

Potentialités androgénétiques du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. et culture *in vitro* d'anthères

Nejla Chaibi (1, 2), Abdallah Ben Abdallah (2, 3), Hanène Harzallah (1), Philippe Lepoivre (3)

(1) Faculté des Sciences de Tunis. 2092 El Manar Tunis (Tunisie). E-mail : tulipetn2001@yahoo.fr

(2) Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie. Rue Hédi Karray, 2049 Ariana (Tunisie).

(3) Unité de Phytopathologie. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique).

Reçu le 18 juin 2002, accepté le 18 septembre 2002.

L'analyse des potentialités androgénétiques de cinq pollinisateurs du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) a été réalisée. Nous avons défini un repère phénotypique du stade optimum de mise en culture *in vitro*, préconisé un prétraitement des anthères à partir d'un choc thermique à 37–38 °C et une optimisation du milieu de culture en retenant celui de Murashige et Skoog additionné d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et de 2-isopentenylaminopurine (2-IP) associés au charbon actif. Ces conditions améliorent significativement le pourcentage de division des microspores et ont permis de choisir le pollinisateur T106 comme génotype répondant le mieux à l'androgénèse.

Mots-clés. *Phoenix dactylifera*, haplodiploïdisation, microspore, oxydation, anthère, milieu de culture.

Genetic potentialities of five male date palm genotypes, and *in vitro* culture of anthers. The experimental results derived from the study of five date palm (*Phoenix Dactylifera* L.) genotypes indicate that the ability of microspores to divide varies with genotype and culture medium. The highest frequency of microspore division is obtained with the induction medium [Murashige and Skoog (MS 1962) mineral elements, 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), 2-isopentenylaminopurine (2-IP)] containing activated charcoal. The pollinator T106 was considered as the most efficient genotype in our experimentation.

Keywords. *Phoenix dactylifera*, haplodiploïdisation, microspore, anther, oxidation, culture medium.

1. INTRODUCTION

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante dioïque à reproduction allogame. Les palmiers mâles sont appelés communément dokkars ou pollinisateurs. Les dokkars issus de semis (graines) étaient initialement utilisés d'une manière plutôt non sélective. Toutefois, les agriculteurs ont vite réalisé la valeur que présentent certains dokkars tant sur le plan de la qualité et de la quantité du pollen produit que sur celui de l'effet métaxénique.

Après avoir identifié les bons dokkars au sein des populations mâles de palmier dattier issues de semis, certains agriculteurs ont été incités à les multiplier végétativement par rejets (Djerbi, 1995). Cette pratique est restée cependant très limitée. Par ailleurs, de nouvelles sélections de dokkars avaient été obtenues dans le monde grâce à des programmes d'amélioration. En effet, la sélection génétique du palmier dattier fait l'objet de recherches depuis très longtemps. Dès 1912, les Américains ont mis en place un programme d'amélioration génétique basé sur une sélection par rétrocroisement pour essayer d'obtenir

des variétés femelles améliorées. Ce programme visant d'abord l'étude de l'héritabilité chez le cultivar 'Deglet Nour', a permis de tirer plusieurs observations concernant la possibilité de transmission de la couleur du fruit. Par contre, il n'a pas permis de retenir, après trois générations successives, une lignée issue de semis meilleure que 'Deglet Nour' (Nixon *et al.*, 1965).

Les travaux menés à El Arfian en Algérie durant une vingtaine d'années, sur l'amélioration génétique avaient pour objectifs de produire une lignée meilleure ou conforme à 'Deglet Nour' en espérant pouvoir assainir la variété et rendre possible la multiplication par voie de graines. Ils ont abouti à la sélection d'un pollinisateur du cultivar 'Ghars' à floraison précoce (mois de janvier) et produisant du pollen en grande quantité et de bonne qualité. Aucun résultat probant n'a été publié concernant la sélection de variétés femelles de bonne qualité ou ayant d'autres caractères recherchés (Monciero, 1961).

Par ailleurs, le projet d'amélioration génétique du palmier dattier entrepris par le Département d'agriculture aux États-Unis de 1948 à 1964, a permis de retenir des lignées très intéressantes après le 4^e

rétrocroisement, aussi bien des palmiers mâles que des palmiers femelles. La principale contrainte ayant limité la portée de ces travaux était le temps que nécessite un rétrocroisement, soit 5 années. Pour quatre rétrocroisements, 25 années sont nécessaires, d'où l'importance capitale de l'utilisation des biotechnologies permettant de raccourcir ce temps (haplodiploïdisation, culture de tissus, assistance par biologie moléculaire, etc.).

Dans ce contexte, la multiplication rapide de *Phoenix dactylifera* par les techniques de culture *in vitro* constitue une voie pouvant apporter des solutions dans un délai raisonnable, afin de propager les bons pollinisateurs et de les diffuser au niveau des agriculteurs. La culture *in vitro* du palmier dattier révèle un certain nombre de difficultés. Celles-ci sont liées entre autres au manque d'informations sur les capacités organogènes et embryogènes des cultivars multipliés en relation avec les divers facteurs du milieu de culture.

L'amélioration génétique des dokkars et la fixation des lignées les plus performantes constituent une alternative à plus long terme. Les haplométhodes, et en particulier l'androgénèse, permettent d'accélérer les programmes d'amélioration grâce à l'obtention rapide d'individus homozygotes, ce qui réduit le nombre de cycles d'autofécondation nécessaires à la fixation des lignées chez les plantes allogames. Certains acquis nous ont incités à entamer un travail d'haplodiploïdisation se basant sur les premiers travaux effectués par Brochard (1981), Bouguédoura (1988) et Ben Abdallah *et al.* (1999).

Le problème d'oxydation est particulièrement épineux dans la culture d'anthères, c'est pourquoi l'utilisation d'un antioxydant dans le milieu est devenue une nécessité. Reuveni *et al.* (1972) puis Reuveni et Kipnis (1974) ont été parmi les premiers à montrer que le charbon actif était un des antioxydants les plus efficaces. Depuis, d'autres chercheurs l'ont utilisé avec succès pour lutter contre le brunissement (Tisseart *et al.*, 1979 ; Letouze, Daguin, 1988 ; Ben Abdallah, 1989).

Notre travail vise l'évaluation des potentialités androgénétiques chez le palmier dattier en définissant des marqueurs phénologiques du stade adéquat d'évolution des microspores pour la mise en culture et en étudiant les différents facteurs contrôlant les premières étapes de la culture d'anthères, notamment le génotype, les conditions de culture *in vitro* ainsi que les milieux de culture.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal

Les cinq génotypes (T23, T25, T67, T105, T106) ayant fait l'objet de notre expérimentation sont choisis parmi les 203 pollinisateurs constituant la collection

de l'Institut National de Recherche Agronomique à Tozeur (Tunisie). La période de prélèvement des inflorescences mâles s'étend de la fin du mois de février jusqu'au début du mois de mai. Les épis prélevés sont stockés au froid. Le matériel végétal mis en culture est constitué d'anthères. Les analyses statistiques sont réalisées d'après Jeller (1979).

2.2. Mise en culture *in vitro*

Les boutons floraux sont lavés à l'eau distillée, puis désinfectés dans une solution de chlorure de mercure (0,01 g/l) pendant 20 minutes. Ils subissent ensuite trois rinçages à l'eau distillée stérile sous flux laminaire stérile. Les anthères sont mises en boîtes de Pétri (à raison de 30 anthères par boîte) sur un milieu d'induction, dont les éléments minéraux et les vitamines sont ceux de Murashige et Skoog (1962), additionné de maltose (40 g/l), de charbon actif (1 g/l) comme antioxydant et des régulateurs de croissance, une auxine (2,4-D) (5 mg/l) et une cytokinine (2-IP) (0,5 mg/l). L'agar-agar est utilisé à raison de 6 g/l et le pH est ajusté à 5,7. Les boîtes de Pétri sont placées à deux températures, 32 °C ou 38 °C, et à l'obscurité pendant sept jours, puis elles sont transférées dans une chambre de culture obscure à une température de 25 °C.

2.3. Observation sous microscope

La coloration des anthères fixées dans le mélange de Carnoy est réalisée au carmin acétique. Les anthères colorées sont écrasées modérément entre lame et lamelle afin de dissocier les cellules les unes des autres et libérer les microspores. Cette technique présente l'avantage d'être rapide et permet de repérer facilement les différents stades de la microsporogénèse.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Recherche de repères phénotypiques lors de la mise en culture

La culture d'anthères nécessite l'étude préliminaire de certains descripteurs caractérisant la fleur et les anthères. Cinquante fleurs prélevées sur chaque génotype à différents niveaux de l'inflorescence mâle (basal, médian et apical) ont servi à déterminer une éventuelle relation entre la longueur du bouton et celle des anthères, les résultats sont consignés dans une seule courbe à la **figure 1**.

Durant les premiers stades de développement des boutons, la longueur de ceux-ci augmente régulièrement jusqu'à 10 mm, de même que celle des anthères. Ces deux descripteurs sont étroitement corrélés dans la première partie de la courbe où $r^2 = 0,8$ au seuil de 5 %.

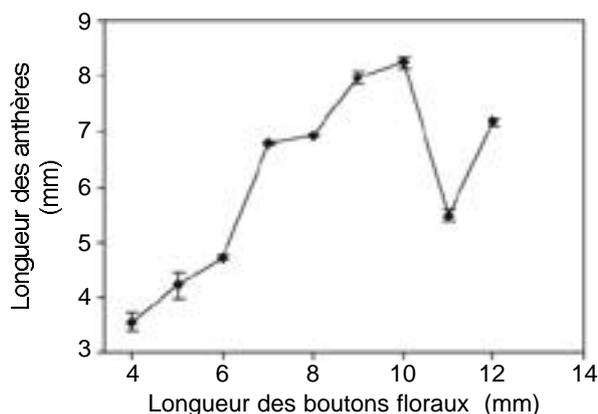


Figure 1. Évolution de la longueur des anthères en fonction de celle des boutons de fleurs mâles du palmier dattier pour les cinq génotypes étudiés. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions (50 fleurs ont été étudiées par répétition) — *Length of anthers as a function of the male flower buds length for five date palm pollinators. Values are means of three independent repetitions (50 flowers by repetition) ± SE.*

Ces mesures montrent la possibilité de considérer la longueur du bouton comme marqueur morphologique permettant d'identifier le moment adéquat pour le prélèvement des anthères et leur mise en culture.

Ce résultat est en accord avec celui qui est rapporté par Evans *et al.* (1984) qui ont travaillé sur la tomate. En effet, ces auteurs ont montré l'existence d'une corrélation entre la morphologie des boutons floraux et le développement des anthères. Toutefois, ils remarquent qu'il peut y avoir dans les anthères une certaine variation entre les stades cytologiques des microspores.

3.2. Microsporogénèse et taille des anthères

L'analyse de l'évolution des stades de développement des microspores en fonction de la longueur des anthères est réalisée en faisant une répartition des anthères en lots de différentes tailles pour les cinq génotypes étudiés.

Les observations microscopiques réalisées après coloration au carmin acétique et écrasement des anthères ont permis de classer les gamètes en trois stades cytologiques : tétrade, microspore uninucléée libre et cellule binucléée, selon la longueur des anthères. Les résultats (**Tableau 1**) montrent que lorsque la longueur des anthères est comprise entre 3 et 4 mm, c'est le stade tétrade qui est majoritaire, quel que soit le génotype considéré. Pour la classe]4, 6 mm[c'est le stade microspore uninucléée qui se trouve en grand nombre pour les génotypes T23, T67, T106, tandis que pour T25 et T105 c'est encore la forme tétrade qui est la plus abondante. Au sein de la classe [6, 7[, c'est le stade uninucléé qui est le plus fréquent chez T106 et T105 ; les microspores se partagent entre les stades uninucléé et binucléé chez T25 et T23, tandis que le pollen est largement binucléé chez T67. Enfin, quand la longueur de l'anthère est comprise entre [7, 8 mm] c'est principalement le stade binucléé qui est rencontré.

D'après les premiers travaux effectués sur la culture d'anthères chez le palmier dattier par Brochard (1981), Bouguedoura (1988), Ben Abdallah *et al.* (1999), et les résultats obtenus sur d'autres espèces telles l'orge (Hoeskstra *et al.*, 1992) et le riz (Swapan *et al.*, 1990), il s'avère que le stade optimum de prélèvement est le moment où la jeune microspore uninucléée va entrer en mitose. Dans nos expérimentations, ce stade correspond à l'existence, au niveau des anthères, de cellules uninucléées en grande quantité. Les résultats, consignés dans le **tableau 1**, montrent que ce stade correspondrait à une taille des anthères située entre 4 et 7 mm : 4–6 mm pour les génotypes T23 et T67 et 6–7 mm pour T25, T105 et T106.

3.3. Effet du charbon actif sur l'oxydation des anthères mises en culture

Une oxydation rapide des anthères, mises en incubation sur le milieu d'induction, est constatée. La présence des substances brunâtres est associée à une

Tableau 1. Nombre de microspores observées par stade de développement en fonction de la longueur des anthères chez cinq génotypes. 500 microspores sont comptées au niveau du champ microscopique, par répétition — *Microspore stages as a function of anther length evaluated for 5 pollinator genotypes. 500 microspores were counted by repetition.*

Longueur des anthères (mm)	Génotypes														
	T23			T25			T67			T105			T106		
	Stade*			Stade			Stade			Stade			Stade		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
[3 – 4]	376	124	0	366	110	24	352	123	25	328	120	52	359	102	39
]4 – 6[172	276	52	226	198	76	222	226	52	202	200	98	164	282	54
[6 – 7[55	229	216	82	237	181	116	105	279	65	352	83	69	385	46
[7 – 8]	66	108	326	49	100	351	67	52	381	73	204	223	36	102	262

* 1 = tétrade ; 2 = microspore libre ; 3 = pollen binucléé.

forte inhibition de la division des microspores et entraîne au bout d'un certain temps la nécrose des anthères, d'où l'intérêt de tester un antioxydant tel que le charbon actif (**Photos 1A à D**).

Soixante anthères de chaque génotype sont mises en culture sur le milieu d'induction additionné ou non de charbon actif, soit 30 anthères sur chaque milieu. Le dénombrement des anthères non oxydées sur les deux milieux est fait chaque semaine pendant un mois. Les moyennes de deux répétitions du caractère étudié sont présentées à la **figure 2**, avec leurs intervalles de confiance au seuil de 5 %.

Malgré l'allure similaire des courbes pour les différents génotypes et une stabilisation de l'oxydation après deux semaines, la présence du charbon actif dans le milieu diminue significativement l'oxydation des anthères par rapport au milieu témoin. Par ailleurs, le

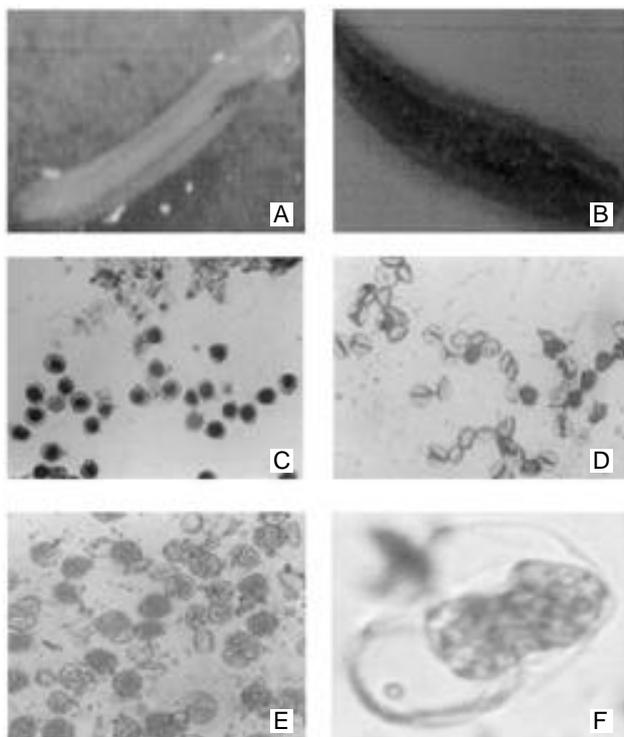


Photo 1. Observation des anthères et des microspores sur un milieu d'induction avec ou sans charbon actif. A : effet inhibiteur du charbon actif sur l'oxydation des anthères (après 30 jours) ; B : anthère après 30 jours sur milieu d'induction sans charbon actif (forte oxydation) ; C : microspores viables ($\times 400$) ; D : microspores vides ($\times 400$) ; E : microspores en début de culture ; F : division des microspores — *Observation of the anthers and the microspores on the induction medium, with or without activated charcoal. A: inhibiting effect of activated charcoal on the oxidization of anthers (after 30 days); B: anther after 30 days on an induction medium without activated charcoal (heavy oxidation); C: viable microspores ($\times 400$); D: empty microspores ($\times 400$); E: microspores in the begin of culture; F: microspores division.*

classement des génotypes selon leur oxydation après 30 jours montre que ceux dont les anthères s'oxydent lentement sont T105 et T106, par contre ceux présentant une oxydation rapide sont T25, T23 et T67. Ces résultats permettent de conclure à l'efficacité du charbon actif comme antioxydant. Celui-ci est également utilisé par Daguin et Letouze (1989), lors de la multiplication *in vitro* du palmier dattier.

3.4. Influence d'un prétraitement thermique et de l'ajout d'une cytokinine sur l'induction de la division des microspores

Cent vingt anthères pour chacun des deux dokkars T105 et T106 sont mises en culture sur un milieu d'induction complété ou dépourvu de 0,5 mg/l de 2-IP.

Un prétraitement des anthères est effectué en utilisant les températures de 31–32 °C et 37–38 °C. Après sept jours d'incubation, les anthères sont prélevées pour une observation cytologique et 900 microspores sont comptées pour chaque traitement. Les résultats sont consignés au **tableau 2**. La température de prétraitement de 37–38 °C augmente significativement, au seuil de probabilité 1 %, le pourcentage moyen de divisions des microspores chez les génotypes étudiés. T106 s'avère le génotype le plus performant en terme de pourcentage de division des microspores et ce quelle que soit la température.

D'après Comeau *et al.* (1992), l'environnement physique, en particulier le prétraitement par la chaleur ou le froid, a une influence sur les processus *in vitro*. Nitch et Norreel (1973), Bennett et Hughes (1973) et Picard (1975) signalent également l'effet favorable d'un prétraitement thermique pour l'androgénèse.

L'ajout de 2-IP a un effet favorable sur l'induction de l'androgénèse. En effet, le test de comparaison de deux moyennes montre que la différence est considérée comme hautement significative au seuil de probabilité 1 % entre les milieux, ainsi que pour les deux génotypes. Le génotype T106 comparativement à T105 possède les meilleurs pourcentages moyens de division de microspores.

3.5. Culture d'anthères *in vitro*

Les anthères du génotype T106 mises en culture sont examinées durant la première semaine d'incubation. Certaines font apparaître des modifications morphologiques telles qu'une augmentation de taille et/ou des divisions. D'autres sont entrées en sénescence, ce qui leur a conféré une couleur brunâtre. La **figure 3** met en évidence que le nombre de microspores en division dans les anthères non oxydées a augmenté au cours des 35 jours. L'analyse cytologique met en évidence que les premières divisions sont symétriques et aboutissent à la formation de deux noyaux fils identiques (**Photos 1E et F**).

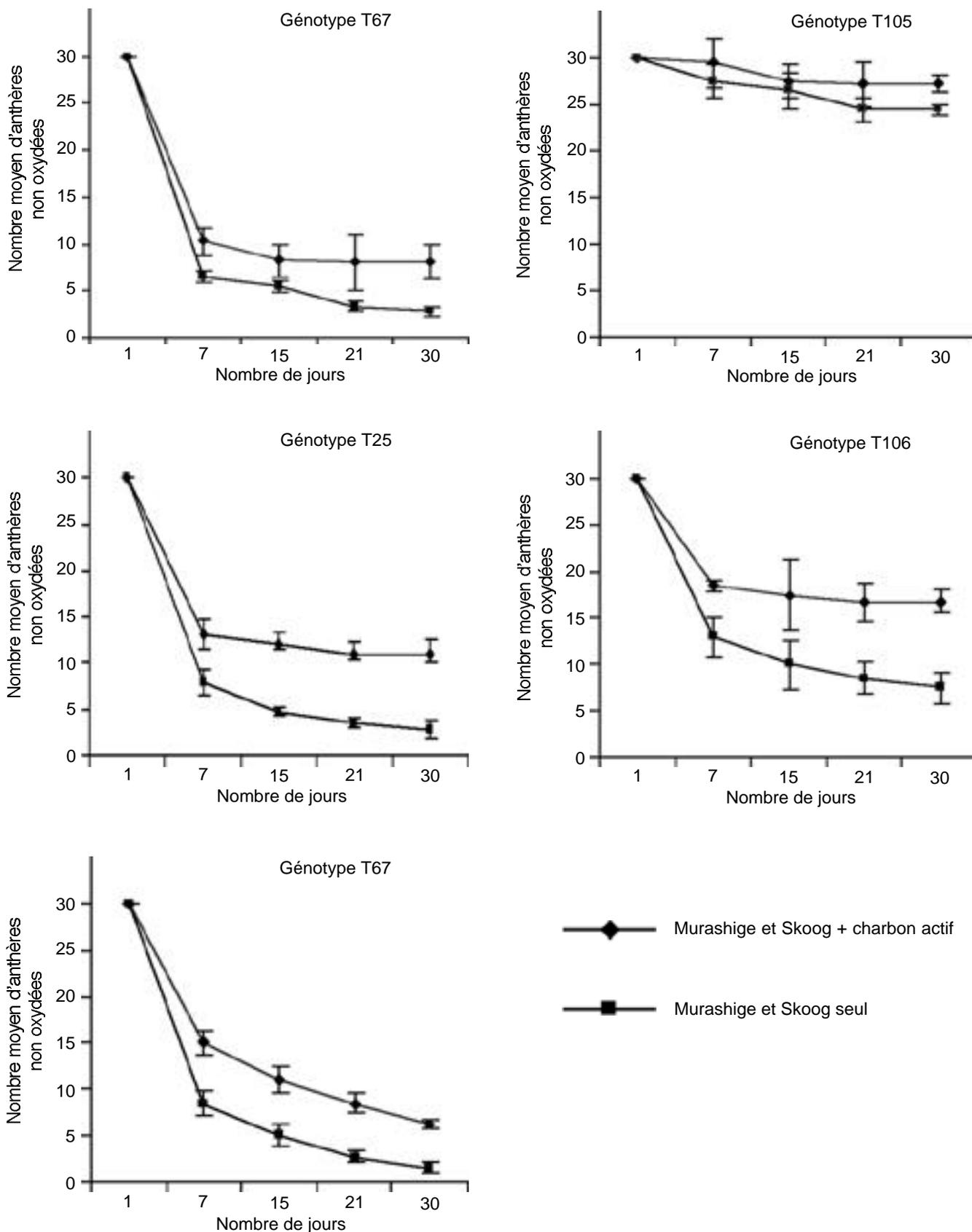


Figure 2. Effet du charbon actif sur l'oxydation des anthers de cinq pollinisateurs du palmier dattier au cours de la phase d'induction. Les valeurs représentent les moyennes de deux répétitions \pm IC au seuil 5 % — *Anthers oxidation of five date palm pollinators on an induction medium with or without activated charcoal. Values are means of two repetitions \pm SE.*

Tableau 2. Effet du prétraitement thermique des anthères et de l'ajout de 2-IP au milieu de culture sur le pourcentage de microspores en division — *Effect of the thermic pretreatment and of 2-IP in the culture medium on the percentage of microspore division.*

T° du pré-traitement	Milieu d'induction sans 2-IP (témoin)		Milieu d'induction avec 2-IP
	31–32 °C	37–38 °C	37–38 °C
Génotype T105	11,78 ± 0,656*	17,56 ± 0,644*	22,35 ± 0,802*
Génotype T106	13,76 ± 4,880*	19,55 ± 5,011*	25,37 ± 8,628*

* = Moyennes de pourcentages de trois répétitions (900 microspores ont été comptées) ± l'écart type au seuil 1% — *Means of percentages of three repetitions (900 microspores were counted) ± SE.*

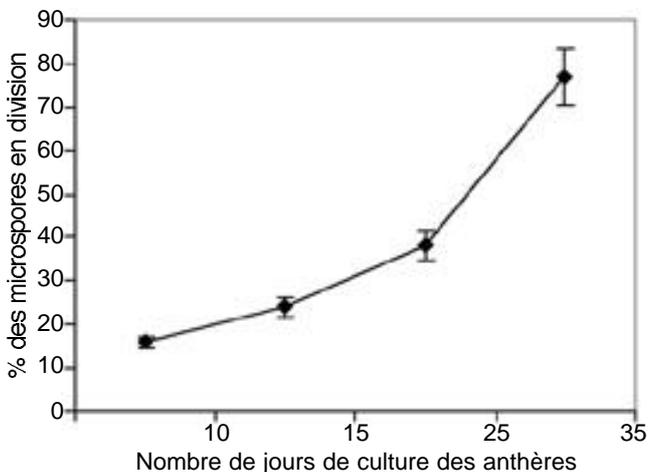


Figure 3. Évolution au cours du temps du pourcentage des microspores en division pour le pollinisateur T106 du palmier dattier. Les valeurs représentent les moyennes de trois répétitions (500 microspores ont été observées par répétition) ± IC au seuil 5 % — *Evolution of microspore division of date palm pollinator T106. Values are means of three independent repetitions (500 microspores were observed by repetition) ± SE.*

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de rendre compte des difficultés posées par l'oxydation et d'observer l'évolution des microspores dans les anthères mises en culture.

Afin d'optimiser la phase d'induction de l'androgénèse, la détermination du stade phénologique des anthères en relation avec l'évolution des microspores, a permis de constater qu'une taille des anthères comprise entre 4 et 7 mm correspondait au stade uninucléé, qui selon la littérature, est le plus favorable à une mise en culture. Par conséquent, ce critère phénologique pourra

être utilisé à l'avenir. Nos résultats permettent de retenir les génotypes T105 et T106 pour l'androgénèse du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), tout en préconisant l'utilisation du charbon actif dans le milieu d'induction. D'autres travaux sont encore nécessaires pour améliorer le rendement à l'induction et aboutir à l'obtention des plantes haploïdes.

Le suivi des divisions des microspores dans les anthères mises en culture sous deux températures, a révélé que la température 37–38 °C a un effet d'activation des divisions plus important que la température 31–32 °C. Ce prétraitement thermique, comme facteur améliorateur de l'induction, devrait faire l'objet d'une analyse sur une gamme plus large de températures.

Le travail d'optimisation du milieu de culture a permis de retenir un milieu ayant comme base les éléments minéraux de Murashige et Skoog auxquels sont ajoutés le 2,4-D et le 2-IP, associés au charbon actif.

Ce travail a permis d'améliorer la phase d'induction en androgénèse évaluée sur base des divisions des microspores. Aucune régénération n'est obtenue jusqu'à présent à partir du matériel issu d'androgénèse, toutefois des perspectives sont ouvertes par la réussite de l'induction qui reste une phase à affiner encore afin d'améliorer son rendement.

L'utilisation de thidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea) pourrait être essayée afin d'obtenir une régénération à partir des cals, cette substance paraissant favoriser l'organogénèse (Ngaboyamahina, 1994). Par ailleurs, d'autres méthodes comme la culture de microspores isolées (Picard *et al.*, 1994) devraient être essayées dans la recherche d'obtention des haploïdes.

Ceci n'est qu'une première étape dans le but d'obtenir des haploïdes chez une espèce dont la génétique reste peu connue. En effet, chez le palmier dattier, on ne sait pas encore sous quel type de contrôle génétique se trouvent les palmiers mâles. Le plus probable est qu'ils soient, comme les asperges, sous la forme (Aa), alors que les palmiers femelles seraient sous la forme (aa). Par conséquent, les plantes haploïdes qui seraient issues de la culture *in vitro* à partir des anthères, dont les chromosomes pourraient être doublés par la colchicine, seraient de type (AA) ou bien (aa), c'est-à-dire des "super mâles" ou des femelles. Au niveau des femelles, on pourrait s'attendre à l'expression des gènes récessifs impliqués dans la résistance à des maladies ou autres. Au niveau des mâles, les "super mâles" pourraient être meilleurs aussi bien pour la qualité que pour la quantité du pollen produit.

Ce type de matériel homozygote ne pourrait être obtenu que lorsque nos travaux dépasseront la phase de régénération qui n'est pas encore maîtrisée.

Bibliographie

- Ben Abdallah A. (1989). Multiplication par organogénèse du palmier dattier (*Phoenix Dactylifera* L.). *Compte rendu du deuxième séminaire maghrébin sur la multiplication rapide du palmier dattier par les techniques de culture in vitro*. Marrakech : FAO. Al Lebanon : Watan Press, p. 37–41.
- Ben Abdallah A., Elloumi N., Bayouh CH., Chaibi N., Lepoivre P., Harrzallah H. (1999). Analysis of pollen androgenetic capacity of male Tunisian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) genotypes. *The International Conference on Date Palm*. Assiut University. Egypt, November 9–11.
- Bennet MD., Hughes WG. (1973). Additional mitosis in wheat pollen inducted by ether. *Nature* **244**, p. 566–568.
- Bouguedoura N. (1988). La multiplication rapide de palmier dattier. Situation présente, contrainte et perspectives. *Compte rendu. Premier séminaire maghrébin sur la culture in vitro du palmier dattier. Projet de lutte contre le bayoud FAO/PNUD/RAB/88/024 Marrakech. Maroc*, p. 24–27.
- Brochard P. (1981). *Culture de tissus de palmier dattier. Rapport de recherches 1975–1981*. Algérie : Station expérimentale de Sidi Mahdi, INRA, 96 p.
- Comeau A., Nadeau P., Plourde A. (1992). Media for in ovulo culture of proembryos of wheat and wheat derived interspecific hybrids and haploïds. *Plant Sci.* **81**, p. 117–125.
- Daguin F., Letouze R. (1989). Biotechnologie du palmier dattier. Nouvelles approches des conditions de post *in vitro* et de la conservation de génotypes sélectionnés. *Compte rendu. Premier séminaire maghrébin sur la génétique de la résistance du palmier dattier. Projet de lutte contre le bayoud FAO/PNUD/RAB/88/024. Adrar, Algérie, 2–7 décembre*.
- Djerbi M. (1995). *Précis de phoeniculture*. Rome : FAO, 190 p.
- Evans DA., Sharp WR. (1984). Application of somaclonal and gametoclonal variation. *Am. J. Bot.* **71**, p. 759–774.
- Hoekstra S., Van Zijderveld MH., Louwerse JD., Heidekamp F., Vander Mark F. (1992). Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. Igri. *Plant Sci.* **86**, p. 89–96.
- Jeller S. (1979). *Abrégé de statistique* 3^e édition. Paris : Masson.
- Letouze R., Daguin F. (1988). Regeneration of date palm by somatic embryogenesis: improved effectiveness by dipping in a stirred liquid medium. *Fruits* **43**, p. 191–194.
- Monciero A. (1961). Le palmier dattier en Algérie et au Sahara. *Les journées de la datte (3–4 mai 1961, Algérie)*.
- Murashige T., Skoog F. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, p. 473–497.
- Ngaboyamahina P. (1994). *Étude de la multiplication végétative in vitro par embryogenèse somatique chez le cultivar Mibilizi du Caféier Arabica*. Thèse de doctorat. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, Belgique, 179 p.
- Nitch C., Norreel B. (1973). Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogénèse du pollen de *Datura innoxia* cultivé dans l'anthère ou isolé. *C. R. Acad. Sci. Série D.* **276**, p. 303–306.
- Nixon W., Furr JR. (1965). Problems and progress in date breeding. *Ann. Date Growers'Inst.* **42**, p. 2–5.
- Picard E. (1975). Nouveaux résultats concernant la culture d'anthères *in vitro* de blé tendre, effet d'un choc thermique et de la position de l'anthère sur l'épi. *C. R. Acad. Sci. Série D.* **281**, p. 127–130.
- Picard E., Crambes E., Liu C., Mihalou-Ziyyat A. (1994). Évolution des méthodes d'haplodiploïdisation et perspectives pour l'amélioration des plantes. *C. R. Soc. Biol.* **188**, p. 109–141.
- Reuveni O., Adato Y., Lilien-Kipnis H. (1972). A study of new and rapid methods for the vegetative propagation of date palms. *Date Grower's Inst. Rep.* **49**, p. 16–24.
- Reuveni O., Lilien-Kipnis H. (1974). Studies of the “*in vitro*” culture of date palm tissues and organs. *Agric. Res. Org. Volcani Center* **145**, p. 1–42.
- Swapan K., Karabi D., Ingo P. (1990). Embryogenesis and plant regeneration from microspores of both “Indica” and “Japonica” rice (*Oryza sativa*). *Plant Sci.* **67**, p. 83–88.
- Tisseart B. (1979). Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. *J. Exp. Bot.* **30**, p. 1275–1283.

(23 réf.)