

**EFFET DE LA TENEUR DU MILIEU
DE CULTURE EN NITRATE D'AMMONIUM
SUR LA VITRIFICATION DES TISSUS
DU PALMIER DATTIER (*Phoenix dactylifera* L.)
CULTIVES *IN VITRO***

BOUGERFAOUL, M.,* et ZAID, A.,**

ملخص

يشكل انتفاخ أنسجة نخيل التمر المزروعة داخل الانابيب الزجاجية أحد العوامل التي تحول دون نجاح عملية الاكثار السريع لعدة اصناف وسلالات نخيل التمر.

ومن أجل دراسة هذا المشكل، تم استعمال أربعة أوساط زراعية متباينة من حيث كميات الامنيوم الازوت الكلي المضافة اليها على الاجزاء السفلى للاوراق الباطنية المؤخوذة من فساتل نخيل التمر - صنف اكليد. وعليه فقد أظهرت النتائج الاولية المحصل عليها الدور الفعال لمادة الامنيوم في بروز ظاهرة انتفاخ الانسجة المزروعة.

كما كانت الاوساط الزرعية الغنية بمادة الامنيوم وراء النمو السريع للانسجة المزروعة وبالتالي الحصول على نسبة مئوية عالية من الاجزاء المنتفخة، غير ان الاوساط الزرعية المحتوية على كميات ضئيلة من مادة الامنيوم ابانت تقلصا في نمو الانسجة مع ظهور نسبة مئوية قليلة من الاجزاء المنتفخة.

كلمات جوهرية : نخيل التمر - الاكثار السريع - الامنيوم - الازوت - انتفاخ الانسجة.

* Laboratoire de Physiologie Végétale Programme Palmier Dattier Centre Régional de la recherche Agronomique du Haouz Pré-Sahara, B.P. 533 Marrakech,

** Laboratoire de Physiologie Végétale Département de Biologie Faculté des Sciences : Semlalia B.P. S/15, Marrakech - MAROC -

RESUME

La vitrification des tissus du palmier dattier constitue un grand handicap pour la réussite de la multiplication *in vitro* de certaines variétés et clones sélectionnés .

Pour remédier à ce problème, quatre milieux d'initiation renfermant différents rapports Ammonium / Azote total ont été testés sur des bases de jeunes feuilles de coeurs de rejets de la variété AGUELLID .

Les résultats préliminaires obtenus ont permis d'élucider le rôle déterminant de l'ion Ammonium dans l'apparition du phénomène de vitrification chez les explants mis en culture .

Les milieux riches en nitrate d'ammonium favorisent la croissance des explants et par conséquent la vitrification de leurs tissus (chez 46 à 53% des cultures) . Par contre, sur les milieux pauvres, la croissance est légèrement faible et s'accompagne d'un taux de vitrification allant de 14 à 19% .

MOTS CLES : Palmier dattier ; *Phoenix dactylifera* L. ; *In vitro* ; Nitrate d'ammonium ; Vitrification ; Micropropagation .

ABSTRACT

Vitrification phenomenon of date palm tissues is a handicap for the successful of *in vitro* multiplication of some varieties and selected clones .

In order to overcome such problem, four culture media with different Ammonium / Total Nitrogen ratio are tested . Bottom young leaves offshoots of AGUELLID variety were used .

Preliminary results showed the important role of Ammonium ion in vitrification process .

High levels of Ammonium Nitrate were found to enhance rapid growth and consequently tissue vitrification (46 to 53% of cultures) . While, this phenomenon is reduced to 14 - 19 % in media with low levels of Ammonium Nitrate .

KEY WORDS : Date palm ; *Phoenix dactylifera* L. ; *In vitro* ; Ammonium nitrate ; vitrification ; Micropropagation .

INTRODUCTION

La vitrification des tissus constitue un grand handicap pour la réussite de la multiplication par organogenèse *in vitro* de certaines variétés et clones de palmier dattier. En phase d'initiation, les explants vitrifiés ont un tissu très vacuolé et spongieux qui, au cours des repiquages successifs, finissent par se nécroser. Les jeunes pousses, en phase de multiplication, présentent souvent des feuilles très épaisses et turgescentes, avec parfois une déficience apparente en chlorophylle. Leur croissance demeure très faible et s'accompagne d'un faible taux de multiplication.

Généralement, ces formations hyperhydriques sont fréquemment rencontrées en culture *in vitro* chez les espèces herbacées et ligneuses (GASPAR, 1988). Les études préliminaires réalisées chez ces espèces ont révélé que les facteurs inducteurs ou activateurs possibles de ces phénomènes sont divers (GASPAR, 1988):

- Certains ions (NH_4^+ , ...).
- Certains régulateurs de croissance.
- L'humidité relative du milieu et / ou de l'atmosphère.
- La température.
- Certains gaz (principalement l'éthylène).

Toutefois, des études réalisées chez *Salix babylonica* (DAGUIN et LETOUZE, 1985) et *Castanea sativa* (GASPAR et KEVERS, 1985) ont montré que la nutrition azotée constitue un facteur déterminant dans l'apparition de cet état hyperhydrique.

Au niveau du laboratoire de Physiologie Végétale de Marrakech, l'utilisation du milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962), particulièrement riche en nitrate d'ammonium semble être à l'origine de ces malformations hyperhydriques chez les tissus du palmier dattier cultivés *in vitro*.

Cette étude vise donc à rechercher certaines composantes du milieu qui induisent l'apparition d'un état vitreux chez les cultures, principalement en phase d'initiation de bourgeons. En fait, nous étudierons le comportement d'une variété très affectée par ce phénomène de vitrification sur des milieux renfermant différentes teneurs en nitrate d'ammonium.

MATERIELS ET METHODES

Matériel Végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de bases de jeunes feuilles de coeurs de rejets de la variété AGUELLID (AGL). Ces rejets ont un poids moyen de 2 à 5 kgs et proviennent de la Station Phoenicicole et de la Palmeraie d'Ouled El Hadj (Zagora).

Leur dissection consiste à éliminer la partie terreuse et les palmes épineuses externes jusqu'à l'apparition des tissus tendres du coeur .

Les introductions des rejets ont été effectuées en deux périodes distinctes : Juillet et Décembre 1990 .

Désinfection du coeur de rejet

La technique de désinfection consiste dans un premier temps en un trempage du coeur dans une solution de Mancozan (3 g/l) pendant 20 minutes . Après trois rinçages à l'eau distillée stérile, le coeur est désinfecté sous vide pendant 20 minutes dans une fiole contenant une solution d'eau de Javel à 12% additionnée de 300 mg/l de permanganate de potassium .

Prélèvement et ensemencement des explants

Les bases de jeunes feuilles du coeur de rejet sont prélevées aseptiquement (sous hotte à flux laminaire) à l'aide d'une paire de pinces et d'un scalpel stérilisés au préalable dans une étuve à 200°C pendant trois heures .

Les explants prélevés ont une taille moyenne de 0,5 à 1 cm et sont ensemencés sur les milieux comparatifs permettant d'étudier leur comportement *in vitro* .

Milieux des Cultures

Les milieux utilisés, au nombre de quatre, renferment la solution minérale de base de MURASHIGE et SKOOG (1962) . Une variation de leur concentration en nitrate d'ammonium a été adoptée et ceci de façon à établir des rapports Ammonium/Azote total voisins de 0,086 ; 0,172 ; 0,257 et 0,343 (Voir tableau I)

Tableau I : Gamme de milieux de culture proposés pour l'étude du phénomène de vitrification chez les tissus du palmier dattier (variété Aguellid) cultivés *in vitro* .

Milieu	MO	M1	M2	M3
NH ₄ ⁺ (méq/l)	20.600	9.940	4.330	1.950
NO ₃ ⁻ (méq/l)	39.400	28.740	23.730	20.750
N total (méq/l)	60.000	38.680	28.680	22.700
NH ₄ ⁺ / N total	0.343	0.257	0.172	0.086
NH ₄ NO ₃ (méq/l)	20.600	9.940	4.930	1.950
NH ₄ NO ₃ (mg/l)	1650.000	759.000	394.000	156.000

milieux d'initiation

En plus de la solution minérale de base, les milieux d'initiation contiennent des vitamines de SKOOG (1 ml/l), le myo-inositol (100 mg/l), le PVP (2000 mg/l), la glutamine (200 mg/l), l'adénine (40 mg/l), le phosphate monosodique (150 mg/l), le sucre (30000 mg/l), l'agar (0,8%) et une combinaison hormonale dont le rapport Auxines/Cytokinines est de l'ordre de 50 .

milieux de multiplication

Ces milieux renferment la même composition que ceux d'initiation . La seule différence réside dans la balance hormonale associée à ces milieux et dont le rapport Auxines/Cytokinines est voisin de 1,6 .

Conditions de Culture

Les cultures sont maintenues pendant les six premiers mois dans les conditions de température et d'éclairage contrôlées ($27 \pm 2^\circ\text{C}$, obscurité totale).

Leur entretien est assuré par des repiquages successifs espacés de quatre semaines . Il consiste à éliminer les cals développés et les parties brunies et à transférer les explants sur les milieux frais correspondants .

Au septième repiquage, les cultures sont transférées sur des milieux de multiplication et incubées en lumière diffuse .

A partir du dixième mois d'ensemencement, les cultures ayant manifesté un début de bourgeonnement sont fragmentées et repiquées sur les mêmes milieux de multiplication . Leur passage aux conditions photopériodiques (16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) est nécessaire pour stimuler leur croissance et leur multiplication .

RESULTATS

Comportement *in vitro* des explants sur les milieux comparatifs d'initiation

première introduction : (Juillet 90)

Le tableau II regroupe les résultats obtenus sur le comportement des explants cultivés *in vitro* sur les quatre milieux comparatifs d'initiation MO, M1, M2 et M3 .

Croissance des tissus

Après 1 mois de culture, les explants ont manifesté des états de développement très variables en fonction des milieux de culture utilisés .

Sur le milieu témoin MO, la croissance a été très rapide et s'accompagne d'une certaine prolifération des explants .

Tableau II : Comportement des explants de la variété Aguellid sur les milieux d'initiation :
(Première introduction : Juillet 1990)

Milieux	MO	M1	M2	M3
Nombre de rejets Cultures initiales	3	3	3	3
	38	44	36	36
Repiquages	1 2 3 4 5 6	1 2 3 4 5 6	1 2 3 4 5 6	1 2 3 4 5 6
	13 23 31 50 63 68	27 35 45 52 57 66	28 33 39 50 56 67	22 39 53 61 67 72
% de cultures contaminées cumulées	16 26 37 42 55 63	18 30 32 44 57 66	8 22 22 39 42 47	36 44 50 58 67 72
% de cultures brunies cumulées	53	32	19	14
% de cultures vitrifiées	+++	++	++	++
Callogenèse	+++	++	++	++
Croissance des cultures	+++	++	++	++

+++ : Croissance rapide
 ++ : Croissance moyenne
 + : Croissance faible
 - : Absence de croissance

Généralement, ces explants atteignent leur maximum de croissance au bout du troisième repiquage sur le milieu MO, le développement des explants demeure moins important lors des premiers passages sur les milieux M1, M2 et M3 et dépend largement de leur teneur respective en nitrate d'ammonium .

A partir du sixième repiquage, l'évolution *in vitro* de certains explants s'accompagne de quelques transformations morphologiques pouvant être à l'origine d'une différenciation de structures organogènes .

Parfois, on assiste à une prolifération importante des ébauches foliaires chez les explants provenant de la zone méristématique interne . L'élimination de ces feuilles s'est avérée nécessaire afin de favoriser le développement des tissus de la base qui possèdent des potentialités morphogéniques importantes .

Vitrification des tissus

L'apparition des tissus vitrifiés chez les explants mis en culture a été observée sur les quatre milieux d'initiation, mais avec des fréquences très variables .

Sur le milieu MO, la croissance trop active a entraîné un pourcentage de vitrification de l'ordre de 53% . Des valeurs de 32%; 19% et 14% correspondent aux pourcentages observés respectivement sur les milieux M1, M2 et M3 .

En général, un début de vitrification se manifeste au niveau des couches épidermiques externes des tissus de l'explant en contact direct avec le milieu de culture . En fonction des repiquages, ce phénomène s'amplifie et atteint tous les tissus de l'explant . Ces derniers ont une texture molle et spongieuse et finissent par se nécroser lorsqu'ils sont repiqués sur les milieux correspondants (Figure 1). En plus, nous avons constaté que les explants provenant des feuilles externes entourant le bourgeon apical sont les plus affectées par ce problème de vitrification .

Formation des cals

A partir du premier mois d'ensemencement, des proliférations tissulaires indifférenciées se forment sur les explants mis en culture . La fréquence d'apparition de ces cals sur le milieu MO reste légèrement supérieure à celle observée chez les autres milieux (M1, M2 et M3) .

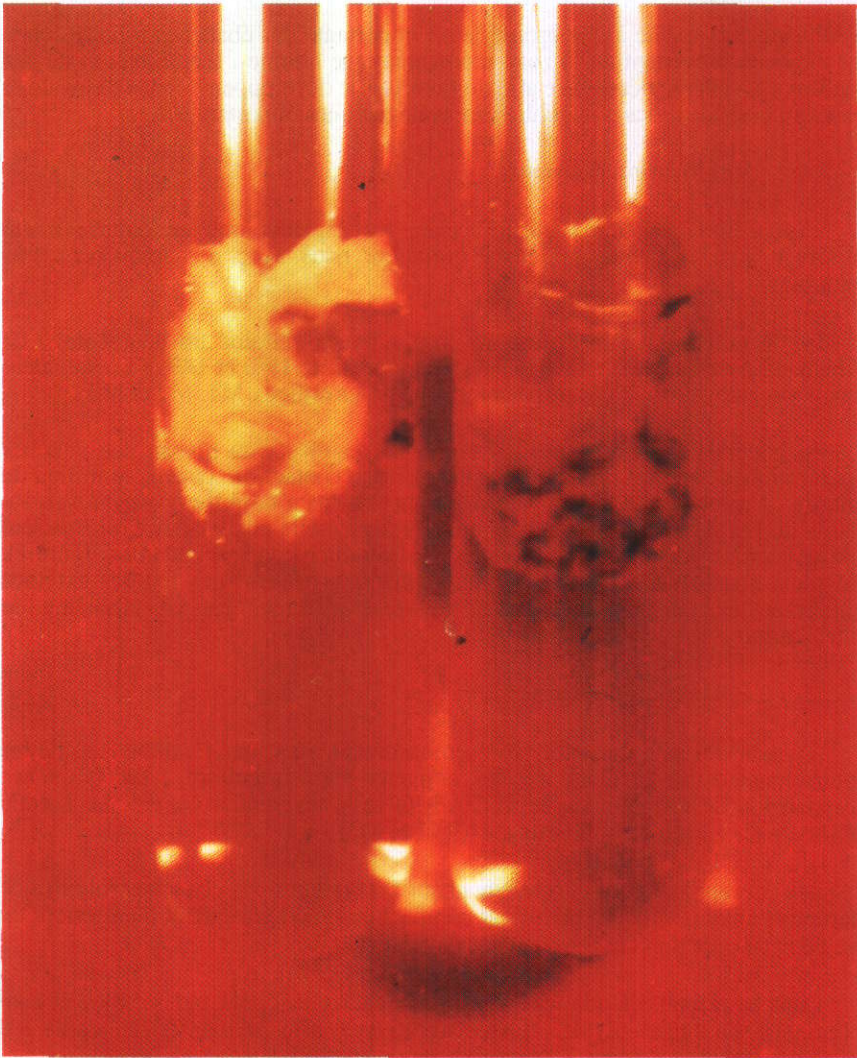
Les cals apparaissent généralement sur les bordures des ébauches foliaires de certains explants . Ils ont un aspect compact et hyperhydrique et manifestent un faible développement et finissent par dégénérer .

Dans la présente étude, ces formations callogènes sont indésirables et sont éliminées au moment de chaque repiquage afin d'orienter le cours de développement des tissus de l'explant vers un état organogène .

Fig 1 : Evolution de la vitrification chez les tissus des explants de la variété AGUELLID .

a : Début d'apparition de la vitrification chez les tissus .

b : Les tissus vitrifiés présentent une texture molle et spongieuse et finissent par se nécroser .



Apparition des contaminations bactériennes endogènes

En dépit de la désinfection appliquée aux coeurs de rejets, lors de la phase introduction *in vitro*, nous nous sommes confrontés au problème d'apparition des contaminations bactériennes endogènes dès les premières semaines d'ensemencement.

Au premier repiquage, ces contaminations affectent en moyenne plus de 25% des cultures sur les milieux M1, M2 et M3 (Figure 2). L'évolution *in vitro* des explants s'accompagne de pourcentages de contaminations de plus en plus importants. Ceux-ci se stabilisent au bout du sixième repiquage entre 66 et 72%.

Brunissement des tissus

Les brunissements des tissus demeurent très importants sur le milieu M3 dès le premier mois d'ensemencement (Figure 3). Les pourcentages de brunissement observés sur les autres milieux paraissent plus ou moins variables en fonction des repiquages. Ils atteignent environ 30% des cultures au bout du troisième repiquage.

En général, une brève comparaison entre l'évolution des pourcentages de contaminations et l'évolution des pourcentages de brunissements montre que celles-ci évoluent de façon parallèle au cours des repiquages. En plus, la lignification plus ou moins avancée des tissus de coeurs de rejets, lors du prélèvement des explants, paraît être à l'origine de ces pourcentages élevés de brunissements.

Développement de bourgeons axillaires et formation du tissu organogène

Des cas de développement de bourgeons axillaires à l'aisselle des bases de jeunes feuilles cultivées sur les quatre milieux d'initiation ont été très rares.

Généralement, les bases de feuilles externes renfermant des bourgeons axillaires bien individualisés ont été éliminées à cause de leur lignification intense. Seuls les explants présentant de très petits bourgeons ont été récupérés. Ces derniers, en se développant, donnent naissance à des feuilles.

Cependant, à partir du sixième repiquage, certains explants ont manifesté une différenciation de structures tissulaires compactes et blanchâtres possédant des propriétés organogènes.

En général, aucune évolution ou transformation morphologique pouvant être à l'origine d'une néoformation des bourgeons n'a été constatée chez les explants mis en culture. Ces derniers ont un comportement normal au cours de leur passage sur les milieux d'initiation.

Deuxième introduction : Décembre 90

Vu l'importance des problèmes de contaminations bactériennes endogènes et de brunissements observés chez les cultures initiales introduites en Juillet 90 de la Station Phoenicicole de Zagora, nous avons jugé intéressant de répéter cette première partie de notre étude, tout en adoptant une série de mesures :

Fig 2 : Evolution des contaminations bactériennes endogènes chez les explants de la variété AGUELLID
(Première introduction : Juillet, 1990)

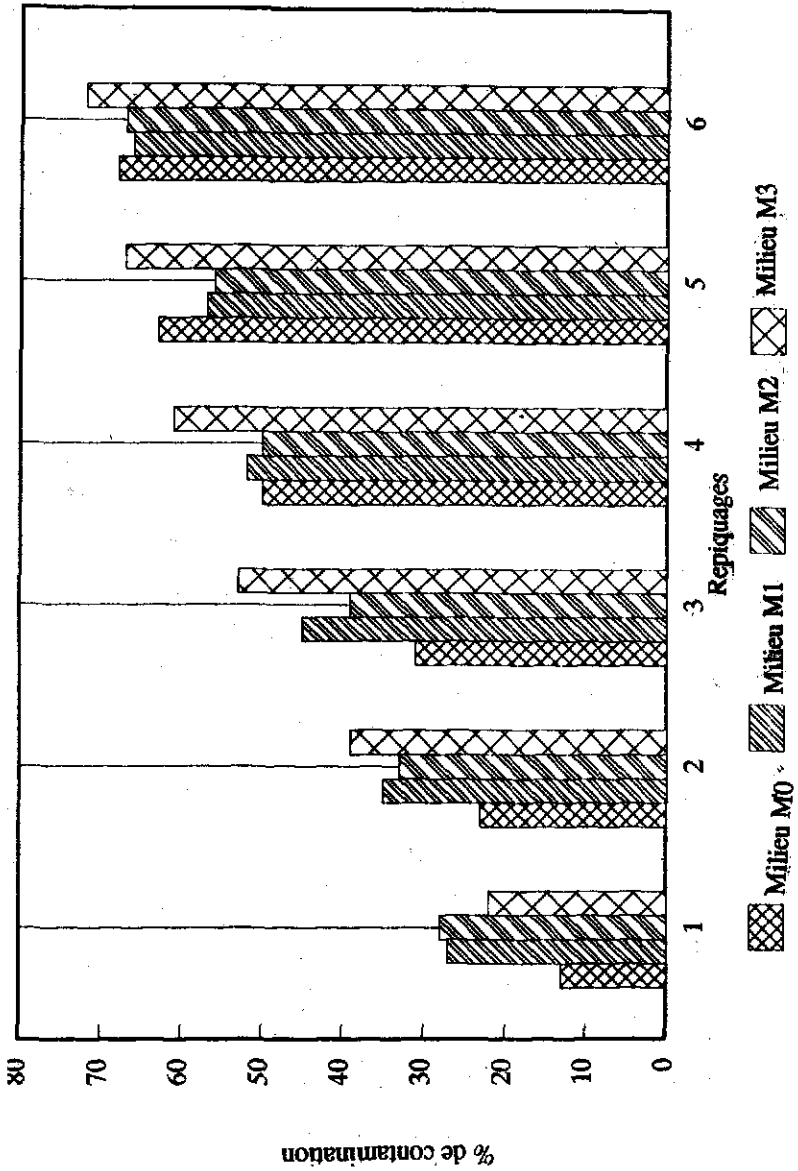
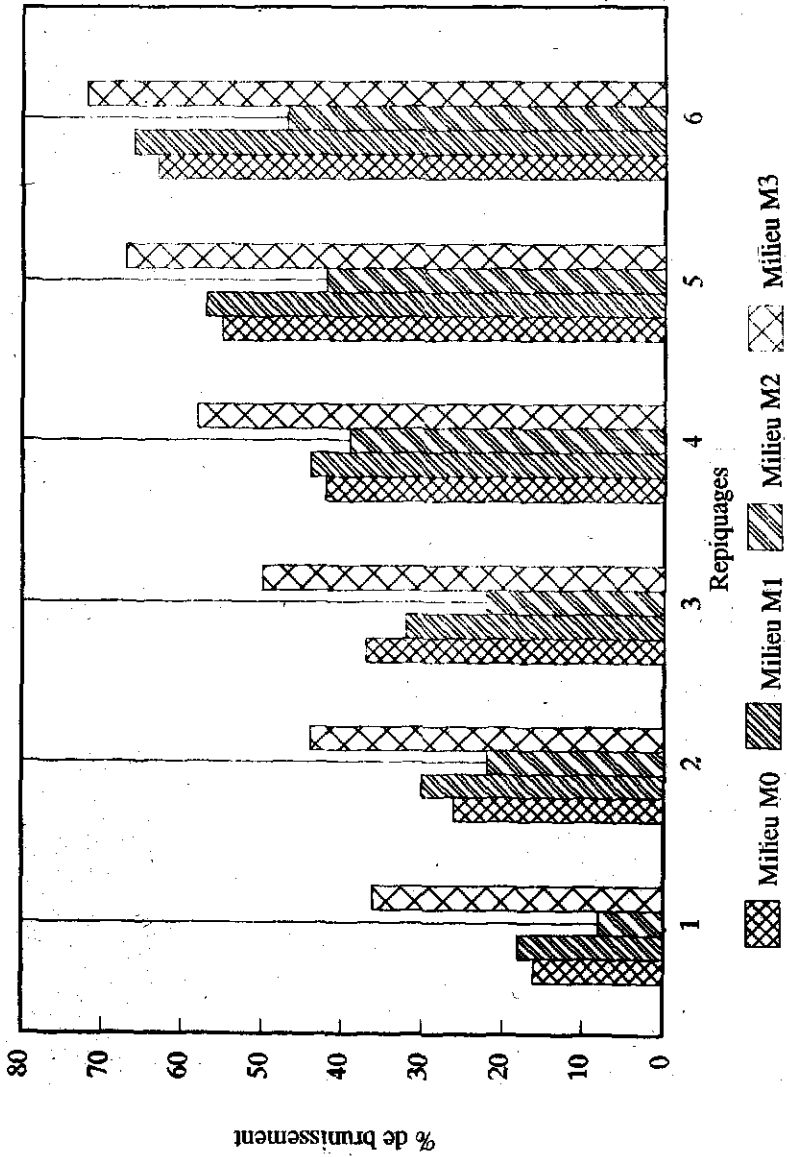


Fig 3 : Evolution des brunissements chez les explants de la variété AGUELLID
(Première introduction : Juillet, 1990).



- Diversifier la source d'approvisionnement en rejets dans l'espoir de trouver un matériel végétal relativement sain .
- Apporter certaines améliorations à la technique de désinfection suivie au niveau du laboratoire .

Dans cet esprit, des rejets de la même variété ont été prélevés de la palmeraie d'Ouled El Hadj, hors de la Station Expérimentale Phoenicicole de l'INRA (Zagora) .

La nouvelle technique de désinfection, conseillée par certains experts (AHLOOWALIA et MARTIN, communication personnelle) pour son efficacité chez les espèces herbacées, consiste en un trempage rapide des explants dans de l'alcool éthylique absolu, suivi d'une désinfection dans une solution de l'eau de Javel à 1,2% pendant 5 minutes et enfin plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile.

Le tableau III regroupe les résultats préliminaires obtenus sur le comportement des explants cultivés *in vitro* sur les mêmes milieux d'initiation .

croissance des tissus

L'évolution des tissus des explants s'accompagne d'un gonflement caractérisant la turgescence des cellules suite à leur mise en culture . Leur croissance sur les milieux MO et M1 reste toujours très importante au cours des trois premiers repiquages .

Les milieux M2 et M3 ont manifesté un développement variable mais relativement inférieur à celui observé sur les milieux précédents .

Au bout du troisième repiquage, on assiste à une chute de la croissance des explants surtout sur les milieux MO et M1 .

vitrification des tissus

Les premiers cas de vitrification ont été observés sur les milieux MO et M1 qui ont induit une croissance trop active chez les explants et ceci dès les premiers repiquages .

L'utilisation des milieux M2 et M3 a été aussi responsable de l'apparition des pourcentages de vitrification, de l'ordre de 24% et 19% respectivement .

L'évolution de la vitrification chez les tissus des explants reste similaire à celle observée lors la première introduction . Seulement, dans ce cas, les pourcentages observés sur les milieux M1, M2 et M3 sont relativement supérieurs à ceux obtenus précédemment .

Tableau III : Comportement des explants de la variété Aguellid sur les milieux d'initiation ;
(Deuxième introduction : Décembre 1990)

Milieux	MO	M1	M2	M3
Nombre de rejets Cultures initiales Repiquages	3	3	4	4
	24	28	25	27
% de cultures contaminées cumulées	1 2 3 4 5 6	1 2 3 4 5 6	1 2 3 4 5 6	1 2 3 4 5 6
	25 33 54 58 67 75	29 36 46 57 61 68	32 44 56 68 76 76	30 45 59 67 70 70
% de cultures brunies cumulées	17 25 41 58 67 71	14 32 39 50 57 66	20 46 52 60 68 68	26 37 44 63 74 74
	46	39	24	19
Callogénèse	++	++	++	+
Croissance des cultures	++ +++ +++ + - - -	+++ +++ +++ + - - -	+++ +++ +++ + - - -	++ ++ + - - -

+++ : Croissance rapide
 ++ : Croissance moyenn
 + : Croissance faible
 - : Absence de croissance

formation des cals

Le développement des cals a été observé, de manière plus ou moins abondante, sur les milieux M0, M1 et M2, aussi bien sur les ébauches foliaires que sur les tissus de la base des explants. Une callogenèse, moins prononcée a été obtenue chez les cultures initiées sur le milieu M3.

La cinétique de formation de ces cals demeure très rapide pendant les deux premiers repiquages. Cependant, leur élimination suite à leur dégénérescence a limité considérablement la fréquence de leur réapparition.

apparition des contaminations bactériennes endogènes

Malgré les améliorations apportées à la technique de désinfection, le problème bactérien reste encore posé et les pourcentages de contaminations, évoluant rapidement avec les repiquages, sont similaires à ceux obtenus lors de la première introduction (Figure 4).

brunissement des tissus

Les courbes d'évolution des brunissements suivent presque la même allure que celles des contaminations (Figure 5).

Les légères variations des pourcentages de brunissements observées sur les milieux M0, M1 et M3 sont probablement dûes aux différents degrés de lignification des explants.

développement des racines

Le développement de certains explants *in vitro* s'accompagne d'une apparition de structures tissulaires à leur base. L'évolution de ces structures a donné naissance à des racines au cinquième repiquage sur les milieux M1 et M2.

Comportement in vitro des explants sur les milieux de multiplication

première introduction : juillet 1990

Au septième repiquage, les cultures ont été transférées sur des milieux de multiplication renfermant les mêmes rapports Ammonium / Azote total que ceux d'initiation.

Les cultures ayant manifesté un début de bourgeonnement sur le milieu d'initiation M2 ont donné naissance à de petites masses blanchâtres (bourgeons initiaux) après quatre passages sur le milieu de multiplication M'2 (Figure 6).

Les autres cultures restantes ont été repiquées régulièrement sur leur milieu correspondant. Cependant, celles-ci n'ont manifesté aucun signe de bourgeonnement (Tableau IV).

deuxième introduction : Décembre 1990

A partir du septième repiquage, les cultures restantes ont été transférées sur les milieux de multiplication correspondants. Leur évolution *in vitro* n'a pas été accompagnée, jusqu'à présent, d'aucun signe de néoformation de structures organogènes.

Fig 4 : Evolution des contaminations bactériennes endogènes chez les explants de la variété AGUELLID
(Deuxième introduction : Décembre, 1990)

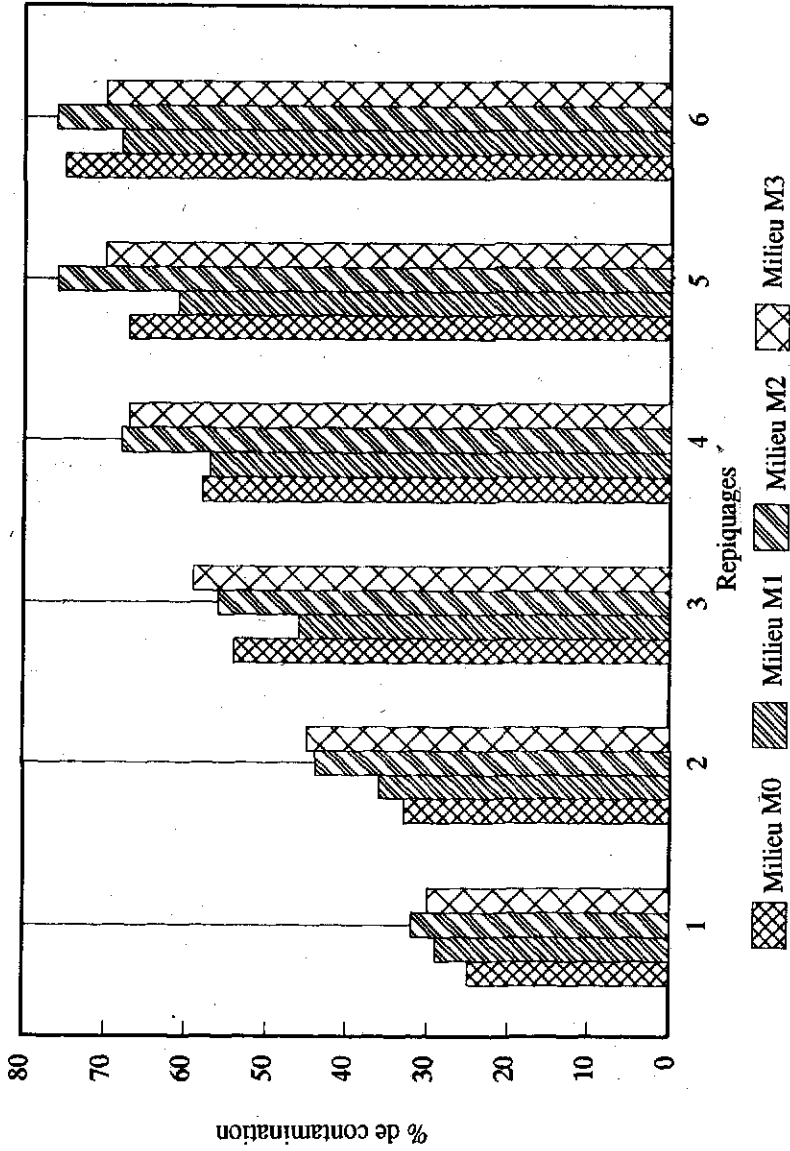
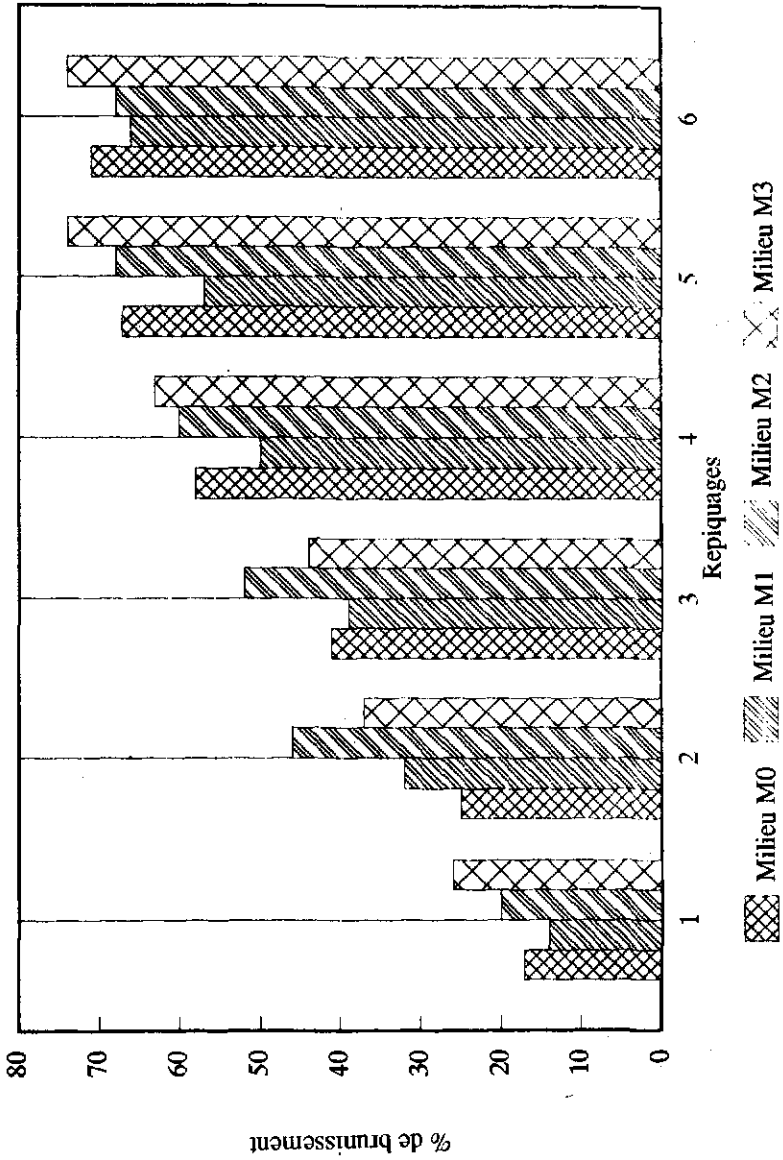


Fig 5 : Evolution des brunissements chez les explants de la variété AGUELLID
(Deuxième introduction : Décembre, 1990)



**Fig 6 : Début de réaction chez un explant de la variété AGUELLID
(Formation de bourgeons et de pousses feuillées).**

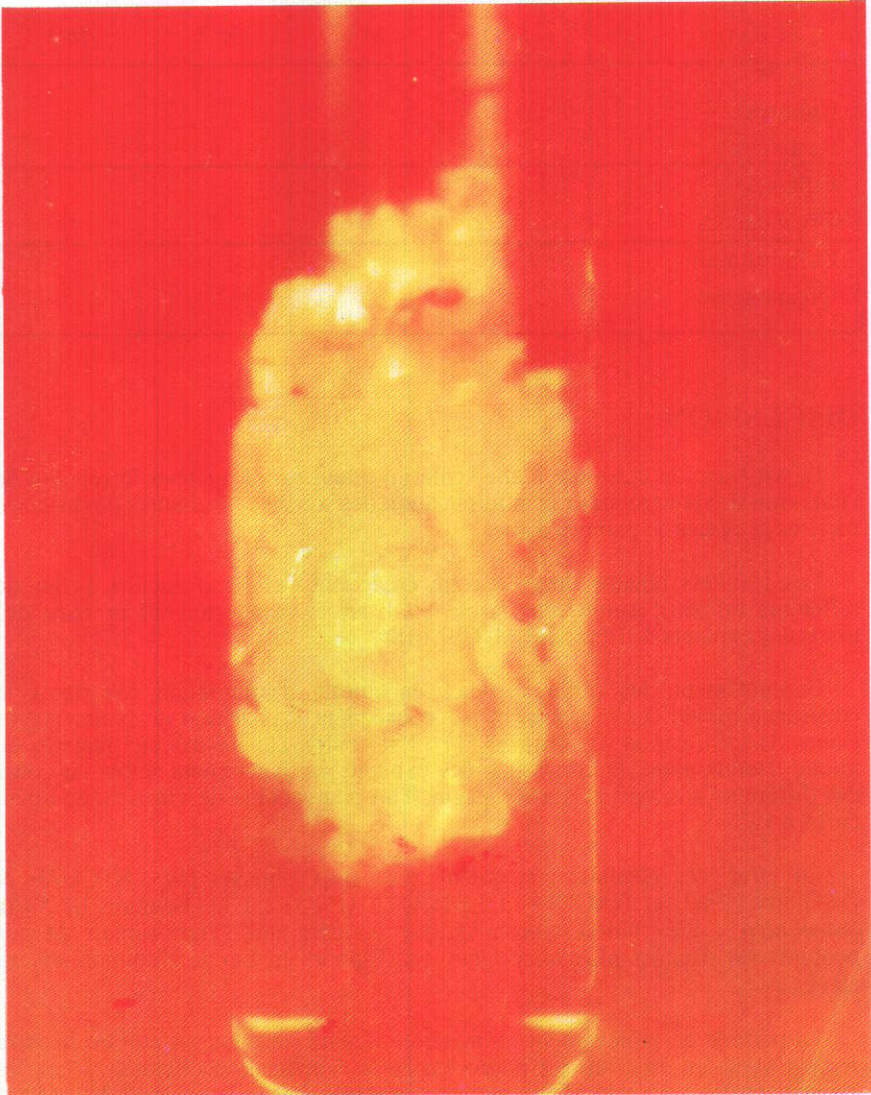


Tableau IV : Comportement des cultivars sur les milieux de multiplication
(Première introduction : Juillet, 1990)

Milieux	M'O	M'1	M'2	M'3
Cultures Restantes	3	8	7	5
Cultures Organogènes	0	0	2	0
Cultures non Organogènes	3	8	5	5

DISCUSSION

La vitrification constitue à elle seule un grand handicap pour la réussite de l'initiation des bourgeons et la multiplication des souches résultantes de certaines variétés et clones de palmier dattier .

Les résultats obtenus lors de cette étude ont permis d'élucider l'effet de différents rapports Ammonium/Azote total sur le comportement *in vitro* des tissus des explants de la variété AGUELLID .

Généralement, les milieux riches en nitrate d'ammonium favorisent la croissance rapide des explants, et par conséquent l'apparition de pourcentages élevés de vitrification (de 46 à 53 %) . Par contre, sur les milieux pauvres en nitrate d'ammonium, la croissance des explants est légèrement faible au cours des différents passages et s'accompagne d'un pourcentage de vitrification allant de 14 à 19% .

En effet, ces résultats concordent avec ceux obtenus par LETOUZE et DAGUIN (1983) et DAGUIN et LETOUZE (1985) sur les boutures de *Salix babylonica* . L'évolution morphologique caractérisant l'état vitreux de ces boutures est d'autant plus importante que l'apport en nitrate d'ammonium est élevé .

La période de prélèvement du matériel végétal introduit en culture *in vitro* semble avoir un effet sur les pourcentages de vitrification obtenus . Chez les explants prélevés au mois de décembre et ensemencés sur les milieux M1, M2 et M3 de plus en plus pauvres en nitrate d'ammonium, les pourcentages de vitrification sont légèrement supérieurs à ceux observés lors du prélèvement du mois de juillet .

L'apparition des contaminations bactériennes "endogènes" est souvent associée aux cas de brunissement observé chez les tissus des explants de palmier dattier mis en culture .

Les pourcentages élevés de brunissement obtenus sont probablement dus au problème de lignification des tissus des explants de la variété AGUELLID . Cette lignification est à l'origine de la faiblesse du nombre d'explants prélevés sur les rejets, surtout lors de la deuxième introduction (Décembre 1990) .

Le matériel végétal originaire de différentes localités (Station Expérimentale Phoenicicole, Douar Ouled El Hadj) présente les mêmes niveaux de contaminations bactériennes et les techniques de désinfection utilisées paraissent donc inadéquates .

Toutes ces contraintes ont été à l'origine d'une élimination massive des cultures et par conséquent d'un faible pourcentage de réaction chez les explants initiés depuis juillet 1990 .

En effet, les différents types de comportement des tissus des explants mis en cultures (brunissement, contamination, vitrification, absence de réaction,...) sont liés à plusieurs facteurs, à savoir les états physiologique et sanitaire du rejet, la lignification, l'âge du rejet et du pied mère ainsi que leur entretien en palmeraie (fertilisation, irrigation,...) .

Ainsi, vu la difficulté de contrôle de tous ces facteurs à la fois, nous avons opté pour l'introduction d'un nombre suffisant de rejets (3 à 4 rejets par milieu testé) afin de compenser les pertes occasionnées par ces contraintes et de réussir la multiplication par organogenèse *in vitro* de la variété AGUELLID .

En fait, cette étude a contribué à l'initiation de bourgeons chez cette variété classée parmi les géotypes les plus difficiles à multiplier . L'évolution *in vitro* de ces bourgeons a donné naissance à des souches réactives qui constituent la base de la multiplication à grande échelle du palmier dattier .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DAGUIN F. et LETOUZE R., 1985 . Relations entre hypolignification et état vitreux chez *Salix babylonica* en culture *in vitro* : Rôle de la nutrition ammoniacale J.Can. Bot., **63** (2), 324-326 .

GASPAR TH., KEVERS C., DEBERGH R., MAENE L., PAQUES M. and BOXUS P., 1987 .Vitrification : morphological, physiological and ecological aspects . In : Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol . 1 / General Principles and Biotechnology . Edited by J.M. BONGA et D.J. DURZAN, Martinus Nijhoff Publishing, Dordrecht (N L), pp : 152-166 .

GASPAR TH. and KEVERS C., 1985 . Colbalt prevention of vitrification process in carnation plant *physiol.*, **77** (Suppl.), 13.

GASPAR. TH., 1988 . Aspect physiologique de l'organogénèse *in vitro* . Dans : Culture de Cellules, Tissus et organes Végétaux: Fondements Théoriques et Utilisations Pratiques . Edité par J.P. ZRYD, Editions Polytechniques Romandes, Lausanne, Suisse, 1988, pp : 69-87 .

LETOUZE R. et DAGUIN F., 1983 . Manifestation spontanée et aléatoire d'une croissance anormale en culture *in vitro* : Recherche de marqueurs métaboliques . Rev. Can. Biol. Exp.**42**, 23-28 .

MURASHIGE T. and SKOOG F., 1962 A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture . *Physiol . Plant.*, **73**, 473-497 .