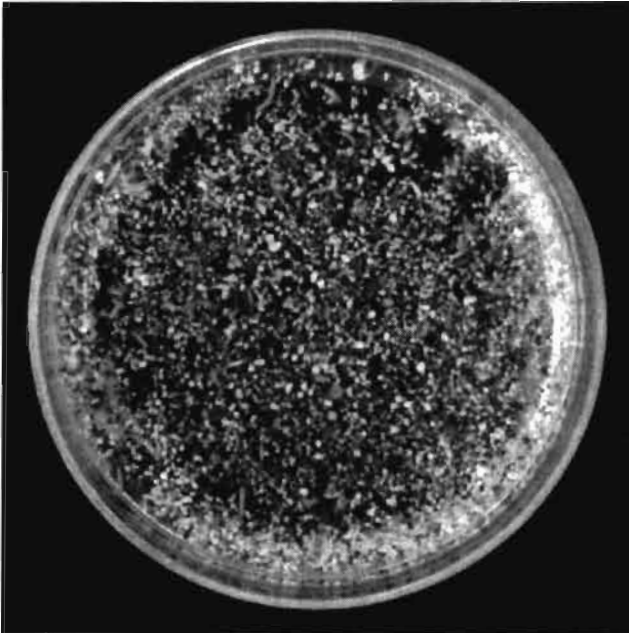


Figure 4
Embryons somatiques
au stade globulaire.

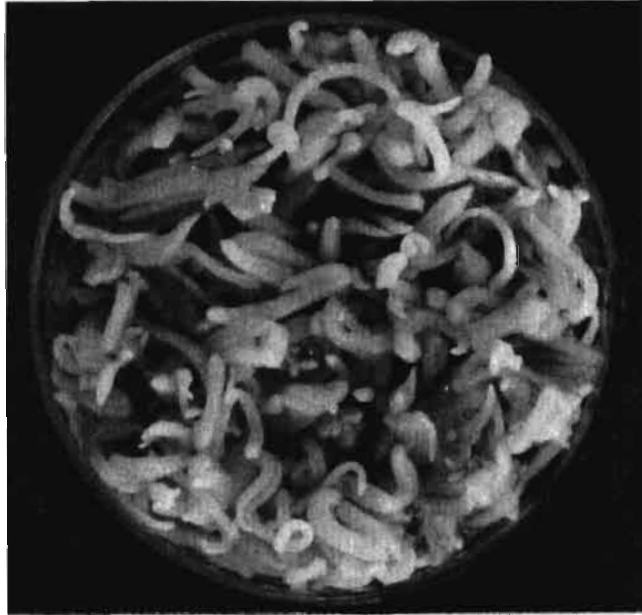
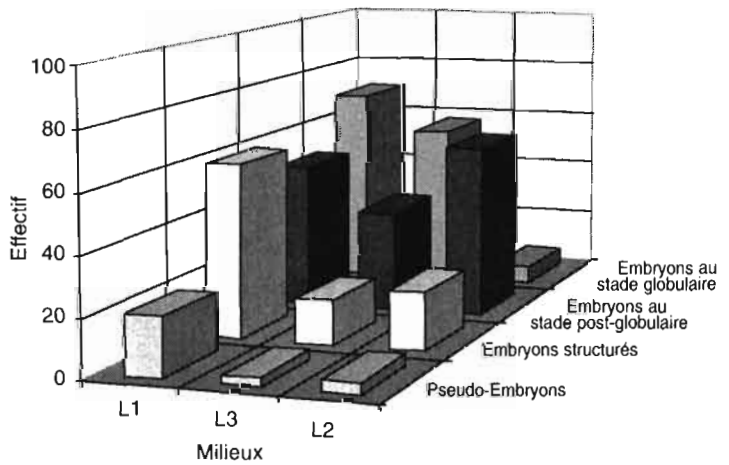


Figure 5
Embryons somatiques
en grand nombre
en milieu liquide
au stade structuré.

Figure 6
Effet de la concentration
minérale du milieu de MS
sur l'effectif des embryons
observés aux différents
stades de l'embryogenèse
végétale à partir
de 500 mg de matière
fraîche de cals
embryogènes au terme
de 6 semaines de culture.



Les milieux liquides permettent une meilleure expression des potentialités embryogènes des tissus et leur maintien au cours de nombreuses générations successives de multiplication, ceci se traduit par le développement simultané de tous les stades de l'em-

bryogenèse somatique. Quatre stades bien distincts allant de l'état globulaire typique au stade mature parfaitement différencié et structuré ont été répertoriés.

Stade 1 : stade globulaire

Ce stade est discernable après une semaine de culture. On note la différenciation de minuscules masses, parfaitement sphériques, dont les futurs méristèmes caulinaires et racinaires ne sont pas encore reconnaissables.

Stade 2 : stade post-globulaire

Ce stade peut être repéré au terme de deux semaines de culture. Les embryoides manifestent, en début de développement, une petite invagination conduisant à des structures rappelant le stade cœur chez les Dicotylédones. Ces embryoides sont caractérisés par une symétrie sensiblement axiale car le développement du cotylédon à l'origine de la feuille cotylédonaire est encore très faible.

Stade 3 : stade embryon structuré

Ce stade prend forme à partir de la 5^e semaine de culture. Le développement du cotylédon à l'origine de la feuille cotylédonaire est très important. Le méristème racinaire bien visible ne se montre pas encore très actif compte tenu du faible développement de la racine.

Stade 4 : stade embryon structuré avancé

Ce stade peut être identifié après 10 semaines de culture. On note, d'une part, l'apparition de la 1^{re} feuille suite à la fissuration de la feuille cotylédonaire d'où elle émerge et, d'autre part, le début d'élongation de la racine suite à l'entrée en activité du méristème racinaire marquant la naissance d'une jeune plante structurée.

Par ailleurs, l'hyperhydricité d'une proportion souvent importante des embryons somatiques formés en milieu liquide constitue un obstacle majeur au processus de la germination. La dessiccation partielle de ces embryons, conduisant à une baisse de leur teneur en eau de 90 à 75 %, améliore très nettement leur capacité germinative dont le taux s'élève de 25 à 80 % (fig. 7). En revanche, l'excès de dessiccation (teneurs en eau inférieures à 60 %) réduit le pouvoir germinatif d'une façon notable.

Les analyses biochimiques effectuées sur les embryons partiellement déshydratés montrent que la dessiccation engendre une augmentation de l'activité des peroxydases (tabl. 2), isoenzymes connues par leur implication dans plusieurs processus morphogénétiques (Gaspar *et al.*, 1991).



■ Figure 7
Plante issue du développement
d'un embryon somatique ayant subi
une déshydratation partielle.

	Embryons somatiques hydratés (teneur en eau 90 %)	Embryons somatiques desséchés (teneur en eau 82 %)
Teneurs en protéines (mg.g ⁻¹ MF)	2,9 ± 0,4	6,2 ± 0,5
Activités peroxydasiques (μ.g ⁻¹ MF)	3 020 ± 105	7 050 ± 206

■ Tableau 2
Teneurs en protéines solubles et activités peroxydasiques totales
des embryons somatiques de palmier dattier
hydratés et desséchés.

En outre, l'excision de la partie antérieure de la feuille cotylédonaire stimule l'émergence de la première feuille chlorophyllienne, si bien que le pourcentage de germination s'élève de 30 à 75 %.

Il convient de noter que le développement des deux types de méristèmes est asynchrone. 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, voire bloquée, par le démarrage précoce du méristème racinaire. De nombreux embryons sont ainsi perdus.

Quant à la phase d'acclimatation, elle doit porter sur des jeunes plants structurés ayant séjournés sur le milieu de MS additionné d'ANA (1 mg.l⁻¹) et de BAP (1 mg.l⁻¹). Ce milieu assure la régénération de plants vigoureux dont le système racinaire et la partie aérienne sont bien développés.

Discussion et conclusion

Chez le palmier dattier cv. Deglet Nour, la multiplication clonale, par le biais de l'embryogenèse somatique en milieu liquide agité, peut conduire à l'obtention d'un grand nombre de plants structurés. Le procédé de production mis en œuvre s'articule comme suit :

- induction d'une callogenèse à partir d'explants végétatifs, prélevés au stade juvénile, sous l'effet de doses variables de 2,4-D ;
- multiplication des cals embryogènes obtenus par passage en milieux liquide agité ou par fragmentation par la technique de hachage ;
- établissement de suspensions cellulaires embryogènes après filtration sur des tamis de 500 µm ;
- induction d'une embryogenèse somatique dans des milieux de culture liquides de composition appropriée ;
- dessiccation partielle des embryons somatiques développés en réduisant leur teneur en eau de 90 à 75 % ;

– germination des embryons ainsi déshydratés sur des milieux gélosés dépourvus d'hormones et obtention de vitroplants structurés.

À partir d'une même masse de cals embryogènes, le nombre d'embryons obtenus en milieu liquide est supérieur à celui que l'on pourrait obtenir sur milieu gélosé. Deux facteurs au moins sont à l'origine de cette amélioration du rendement. D'une part, les conditions inhérentes à la phase liquide permettent d'assurer de meilleures conditions d'échange de métabolites par les structures embryonnaires en suspension et, d'autre part, l'intervention d'une embryogenèse secondaire très précoce et active. En effet, les observations effectuées à la loupe révèlent le développement de minuscules masses sphériques sur les proembryons qui se détachent sous l'effet de l'agitation. Certains nodules évoluent en embryons structurés, d'autres continuent leur prolifération.

Quant à l'efficacité du milieu L₁, elle est surtout due à l'effet de dilution du milieu minéral de MS. En effet, chez *Fagus sylvatica* L., cette dilution assure une bonne prolifération de la suspension embryogène (Vieitez *et al.*, 1992). Par ailleurs, Sharma *et al.* (1993) rapportent que le 2,4-D à faible dose stimule la différenciation des embryons somatiques et assure le maintien des cultures en suspension chez *Datura innoxia* Mill.

Les pseudo-embryons, dont on ignore les conditions et les facteurs essentiels d'induction, sont un obstacle à une meilleure exploitation du processus de l'embryogenèse végétale. Trois types d'anomalies seraient à l'origine de leur incompétence à la germination : 1) l'absence totale de toute structure de type méristème caulinaire, 2) la mise en place d'un méristème mal formé non fonctionnel sur le plan physiologique, 3) le méristème formé est typique mais soumis à des inhibitions dont les causes restent à déterminer.

La dessiccation des embryons somatiques est un traitement très efficace permettant d'atteindre des pourcentages de germination élevés. Les avantages de la dessiccation ont été aussi évoqués chez *Manihot esculenta* C. où elle améliore les capacités germinatives des embryons somatiques (Mathews *et al.*, 1993). Ces auteurs rapportent que l'augmentation de la pression osmotique intracellulaire, conséquence directe de la dessiccation, peut déclencher une série d'événements biochimiques. Ces derniers affectent la perméabilité membranaire et modifient la teneur de l'ABA endogène qui induit

l'expression de gènes spécifiques impliqués dans certains processus morphogénétiques.

L'accroissement de l'activité peroxydasique pourrait traduire une réduction du niveau auxinique endogène (Thorpe et Gaspar, 1978) à l'origine de l'établissement d'une balance auxine/cytokinine favorable à l'activation des voies métaboliques impliquées dans l'accumulation des substances de réserve qui constituent des marqueurs d'intérêt pour l'évaluation du degré de maturité des embryons somatiques (Rival *et al.*, 1998).

En ce qui concerne l'amélioration des capacités germinatives liées à l'excision de la partie antérieure de la feuille cotylédonaire, les travaux de Bulvard et Monin (1960, 1963) sur les embryons zygotiques de *Euronymus europaeus* et *Fraxinus excelsior* ont mis, en évidence le rôle joué par les cotylédons dans l'incompétence à la germination. Celle-ci est très forte lorsque les cotylédons s'imbibent par contact avec le milieu de culture. En revanche, la germination est possible si les cotylédons sont supprimés ou s'ils ne sont pas en contact avec le milieu de culture. Ces résultats suggèrent que l'inhibition exercée par cette portion de la feuille cotylédonaire peut être levée par la dessiccation des embryons somatiques.

Les plantules régénérées n'échappent pas au risque de la variation somaclonale étant donné qu'on a largement fait usage du 2,4-D. Toutefois, sachant que la régénération peut être effectuée sur des milieux renfermant de faibles doses de 2,4-D et que le dattier est réputé stable au plan génétique (Othmani, 1998), un contrôle de l'état de variation de la descendance semble pouvoir être obtenu en modulant d'une part les quantités d'auxines employées et d'autre part les délais de repiquage et de séjour des explants dans les milieux de culture. Sur le plan pratique, les résultats obtenus permettent d'envisager le passage en bioréacteur en vue de la production de semences artificielles (Daikh et Demarly, 1987).

Remerciements

Les auteurs adressent leurs remerciements à l'Agence internationale de l'énergie atomique qui a soutenu ces activités de recherche à travers le projet « Contrôle de la fusariose du palmier dattier, RAF/5/035 ».

Bibliographie

- Bradford MM 1976 —
A rapid and sensitive method for quantification of microgam quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Ann Bioche 72 : 248-254.
- Bulvar C, Monin J 1960 —
Graines et embryons dormants d'*Evonymus europaeus* : Différentes modalités dans l'éveil de leur dormance par l'acide gibbérellique.
C R Acad Sci 250 : 4197-4199.
- Bulvar C, Monin J 1963 —
Étude du comportement d'embryons de *Fraxinus excelsior* L. prélevés dans des graines dormantes et cultivés *in vitro*.
Phyton 20 (2) : 115-125.
- Daguin F, Letouze F 1988 —
Régénération du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par embryogenèse somatique : amélioration de l'efficacité par passage en milieu liquide agité.
Fruits 43 : 191-194.
- Daikh H, Demarly Y 1987 —
Résultats préliminaires sur l'obtention d'embryons somatiques et la réalisation de semences artificielles de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.).
Fruits 42 : 593-596.
- Dira N 1983 —
Multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par la culture *in vitro* de bourgeons axillaires et de feuilles qui en dérivent. C R Acad Sc Paris Ser III 296 : 1077-1082.
- El Hadrami I, D'auzak J 1992 —
Effects of growth regulator on polyamine content and peroxidase activity in *Hevea brasiliensis* callus.
Ann Bot 69 : 323-325.
- Fki L 1998 —
Embryogenèse somatique et régénération de plants de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à partir de cultures embryogènes en suspension. DEA, université du Sud, Tunisie, 74 p.
- Gaspar T, Penel C, Hagege D, Greppin H 1991 —
Peroxydases in plant growth, differentiation, and development process. In Biochemical, Molecular, and Physiological Aspects of Plant Peroxydases. J Lobarzewski, H Greppin, C penel, Tn Gaspar eds. Univ. of Genève, Switzerland, 249-280.
- Masmoudi R 1999 —
L'embryogenèse somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : induction et maintien des structures embryogènes, caractérisation biochimique. Thèse de doctorat, université de Sfax, 113 p.
- Mathews H, Schopke C, Carcamo R, Chavarriga P, Fauquet C, Beachy RN 1993 —
Improvement of somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava.
Plant Cell Rep 82 : 328-333.
- Munier P 1973 —
Le palmier dattier. Maisonneuve et Larose, Paris, 209 p.
- Murashige T, Skoog F 1962 —
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15 : 473-497.
- Othmani A 1997 —
Étude de l'influence du facteur hormonal sur la variabilité chez *Phoenix dactylifera* L.
DEA, université de Tunis-II, 62 p.
- Rhoma A 1998 —
La recherche scientifique agricole

au service du palmier dattier.
Rev Agr 21 : 31-34.

Rival A, Alberfenc-Bertossi F, Beule T,
Morcello F, Richaud F, Tregar J,
Verdeil JL, Durand-Gasselín T,
Konan E, Duval Y, Kouame B 1998 —
Multiplication clonale du palmier
à huile par embryogenèse somatique
(*Elaeis guineensis* Jacq.).
Cahiers agricultures 7 : 492-498.

Sharma VK, Jethwani V,
Kothari SL 1993 —
Embryogenesis in suspension
culture of *Datura innoxia* Mill.
Plant Cell Rep 12 : 581-584.

Sedra My H 1994 —
Évaluation de la résistance au
bayoud (*Fusarium oxysporum* f sp
albedinis) chez le palmier dattier.
Comparaison de méthodes
d'inoculation expérimentales

en palmeraie et en pépinière.
Agronomie 14 : 445-452.

Tisserat B 1979 —
Propagation of date palm
(*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*.
J Ex Bot 30 : 1275-1283.

Tisserat B, Demason D 1980 A —
histological study of development of
adventive embryos in organ cultures
Phoenix dactylifera L..
Ann Bot 46 : 465-472.K

Thorpe TA, Gaspar T 1978 —
Changes in isoperoxidases during
shoot formation in tobacco callus.
In vitro 14 : 522-526.

Vieitez FJ, Ballester A,
Vieitez AM 1992 —
Somatic embryogenesis and plantlet
regeneration from cell suspension
cultures of *Fagus sylvatica* L.
Plant Cell Rep 11 : 609-613.