



Biannual journal, edited by Ferhat ABBAS University, Sétif1

Agriculture Journal

Homepage: <http://revue-agro.univ-setif.dz/>



Impact de la composition du milieu de culture sur la viabilité des grains de pollen du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), type Ghars cultivés *in vitro*

LAIADI Z^{1*}, ZEBILA S¹, TAIB S²

¹Laboratoire de Génétique, Biotechnologie et Valorisation des Bio-ressources (LGBVB), FSESNV, Université de Biskra.

²Institut Technique de Développement de l'Agronomie Saharienne « ITDAS » Elhadjeb –Biskra

* Corresponding author: zlayadi@yahoo.fr

Received: 06 January 2018/ Accepted: 30 April 2018

Abstract

The research titled was undertaken to investigate the effect of different nutrients such as boric acid (H_3BO_3), calcium nitrate ($CaNO_3$), potassium nitrate (KNO_3) and magnesium sulfate ($MgSO_4$) on the viability of pollen grains of the date palm pollen (*Phoenix dactylifera* L.), type Ghars. Different culture media containing low and high concentrations relative to the control (BKM) were prepared for the pollen grains *in vitro* culture during 24 hours of incubation. The germination rate and length of the pollen tube were varied depending on the culture media composition. [0,01%] $CaNO_3$, [0,016%] $MgSO_4$, [0,01%] KNO_3 and [0,05%] H_3BO_3 exhibited the maximum germination rates with maximum pollen tube lengths of 72.86 μm , 44.58 μm , 57.56 μm and 32.25 μm , respectively.

Key words: date palm, pollen grain, Ghars, *in vitro* germination, viability, pollen tube.

Résumé

La recherche intitulée a été entreprise pour étudier l'effet de différents nutriments comme l'acide borique (H_3BO_3), nitrate de calcium ($CaNO_3$), nitrate de potassium (KNO_3) et sulfate de magnésium ($MgSO_4$) sur la viabilité des grains de pollen de palmier (*Phoenix dactylifera* L.), de type Ghars. Différents milieux de cultures contenant des concentrations faibles et élevés par rapport au témoin (BKM) sont préparés pour la culture *in vitro* des grains de pollen pendant 24h d'incubation. Le taux de germination et la longueur du tube pollinique ont été variés selon la variation des concentrations des composants du milieu. [0,01%] $CaNO_3$, [0,016%] $MgSO_4$, [0,01%] KNO_3 et [0,05%] H_3BO_3 donnent des taux maximaux de germination avec des longueurs du tube pollinique maximales : 72.86 μm , 44.58 μm , 57.56 μm et 32,25 μm , respectivement.

Mots clés: palmier dattier, grains de pollen, Ghars, germination *in vitro*, viabilité, tube pollinique.

INTRODUCTION

Le palmier dattier est la principale espèce cultivée au Sahara, celle qui constitue l'essentiel de la nourriture des populations oasiennes. La germination du pollen et la croissance du tube pollinique sont des conditions préalables à la fertilisation et au développement des grains de pollen (Ahmad et al., 2012). De nombreux travaux ont mis en évidence l'action de rendement, de la qualité des grains de pollen et de la précocité ou la tardiveté de la floraison sur la réussite de la fécondation donc sur la production des dattes (Babahani et al., 2009). La viabilité du pollen et la réceptivité au stigmate sont des facteurs critiques pour la réussite des événements de post-pollinisation mais les études physiologiques et biochimiques sur la germination du pollen et la croissance du tube pollinique *in vivo* sont plutôt difficiles, ainsi les techniques de germination *in vitro* ont donc été largement utilisés sur divers systèmes de pollen (Ahmad et al., 2012) pour identifier l'effet de la pratique culturale sur la viabilité de pollen (Kavand et al., 2014).

La composition du milieu nutritif pour la germination pollinique in vitro suggéré par Brewbacker et Kwack (1963) est normalement modifiée pour une germination optimale du pollen, car les besoins en germination de ces grains varient d'une espèce à une autre (Mankad et Katara, 2015). A cet égard on cherche l'effet de la composition de ce milieu de culture sur la germination et la longueur de tube pollinique des grains de pollen de type Ghars afin de préciser la qualité des grains de pollen. Ces tests de germination in vitro sont envisagés sur la base du milieu de culture de Brewbacker et Kwack (1963) modifié: des milieux de culture nouvellement préparés à la base des nutriments : acide borique, nitrate de calcium, nitrate de potassium et sulfate de magnésium, à des concentrations différentes.

MATERIEL ET METHODES

Dans notre étude on a utilisé un seul type des grains de pollen "Ghars" récolté de la ferme de démonstration et production de semence à Ain Ben Naoui qui se situe dans la commune d'Elhajeb à 9 km environ au Sud-Ouest de la ville de Biskra. La préparation des milieux de cultures est réalisée selon les proportions données dans les Tableaux (1-4).

Tableau 1. Modification des concentrations de l'acide borique

[H ₃ BO ₃] g/100ml	Absence	0,03	0,04	T=0,05	0,06	0,07	1	2
Saccharose 15%								
Agar-agar 1%								
CaNO ₃ =0,03g			KNO ₃ =0,01g			MgSO ₄ =0,02g		
100 ml l'eau distillée								

*T: témoin

Tableau 2. Modification des concentrations de nitrate de calcium

[CaNO ₃] g/100ml	Absence	0.01	0.02	T=0.03	0.04	0.05	1	2
Saccharose 15%								
Agar-agar 1%								
H ₃ BO ₃ =0,05g			KNO ₃ =0.01g			MgSO ₄ =0.02g		
100 ml l'eau distillée								

Tableau 3. Modification des concentrations de nitrate de potassium

[KNO ₃] g/100ml	Absence	0,006	0,008	T= 0,01	0.012	0.014	1	2
Saccharose 15%								
Agar-agar 1%								
H ₃ BO ₃ =0,05g			CaNO ₃ =0,03g			MgSO ₄ =0,02g		
100 ml l'eau distillée								

Tableau 4. Modification des concentrations de sulfate de magnésium

[MgSO ₄] g/100ml	Absence	0,012	0,016	T= 0.02	0.024	0.028	1	2
Saccharose 15%								
Agar-agar 1%								
H ₃ BO ₃ =0,05g			CaNO ₃ =0,03g			KNO ₃ =0,01g		
100 ml l'eau distillée								

Ces milieux de cultures nouvellement préparés sont ensuite passés à la stérilisation à 120 C° pendant 20 min (Boughdiri, 1985), suivie par un coulage dans des boîtes de Pétri (10 dcm³) et un refroidissement à 4 C°, on fait l'ensemencement des pollens frais à l'aide d'un petit pinceau sur paillasse aseptique.

L'incubation est faite ensuite dans une étuve à une température de 27C° pendant 24h (Boughdiri, 1985) comme suit :

La germination in vitro du pollen permet de juger ses aptitudes intrinsèques à germer en dehors de toutes interactions pollen-stigmate. Le pourcentage de germination se définit comme étant le rapport entre le nombre de grains germés et le nombre total de grains mis à germer (Boughdiri, 1985) :

$$\text{PG (\%)} = \frac{\text{Nbre de graine germé}}{\text{Nbre de graine mis à germé}} \times 100$$

Le dénombrement des grains du pollen germés est effectué en examinant trois champs sous le microscope (à raison de 100 grains de pollens / champ). Les longueurs des tubes polliniques sont mesurées à l'aide du logiciel Optika vision lite 2.1, en examinant trois champs sous le microscope au grossissement (x200) et (x400). On a utilisé une analyse de la variance (ANOVA) par le logiciel XL STAT 2009.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. L'effet de l'acide borique sur la germination et la longueur du tube pollinique

D'après les Figures 1 et 2 on constate qu'il y a un effet des concentrations sur le taux de germination et la longueur des tubes polliniques.

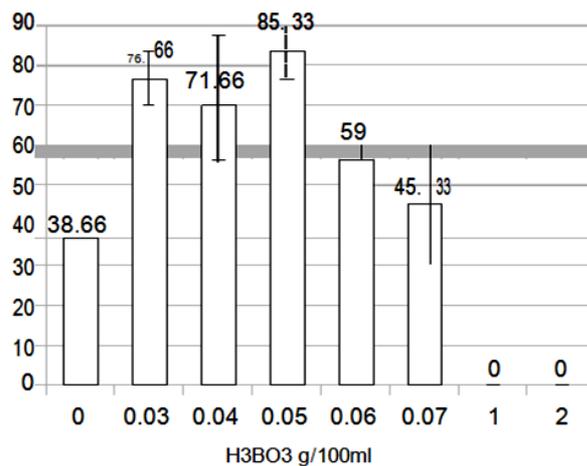


Figure 1. Le pourcentage de germination des grains de pollens en fonction de la concentration de l'acide borique H₃BO₃

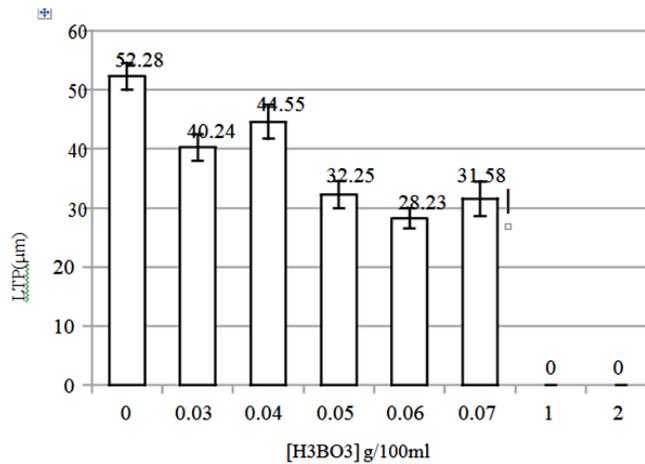


Figure 2. La longueur du tube pollinique des grains de pollen en fonction de la concentration de l'acide borique H_3BO_3

D'après les résultats de l'analyse de la variance et le test de Newman-Keuls (Tableaux 5 et 6) des deux paramètres étudiés (taux de germination et longueur du tube pollinique) obtenus, on trouve qu'il y a une différence très hautement significative entre les concentrations de l'acide borique selon le test de Fischer.

Tableau 5. Test de Newman-Keuls (5%) du taux du germination sous l'effet de l'acide borique.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes				
T	85.333	A				
D2	76.667	A	B			
D1	71.667	A	B			
D3	59.000		B	C		
D4	45.333			C	D	
D0	38.667				D	
D5	0.000					E
D6	0.000					E

Tableau 6. Test de Newman-Keuls (5%) de la longueur du tube pollinique sous l'effet de l'acide borique.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes				
D0	52.280	A				
D2	44.553		B			
D1	40.237			C		
T	32.250				D	
D4	31.580				D	
D3	28.223				D	
D5	0.000					E
D6	0.000					E

Nous notons que le meilleur taux de germination (85,3%) correspond la une concentration 0,05% (T) de l'acide borique avec une longueur du tube pollinique de 32,25 μm .

Pour cette concentration, la germination des grains de pollens est maximale (Figure 3), justifiée par les résultats de milieu fourni par Brewbaker et Kwack (1963).

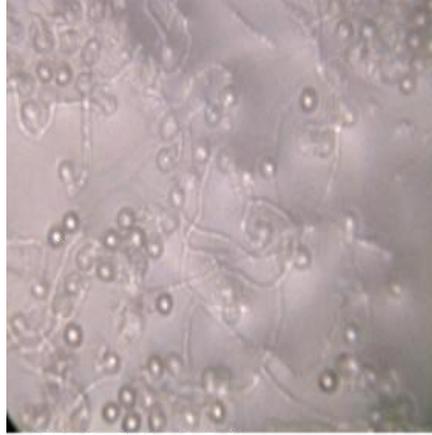


Figure 3. Grains de pollen Témoin de H_3BO_3 (Photo original) Gx400

A des teneurs élevées, de valeurs supérieures ou égales à 0,06%, l'acide borique provoque des diminutions de germination, avec une diminution de la longueur des tubes polliniques. Selon Boughediri (1985), les concentrations élevées 0,5 et 1% font chuter et peuvent même inhiber la germination. Des résultats semblables ont été déjà signalés par Lepengue et al. (2013) chez différentes espèces telles que le blé, la lentille et le tournesol. Ces chercheurs ont montré encore à des concentrations élevées d'acide borique il ya une réduction des indices morphologiques de croissance des plantes de roselle, cela est probablement dû à un phénomène de la toxicité chimique de ce composé.

L'absence totale de l'acide borique montre un plus faible pourcentage de germination de l'ordre de 38,66% avec une longueur maximale du tube pollinique de 52,28 μm . Ce résultat concorde avec celui de Boughediri (1985) qui déclare qu'une concentration nulle de l'acide borique (0%) donne une longueur maximale du tube pollinique ce qui entraîne son enroulement autour des grains de pollen. Ce phénomène peut être expliqué par l'absence du bore d'une part, et l'action synergique des ions calcium, potassium et magnésium d'autre part. Raghavan et Bervak (1959) in Boughediri (1985) ont remarqué l'existence d'une relation entre la synthèse de la pectine et le bore dans la germination du pollen. Au niveau du transport moléculaire de glucides, le bore stimulerait l'enchâssement membranaire des pompes protéiques de types ATPases, permettant l'accélération des échanges ioniques inter membranaires (Duval, 1995 ; Pendias, 1982 in Ghanta et Mondal, 2013).

2. L'effet de nitrate de calcium sur le taux de germination et la longueur du tube pollinique

Les résultats du taux de germination des grains de pollen de type Ghars sous l'effet de la variation de la concentration de nitrate de calcium sont illustrées dans les Figures 4 et 5.

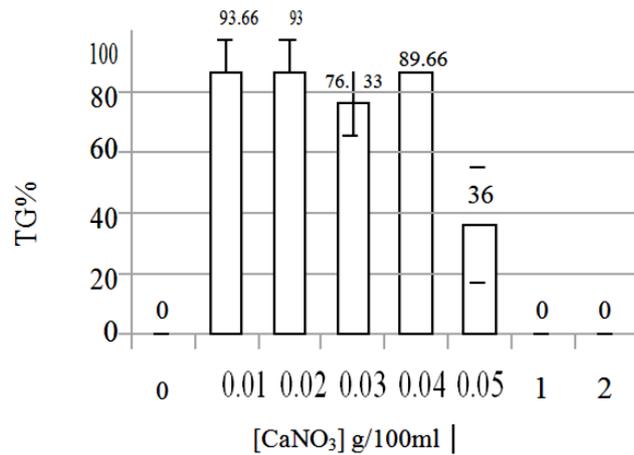


Figure 4. Le pourcentage de germination des grains de pollens en fonction de la concentration de CaNO₃

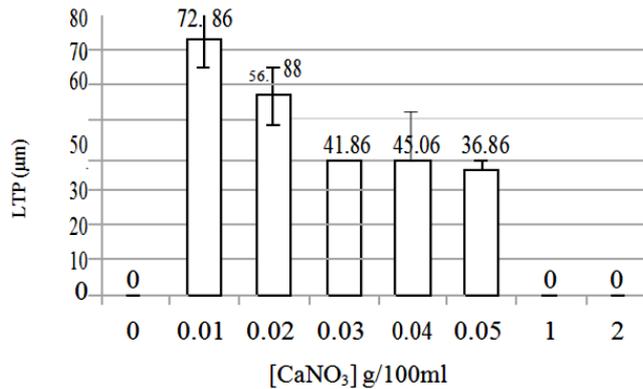


Figure 5. La longueur du tube pollinique des grains de pollens en fonction de la concentration de nitrate de calcium CaNO₃

Nous constatons qu'il y a un effet très hautement significatif des concentrations du nitrate de calcium sur le taux de germination et la longueur de tube pollinique (Tableaux 7 et 8).

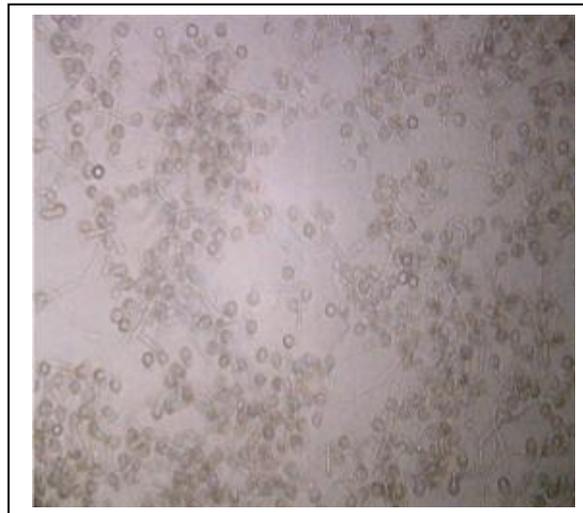
Tableau 7. Test de Newman-Keuls (5%) du taux du germination sous l'effet de nitrate de calcium.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes
D1	93.667	A
D2	93.000	A
D3	89.667	A
T	76.333	A
D4	36.000	B
D0	0.000	C
D6	0.000	C
D5	0.000	C

Tableau 8. Les Test de Newman-Keuls (5%) de la longueur du tube pollinique sous l'effet de nitrate de calcium.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes		
D1	72.867	A		
D2	56.880		B	
D3	45.063			C
T	41.857			C
D4	36.860			C
D0	0.000			D
D6	0.000			D
D5	0.000			D

On constate que l'absence de nitrate de calcium ne déclenche pas la germination des grains de pollen et donc aucune formation du tube pollinique. D'après Brewbaker et Kwack (1963), les sels simples ont été éliminés successivement du milieu inorganique basique, ils ont trouvé que la germination était excellente dans chaque cas sauf une ; la croissance des tubes polliniques est nulle en l'absence de calcium. Kavand et al. (2014) ont trouvé que la meilleure germination chez les grains de pollen des palmiers de la variété Shahan jahrom est supérieure à 80% avec des concentrations de nitrate de calcium de 0,015 % combinées avec une concentration de nitrate de potassium de 0,01%. Ils ont constaté également dans un autre travail que la meilleure concentration de nitrate de calcium est de l'ordre de 0,01% qui aboutit un taux de germination estimé à 64,49% chez les grains de pollen des palmiers de la variété Fard, ces résultats corroborent nos conclusions avec un taux de germination plus élevé de 93,66% et un allongement des tubes polliniques qui arrive jusqu'à 72,86 μm (Figure 6).

**Figure 6.** Grains de pollen à 0,01 % CaNO_3 (Photo original) Gx20

Ces mêmes auteurs ont trouvé aussi qu'une légère augmentation de CaNO_3 (0,015 % et 0,02%) diminue le taux de germination de la variété Fard, ce qui concorde avec nos résultats chez le type Ghars qui atteint 93% et 76,33% successivement avec une diminution de longueur du tube pollinique atteint 56,88 μm et 41,86 μm . A des

concentrations élevées supérieures ou égales à 0,05 % de nitrate de calcium, on observe une chute brutale du taux de germination qui devient nul avec un allongement minimal des tubes polliniques de l'ordre $36,86 \mu\text{m}^2$. Dans les années 1990, des progrès significatifs ont été réalisés dans la caractérisation et la mesure du gradient Ca^{++} dans le tube et les afflux d'ions de l'espace extracellulaire par de colorants sensibles au Ca^{++} et des électrodes vibrantes sélectives d'ions (Miller, 1992 ; Kührtreiber et Jaffe, 1990 ; Obermeyer et Weisenseel, 1991 ; Rathore et al., 1991). De nos jours, l'importance du gradient Ca^{++} axé sur les pointes et de l'afflux apical de cet ion ainsi que sa contribution à la croissance polaire du tube sont solidement établies (Pierson et al., 1994, 1996 ; Malho et Trewavas, 1996 ; Holdaway et Hepler, 2003 ; Cole et Flower, 2006). Prajapati et al. (2010) in Kavand (2014) montrent que le calcium peut donc jouer un rôle dans la détermination et la directionnalisation de l'allongement du tube. D'après Lige et al. (2006) in Kavand et al. (2014) l'allongement du tube pollinique repose généralement sur des réserves de calcium externes dans le pistil.

3. L'effet du nitrate de potassium sur le taux de germination et la longueur du tube pollinique

Les résultats du taux de germination et la longueur des grains de pollen de type Ghars sous l'effet de variation de la concentration de nitrate de potassium sont illustrés dans les Figures 7 et 8.

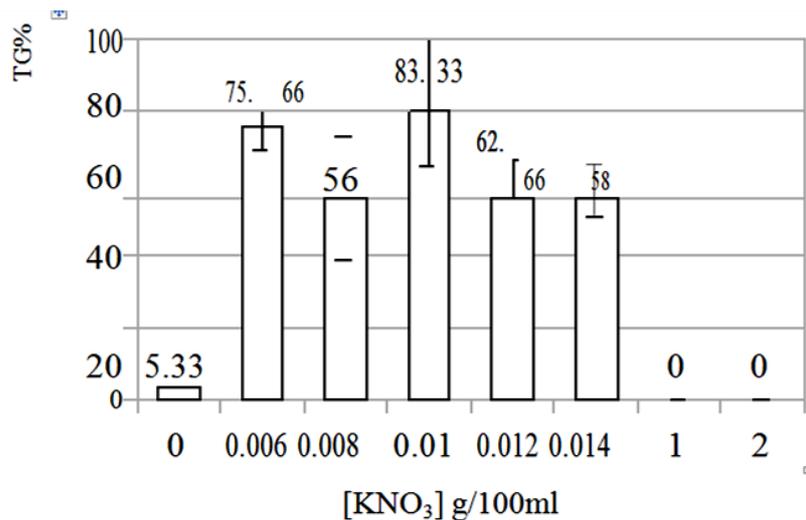


Figure 7. Le pourcentage de germination des grains de pollens en fonction de la concentration de nitrate de potassium KNO_3

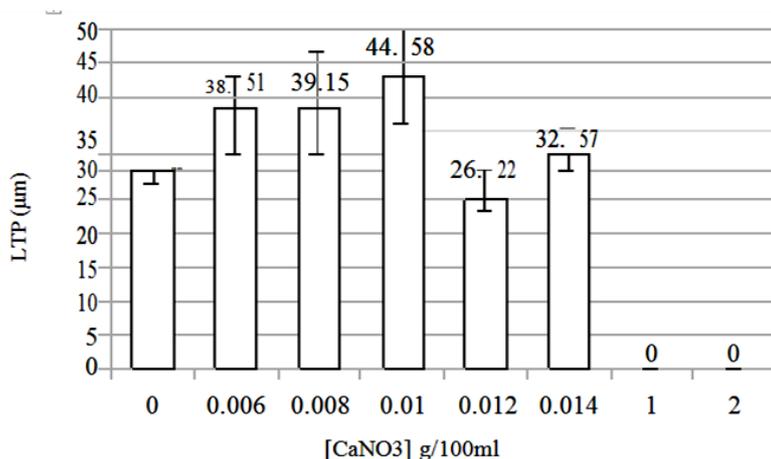


Figure 8. La longueur de tube pollinique des grains de pollens en fonction de la concentration de nitrate de Potassium KNO₃.

Au fur à mesure que la concentration de nitrate de potassium augmente on assiste à une augmentation significative de taux de germination et des tubes polliniques (Tableaux 9 et 10) jusqu'à un optimum de 0,01% (Brewbacker et kwack modifié).

Tableau 9. Test de Newman-Keuls (5%) du taux de germination sous l'effet de nitrate du potassium.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes	
T	83.333	A	
D1	75.667	A	B
D3	62.667		B
D4	58.000		B
D2	56.000		B
D0	5.333		C
D6	0.000		C
D5	0.000		C

Tableau 10. Test de Newman-Keuls (5%) de la longueur du tube pollinique sous l'effet de nitrate de potassium.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes		
T	44.580	A		
D2	39.153	A	B	
D1	38.510	A	B	
D4	32.573		B	C
D0	28.860		B	C
D3	26.220			C
D6	0.000			D
D5	0.000			D

D'après les résultats obtenus dans la Figure 9 on trouve que 0,01% de KNO₃ donne la meilleure germination qui est à la base de Brewbaker et Kwack (1963) qui atteint 83,33 % avec une longueur maximale des tubes polliniques de 44,58µm.

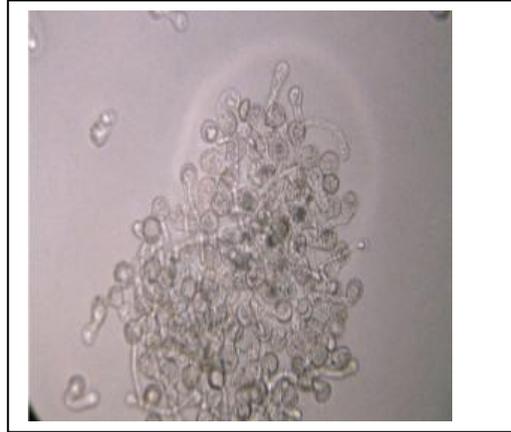


Figure 9. Grains de pollen Témoin KNO₃ (Photo original) Gx400.

D'après Ghanta et Mondal (2013), la germination du pollen et la croissance des tubes de pollen sont fortement régulées par le transport des ions inorganiques, tel que Ca^{++} , K^+ à travers le plasma, la membrane des tubes de pollen. L'absence de KNO_3 ne représente que 5,33% du taux de germination avec une longueur du tube pollinique de l'ordre 28,86 μm . Une fine augmentation du KNO_3 provoque une augmentation du taux de germination et de la longueur du tube pollinique. Selon Brewbaker et Kwack (1963), Feigo et al. (1995) in Ghanta et Mondal (2013), le K^+ est nécessaire pour la germination du pollen et l'élongation du tube pollinique. A la concentration de 0,008%, on assiste une diminution du taux de germination par rapport à (0,01% témoin). Des travaux faits par Mankad et Katara (2015) en utilisant différentes concentrations de nitrate de potassium de 0,01 % à 0,06 % sur *Datura metel* ont montré que la meilleure concentration est de 0,05% pour une meilleure germination estimée à 86,43%. D'après notre étude on considère qu'une faible concentration de nitrate de potassium 0,006% donne un taux de germination de l'ordre de 75.66% (Figure 10) alors que Mankad et Katara (2015) ont considéré qu'une forte concentration du 0,06% donne un taux de germination de 70.34%. Si possible que cette différence a une relation avec la variété du grains de pollen comme Weinbaum et al. (1984) ont déclaré que la capacité de germination du pollen entre différents cultivars de différents espèces serait différente, cela est montré par Mankad et Katara (2015) qu'une concentration de 0,01% de KNO_3 est également été incorporé dans les médias standard de *Gossypium hirsutum* (Shivastava, 1962 in Mankad et 2015) et était bon pour *Plumeria alba* (Johri et Shivanna, 1985 in Mankad, 2015).

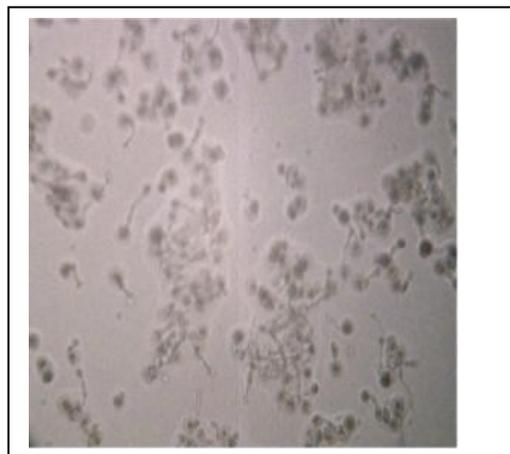


Figure 10. Grains de pollen à 0,006 % KNO₃ (Photo original) Gx200

4. L'effet du sulfate de magnésium sur le taux de germination et la longueur du tube pollinique

Les résultats de taux de germination et de la longueur pollinique des grains de pollen de type Ghars sous l'effet de la modification de la concentration de sulfate de magnésium sont illustrés dans les Figures 11 et 12.

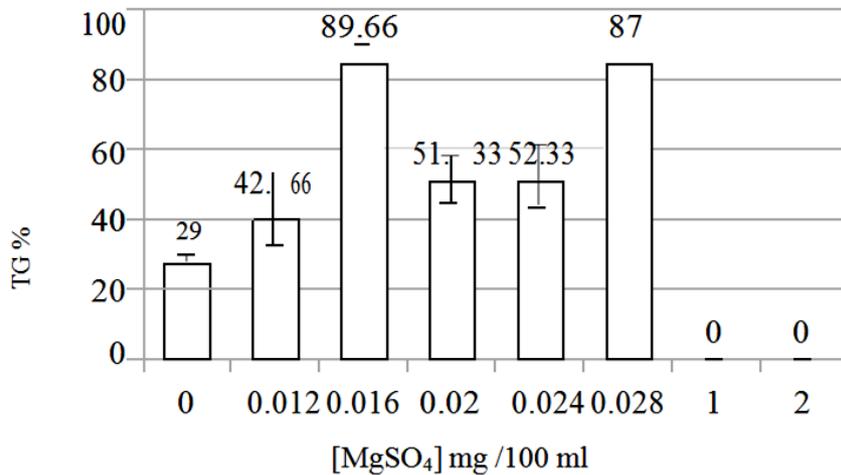


Figure 11. Le pourcentage de germination des grains de pollens en fonction de concentration de sulfate de magnésium MgSO₄.

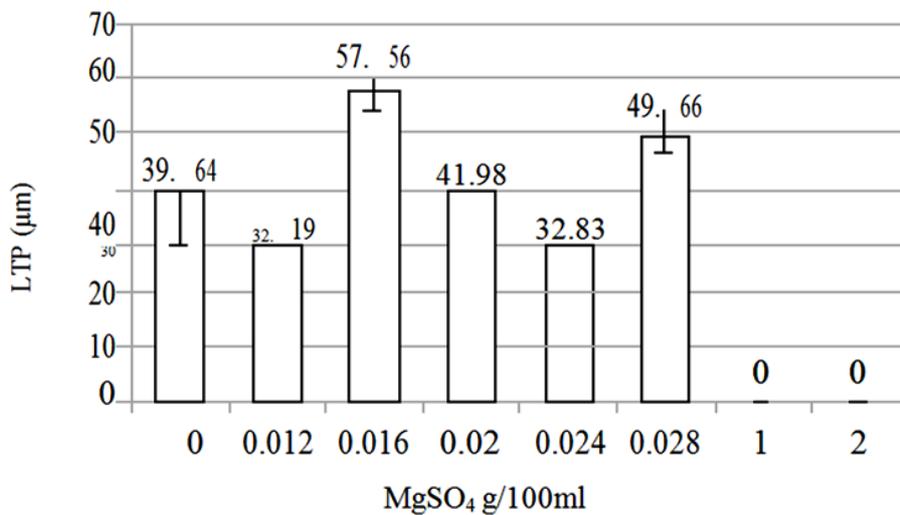


Figure 12. La longueur des tubes pollinique des grains de pollens en fonction de concentration de sulfate de magnésium MgSO₄.

Nous constatons qu'il y a un effet significatif des doses du sulfate de magnésium sur le taux de germination et la longueur de tube pollinique (Tableaux 11 et 12).

Tableau 11. Test de Newman-Keuls (5%) du taux de germination sous l'effet de sulfate du magnésium.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes		
D2	89.667	A		
D4	87.000	A		
D3	52.333		B	
T	51.333		B	
D1	42.667		B	
D0	29.000			C
D6	0.000			D
D5	0.000			D

Tableau 12. Test de Newman-Keuls (5%) de la longueur du tube pollinique sous l'effet de sulfate du magnésium.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes			
D2	57.560	A			
D4	49.663		B		
T	41.983			C	
D0	39.640			C	
D3	32.827				D
D1	32.190				D
D6	0.000				E
D5	0.000				E

L'absence totale de $MgSO_4$ donne une germination de 29% avec un allongement du tube pollinique de 39,64 μm . Pour les sulfates de magnésium $MgSO_4$, Moore et Jung (1974) in Ghanta et Mondal, (2013) ont souligné que le NO_3^- et Mg^{++} ont amélioré la croissance du tube dans le cas de la germination in vitro de la canne à sucre. Ce là concorde à nos propres résultats qui montrent que dans le cas d'absence de sulfate de magnésium, un taux de germination égale à 29% (Figure 13), et l'ajoute d'une légère concentration de $MgSO_4$ induit une augmentation du taux de germination.

**Figure 13.** Grains de pollen en absence du $MgSO_4$ (Photo original) Gx200.

La meilleure concentration est de 0,016% qui donne une excellente germination (89,66%) avec un allongement de tube pollinique de 57,56 μm (Figure 14) par rapport à notre témoin 0,02% de MgSO_4 qui est à base de Brewbaker et Kwack (1963) (Figure 15).

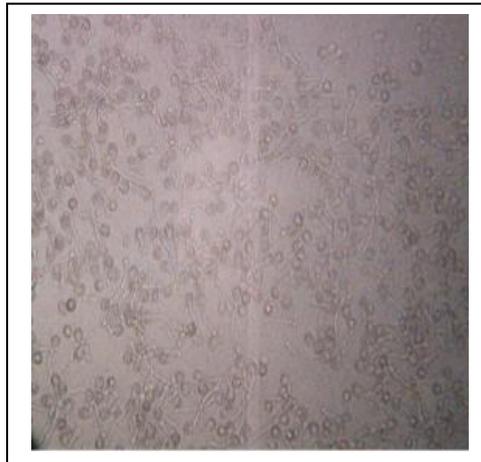


Figure 14. Grains de pollen à 0,016 % de MgSO_4 (Photo original) Gx200.



Figure 15. Grains de pollen Témoin de MgSO_4 (Photo original) Gx200.

Les concentrations élevées de sulfate de magnésium de 1 et 2 % ne déclenchent aucune germination et donc aucune formation du tube pollinique (Figure 16).

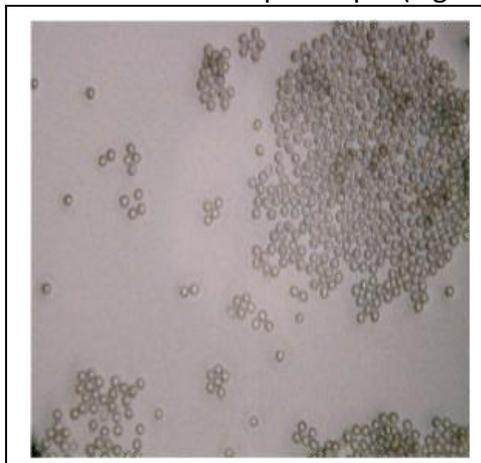


Figure 16. Grains de pollen à 1 % du MgSO_4 (Photo original) Gx200

Nos résultats conflictent aux travaux d'Abid et al. (2008) sur le développement de la luzerne qui affirme que des pourcentages élevés < 90% ont été détectés à une concentration de 1g/ml, alors que nous trouvons qu'il y a une inhibition totale de la germination.

CONCLUSION

La germination du pollen et la croissance des tubes polliniques sont des conditions préalables à la fertilisation et au développement des grains de pollen. Notre étude permet de créer un milieu de culture optimum pour la germination des grains de pollen *in vitro* de type Ghars, ce milieu est donc modifié de ceux de Brewbaker et Kwack. On a trouvé que pour une germination et une longueur de tube pollinique maximales il faut préparer un milieu composé de : 0,05% H₃BO₃, 0,01% CaNO₃, 0,01% KNO₃ et 0,02% MgSO₄. Ce milieu approprié permet d'utiliser le pollen adéquat pour accroître le rendement, augmenter les cultures commerciales. On déduit à la fin que les composants du milieu de culture ont un rôle important dans la germination et croissance des tubes polliniques et que l'effet de ces composants est complémentaire. L'acide borique (H₃BO₃) augmente le taux de germination, le nitrate de calcium (CaNO₃) influe sur la germination et beaucoup plus sur l'allongement du tube pollinique, alors que le nitrate de potassium (KNO₃) et le sulfate de magnésium (MgSO₄) amplifient l'action de nitrate de calcium.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abid M., Haddad M. et Ferchichi D., (2008).** Effect of magnesium sulfate on the first stage of development of Lucerne. Séminaires méditerranés, (79), 405-408.
- Ahmad S., Rana A., Sharma R., Kumar A. et Gnihotri R., (2012).** Effect of different media and boric acid on pollen germination and tube growth of *Tribulus terrestris-atraditional* medicinal plant. International journal of pharmaceutical sciences review and research, 13(2), 3p.
- Babahani S., Siboukeur S. et Bougedoura N., (2009).** Palmiers males dans la cuvette de Ouargla : un patrimoine marginalise. Journal Algérien des régions arides, (8), 5-13.
- Benabdallah A., (1990).** La phoeniculture, Options méditerranéennes, (11), 16p.
- Boughediri L., (1985).** Contribution à la connaissance du palmier dattier : Étude du pollen. Univ. Alger, Mém., Magister, 132p.
- Brewbaker J.L. et kwack B.H., (1963).** The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. American journal of botany, (50), 859-865.
- Cole R. A et Flower J.E., 2006.** Polarized growth: maintaining focus on the stipe. Plant biology, (159), 539-563.
- Ghanta R. et Mondal S., (2013).** Effect of Some Nutrients on *In Vitro* Pollen Germination of *Withania Somnifera* (L.) Dunal. Annals of Plant Sciences, 02 (06), 182-187.
- Holdaway T.L. et Hepler P.K., (2003).** Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes. New phytol., (159), 539-563.
- Kavand A., Shuraki Y. D., Ebadi A. Et Abdosi V., (2014).** Optimizing culture medium for *in vitro* germination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pollen. European journal of experimental biology, (4), 665-669.
- Kühntreiber W. M. Et Jaffe L. F., (1990).** Detection of extracellular calcium gradients with a calcium-specific vibrating electrode. J. cell. biol., (110), 1565-1573.
- Lepengue A .N., Mavoungou J. F., Souza A., M'batchi B., (2013).** Effet de l'acide borique sur la croissance de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *Sabdariffa*) au Gabon. European scientific journal, (9), 2013, 12p.
- Malhó R. et Trewavas A. J., (1949).** Localized apical increases of tosolite free calcium control pollen tube orientation. Plant cell., (8), 1996, 1935-1949.
- Miller D.D., Callahan D.J. et Hepler P.K., (1992).** Free Ca²⁺ gradient in growing pollen tubes of lillim. J. Cell., (101), 77-12.

- Obermeyer G. et Weisenseel M.H., (1991).** Calcium channel blocker and calmodulin antagonists affect the gradient of free calcium ions in lily pollen tubes. *Eur. J. Cell. Biol.*, (56), 1991, 319-327.
- Pieron E.S., Miller D.D., Callaham D.A., Shipley A.M., Rivers B., Cresti M. et Hepler P.K., (1994).** Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: Effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *Plant cell.*, (6), 1815-1828.
- Pierson E.S., Miller D.D., Callaham D.A., Aken J.V., Hackett G. Et Hepler P.K., (1996).** Tip- localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth, *Dev. Biol.*, (174), 160-173.
- Rathore K.S., Cork R.J. et Robinson K.R. (1991).** Cytoplasmic gradient of Ca²⁺ is correlated with the growth of lily pollen tubes. *Dev. Biol.* (148), 612-619.
- Weinbaum S.A., I. Klein F.E., Broadbent W.C. Micke et Muraoka T.T., (1984).** Effects of time of nitrogen application and soil texture on the availability of isotopically labeled fertilizer nitrogen to reproductive and vegetative tissue of mature almond trees. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, (109), 339-343.