

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES ET DE BIOLOGIE  
DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

Thèse

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTRE  
EN SCIENCE AGRONOMIQUE

SPECIALITE : AMELIORATION DES PRODUCTIONS VEGETALES

Thème

*Essais d'obtention des cals embryogènes et de  
régénération de plants résistants à la salinité  
chez l'*Atriplex halimus* L.*



Présentée par :

M<sup>elle</sup> OUAISSA NADJET

Jury :

Président : M<sup>r</sup> BOUTEKRABT A. Professeur Univ. SAAD DAHLEB Blida.

Promotrice : M<sup>me</sup> BENREBIHA F/Z. Chargée de cours Univ. SAAD DAHLEB Blida.

Examineurs : M<sup>me</sup> ABDUL HUSSAINE M.S Chargée de cours Univ.

MOULOUD MAMMERI Tizi-Ouzou.

M<sup>r</sup> SNOUSSI S.A. Maître de conférence Univ. SAAD DAHLEB

M<sup>r</sup>. ACHOUCH A. ; Maître de conférence Univ. SAAD DAHLEB  
Blida.

---- Année universitaire 2002-2003 ----

## Erratum

- P. 2 : Faux : différentes combinaisons et concentrations  
Juste : différentes combinaisons et concentrations hormonales
- P. 32 : Faux : 16 et 8 heures d'obscurité  
Juste : 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité
- P. 33 : Faux : le paramètres suivantes  
Juste : les paramètres suivants
- P. 34 : Faux : vitropagation  
Juste : vitropropagation
- P. 36 : Faux : différentes combinaisons et concentration hormonales  
Juste : différentes combinaisons et concentrations hormonales
- P. 37 : Faux : d'induisent aptitude  
Juste : induisent une aptitude
- P. 39 : Faux : Tableau 10  
Juste : Tableau 7
- P. 40 : Faux : Nettement plus supérieur  
Juste : Plus supérieur
- P. 44 : Faux : Le poids frais  
Juste : Le poids sec
- P. 47 : Faux : par entre noeuds  
Juste : des entre-nœuds
- P. 49 : Faux : les cals issus des feuilles et développés sont  
Juste : les cals issus des feuilles sont
- P. 50 : Faux : A<sub>2</sub> (2mg/l "2,4-D" + 1 mg/l "kinétine")  
Juste : A<sub>2</sub> (2mg/l "2,4-D" + 2 mg/l "kinétine")  
Faux : A<sub>4</sub> (2mg/l "2,4-D" + 1 mg/l "BAP")  
Juste : A<sub>4</sub> (2mg/l "2,4-D" + 2 mg/l "BAP")
- P. 52 : Faux : (combinaison et concentration hormonales)  
Juste : (combinaisons et concentrations hormonales)  
Faux : 1 mg/l kinétine + 0,5 2,4-D  
Juste : 1 mg/l kinétine + 0,5 mg/l 2,4-D
- P. 53 : Faux : Les micro-éléments de GAMBORG induit  
Juste : Les micro-éléments de GAMBORG induisent
- P. 59 : Faux : Les entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) sur le milieu A<sub>1</sub>  
Juste : Les entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) sur le milieu A<sub>2</sub>
- P. 63 : Faux : Qui sont caractéristique morphologique des cals de type organogène.  
Juste : Qui présentent des caractéristiques morphologiques des cals de type organogène.
- P. 85 : Faux : P<sub>0</sub>. Juste : L<sub>0</sub> (Planche 4)  
Faux : P<sub>2</sub>. Juste : L<sub>1</sub> (Planche 4)
- P. 86 : Faux : P<sub>3</sub>. Juste : L<sub>2</sub> (Planche 5)  
Faux : P<sub>5</sub>. Juste : L<sub>3</sub> (Planche 5)
- P. 97 : Faux : au concentration élevé  
Juste : aux concentrations élevées

# Dédicaces

*Ce modeste mémoire de fin d'étude est dédié :*

*A mes très chères parents qui m'ont encouragés et aidés tout au long de mes études par leurs constant soutien.*

*A mes sœurs et frères.*

*A HAKIM et NARIMEN pour leurs précieuses aides.*

*Ainsi qu'à toute ma famille.*

*A HAMIDA, AHLEM, FATIHA, SUSANE, FADHILA, KARIMA et NADJIA qui m'ont beaucoup aidés au cours de mon expérience.*

*A tous mes amis qui m'ont souhaités du bien*

**NADJET**



## REMERCIEMENTS

*Je* remercie DIEU qui m'a donné la force, la santé et le courage de pouvoir achever ce modeste travail.

*Je* ne saurais exposer ce mémoire sans exprimer ma reconnaissance à mon professeur Madame BENREBIHA F.Z. de bien vouloir m'encadrer, ainsi que pour avoir suivi attentivement la progression de ce travail et pour ses conseils judicieux.

*J'*adresse aussi toute ma gratitude à Monsieur BOUTEKRABT A. qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

*Mes* sincères remerciements vont à Messieurs SNOUSSI S.A. et ACHOUCH A., ainsi qu'à Madame ABDUL HUSSAINE M.S., qui m'ont fait l'honneur d'être examinateurs de mon jury de thèse.

*J'*exprime ma reconnaissance à toutes les techniciennes du laboratoire de physiologie végétale, laboratoire de mycologie et laboratoire d'amélioration des plantes pour leurs extrêmes gentillesse et soutiens.

*Je* ne voudrais pas non plus oublier de remercier très sincèrement Madame CHAOU A. F., professeur à l'institut d'Agronomie pour ses précieux conseils ainsi qu'à son aide pour la réalisation de ce travail.

# Sommaire

INTRODUCTION .....	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique .....	3
1 – Généralité sur l' <i>Atriplex halimus</i> .....	3
1-1– Description de l'espèce .....	3
1-2– Ecologie et répartition .....	3
1-3– Multiplication de l' <i>Atriplex halimus</i> .....	4
1-4– Intérêts de l' <i>Atriplex halimus</i> .....	5
1-4-1– Intérêt agronomique .....	5
1-4-2– Intérêt écologique .....	5
1-4-3– Intérêt économique .....	5
2 – Stress salin .....	6
2-1– La salinité .....	6
2-1– Stratégie adaptative des plantes en milieu salin.....	6
3 – Culture <i>in vitro</i> .....	7
3-1– Considérations générales sur la culture <i>in vitro</i> .....	7
3-2– Intérêt de la culture <i>in vitro</i> .....	8
3-3– Intérêt de la sélection <i>in vitro</i> .....	9
4 – Organogenèse chez les plantes supérieures .....	9
4-1– Caulogenèse et la rhizogenèse .....	9
4-2– Embryogenèse somatique .....	10
4-2-1– Généralité sur l'embryogenèse somatique .....	10
4-2-2– Comparaison entre l'embryogenèse somatique et l'embryogenèse zygotique .....	11
4-2-3 – Intérêts de l'embryogenèse somatique .....	12
5 – Facteurs influençant l'organogenèse chez les plantes supérieurs .....	13
5- 1 – Conditions extrinsèques .....	13
5- 1-1 – Environnement .....	13
5-1-1-1– Température .....	13
5-1-1-2– Lumière .....	14
5-1-1-3– Potentiel hydrique .....	14
5-1-1-4– Les échanges gazeux .....	14

5-1-2- Milieu de culture .....	14
5-1-2-1- Composition minérale du milieu .....	15
5-1-2-2- Régulateurs de croissance .....	16
• Les auxines .....	18
• Les cytokinines .....	19
• Les gibbérellines .....	20
5-1-2-3- Source de carbone .....	21
5-2- Les conditions intrinsèques .....	21
5-2-1- Type d'explant .....	21
5-2-2- Age physiologique de l'explants .....	21
5-2-3- Epoque de prélèvement .....	22
5-2-4- Génotype .....	22
<b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes .....</b>	<b>23</b>
1 - Matériel végétal .....	23
2 - Stérilisation du matériel végétal .....	23
3 - Germination .....	23
4 - Repiquage .....	23
5 - Origines des explants .....	23
6 - Milieu de culture .....	28
6-1- Composition minérale .....	28
6-2- Composition organique des milieux de base .....	29
6-2-1- Source de carbone .....	29
6-2-2- La gélose .....	29
6-2-3- Les combinaisons hormonales .....	30
7 - Le pH .....	32
8 - Condition de culture .....	32
8-1- Température .....	32
8-2- Lumière .....	32
9 - Paramètres étudiés .....	33
10 - Mode d'expression des résultats .....	33
<b>Chapitre 3 : Essais d'embryogenèse somatique .....</b>	<b>34</b>
Introduction .....	34
1 - Recherche des embryons somatiques à partir de feuilles, entre-nœuds et racines de deux clones sélectionnés .....	34

1-1- Effets des hormones de croissance sur le pourcentage des cals...	34
1-1-1- Effet des hormones de croissance sur le pourcentage des cals issus des deux clones .....	35
1-1-2- Effets des hormones de croissance sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants .....	36
1-1-3- Effets des hormones de croissance sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants des deux clones .....	37
1-2- Effets des hormones de croissance sur le poids frais des cals .....	39
1-2-1- Effet des hormones de croissance sur le poids frais des cals issus des deux clones .....	40
1-2-2- Effets des hormones de croissance sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants .....	41
1-2-3- Effets des hormones de croissance sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants des deux clones .....	42
1-3- Effets des hormones de croissance sur le poids sec des cals.....	44
1-3-1- Effets des hormones de croissance sur le poids sec des cals issus des deux clones .....	45
1-3-2- Effets des hormones de croissance sur le poids sec des cals issus des différents types d'explants .....	46
1-3-3- Effets des hormones de croissance sur le poids sec des cals issus des différents types d'explants des deux clones .....	47
1-4- Effets des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals .....	49
1-4-1- Effets des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals issus du clone $P_1$ .....	49
1-4-2- Effets des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals issus de feuilles du clone $P'_1$ .....	50
1-5-Discussion .....	52
2 - Recherche des embryons somatiques à partir de différents types d'explants.	53
2-1- Effets des hormones de croissance sur le pourcentage des cals ....	53
2-2- Effets des hormones de croissance sur le poids frais des cals .....	56
2-3- Effets des hormones de croissance sur le poids sec des cals .....	58
2-4- Effets des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals issus des différents types d'explants .....	60
2-5-Discussion .....	62
Conclusion .....	63

Chapitre 4 : Sélection de cals résistants au chlorure de sodium (NaCl) .....	64
Introduction .....	64
1 – Effets de différentes concentrations en NaCl sur le pourcentage des cals ...	64
1-1– Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents clones .....	65
1-2– Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants .....	66
1-3– Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants des différents clones .....	67
1-3-1– Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L <sub>0</sub> .....	67
1-3-2– Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L <sub>1</sub> .....	69
1-3-3– Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L <sub>2</sub> .....	69
1-3-4– Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L <sub>3</sub> .....	69
2 – Effets du NaCl sur le poids frais des cals .....	70
2-1– Effets du NaCl sur le poids frais des cals issus des différents clones .....	70
2-2– Effets du NaCl sur le poids frais des cals issus de différents types d'explants .....	71
2-3– Effets du NaCl sur le poids frais des cals issus de différents types d'explants des différents clones .....	73
2-3-1– Effets du NaCl sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants du clone L <sub>0</sub> .....	73
2-3-2– Effets du NaCl sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants du clone L <sub>1</sub> .....	73
2-3-3– Effets du NaCl sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants du clone L <sub>2</sub> .....	73
2-3-4– Effets du NaCl sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants du clone L <sub>3</sub> .....	74
3 – Effets du NaCl sur le poids sec des cals .....	76
3-1– Effets du NaCl sur le poids sec des cals des différents clones .....	76
3-2– Effets du NaCl sur le poids sec des cals issus de différents types d'explants .....	77
3-3– Effets du NaCl sur le poids sec des cals issus de différents types d'explant issus des différents clones .....	78

3-3-1-	Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L <sub>0</sub> .....	78
3-3-2-	Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L <sub>1</sub> .....	79
3-3-3-	Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L <sub>2</sub> .....	79
3-3-4-	Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L <sub>3</sub> .....	79
4 -	Effet du sel sur la couleur et la texture des cals .....	81
4-1-	Effets du NaCl sur la couleur et la texture des cals issus du clone L <sub>0</sub> .....	81
4-2-	Effets du NaCl sur la couleur et la texture des cals issus du clone L <sub>1</sub> .....	82
4-3-	Effets du NaCl sur la couleur et la texture des cals issus du clone L <sub>2</sub> .....	83
4-4-	Effets du NaCl sur la couleur et la texture des cals issus du clone L <sub>3</sub> .....	84
5 -	Discussion .....	87
	Conclusion .....	88
	<b>Chapitre 5 : Essais de régénération chez l'<i>Atriplex halimus</i> L.</b> .....	89
	Introduction .....	89
1 -	Effet de différentes concentrations en hormones de croissance sur le poids frais des cals secondaires .....	89
2 -	Effet de différentes concentrations en hormones de croissance sur le poids sec des cals secondaires .....	90
3 -	Effet de différentes concentrations en hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals secondaire .....	91
4-	Discussion .....	94
	Conclusion .....	95
	Conclusion générale .....	96
	Perspective .....	97
	Références bibliographiques .....	98
	Annexe .....	106

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

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

BAP : Benzylaminopurine

AIA : Acide indole-3-acétique.

AG<sub>3</sub> : Acide gibbérellique

NaCl : Chlorure de sodium

Moy. : Moyenne.

G.H. : Groupe homogène.

CV : Covariance.

E.T. : Ecart-type.

M.S. : MURASHIGE et SKOOG

### 3 – Effets du NaCl sur le poids sec des cals

Afin de déterminer l'effet des différentes concentrations en NaCl sur le poids sec des cals, nous avons effectués l'analyse de variance indiquée sur le tableau suivant.

Tableau 17 : Analyse de variance du poids sec des cals issus des différents types d'explants des clones et développés sur différents milieux de culture.

	DDL	S.C.E.	Carrés Moyens	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var. Totale	143	17839,25	124,75				
Var. Facteur1	3	423,48	141,16	18,14	0,0000		
Var. Facteur2	2	674,08	337,04	43,31	0,0000		
Var. Facteur3	3	10371,96	3457,32	444,27	0,0000		
Var. Inter F.1.2	6	387,18	64,53	8,29	0,0000		
Var. Inter F.1.3	9	2242,80	249,20	32,02	0,0000		
Var. Inter F2.3	6	1078,80	179,80	23,10	0,0000		
Var. Inter F1.2.3	18	1913,22	106,29	13,66	0,0000		
Var. Résiduelle	96	746,88	7,78			2,79	28,0%

Facteur 1 : Clone

Facteur 2 : Explant

Facteur 3 : Différentes concentrations en sel (NaCl).

L'analyse de variance montre que les facteurs clones, type d'explant et salinité exercent une influence très hautement significative sur le poids sec des cals.

De même, l'analyse de variance des différentes interactions entre ces facteurs étudiés deux à deux et ces trois facteurs ensemble révèle l'existence d'une action très hautement significative sur le poids sec des cals.

#### 3-1– Effets du NaCl sur le poids sec des cals des différents clones

Les différents clones étudiés ne répondent pas de la même manière vis-à-vis des différentes concentrations en NaCl sur le poids sec moyen des cals. Le clone L<sub>0</sub> présente le poids sec moyen le plus élevé (12,79 mg) par rapport aux autres clones (Annexe 19 et figure 25).

Quand aux différentes concentrations en sel, les milieux de culture S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub> induisent la formation des cals avec des poids secs moyens variants de 11,49 mg, pour la concentration S<sub>1</sub>, à 1,10 mg, pour la concentration S<sub>3</sub>. Alors que le milieu de culture témoin permet aux clones testés d'exprimer le meilleur pouvoir callogène (Poids sec moyen des cals égal à 23,14 mg) (Annexe 18 et figure 25).

En ce qui concerne l'étude de ces deux facteurs simultanément, nous constatons que les clones L<sub>0</sub> mis en culture sur le milieu de culture témoin présente les meilleures potentialités callogènes. Ce même clone mis en culture sur le milieu de culture S<sub>3</sub> n'induit aucun pouvoir calogène. Les clones L<sub>2</sub> et L<sub>3</sub> présentent respectivement les poids secs moyens des cals 22,80 mg et 18,33 mg pour le milieu de culture S<sub>3</sub>. Ces clones mis en culture sur le milieu de culture S<sub>3</sub> induisent un faible pouvoir calogène, dont le poids sec moyen des cals varie de 1,66 mg à 2,76 mg, qui sont obtenus respectivement par le clone L<sub>3</sub> et le clone L<sub>2</sub> (Annexe 18 et figure 25).

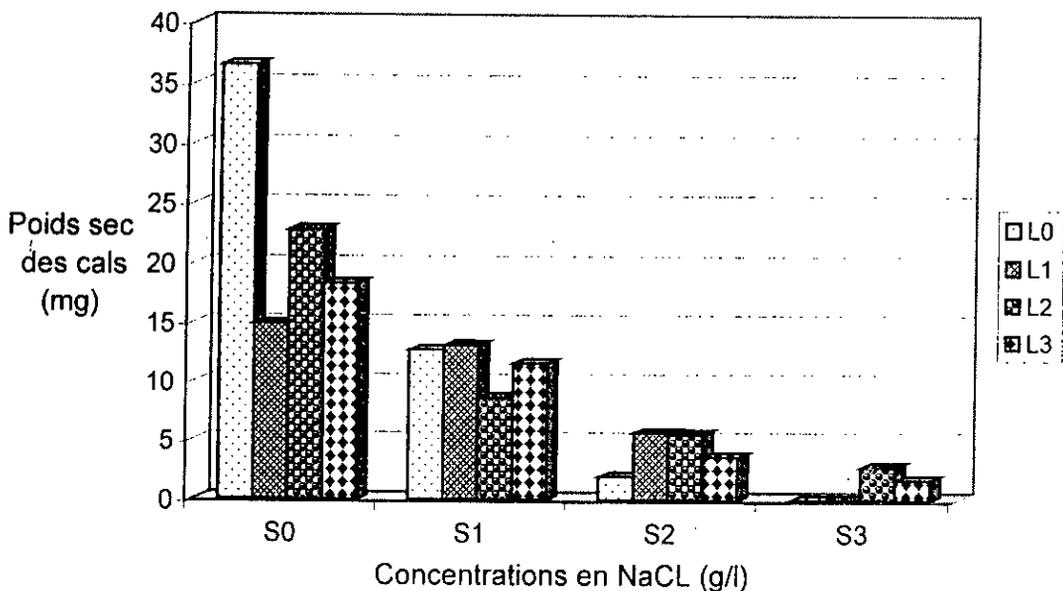


Figure 25 : Effet du NaCl sur le poids sec des cals issus des différents clones

### 3-2- Effets du NaCl sur le poids sec des cals issus de différents types d'explants

Les différentes concentrations en sel n'exercent pas un même effet sur les différents types d'explants étudiés sur le poids sec des cals. L'annexe 20 et la figure 26 révèlent que le meilleur potentiel callogène exprimé en poids sec moyen (11,89 mg) est obtenu par les entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>). Alors que les fragments de racines (Ex<sub>2</sub>) montrent un faible poids sec moyen des cals (6,95 mg).

Quant aux différentes concentrations en sel, le milieu S<sub>0</sub> permet aux explants d'exprimer la meilleure potentialité callogène (23,14 mg). Cette potentialité diminue avec l'augmentation de la concentration de NaCl dans le milieu de culture jusqu'à un poids moyen sec des cals égal à 1,10 mg, qui est obtenu est pour la concentration S<sub>3</sub> (Annexe 20 et figure 26).

Concernant l'étude de l'interaction entre les deux facteurs étudiés, nous remarquons que le milieu S<sub>3</sub> ne permet pas aux fragments de racines d'exprimer leur potentialité callogène. Par ailleurs, les entre-nœuds et les feuilles (Ex<sub>3</sub>) mis en culture sur le même milieu (S<sub>3</sub>) expriment un faible pouvoir callogène dont les poids secs moyen des cals sont respectivement 0,86 mg et 2,45 mg (Annexe 20 et figure 26).

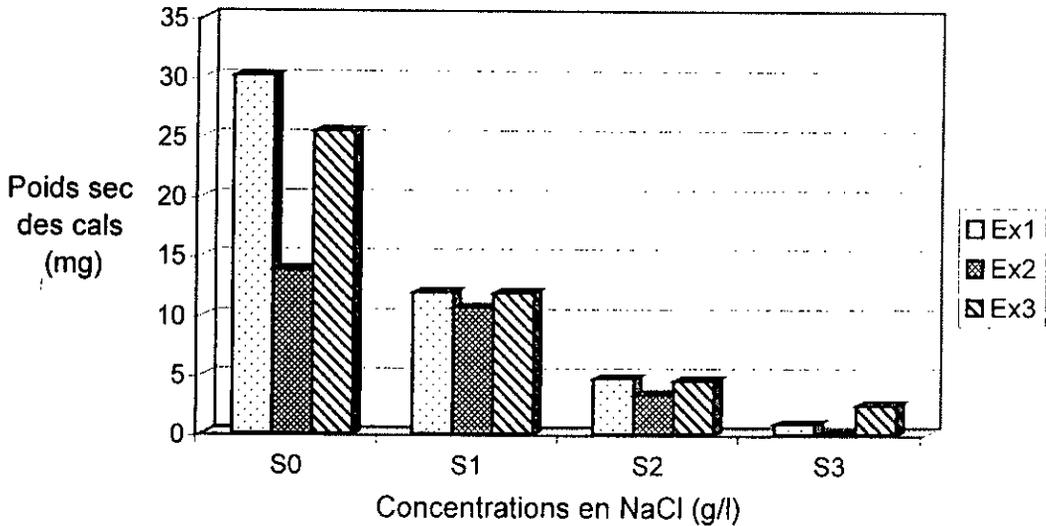


Figure 26 : Effet du NaCl sur le poids sec des cals issus des différents types d'explants

### 3-3- Effets du NaCl sur le poids sec des cals issus de différents types d'explant issus des différents clones

Après un mois de mis en culture, nous avons obtenu un développement des cals avec des poids sec moyens qui se diffèrent non seulement selon les concentrations en NaCl utilisées dans le milieu de culture, mais aussi selon le type de clone et le type d'explant utilisés (Annexe 21 et figure 27).

#### 3-3-1- Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>0</sub>

Le meilleur poids sec moyen des cals (57,00 mg) est obtenu par les entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) sur le milieu de culture témoin. En second, les feuilles (Ex<sub>3</sub>) présentent un poids sec moyen des cals de l'ordre de 28,93 mg. Nous remarquons que le poids sec moyen des cals diminue avec l'augmentation de la concentration du NaCl dans le milieu de culture jusqu'à s'annuler pour la concentration 15 g/l (S<sub>3</sub>) et ceci pour les trois types d'explants testés. Par ailleurs, les fragments de racines ne présentent aucun pouvoir callogène à partir de la concentration 10 g/l de NaCl (S<sub>2</sub>) (Annexe 21 et figure 27).

### **3-3-2- Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>1</sub>**

Le meilleur pouvoir callogène (24,80 mg) est obtenu par les feuilles mises en culture sur le milieu témoin suivi des entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) mis en culture sur le même milieu. Ces valeurs diminuent avec l'augmentation de la concentration de NaCl dans le milieu de culture et qui s'annule pour la concentration 15 g/l de NaCl (Annexe 21 et figure 27).

Par ailleurs, le plus faible poids sec moyen des cals (5,03 mg) est obtenu par les fragments de racines (Ex<sub>2</sub>) sur le milieu témoin ; cette valeur augmente (13,33 mg) pour cet explant sur le milieu de culture S<sub>1</sub> (Concentration en NaCl est 5 g/l). Ce poids sec des cals diminue (5,13 mg) pour ces fragments de racines à partir de la concentration 10g/l jusqu'à s'annuler pour la concentration 15 g/l (Annexe 21 et figure 27).

### **3-3-3- Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>2</sub>**

Les cals obtenus à partir des feuilles (Ex<sub>3</sub>) présentent le meilleur poids sec moyen (27,47 mg) pour la milieu témoin (S<sub>0</sub>). En second, les cals obtenus à partir des entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) présentent un poids sec moyen des cals égal à 22,63 mg pour le même milieu de culture. Comme pour les autres clones, ces valeurs diminuent avec l'augmentation de la concentration de NaCl dans le milieu de culture (Annexe 21 et, figure 27).

Le milieu S<sub>3</sub> permet aux feuilles et aux entre-nœuds d'exprimer un faible pouvoir callogène avec des poids secs moyens des cals, respectivement, de l'ordre de 6,33 mg et 1,93 mg. Les fragments de racines présentent un faible pouvoir callogène par rapport aux autres types d'explants et qui s'annule pour le milieu S<sub>3</sub> (Annexe 21 et figure 27)

### **3-3-4- Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>3</sub>**

Les entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) induisent le meilleur pouvoir callogène, exprimé en poids sec moyen des cals (25,87 mg), pour le milieu témoin (S<sub>0</sub>). En second, les feuilles (Ex<sub>3</sub>) présentent un poids sec moyen des cals de l'ordre de 20,77 mg. Ces types d'explants développent des cals avec des poids secs moyens inférieures à ceux obtenus par le milieu témoin, et ce ci pour les autres milieux de culture, jusqu'à (1,05) mg (obtenu par les entre-nœuds sur le milieu S<sub>3</sub>) (Annexe 21 et figure 27).

Les fragments de racines (Ex<sub>2</sub>) sur le milieu S<sub>1</sub> développent des cals avec un poids sec moyen (17,53 mg) supérieur à celui obtenus avec ces explants mis en culture sur le milieu de culture témoin. Ces mêmes explants mis en culture sur le milieu S<sub>2</sub> présentent un poids sec moyen des cals de l'ordre de (2,77) mg. Ce poids sec est inférieur à celui obtenu par le milieu témoin (Annexe 21 et figure 27).

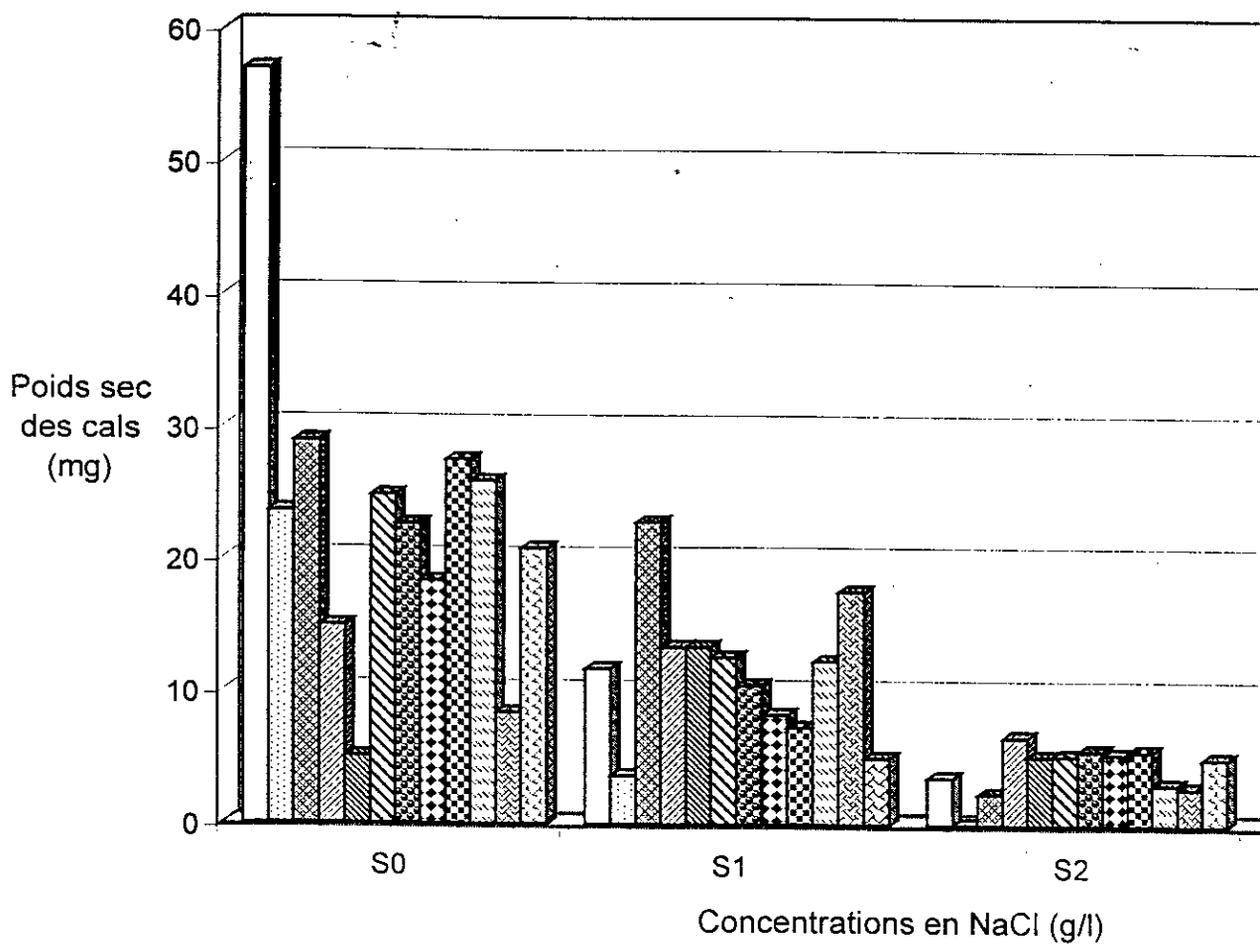


Figure 27 : Effet du NaCl sur le poids sec des cals issus des différents types différents clones

#### 4 – Effet du sel sur la couleur et la texture des cals

##### 4-1– Effets du NaCl sur la couleur et la texture des cals issus du clone L<sub>0</sub>

Les cals issus de différents milieux de culture présentent des couleurs et des textures différentes (Tableau 18).

Tableau 18 : Couleurs et textures des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>0</sub>

Explants	Milieu	Couleur	Texture
Entre-nœuds	S <sub>0</sub>	Vert clair à blanc	Friable
	S <sub>1</sub>	Vert à beige	Noduleuse
	S <sub>2</sub>	Beige à brune	Granuleuse
	S <sub>3</sub>	-	-
Fragments de racines	S <sub>0</sub>	Beige	Friable
	S <sub>1</sub>	Beige à brune	Granuleuse
	S <sub>2</sub>	-	-
	S <sub>3</sub>	-	-
Feuilles	S <sub>0</sub>	Vert clair à blanc	Noduleuse
	S <sub>1</sub>	Vert clair	Noduleuse
	S <sub>2</sub>	Beige à brune	Granuleuse
	S <sub>3</sub>	-	-

Le tableau 18 indique que les cals issus des fragments de racines sur le milieu témoin sont de couleur beige à texture friable caractéristique morphologique des cals embryogènes. Or, les cals issus des entre-nœuds et des feuilles sur le même milieu S<sub>2</sub> sont de couleur vert clair à blanc de texture noduleuse caractéristique morphologique des cals caulogènes. De même, les cals obtenus à partir des entre-nœuds et des feuilles repiqués sur le milieu S<sub>1</sub> sont de couleur verte à beige à texture noduleuse (Planche 4 : A).

Cependant, les feuilles, mis en culture sur le milieu de culture S<sub>2</sub>, induit la formation de cals de couleur beige à brune de texture granuleuse. La couleur brune indique sur la mort des cellules.

#### 4-2- Effets du NaCl sur la couleur et la texture des cals issus du clone L<sub>1</sub>

Les cals issus de différents milieux présentent des caractéristiques morphologiques variées (Tableau 19).

Tableau 19 : Couleurs et textures des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>1</sub>

Explants	Milieu	Couleur	Texture
Entre-nœuds	S <sub>0</sub>	Vert clair	Friable
	S <sub>1</sub>	Vert	Noduleuse
	S <sub>2</sub>	Vert	Noduleuse
	S <sub>3</sub>	—	—
Fragments de racines	S <sub>0</sub>	Vert clair	Friable
	S <sub>1</sub>	Vert à beige	Friable
	S <sub>2</sub>	Vert à beige	Friable
	S <sub>3</sub>	—	—
Feuilles	S <sub>0</sub>	Vert clair	Friable
	S <sub>1</sub>	Vert	Noduleuse
	S <sub>2</sub>	Vert	Noduleuse
	S <sub>3</sub>	Vert clair à beige	Noduleuse

Le tableau 19 révèle que le milieu S<sub>0</sub> donne des cals de couleur vert clair (indiquant sur l'activité photosynthétique) et de texture friable. En outre, les cals issus des feuilles et des entre-nœuds, qui sont développés sur le milieu S<sub>1</sub>, et les cals issus des feuilles développés sur le milieu S<sub>3</sub> sont de couleur verte à beige de texture noduleuse, caractéristique morphologique des cals de type organogène. Tandis que les cals obtenus à partir des fragments de racines repiqués sur les milieux S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> sont de couleur verte à beige de texture friable (Planche 4 : B).

#### 4-3- Effets du NaCl sur la couleur et la texture des cals issus du clone L<sub>2</sub>

Les cals issus des trois types d'explants et développés sur les différents milieux de culture présentent des caractéristiques morphologiques variées, mais nous remarquons que ces cals présentent tous la couleur verte (Tableau 20).

Tableau 20 : Couleurs et textures des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>2</sub>

Explants	Milieu	Couleur	Texture
Entre-nœuds	S <sub>0</sub>	Vert clair	Friable
	S <sub>1</sub>	Vert	Noduleuse
	S <sub>2</sub>	Vert	Noduleuse
	S <sub>3</sub>	Vert clair à beige foncé	Friable à granuleuse
Fragments de racines	S <sub>0</sub>	Vert clair à beige	Friable
	S <sub>1</sub>	Vert à beige	Friable
	S <sub>2</sub>	Vert clair à beige foncé	Friable
	S <sub>3</sub>	—	—
Feuilles	S <sub>0</sub>	Vert clair	Friable
	S <sub>1</sub>	Vert	Noduleuse
	S <sub>2</sub>	Vert	Noduleuse
	S <sub>3</sub>	Vert à beige foncé	Noduleuse

Les entre-nœuds et les feuilles induisent la formation de cals verts à texture friable pour le milieu témoin. Alors que ces types d'explants développent des cals verts à texture noduleuse pour les milieux S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub>, qui présentent des caractéristiques morphologiques des cals de type calogène (Tableau 20) (Planche 5 : A).

Quant aux fragments de racines, les cals développés sur les milieux S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> sont de couleurs verte claire à verte à beige et de texture friable. La partie des cals dont la couleur est beige présente des caractéristiques morphologiques des cals embryogènes; tandis que la partie des cals dont la couleur est verte claire à verte présente des caractéristiques morphologiques des cals organogènes.

#### 4-4- Effets du NaCl sur la couleur et la texture des cals issus du clone L<sub>3</sub>

Les milieux de culture n'ont pas la même action sur la morphogenèse des cals, ce qui est indiqué dans le tableau suivant.

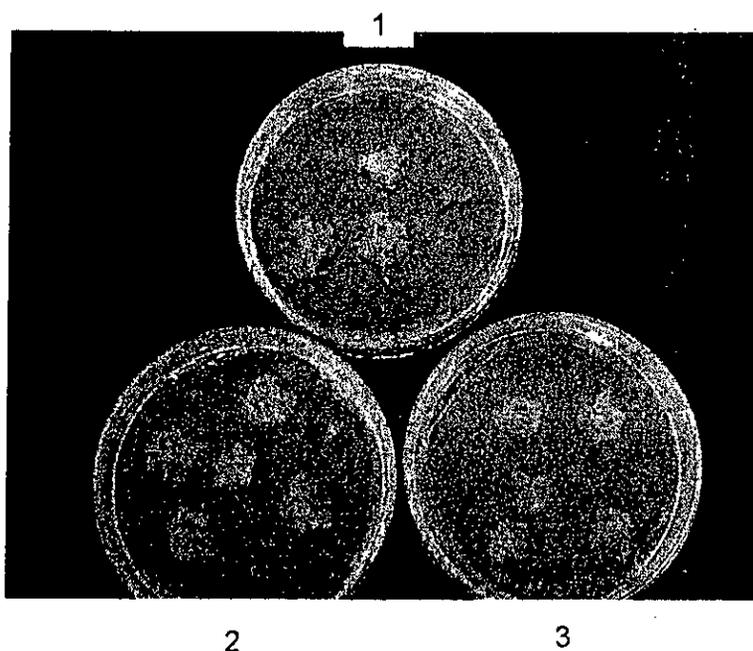
Tableau 21 : Couleurs et textures des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>3</sub>

Explants	Milieu	Couleur	Texture
Entre-nœuds	S <sub>0</sub>	Vert clair	Friable
	S <sub>1</sub>	Vert	Noduleuse
	S <sub>2</sub>	Vert	Noduleuse
	S <sub>3</sub>	Vert à beige foncé	Friable à granuleuse
Fragments de racines	S <sub>0</sub>	Vert clair à beige	Friable
	S <sub>1</sub>	Vert clair	Friable
	S <sub>2</sub>	Vert à beige foncé	Friable
	S <sub>3</sub>	—	—
Feuilles	S <sub>0</sub>	Vert clair	Friable
	S <sub>1</sub>	Vert	Noduleuse
	S <sub>2</sub>	Vert	Noduleuse
	S <sub>3</sub>	Vert à beige foncé	Friable à granuleuse

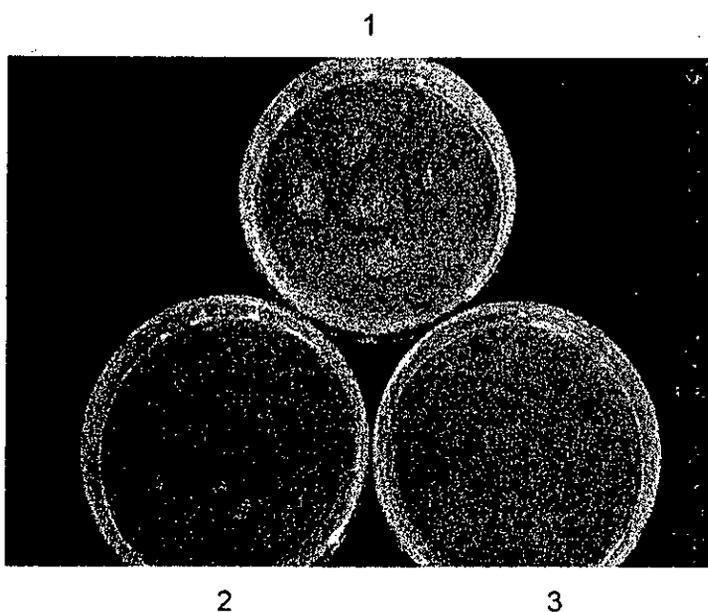
Le tableau 21 montre que les cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>2</sub> sont de couleur verte indiquant sur l'activité photosynthétique. Les cals issus des entre-nœuds et des feuilles, développés sur les milieux S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub>, sont de couleur verts et noduleux se qui nous indique sur leurs potentialités caulogènes (Planche 5 : B). Les fragments de racines mis en culture sur les milieux de culture S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub>, présentent des cals verts à verts clairs à beige foncés de texture friable.

Nous remarquons que le milieu S<sub>0</sub> donne des cals verts clairs à texture friable; caractéristiques morphologiques des cals organogènes. Le milieu S<sub>3</sub> induit la formation des cals de couleur verte à beige foncé à texture friable à granuleuse. La partie des cals qui est de couleur beige foncé à texture granuleuse, indique l'arrêt de toute activité cellulaire.

## Planche 4

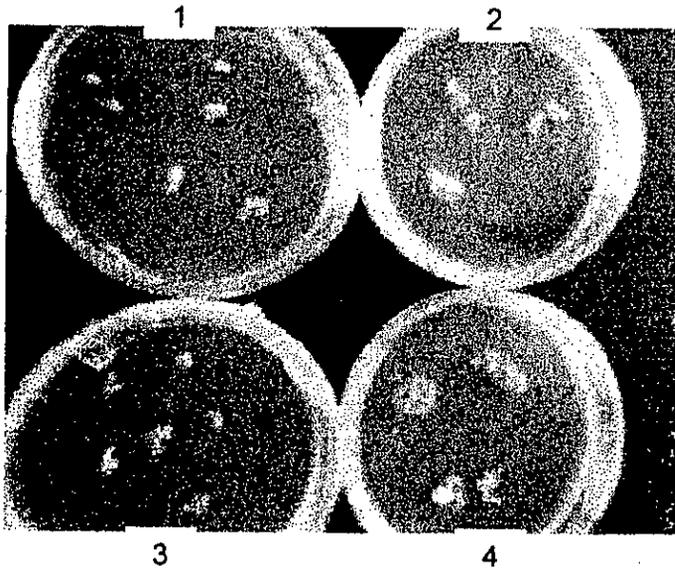


**A** : Aspects morphologiques des cals issus de  $P_0$  et développés sur milieu  $S_0 = M.S. + 1 \text{ mg/l "2,4-D"} + 1 \text{ mg/l "BAP"}$ . (1) Cals issus de feuilles.  
(2) Cals issus d'entre-nœuds.  
(3) Cals issus de fragments de racines.



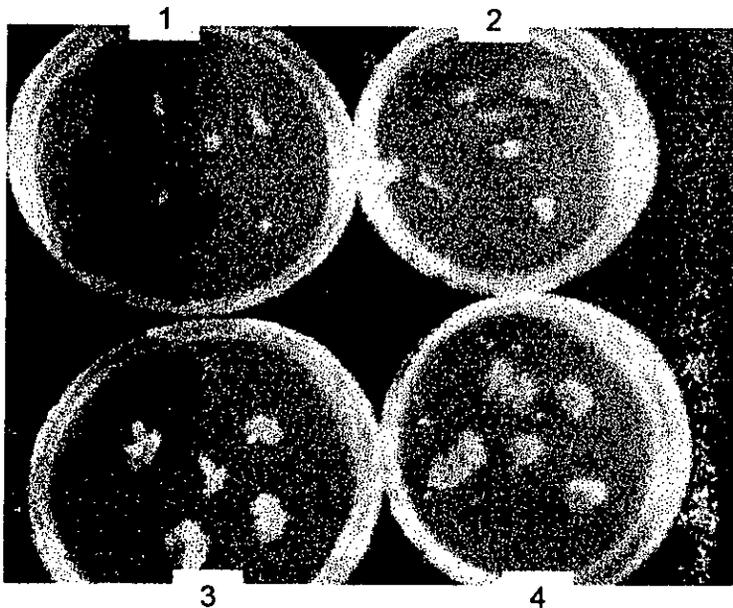
**B** : Aspects morphologiques des cals issus de  $P_2$  et développés sur milieu  $S_2 = M.S. + 1 \text{ mg/l "2,4-D"} + 1 \text{ mg/l "BAP"} + 10 \text{ g/l de NaCl}$ . (1) Cals issus de feuilles.  
(2) Cals issus d'entre-nœuds.  
(3) Cals issus de fragments de racines.

### Planche 5



**A :** Aspects morphologiques des cals issus des feuilles du clone P<sub>3</sub> et développés sur milieu M.S. + 1 mg/l "2,4-D" + 1 mg/l "BAP" et additionnés de différents concentrations de NaCl.

- (1) Cals développés sur milieu S<sub>3</sub> ([NaCl]=15g/l)
- (2) Cals développés sur milieu S<sub>2</sub> ([NaCl]=10g/l)
- (3) Cals développés sur milieu S<sub>1</sub> ([NaCl]= 5g/l)
- (4) Cals développés sur milieu S<sub>0</sub> ([NaCl]= 0g/l)



**B :** Aspects morphologiques des cals issus de feuilles du clone P<sub>5</sub> et développés sur milieu M.S. + 1 mg/l "2,4-D" + 1 mg/l "BAP" additionnés de différentes concentrations de NaCl.

- (1) Cals développés sur milieu S<sub>3</sub> ([NaCl]=15g/l)
- (2) Cals développés sur milieu S<sub>2</sub> ([NaCl]=10g/l)
- (3) Cals développés sur milieu S<sub>1</sub> ([NaCl]= 5g/l)
- (4) Cals développés sur milieu S<sub>0</sub> ([NaCl]= 0g/l)

## 5 – Discussion

Nous constatons que les meilleurs types d'explants qui montrent une bonne aptitude à la callogenèse, ainsi qu'un bon pouvoir callogène sont ceux appartenant aux clones L<sub>3</sub> (clone développé sur milieu M.S. additionné de 15 g/l de NaCl), suivi du clone L<sub>2</sub> (clone développé sur milieu M.S. additionné de 10 g/l de NaCl).

Par ailleurs, le milieu témoin induit une meilleure aptitude à la callogenèse (exprimé en pourcentage moyen des cals) et un meilleur pouvoir callogène (exprimé en poids frais moyen des cals et en poids sec moyen des cals) ; qui diminuent avec l'augmentation du NaCl dans le milieu de culture. Chez les espèces halophytes, NIU *et al.* (1993) notent que les mécanismes de résistance au sel sont associés, non seulement, à l'organisation de la plante entière, mais aussi à la composante cellulaire.

Pour les clones L<sub>1</sub> et L<sub>2</sub>, nous avons notés que le milieu de callogenèse additionné de 5 g/l de NaCl induit les meilleures potentialités callogènes par rapport au milieu témoin et aux autres milieux testés. Une même différence de sensibilité entre la plante entière et la souche cellulaire est constatée par CHRETIEN (1992) chez le jojoba (*Simmondsia chinensis* Link).

En ce qui concerne les clones L<sub>2</sub> et L<sub>3</sub>, les entre-nœuds et les feuilles manifestent une certaine tolérance au NaCl puisqu'ils présentent une faible aptitude callogène vis-à-vis du milieu S<sub>3</sub> (M.S.+1mg/l "2,4-D" + 1 mg/l "BAP" + 15 g/l de NaCl). D'après AYADI *et al.* (1980), au niveau cellulaire, chez plantes supérieures, le sodium est pompé du cytoplasme vers l'extérieur ou vers la vacuole, maintenant, ainsi, la machinerie métabolique à l'abri de concentrations ioniques trop élevées.

Par ailleurs, les différents types d'explants issus des clones L<sub>0</sub> et L<sub>1</sub> ne manifestent aucune aptitude callogène. Par contre, les clones L<sub>2</sub> et L<sub>3</sub> ne manifestent aucune potentialité callogène vis-à-vis du milieu S<sub>3</sub>.

D'autre part, le meilleur pouvoir callogène exprimé en poids frais moyen des cals ((217,29) mg) est induit par le clone témoin (L<sub>0</sub>), suivi par le clone L<sub>3</sub> dont le poids frais des cals égal à (124,96) mg.

BAJJI *et al.* (1998), soulignent, pour un certain nombre de paramètres physiologiques, l'absence de relation entre le comportement des organes au niveau de la plante entière et au niveau des cals correspondants.

Les cals issus des entre-nœuds présentent, en général, le plus important poids frais moyen par rapport aux feuilles et aux fragments de racines.

En effet, le choix de l'explant est un facteur important en vue de l'établissement d'une souche (ZRYD, 1988).

Quant à l'étude morphologique des cals, les trois types d'explants issus des clones L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> et L<sub>3</sub> développent des cals verts clairs à blancs et de texture variant entre friable et noduleuse. Cette étude nous renseigne sur la capacité de ces cals à la caulogénèse. Or, les cals issus des trois types d'explants, qui appartiennent au clone L<sub>0</sub>, sont de couleur et de texture variables. Des résultats similaires ont été trouvés par BOUABDALLAH (1986) chez le *Cucumis melo* L. et confirmé par des coupes histologiques, qui révèle l'existence d'une structure complexe et que les méristèmes s'édifient. Ces derniers constituent l'origine bourgeons néoformés.

## Conclusion

Nous constatons que la réaction des quatre clones testés avec leurs différents types d'explants, sur la callogénèse, est très hétérogène pour les différentes concentrations en NaCl.

L'aptitude à la callogénèse (exprimé en pourcentage moyen des cals) et le pouvoir callogène (exprimé en poids frais moyens des cals et en poids sec des cals) diminue avec l'augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu de culture.

Les clones L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> et L<sub>3</sub> présentent des potentialités callogènes inférieures à ceux obtenus par le clone témoin (L<sub>0</sub>).

Par ailleurs, les entre-nœuds issus du clone L<sub>0</sub> présentent le meilleur pouvoir callogène.

Cependant, les différents milieux de culture testés n'ont pas la même action sur la morphologie des cals (couleur et texture des cals) issus des trois types d'explants des différents clones.

Les cals issus des clones L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> et L<sub>3</sub> sont de couleur verte. Tandis que les cals issus des fragments de racines du clone L<sub>0</sub> mis en culture sur le milieu de callogénèse témoin sont de couleur beige et de texture friable, indiquant sur leur capacité à l'embryogénèse.

## Chapitre 5

Essais de régénération chez  
*Atriplex halimus* L.

## Chapitre 5 : Essais de régénération chez l'*Atriplex halimus* L.

### Introduction

Les cals sont susceptibles d'être conservés indéfiniment par repiquage successif sur des milieux de culture frais. Cependant, ils peuvent aussi être utilisés à n'importe quel moment, pour régénérer rapidement et en grande quantité, des plantes entières.

Pour cela, les cals verts obtenus lors des essais de callogenèse (Chapitre 3), sont fragmentés et repiqués sur sept (7) milieux de culture, qui se diffèrent par la composition hormonale, dans le but de les orienter vers une nouvelle voie d'organogenèse en vue de régénération des plantules d'*Atriplex halimus*.

### 1 – Effet de différentes concentrations en hormones de croissance sur le poids frais des cals secondaires

Après un mois de culture, nous avons obtenus les résultats indiqués dans le tableau ci-dessous.

Tableau 22 : Analyse de variance du poids frais des cals développés sur différents milieux de culture.

	DDL	S.C.E.	Carrés Moyens	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var. Totale	20	1042709,	52135,47				
Var. Facteur1	6	40907924,50	151320,75	15,72	0,0000		
Var. Résiduelle	14	134785,00	9627,50			98,12	9,8%

Facteur 1 : Différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance.

Nous constatons que l'analyse de la variance du facteur hormone montre une différence très hautement significative sur le poids frais des cals (Tableau 22).

L'annexe 22 et la figure 28 font apparaître que les différentes combinaisons et concentrations hormonales utilisées présentent des effets hétérogènes sur le poids frais moyen des cals. Le milieu M<sub>2</sub> induit le meilleur pouvoir callogène (Poids frais moyen des cals égal à 1486,07 mg) par comparaison aux autres milieux. Par ailleurs, les milieux M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> et B<sub>4</sub> présentent un même effet sur le poids frais moyen des cals qui varie de 870,00 mg à 1020,63 mg. Ces derniers sont obtenus respectivement par les milieux M<sub>3</sub> et B<sub>4</sub>.

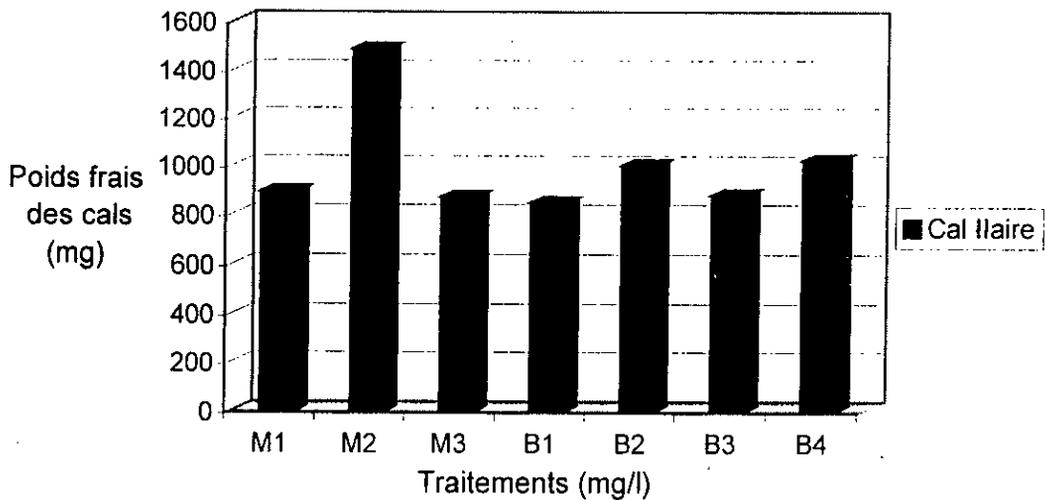


Figure 28 : Effet des différentes combinaisons et concentrations hormonales sur le poids frais des cals secondaires

## 2 – Effet de différentes concentrations en hormones de croissance sur le poids sec des cals secondaires

L'analyse de la variance (tableau 23), nous montre que le facteur étudié exerce une action très hautement significative entre les différents traitements sur le poids sec des cals.

Tableau 23 : Analyse de variance du poids frais des cals développés sur différents milieux de culture.

	DDL	S.C.E.	Carrés Moyens	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var. Totale	20	9571,40	478,57				
Var. Facteur 1	6	9203,28	1533,88	58,32	0,0000	5,13	9,1%
Var. Résiduelle	14	368,20	26,30				

Facteur 1 : Différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance.

Les différents milieux de culture utilisés ne réagissent pas de la même manière sur le pouvoir callogène exprimé en poids sec moyen des cals. Le poids maximal des cals (94,40 mg) est obtenu par le milieu M<sub>3</sub>. Tandis que les milieux comportant l'AG<sub>3</sub> (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> et B<sub>4</sub>) présentent un faible pouvoir callogène par rapport aux autres combinaisons et concentrations hormonales avec un poids sec des cals variant de (32,7) mg à (50,20) mg (obtenus respectivement par les concentrations B<sub>3</sub> et B<sub>2</sub>) (Annexe 23 et figure 29).

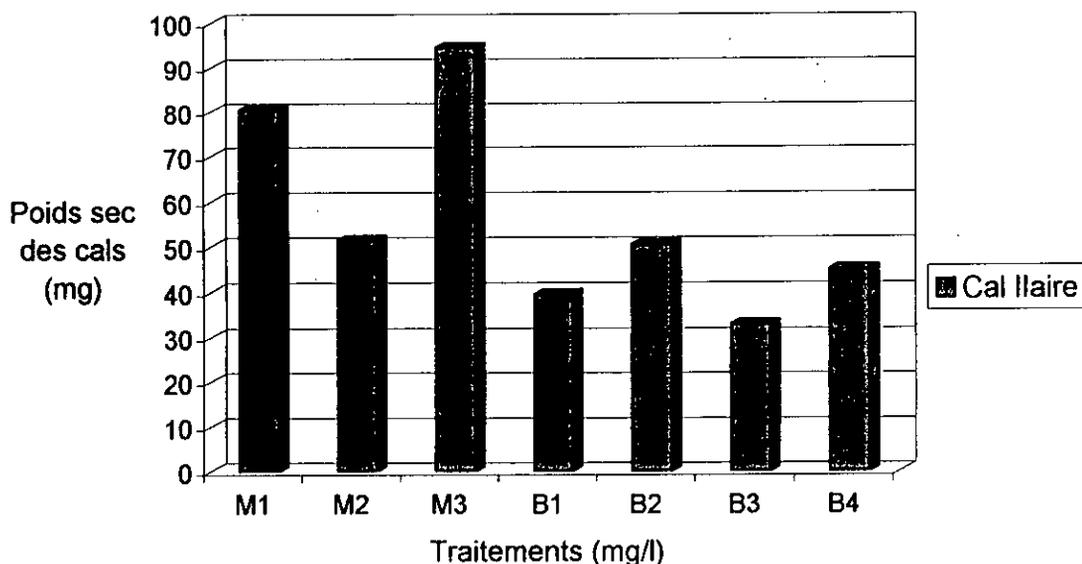


Figure 29 : Effet des différentes combinaisons et concentrations hormonales sur le poids sec des cals secondaires

### 3 – Effet de différentes concentrations en hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals secondaires

La couleur et texture des cals secondaires sont mentionnées dans le tableau ci-dessous.

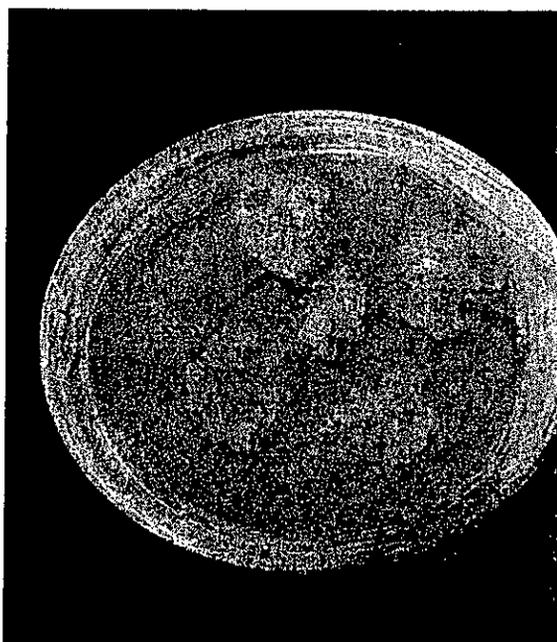
Tableau 24 : Couleurs et textures des cals secondaires

Milieu	Couleur	Texture
M <sub>1</sub>	Vert clair à blanc	Friable
M <sub>2</sub>	Vert avec des points rouges	Noduleuse
M <sub>3</sub>	Marron	Ferme
B <sub>1</sub>	Vert à blanc	Noduleuse
B <sub>2</sub>	Vert à blanc	Noduleuse
B <sub>3</sub>	Vert à blanc	Noduleuse
B <sub>4</sub>	Vert à blanc	Noduleuse

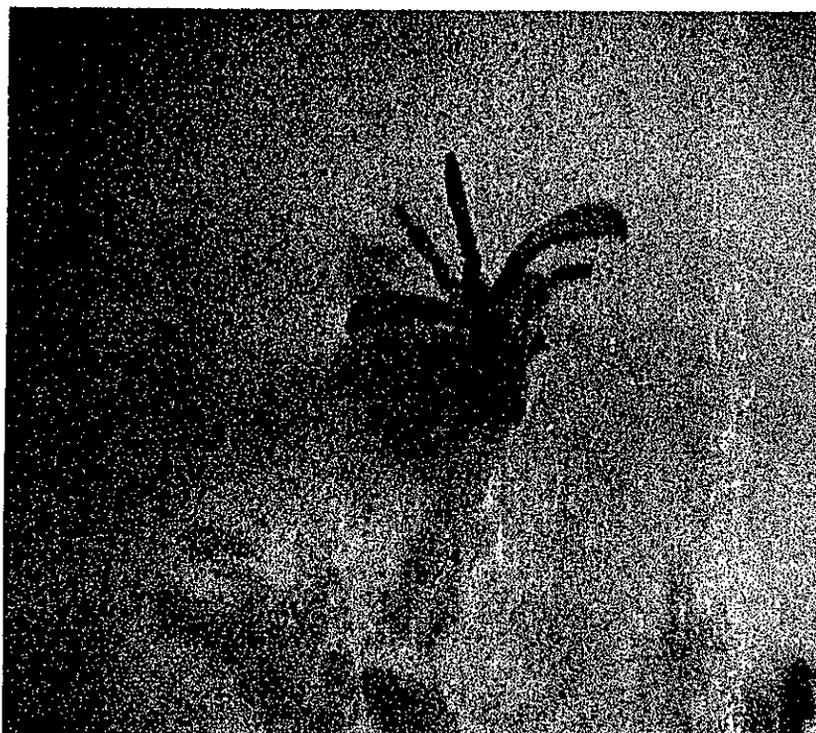
Nous constatons que les hormones de croissance utilisées n'exercent pas le même effet sur la couleur et texture des cals. Les cals obtenus à partir des milieux comprenant les différentes concentrations en AG<sub>3</sub> (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> et B<sub>4</sub>) sont de couleur verte à blanc de texture noduleuse (Tableau 24).

Quant aux milieux utilisés, nous remarquons que la concentration  $M_3$  (1 mg/l "AIA" + 1 mg /l "kinétine") présente des cals marrons à texture ferme indiquant sur la perte du pouvoir caulogène. Par contre, la concentration (1 mg/l "2,4-D" + 1mg/l "BAP" =  $M_2$ ) présentent des cals de couleur verte avec des points rouges indiquant sur la formation de glycinebétaine. Le cals développés sur le milieu  $M_1$  (0,5 "2,4-D" + 1 mg/l "kinétine") sont de couleur vert clair à blanc de texture friable indiquant sur la transformation des cals caulogènes en cals embryogènes (Planche 6 : A).

## Planche 5



**A** : Cals secondaires développés sur milieu de culture  
M<sub>1</sub> (M.S. + 0,5 mg/l "2,4-D" + 1 mg/l "kinétine")



**B** : Plantule régénéré à partir de cal issu du clone L<sub>4</sub>

#### 4- Discussion

Les résultats obtenus lors de cet essai montrent que le milieu de culture M<sub>2</sub> induit une importante callogenèse, exprimé en poids frais des cals, par rapport aux autres milieux de culture. Par ailleurs, le milieu M<sub>3</sub> induit le plus grand poids sec moyen des cals.

D'après BOURGKARD (1986), pour les huit (8) premiers mois suivant l'implantation primaire (trois transfert) les cals cultivés à la lumière, on constate l'existence d'une corrélation entre la couleur de la surface des cals et leurs potentialités de croissance. Par ailleurs, les variations de la couleur en fonction de la vitesse de croissance résultent probablement de la dynamique cellulaire interne du cal.

Par conséquent, le repiquage des cals se révèle nécessaire, car le développement dans le même milieu pendant une période prolongée, provoque un épuisement du milieu ainsi qu'une dessiccation de la gélose.

Par ailleurs, BIGOT (1980) montrent que chez la betterave la néoformation de bourgeons sur cal n'est aisément observable qu'à partir de tissus floraux.

MARGARA (1989), notent que l'initiation caulogène est induite secondairement à la suite des repiquages successifs avec l'utilisation de différentes concentrations d'hormones.

Cependant, le métabolisme sécrété par le cal en croissance provoque l'accumulation de certaines toxines dans le milieu de culture (DODD, 1982).

En ce qui concerne la couleur des cals, elle reste verte pour les milieux de culture à l'exception du milieu M<sub>3</sub> où les cals sont de couleur marron indiquant la mort des cellules.

Pour DUCREUX *et al.* (1998) et ROSSIGNOL (1988), la coloration verte est une preuve de l'existence d'une activité photosynthétique indiquant leur viabilité.

Suivant les caractéristiques morphologiques des cals obtenus, nous remarquons la présence de la couleur verte au niveau de l'ensemble des cals avec une texture variant entre friable et noduleuse. La coloration verte est plus importante pour les milieux de culture contenant l'"GA<sub>3</sub>" comme substance de croissance.

Plusieurs travaux confirment, en effet, l'effet stimulateur de la "GA<sub>3</sub>" sur le développement des organes néoformés (ELKHIFI, 1984), mais signalant que cette substance joue un rôle inhibiteur sur l'initiation des méristèmes.

Cependant, nous avons pu obtenir un développement de bourgeons adventif sur le milieu M.S. additionné de 1 mg/l "AIA" + 1 mg/l "kinétine", leur croissance n'étant pas très importante malgré leur transfert dans des milieux frais. (OUAISSA, 1999)

Il faut indiquer que la présence de la coloration rouge au niveau des cals est due à la synthèse de glycinebétaine, qui est le principal acide aminé intervenant dans la résistance au stress salin chez les Chénopodiacées au niveau des chloroplastes.

Néanmoins que lors du microbouturage, la multiplication successive du plant sélectionné sur milieu de culture de base M.S. additionné de 20 g/l de NaCl a provoqué un développement de bourgeons adventifs sur cals au niveau de la section. Ces derniers sont développés en deux types de plantules. Le premier type est constitué de plantules identiques à la plante-mère. Le microbouturage de ces plantules donne, aussi, des plantules identiques à la plante-mère. Le deuxième type est constitué de plantules en forme de rosettes dont les feuilles sont épaisses et turgescents. Le microbouturage de ces plantules donne des plantules avec une longueur moyenne de la tige égale à 1 cm et avec des feuilles épaisses et turgescents (planche 6 : B).

Pour LEBRUN (1986), les plantes régénérées à partir de cals sélectionnés pour leur tolérance élevées, possédaient un niveau de résistance au NaCl supérieur à celui des plantes mères (témoins). Ainsi, des plantes tolérantes ont été obtenues par néoformation de bourgeons chez quelques graminées tel que *Avena sativa* (NOBORS et DIKES, 1984) in (LEBRUN, 1986) et chez quelques dicotylédones tel que *Nicotiana tabacum* (NOBORS *et al.*, 1980) in (LEBRUN, 1986).

## Conclusion

Cet essai révèle que les différents milieux de culture induisent une importante croissance des cals, mais sans aucune régénération.

Les poids frais moyen des cals induit par les différents milieux sont homogènes, sauf pour le milieu de culture M<sub>2</sub> (Composition hormonale : 0,5 mg/l "2,4-D" + 1 mg/l "kinétine") qui donne le plus important poids frais moyen (1486,07 mg) par rapport aux autres milieux testés.

Quant au poids sec moyen des cals, l'influence des différents milieux de culture est assez hétérogène. Le meilleur poids sec des cals (94,40 mg) est obtenu pour la composition hormonale est 1 mg/l "AIA" + 1 mg/l "Kinétine" (M<sub>3</sub>).

Nous constatons, aussi, la présence de la couleur verte au niveau de la majorité des cals indiquant sur l'activité photosynthétique.

# Conclusion générale

## Conclusion générale

Les essais d'embryogenèse somatique entrepris sur l'*Atriplex halimus* L. nous révèlent que l'aptitude et le pouvoir callogène, ainsi que l'obtention des cals embryogènes, nécessitent la présence simultanée d'une auxine et d'une cytokinine dans le milieu de culture de base.

Les résultats obtenus nous montrent que toutes les parties de la plante (entre-nœuds, fragments de racines, feuilles, hypocotyles et feuilles cotylédonaire) sont aptes à la callogenèse avec des taux atteignant les 100 %. Ce dernier est obtenu à partir des entre-nœuds et les fragments de racines. Nous pouvons conclure que les tissus d'*Atriplex halimus* L. sont capables de se différencier.

Quant au pouvoir callogène, exprimé en poids frais moyen des cals et en poids sec moyen des cals, nous constatons que les hypocotyles et les feuilles cotylédonaire présentent les meilleures potentialités callogènes avec des poids frais moyennés égal à 444,79 mg et 453,81 mg. Les poids secs moyens sont respectivement égaux à 28,41 mg et 26,31mg.

Au cours de nos différents travaux sur la sélection des cals résistants au NaCl, le choix de clone a un effet très significatif sur l'aptitude et le pouvoir callogène des différents types d'explants.

En effet, la sélection des clones sur milieu salin est très importante pour l'étude du mécanisme de résistance au stress salin chez l'*Atriplex halimus* L. au niveau cellulaire.

Les résultats obtenus sur la sélection des cals résistants au NaCl, nous révèle que la callogenèse est influencée par la concentration en NaCl utilisée dans le milieu de culture, mais surtout du génotype et de la structure génétique de l'explant.

La formation des cals (exprimée en pourcentage) et leur croissance (exprimée en poids frais et en poids sec) pendant un mois de stress sont d'autant plus réduites que la concentration saline augmente dans le milieu de culture. En effet l'aptitude à la callogenèse s'annule pour la concentration 15 g/l de NaCl dans le milieu de callogenèse ; sauf pour les entre-nœuds et les feuilles issus du clone L<sub>2</sub> (Clone sélectionné sur le milieu MURASHISE et SKOOG additionné de 10 g/l de NaCl) et L<sub>3</sub> (Clone sélectionné sur le milieu MURASHISE et SKOOG additionné de 15 g/l de NaCl). Pour ces derniers, nous observons une faible aptitude à la callogenèse avec un pourcentage maximal des cals égal à 40,00 mg, obtenu par les entre-nœuds issus des clones développés sur milieux de culture stressants (L<sub>2</sub> et L<sub>3</sub>). Ces clones expriment les meilleures aptitudes à la callogenèse par rapport au clone témoin (L<sub>0</sub>) et au clone L<sub>1</sub> (Clone sélectionné sur le milieu MURASHISE et SKOOG additionné de 5 g/l de NaCl).

D'autre par, les cals issus des trois explants des différents clones présentent des caractéristiques morphologiques variées pour les différentes concentrations salines. En outre, les cals issus des différents types d'explants des clones "L<sub>1</sub>", "L<sub>2</sub>" et "L<sub>3</sub>" sont de couleur verte avec une structure variant entre friable et noduleuse. Tandis que les différents types d'explants issus du clone témoin "L<sub>0</sub>" donnent les cals de couleur et de texture variable. Nous remarquons que les cals issus des fragments de racines mis en culture sur le milieu de callogenèse témoin sont de couleur beige et de texture friable caractéristique morphologique des cals embryogènes.

Cependant, la fragmentation des cals verts, développés sur milieu de callogenèse contenant 5 g/l de NaCl (S<sub>3</sub>) et leur mis en culture sur des milieux de culture frais comprenant les combinaisons 0,5 mg/l "2,4-D" + 1 mg "kinétine" (M<sub>1</sub>), 1mg/l "2,4-D" + 1 mg "BAP" (M<sub>2</sub>) et 1 mg/l "AIA" + 1 mg "kinétine" (M<sub>3</sub>) et ceux comprenant comme hormone de croissance l'"AG<sub>3</sub>", provoque leurs croissance sans développement des nodules en plantules.

Cependant, le milieu MURASHIGE et SKOOG contenant 1 mg/l "2,4-D" + 1 mg/l "BAP" induit le meilleur poids frais moyen des cals (1486,07 mg). Quant au milieu MURASHIGE et SKOOG contenant 1 mg/l "AIA" + 1 mg/l "BAP" donne le meilleur poids sec des cals (94,40 mg).

Les différentes concentrations en "AG<sub>3</sub>" (1,5 ; 2 ; 3 et 4 mg/l) présentent des cals de couleur verte à blanc de texture noduleuse. De ce fait, l'"AG<sub>3</sub>" provoque la multiplication des nodules sans leur développement en plantules.

## Perspective

La maîtrise de l'embryogenèse somatique indirecte est indispensable dans les programmes d'amélioration génétique de l'*Atriplex halimus* L.. Son intérêt réside dans le gain de temps pour l'obtention de génotypes améliorés vis-à-vis de la résistance aux stress salin.

Les résultats obtenus à partir de ce travail nous ont permis de mettre en évidence la combinaison et la concentration hormonale et les types d'explants qui assurent la callogenèse et l'obtention des cals embryogènes de point de vue caractéristiques morphologiques. Pour confirmer que ces cals contenant des embryons somatiques, il est intéressant d'effectuer des coupes histologiques, ou encore de faire des études biochimiques sur les constituants polysaccharides et protéines totales de ces cals.

Concernant le développement des bourgeons adventifs issus des cals verts, il est intéressant de tester autres combinaisons hormonales (dont l'apport auxines/cytokinine  $\leq 1$ ) et d'autres concentrations en "AG<sub>3</sub>" en vue de provoquer le développement de bourgeons adventifs en plantules régénérer. Ces plantules régénérées seront résistantes au concentration élevé de NaCl.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- ANONYME, 1989 : Bilan préliminaire des zones de Pastoralisme. FAO 204P.
- ANONYME, 2001 : Encyclopédie : Les auxine. Ed. : Hachette ; Multimédia. France.
- AUGE R., 1984 : La nouvelle botanique : Culture *in vitro*. Rev. Science et vie. Paris.. (146), pp : 48-55.
- AUGE R., BEAUCHESNE G., BOCCON-GIBOD J., DECOURTYE L., DIGAT B., JALOUZOT R., MINIER R., MORAND J.- CL., REYNOIRD J.P., STRULLU D.G. et VIDALIE H., 1989 : La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed. : Technique et documentation-Lavoisier. Paris. 225 P.
- AYADI A., MONNIER A., DEMARLY M. et HELLIER M., 1980 : Echanges ioniques cellulaires : cas des plantes en milieu salé. Rôle particulier des parois cellulaires. Physio. Vég. V. 18 (1) ; pp : 89-104.
- BAJJI M., KINET J.-M. and LUTTS S., 1998 : Salt stress effect on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. Plant science. Ed.: ELSERVIER SCIENCE. Irland. (137) ; pp : 131-142.
- BANDYOPADHYAY S. and HAMILL J.D., 2000 : Ultrastructural studies of embryos of *Eucalyptus nitens* and comparison with zygotic embryos found in mature seeds. Rev. Annals of botany. (86); pp : 237 – 244.
- BATESON J.M. et GROUT B.W.W., 1987 : The influence of container dimension on multiplication rate of regenerating plant cellculture. Colloque d'Angers.
- BECKERT M., 1986 : Quelques systèmes de production de plantes haploïdes chez le maïs : perspective d'utilisation. Le sélectionneur français.n°36. 29 P.
- BEN AHMED H., ZID E., ELGAZZAH M. et GRIGNON G., 1996 : Croissance et accumulation ionique chez l'*Atriplex halimus* L.. Cahier d'Agricultures. V. 5 (5) ; pp : 365 – 372.
- BENLHABIB O., 1983 : Culture *in vitro* de tissus de *Beta vulgaris* L.. Induction de cals et essais de régénération. Mémoire : D.E.A., Univ. Paris XI, Orsay. 52P.
- BENREBIHA A.K., 1984 : Contribution à l'étude de l'aménagement pastoral dans les zones steppiques, cas de la coopérative pastorale d'Ain-Oussara (W. Djelfa). Mémoire de magistère. L'I.N.A. Alger. 160 P.
- BENREBIHA F.Z., 1987 : Contribution à l'étude de la germination de quelques espèces d'*Atriplex* locales et introduites. Mémoire de Magestèr en science agronomiques .L'I.N.A. Alger. 119P.

- BENREBIHA F.Z., POURRAT Y. et DUTUIT P., 1992** : Induction de la callogenèse chez *Atriplex halimus* sur des milieux dépourvus d'hormone de croissance. Rôle des éléments minéraux. Bull. Soc. Lettres Bot. France. 139 (3) pp : 219-222.
- BIGOT J., 1980** : Multiplication végétative *in vitro* par néoformation de bourgeons et embryons somatiques. In GAUTHIER-VILLARS. Ed. : Bordas. Paris. pp : 132 – 159.
- BILLARD J.P., BINET P., BOUCAUD J., COUDRET A. et LESAOS J., 1976** : Halophilie et résistance au sel. Réflexions sur l'halophilie et quelques-uns de ses aspects physiologiques. Ed. : R. JACQUES. Paris. pp : 39-55.
- BOCCON-GIBOD J., 1984** : La nouvelle botanique : La production du saintpaulia. Ed. : Science et vie. Paris. (146), pp : 56-63.
- BOUABDALLAH L., 1986** : Culture *in vitro* du melon (*Cucumis melo* L.) et tentative d'application à l'étude de la fusariose. Mémoire de docteur 3<sup>ème</sup> cycle Uni. Paris Sud centre d'Orsay. 75P.
- BOUABDALLAH E.-H., 1992** : La végétation steppique sur sols salés des hautes plaines Sud – Algéroises. Composition, structure et production. Mémoire de Docteur en science. Paris – Sud. 209 P.
- BOULAY M., 1987** : Recherche préliminaire sur l'embryogenèse somatique d'*Eucalyptus gunii*. Ed. : Afocel. Paris. pp : 23 – 37.
- BOURGKARD F., 1986** : Etude du compoement de cals cultivés en milieu solide et en milieu liquide en vue d'une recherche de l'embryogenèse somatique chez *Squoia sempervirens*. Thèse de D.E.A. Uni. De Nancy. pp : 1-29.
- BOUTEYRE G. et LOYER J. Y., 2000** : Sodisols et salsodisoles. Ed. : Sience et vie. Paris.
- BOUZOULA R., 2000** : Essais d'obtention des cals embryogènes à partir des plantules (*in vivo* et *in vitro*) chez *Atriplex halimus*. Mémoire d'ingénieur d'Etat en Agronomie. Uni. SAAD DAHLAB. Blida. 53 P.
- BOXUS P., 1998** : Multiplication végétative par embryogenèse somatique. Rev. Cahier Agricultures. Belgique. (7) ; pp : 447 –458.
- CHAMPAGNAT R., OZENDA P. et BAILLAUD L., 1969** : Biologie végétale : Croissance et morphogenèse et reproduction. Ed. : Masson et Cie. Paris. T. 3. 506 P.
- CHAUSSAT R. et BIGOT C., 1980** : Régulateurs de croissance et multiplication végétative. In GAUTHIER-VILLARS. Ed. : Bordas. Paris. pp : 31- 68.



- CHOI Y.E., KIM Y.N. et YOON E.S., 1999 : High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. Rev. Annals of botany. (83) ; pp : 309 – 314.
- CHRETIEN D., 1992 : La résistance au sel chez le Jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Cshneider) : Croissance et modification du contenu lipidique de cals cultivés en présence d'une teneur élevée en NaCl. Mémoire de Doctorat en biologie et physiologie végétale. Paris. 144P.
- DAIKH H., 1983 : Essai d'induction de variantes de pomme de terre (*Golanum tuberosum*) à partir de tissu *in vitro*. Mémoire d'ing. Agro. I.N.A. Alger. 52 P.
- DAVID A., 1972 : Effet de diverses solutions minérales sur la prolifération des tissus de pin maritime en culture *in vitro*. CR. Acad. Sci. D. France. 275 (25) ; pp : 2857 – 2860.
- DEBEZ A., CHAIBI W. et BOUZID S., 2001 : Effet du NaCl et de régulateurs de croissance sur la germination d'*Atriplex halimus* L.. Cahier d'étude et de recherches francophones : Agricultures. Tunisie. V. : 10. (2) ; pp : 135 – 138.
- DEMARLY Y., 1982 : Les culture *in vitro*. Réalités agricoles et industrielles. Conférences colloque APRIA. I.N.R.A.. Paris. pp : 19
- D'HALLUIN K., BENOIT F., CEUSTERMANS N., DEBERGH P. et MAENE L., 1980 : Multiplication de celeris blancs et raves démontrant une résistance naturelle à des viroses. In Application de la culture *in vitro* à l'amélioration des plantes potagères. Ed. : I.N.R.A.. France. pp : 14 – 19.
- DJAADI N., 2001 : Etude d'embryogenèse somatique chez l'*Atriplex halimus* et sélection des cals résistants au chlorure de sodium (NaCl). Mémoire d'ingénieur d'Etat en Agronomie. Uni. SAAD DAHLAB. Blida. 83 P.
- DODD S., 1982 : Tissue culture of hard woods in tissue culture of trees. Ed. : JOHN. (2); pp : 22 – 28.
- DUCREUX G., BUYSER J., DODEHAN V., HAICOUR R., LAVARGNE D., NATO M., AÏCHA OUICHOU A., PICARD E. et SIHACHAKR D. 1998 : Recherches récentes et biotechnologies de la multiplication végétative. Rev. Cahier d'Agriculture. V. : 7 (6) ; pp : 447 – 458.
- DUMAS DE VAULX R. et POCHAARD D. 1986 : Parhénogenèse et androgenèse chez le piment. Rôle actuel dans les programmes de sélection. Le sélectionneur français. (36) ; pp : 3-16.
- DUTUIT P., 1999 : Etude de la diversité biologique de l'*Atriplex halimus* pour le repérage *in vitro* et *in vivo* d'individus résistants à des concentrations extrêmes du milieu et constitution des clones. Ed. : C.T.A.. Rapport final. Agriculture Tropicale et Subtropicale. Troisième programme S.T.D.. Paris Sud. pp : 138 – 141.

- ELKHIFI O., 1984 : Contribution à l'étude de la variabilité chez la pomme de terre : Analyse de clones néoformés sur cals issus de souches diploïdes et dihaploïdes. Mémoire de docteur 3<sup>ème</sup> cycle. Paris -Sud. 101P.
- EVANS D.A., 1981 : Soy bean tissue culture, soy bean genetic. News letter. (8); pp : 27- 29.
- FLOWERS T.J., TROKE P.F. and YEO A.R., 1977 : The mechanism of salt tolerance in halophytes. Annu. Rev. Physiol, (28), pp : 89-121.
- FRANCLET A. et LE HOUEROU H.N., 1971 : Les *Atriplex* en Tunisie et en Afrique du Nord. Doc. F.A.O. Rome. 249 P.
- GAUTHERET R.J., 1959 : La culture des tissus végétaux techniques et réalisation. Ed. : Masson. Paris. 863 P.
- GAUTHERET R.J., 1977 : La culture des tissus et des cellules des végétaux. Ed. : Masson. Paris. 262 P.
- GOACOLOU J. et PERDRIZET E., 1988 : Multiplication végétative et culture des plantes *in vitro*. Ed. : I.N.R.A. ; Paris.
- HAMDANI F., 1997 : Essai d'obtention de cals embryogènes chez l'*Atriplex halimus*. Mémoire d'ingénieur d'Etat en Agronomie. I.N.E.S. Blida. 60 P.
- HAMZA M., 1980 : Réponse des végétaux à la salinité. Ed.: GAUTHIER-VILLARS. Physiol. Vég.. Tunis. 18 (1), pp : 69-81..
- HASSANE S., 1998 : Multiplication et clonage de l'*Atriplex halimus* par le bourgeonnement axillaire. Mémoire d'ingénieur d'Etat en Agronomie. I.N.E.S. Blida. 54P.
- HELLER R., 1985 : Physiologie végétale : Développement. 3<sup>ème</sup> édition. Ed : Masson. Paris. T.2 ; 215 P.
- HELLER R., ESNAULT R. et LANCE C., 1998 : Physiologie végétale : Nutrition. 6<sup>ème</sup> édition. Ed. : DUNOD. Paris. T. 1 ; 323 P.
- HELLER R., ESNAULT R. et LANCE C., 2000 : Physiologie végétale : Développement. 6<sup>ème</sup> édition. Ed. :DUNOD. Paris. T. : 2 ; 366 P.
- HOUCHI R., 1986 : Action de la salinité du milieu (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sur les relations hydriques, ioniques et échanges gazeux de *Plantago maritime* L. (halophyte) et de *Plantago lanceolata* L. (glycophyte). Mémoire de docteur ingénieur en biologie et physiologie végétale. Univ. Paris VII.111P.
- KAPLAN A. and GALE J., 1972 : Effect of sodium chloride salinity on the water balance of *Atriplex halimus*. Aust., J., Biol., Sci.. (25), pp : 895-903.

- KEBOUR D., 1995** : Effet des nitrates et phosphates sur la morphogénèse de l'*Atriplex halimus* en culture *in vitro*. Mémoire d'ingénieur d'Etat en Agronomie. I.N.E.S. Blida. 44 P.
- KINET J.M., BENREBIHA F.Z., BOUZID S., LALHACAR S. et DUTUIT P., 1998** : Le réseau *Atriplex*. Allier biotechnologies et écologie pour une sécurité alimentaire accrue en région arides et semi-arides. Rev. Cahiers d'agricultures. V.: 7 (6) pp : 505 – 509.
- KOTUBY-AMACHER J., KOENIG R. et KITCHEN B., 1997** : Salinity and plant tolerance. Ed. : Cooperative Extension Service. LOGAN, UTAH.
- LEBRUN L., 1986** : Etude de l'embryogénèse somatique *in vitro* chez la vigne (*Vitis* sp.) et application à la sélection de plantes tolérantes de fortes concentrations en chlorure de sodium. Mémoire de doctorat Univ. De Paris Sud centre d'Orsay. 145 P.
- LEFLOCH E., 1989** : Plantation d'arbustes fourragers. Bilan préliminaire de 30 ans de pastoralisme. Ed. : F.A.O.. 204P.
- LE HOUEROU H.N. et PANTANIER R., 1988** : Les plantations sylvo-pastorales dans la zone aride de Tunisie. Extrait de la revue Pastoralisme et développement. 24 mai au 9 juillet 1988.
- LEVIGNERON A., LOPEZ F., VANSUYT G., BERTHOMIEU P., FOURCROY P. et CASSE-DELBART F., 1995** : Les plantes face au stress salin. Rev. Cahiers Agricultures. Montpellier France. (4), pp : 263 – 273.
- LUTZ A., 1985** : L'expression de la variabilité morphologique après régénération dans les cultures de tissus et de cellules. Bull. SOC. Bot. Fr. Actual. Bot.. 132 (3/4) ; pp : 35 – 50.
- MARGARA J., 1980** : La multiplication des méristèmes et des apex de tige. In la multiplication végétative des plantes supérieures. Ed. : Bordas. Paris. pp : 113 – 115.
- MARGARA J. et PIOLLAT M.-T., 1982** : Physiologie végétale – Influence de divers facteurs sur l'organogénèse observée *in vitro* à partir de pétale de *Begonia X elatior*. C.R.Acad.Sc.. Paris T. 294 ; pp : 181-184.
- MARGARA J., 1989** : Bases de la multiplication végétative : Les méristèmes et l'organogénèse. Ed. : I.N.R.A.. Paris. 230 P.
- MAZLIAK P., 1981** : Physiologie végétale : Nutrition et métabolisme. Ed.: Hermann. Paris. T. 1 ; 349 P.
- MOHANJAIN S. and ISHII K., 1997** : Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees. In Recent advances in biotechnology for tree conservation and management. Ed. : I.F.S. Workshop. Brazil. pp : 214 – 231.

- MOLET D., 1988 : Culture *in vitro* évolution des techniques : Boutures – microbouture. Minitubérisation. La pomme de terre française. (444); pp: 43 – 46.
- MURASHIGE T. and SKOOG F., 1962: A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant.* (15) ; pp : 473 – 497.
- NEGRE R., 1961 : Petite flore des régions arides du Maroc occidental. Ed. : C.N.R.S.. Paris. T.: 1. 179 P.
- NOZERAN R., 1985 : L'expression de la variabilité dans les cultures d'organes. *Rev. Actualités botaniques.* (314) ; pp : 17 – 21.
- NIU X., ZHU J.-K., NARASIMHAN M. L., BRESSAN R.A. and HASEGAWA R.A., 1993 : Plasma-membrane H<sup>+</sup> – ATPase gene expression is regulated NaCl in cells of the halophyte *Atriplex nummularia* L.. *Planta.* (190); pp: 433-438.
- NOUAILLE C. et PETIARD V., 1988 : Semences artificielles. Rêves et réalité. *Biofutur.* pp : 33 – 34.
- NOVAK F.J. and KONECMA D., 1982 : Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures of alfa alfa (*Medicago sativa* L.). *Zeixhrift Fur Pflanzen physiologie.* (105) ; pp : 279 – 284.
- ONESTO J.P., JACQUEMONT R., POUPET R., LEDRAPPIER C. et FRONCOR., 1994 : *Delphinium* X : micropropagation in vitro. *Rev. Horticole P.H.M.*. Ed. : SEDA. Paris. (348) ; pp : 4 – 7.
- OUAÏSSA N., 1999 : Essai d'obtention des cals embryogènes et la régénération chez l'*Atriplex halimus*. Mémoire d'ingénieur d'Etat en Agronomie. I.N.E.S.Blida. 86 P.
- PIATTI M.-F., 1990 : Embryogenèse somatique et synchronisation du développement embryonnaire. Mémoire de Docteur d'Etat en pharmacie. Paris. 130 P.
- POURRAT Y. and DUTUIT P., 1993 : Effects of sodium and calcium concentration on the "vitro" growth of *Atriplex halimus* plantlets. *J. Plant Nutrition.* 16 (8); pp : 1417-1429.
- RAGHAVAN V., 1997 : Molecular embryology of flowering plants. Ed.: Cambridge University Press. New York U.S.A.. 1028 P.
- REIMANN C. and BRECKLE S.W., 1993: Sodium relations in chenopodiaceae: A comparative approach. *Plant, Cell. and Environment.* Germany. V.16 ; pp: 323-328.
- ROSSIGNOL L., 1988 : La pomme de terre de qualité. Congrée national. Paris. 13P

- SAKA H., AMARA A.B. et KERMICHE A., 1997 : Embryogenèse somatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : Induction de la callogenèse à partir d'organes de rejets de quelques cultivars. Ed : I.N.R.A.A. ; Rev. Semestrielle. Alger.(0) ; pp : 1 – 7.
- SEELIG B. D., 2000 : Salinity and sodicity in North Dakota soils. Ed. : N.D.S.U. Extension service.North Dakota.
- SHARP P.W.R., 1980 : The physiologie of *in vitro* asexual embryogenesis. Horticulture reviews. pp : 168 – 310.
- SIHACHAKR D., CAVALCANTE-ALVES J.M., TIZROUTINE S., ALLOT M., MUSSIO I., SERVAES A., NZOGHE O. et DUCREUX G., 1995 : Embryogenèse somatique chez la patate douce (*Ipomoea batatas* L.). Ed. : JOHN LIBBEY. France. pp : 254 – 260.
- SOMON E., 1987 : Arbres, arbustes et arbrisseaux en Algérie. Ed. : Office de Publication Universitaire. Alger. pp : 22.
- TALAMALI A., 1996 : Essai de mis au point de l'embryogenèse somatiques et de clonage chez l'*Atriplex halimus*. Mémoire d'ingénieur d'Etat en Agronomie. I.N.E.S. Blida. 63 P.
- TANG D., ZHANG J., NIU Y. et TSUI O., 1980 : The effect of plant hormones on callus formation and plantlet regeneration in *Cucumis melo*. Rev. Acta Sotamica Sinica. V.22 (2) ; pp : 132 – 135.
- TEOULE E., 1999 : Biotechnologie et amélioration des plantes. In SRIBAN R. 5<sup>ème</sup> édition, Ed. : Technique et Documentation. Paris. pp : 597-627.
- TIRILLY Y. et BOURGEOIS M., 1999 : Génétique et création de nouvelles variétés de légumes in PITRAT M. et BRANKARD M.. Ed. : Techniques et documentation. Paris. pp :27 – 44.
- TISSERAT B., 1979 : Somatic embryogenesis in angiosperms. Horticol reviews. (1) : 1 – 78.
- TOURTE Y., 1998 : Génétique et biotechnologies : Concepts et méthodes. Application à l'agronomie et au bio-industries. 2<sup>ème</sup> cycle.Ed. : DUNOD. Paris. 209 P.
- WILIAMS G.W. and MAHESWARAN G., 1986 : Somatic embryogenesis : Factors in fluencing coordinated behaviour of all as an embryogenetic group. Rev. Annals of botany. V.57 (7); pp : 443 – 462.
- YANCHUK A.D., 2001 : Le rôle des outils biotechnologiques et leur incidence en foresterie. Revue internationale des forêts et des industries forestières. F.A.O.. Ed. : C.T.S. Nair ..Canada. V.52.

- ZAID A., 1991** : Réflexions sur la conformité génétique des vitro-plantes : Cas du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Bulletin du réseau maghrébin de recherche sur la phoeniculture et la protection du palmier dattier. Maroc. V.1 (4) ; pp : 21 – 27.
- ZHANG V., BOCCONGIBO D.J. et LESPINASSE Y., 1987** : Obtention d'embryons de pommiers (*Malus domestica* Borkl) après culture d'anthères. C.R.A. Cad. ; Sci.. Paris. pp : 305 – 443.
- ZIANI P., 1970** : *Atriplex halimus*. Exploitation des formations naturelles et des plantations. F.A.O.. Tunis. 24 P.
- ZRYD J.P., 1988** : Culture de cellules, tissus et organes végétaux : Fondement théorique et utilisation pratique. Ed. : Press Polytechnique Renandes. Suisse. 308P.

### Annexe

Les comparaisons des moyennes sont traitées par le test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5 %.

Annexe 1 : Pourcentage des cals issus des deux clones et développés sur les différentes combinaisons et concentrations hormonales.

F <sub>3</sub>	F <sub>1</sub>	P <sub>1</sub>	P' <sub>1</sub>	Moyenne F <sub>3</sub>
	A <sub>0</sub>	17,78 ± 11,55	0,00 ± 0,00	8,89 ± 7,92
	G. H.	D	E	B
	A <sub>1</sub>	87,78 ± 6,45	98,89 ± 2,89	93,33 ± 4,85
	G. H.	C	AB	A
	A <sub>2</sub>	86,67 ± 10,00	93,33 ± 10,00	90,00 ± 9,70
	G. H.	C	ABC	A
	A <sub>3</sub>	100,00 ± 0,00	88,89 ± 5,77	94,44 ± 3,96
	G. H.	A	BC	A
	A <sub>4</sub>	86,67 ± 8,16	96,67 ± 5,00	91,67 ± 6,57
	G. H.	C	ABC	A
	Moyenne F <sub>1</sub>	75,78 ± 7,88	75,56 ± 5,50	Moy. Générale : 75,67

Annexe 2 : Pourcentage des cals issus des différents types d'explants et développés sur les différentes combinaisons et concentrations hormonales.

F <sub>3</sub>	F <sub>2</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	Moyenne F <sub>3</sub>
A <sub>0</sub>		0,00	0,00	26,67	8,89
		±	±	±	±
		0,00	0,00	14,61	7,92
G. H.		F	F	E	B
A <sub>1</sub>		88,33	93,33	98,33	93,33
		±	±	±	±
		3,65	7,30	3,65	4,85
G. H.		ABC	AB	A	A
A <sub>2</sub>		100,00	100,00	70,00	90,00
		±	±	±	±
		0,00	0,00	17,89	9,70
G. H.		A	A	D	A
A <sub>3</sub>		100,00	100,00	83,33	94,44
		±	±	±	±
		0,00	0,00	7,30	3,69
G. H.		A	A	BC	A
A <sub>4</sub>		96,67	100,00	78,33	91,67
		±	±	±	±
		7,30	0,00	9,66	6,57
G. H.		A	A	CD	A
Moyenne F <sub>2</sub>		77,00	78,67	71,33	Moy. Générale : 75,67
		±	±	±	
		3,39	3,03	10,93	
G. H.		A	A	B	

Annexe 3 : Pourcentage des cals issus des différents types d'explants des deux clones et développés sur les différentes combinaisons et concentrations hormonales.

F <sub>1</sub>		P <sub>1</sub>			P' <sub>1</sub>		
F <sub>2</sub>		EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>
F <sub>3</sub>	A <sub>0</sub>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	53,33 ± 23,09	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	G. H.	E	E	D	E	E	E
	A <sub>1</sub>	76,67 ± 5,77	86,67 ± 11,55	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	96,67 ± 5,77
	G. H.	ABC	A	A	A	A	A
	A <sub>2</sub>	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	60,00 ± 20,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	80,00 ± 20,00
	G. H.	A	A	CD	A	A	AB
	A <sub>3</sub>	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	66,67 ± 11,55
	G. H.	A	A	A	A	A	BCD
	A <sub>4</sub>	93,33 ± 11,55	100,00 ± 0,00	66,67 ± 11,55	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	90,00 ± 10,00
	G. H.	A	A	BCD	A	A	A

Annexe 4 : Poids frais des cals (en mg) issus des deux clones et développés sur les différentes combinaisons et concentrations hormonales.

F <sub>3</sub>	F <sub>1</sub>	P <sub>1</sub>	P' <sub>1</sub>	Moyenne F <sub>1</sub>
A <sub>0</sub>		115,38 ± 68,95	0,00 ± 0,00	57,69 ± 47,30
G. H.		D	E	B
A <sub>1</sub>		417,15 ± 114,63	249,91 ± 81,74	333,53 ± 96,58
G. H.		A	BC	A
A <sub>2</sub>		156,88 ± 86,34	476,78 ± 41,67	316,83 ± 111,39
G. H.		CD	A	A
A <sub>3</sub>		199,59 ± 41,67	366,93 ± 128,81	283,26 ± 92,87
G. H.		CD	AB	A
A <sub>4</sub>		351,23 ± 93,70	352,28 ± 89,94	351,76 ± 89,10
G. H.		AB	AB	A
Moyenne F <sub>3</sub>		248,05 ± 80,75	289,18 ± 95,61	Moy. Générale : 268,61

Annexe 5 : Poids frais des cals (en mg) issus des différents types d'explants et développés sur les différentes combinaisons et concentrations hormonales.

F <sub>3</sub>	F <sub>2</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	Moyenne F <sub>3</sub>
A <sub>0</sub>		0,00	0,00	173,07	57,69
		±	±	±	±
		0,00	0,00	87,22	47,30
G. H.		C	C	B	B
A <sub>1</sub>		453,97	286,71	259,92	333,53
		±	±	±	±
		135,97	55,00	101,01	96,58
G. H.		A	AB	AB	A
A <sub>2</sub>		360,37	322,63	267,48	316,83
		±	±	±	±
		142,29	52,70	138,44	111,39
G. H.		AB	AB	AB	A
A <sub>3</sub>		197,57	224,35	427,87	283,26
		±	±	±	±
		45,79	29,84	162,29	92,87
G. H.		B	B	A	A
A <sub>4</sub>		441,82	261,87	351,58	351,76
		±	±	±	±
		119,06	58,68	96,81	89,10
G. H.		A	AB	AB	A
Moyenne F <sub>2</sub>		260,74	219,11	295,98	Moy. Générale : 268,61
		±	±	±	
		97,38	41,80	111,95	
G. H.		A	B	A	

Annexe 6 : Poids frais des cals (en mg) issus des différents types d'explants des deux clones et développés sur les différentes combinaisons et concentrations hormonales.

F <sub>1</sub>		P <sub>1</sub>			P' <sub>1</sub>		
F <sub>2</sub>		EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>
F <sub>3</sub>	A <sub>0</sub>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	346,13 ± 137,91	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	G. H.	G	G	CDEF	G	G	G
	A <sub>1</sub>	747,83 ± 212,35	301,39 ± 46,06	202,23 ± 73,14	160,10 ± 33,53	272,03 ± 73,76	317,60 ± 141,99
	G. H.	A	CDEFG	DEFG	EFG	CDEFG	CDEFG
	A <sub>2</sub>	224,07 ± 97,53	81,77 ± 4,48	164,80 ± 142,44	496,67 ± 202,74	563,50 ± 83,20	370,17 ± 166,22
	G. H.	DEFG	FG	EFG	BCD	ABC	CDEF
	A <sub>3</sub>	249,60 ± 69,77	149,13 ± 40,96	200,03 ± 20,00	145,53 ± 19,36	299,57 ± 23,42	655,70 ± 225,83
	G. H.	DEFG	EFG	DEFG	EFG	CDEFG	AB
	A <sub>4</sub>	416,40 ± 96,49	251,70 ± 56,28	385,60 ± 150,48	467,23 ± 161,64	272,03 ± 73,76	317,57 ± 28,08
	G. H.	BCDE	DEFG	CDEF	BCDE	CDEFG	CDEFG

Annexe 7 : Poids frais des cals (en mg) issus des deux clones et développés sur les différentes combinaisons et concentrations hormonales.

F <sub>3</sub>	F <sub>1</sub>	P <sub>1</sub>	P' <sub>1</sub>	Moyenne F <sub>3</sub>
A <sub>0</sub>		7,31	0,00	3,66
		±	±	±
G. H.		4,79	0,00	3,28
		C	C	B
A <sub>1</sub>		26,06	18,99	22,52
		±	±	±
G. H.		10,49	6,42	8,43
		AB	AB	A
A <sub>2</sub>		17,50	26,22	21,86
		±	±	±
G. H.		3,92	7,09	5,55
		B	AB	A
A <sub>3</sub>		21,36	29,14	25,25
		±	±	±
G. H.		7,62	6,17	6,72
		AB	A	A
A <sub>4</sub>		18,46	25,28	21,87
		±	±	±
G. H.		6,44		5,64
		B	AB	A
Moyenne F <sub>3</sub>		18,14	19,93	Moy. Générale :
		±	±	19,03
		6,71	5,32	

Annexe 8 : Poids sec des cals (en mg) issus des différents types d'explants et développés sur les différentes combinaisons et concentrations hormonales.

F <sub>3</sub>	F <sub>2</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	Moyenne F <sub>3</sub>
A <sub>0</sub>		0,00	0,00	10,97	3,66
		±	±	±	±
		0,00	0,00	6,06	3,28
G. H.		C	C	B	B
A <sub>1</sub>		25,07	19,10	23,40	22,52
		±	±	±	±
		9,34	5,08	11,35	8,43
G. H.		A	AB	AB	A
A <sub>2</sub>		29,97	15,83	19,78	21,86
		±	±	±	±
		6,12	5,45	6,14	5,55
G. H.		A	AB	AB	A
A <sub>3</sub>		28,40	25,38	21,97	25,25
		±	±	±	±
		8,19	7,34	5,73	6,72
G. H.		A	A	AB	A
A <sub>4</sub>		24,72	17,57	23,32	21,87
		±	±	±	±
		6,20	4,48	7,04	5,64
G. H.		A	AB	AB	A
Moyenne F <sub>2</sub>		21,63	15,58	19,89	Moy. Générale : 19,03
		±	±	±	
		6,30	4,72	7,02	
G. H.		A	B	A	

# Introduction

## INTRODUCTION

Les sols salins sont très répandus à la surface du globe. Leur salinité constitue l'un des principaux problèmes qui nuit sérieusement le développement de l'agriculture.

En Algérie, les régions semi-arides et arides et en particulièrement les steppes, qui restent le support principal de l'élevage, connaît actuellement une désertification et une salinisation de plus en plus accentuée. Ces derniers causent des problèmes environnementaux et économiques graves. Afin de protéger ces régions et de les améliorer, l'introduction d'espèces fourragères connues pour leurs tolérances à la sécheresse et à la salinité tel que les *Atriplex* s'avère indispensable.

L'*Atriplex halimus*, espèce originaire du bassin méditerranéen, est l'une des espèces halophiles appartenant au genre *Atriplex*. Il est très intéressant de l'exploiter en raison de sa rusticité et en tant que plante fourragère sur pied durant les périodes critiques de disette.

D'après FRANCKET et LE HOUEROU (1971), l'*Atriplex halimus*, espèce très polymorphe, mérite d'être exploité afin de protéger ces écosystèmes fragiles de la désertification et de contribuer à l'augmentation de la production animale.

Cependant, la culture *in vitro* de tissus végétaux permet d'amplifier et d'élargir les potentialités de sélection de génotypes possédant des caractères intéressants (résistance à la salinité, à la sécheresse et aux basses températures.).

En dépit de l'apport considérable des techniques *in vitro* pour la sélection de lignées résistantes au sel, il demeure néanmoins nécessaire de les améliorer via un enrichissement des cultures en cellules mutantes et un perfectionnement des méthodes de régénération de plantes susceptibles d'exprimer et de transmettre la résistance au sel (CHRETIEN, 1992).

Dans le contexte de la multiplication végétale, la maîtrise de l'embryogenèse somatique devrait offrir une situation idéale : possibilité de multiplication prodigieuse (une cellule somatique donne une plante) (DUCREUX *et al.*, 1998).

En effet, l'embryogenèse constituerait l'un des moyens les plus économiques de produire des clones en évitant la main-d'œuvre de repiquage (PIATTI, 1990).

Par ailleurs, le déclenchement des phénomènes d'organogenèse *in vitro* dépend de l'état physiologique de l'explant et des conditions physiques et techniques du milieu.

En outre, l'organogenèse et le développement des implants *in vitro* dépend non seulement de la concentration des composés du milieu de culture (les éléments minéraux, les vitamines et le sucre) ; mais, plus particulièrement, des régulateurs de croissance qui constituent des facteurs déterminants.

Selon HELLER *et al.* (2000), les phytohormones participent au contrôle de nombreuses étapes du développement tel que la croissance, la différenciation des organes végétatives ou reproducteurs.

Compte tenu de l'importance qu'offre l'*Atriplex halimus* et les avantages apportés par la culture *in vitro* pour sa propagation, notre objectif est d'étudier le développement des cals à partir de différents types d'explants cultivés sur des milieux de culture additionnés d'hormones de croissance et de NaCl.

Pour cela, la démarche adoptée consiste d'abord à la sélection de lignée d'*Atriplex halimus* vis-à-vis de différentes concentrations en NaCl en plus du milieu témoin. Ces lignées vont nous servir pour les études de callogenèse qui se déroulera en trois étapes :

- L'étude comparative de différentes combinaisons et concentrations additionnées au milieu de culture de base pour l'obtention de cals embryonnaires à partir de différents types d'explants de lignées sélectionnées et d'explants issus de plantes âgées de 5 jours.

- L'étude de l'influence de différentes concentrations en NaCl sur le développement des cals embryonnaires à partir des différents types d'explants issus des lignées sélectionnées.

- Essai de régénération de plants résistants au NaCl à partir des cals caulogènes.

# Chapitre I

## Synthèse bibliographique

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

### 1 – Généralité sur l'*Atriplex halimus*

#### 1-1– Description de l'espèce

L'*Atriplex halimus* L. (nom vernaculaire arabe : G'ttef) est une espèce halophyte vivace appartenant au genre *Atriplex* et à la famille botanique des Chénopodiacees. D'après REINMANN et BRECKLE (1993), cette famille est connue par l'accumulation de grande quantité des ions alcalins.

D'après DUTUIT (1999), l'important polymorphisme que présente l'*Atriplex halimus* se manifeste au niveau de la morphologie des structures végétatifs (la taille des plantes et de la forme des feuilles), ainsi qu'au niveau des structures reproductifs (des inflorescences et des valves fructifères des graines).

Selon FRANCKET et LE HOUEROU (1971), la grande diversité phénotypique des populations naturelles d'*Atriplex halimus* est dû essentiellement à la reproduction allogame de ces plantes.

NEGRE (1961) et SOMON (1987) montrent que cette espèce est polygame particulièrement trimonoïque. En d'autre terme, la plante d'*Atriplex halimus* peut porter à la fois des fleurs unisexuées mâles, unisexuées femelles et bisexuées. C'est une plante monophanérophyte, fleurissant à partir d'Avril jusqu'en Novembre.

L'*Atriplex halimus* comprend deux sous-espèces :

L'*Atriplex halimus* ssp. *Halimus*, qui est un arbuste très ramifié, pouvant atteindre 3 mètres de haut avec des feuilles alternes, charnues, à limbe entier (FRANCKET et LE HOUEROU, 1971).

L'*Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii* boiss se caractérisant par les rameaux florifères nus (LE HOUEROU et al., 1988).

#### 1- 2– Ecologie et répartition

L'*Atriplex halimus* L. est un arbuste natif d'Afrique du nord où il est abondant. Il s'étend également aux zones littorales méditerranéennes de l'Europe et aux terres intérieures gypso salines d'Espagne (FRANCKET et LE HOUEROU (1971) et DUTUIT, 1999).

D'après LEFLOCH (1989), c'est une halophyte qui convient aux sols sableux sur horizons salés (jusqu'à une conductivité de l'ordre de 60 mmhos/cm).

FRANCLET et LE HOUEROU (1971) notent, qu'en Afrique du nord, l'*Atriplex halimus* ssp. *halimus* se trouve dans les étages humides, sub-humides, semi-aride et arides supérieurs à hivers chauds et froids. Tandis que l'*Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii* Boiss est une plante des zones arides FRANCLET et LE HOUEROU (1971) et LE HOUEROU et PANTANIER (1988).

L'*Atriplex halimus* L. est cultivée dans les régions aride et semi-arides correspondant à l'isohyète 400 mm/an au nord et 100 mm/an au sud (BENREBIHA, 1984).

D'après ZIANI (1970), c'est une espèce qui supporte bien les basses températures (jusqu'à - 10° C).

### 1-3- Multiplication de l'*Atriplex halimus*

L'*Atriplex halimus* peut être multiplié par voie sexuée. En effet, cette méthode est la plus simple à pratiquer. Il se multiplie également par bouturage ou par éclats de souche.

Par ailleurs, la germination est influencée par la concentration de milieu en NaCl et inhibée par les températures élevées (BENREBIHA, 1987).

DEBEZ *et al.* (2001) montrent que le pouvoir germinatif des graines d'*Atriplex halimus* L. n'est pas altéré, après exposition au sel, dans les conditions naturelles. Cette particularité s'avère d'un grand intérêt pour la survie des espèces dont les habitats naturels présentent de grandes fluctuations de teneurs en sel.

Cependant, FRANCLET et LE HOUEROU (1971) montrent que la présence d'un maximum de feuilles sur les boutures est recommandée pour obtenir un enracinement rapide.

La micro propagation *in vitro*, à partir de pousses feuillées des vitro-plants issus de semis ou d'individus adultes fait apparaître des taux d'enracinement variant respectivement de 60 à 70 % des axes gris en culture (DUTUIT, 1999).

Selon KINET *et al.* (1998), la micro propagation *in vitro* chez l'*Atriplex halimus*, par bourgeonnement axillaire ou adventif, constitue un objectif réalisable, tandis que la multiplication par embryogenèse somatique reste jusqu'à présent difficile à réaliser.

## **1-4- Intérêts de l'*Atriplex halimus***

### **1-4-1- Intérêt agronomique**

L'*Atriplex halimus* L. offre plusieurs avantages. Le plus important de ces avantages c'est son utilisation en tant que plante fourragère.

ZIANI (1970), souligne que l'*Atriplex halimus* montre un caractère particulier très inconvenant, à savoir qu'il constitue des brindilles sèches à la partie supérieure des branches. Leur formation est empêchée par le broutage au moment où les rejets sont jeunes et tendres.

D'après FRANCKET et LE HOUEROU (1971), l'*Atriplex halimus* L. doit être considérée comme une réserve durant la période de disette exploitable entre le milieu de l'été et le début de l'hiver en raison de l'absence d'autres aliments verts dans les pâturages.

ZIANI (1970) indique que les arbustes d'*Atriplex* exercent une influence très favorable sur la végétation herbacée qui s'installe entre eux ; cette végétation présente, souvent, une valeur fourragère plus grande que celle apportée par l'*Atriplex*.

### **1-4-2- Intérêt écologique**

L'installation de l'*Atriplex halimus* L. dans les zones salins peut réduire l'érosion et la dégradation des sols.

FRANCKET et LE HOUEROU (1971), notent qu'en Afrique du nord, l'emploi des *Atriplex halimus* L. est efficace pour la fixation des dunes et des marnes.

Quant à la production de bois, les buissons d'*Atriplex halimus* L. présentent un grand nombre de brindilles sèches représentant environ 23 % du poids total en frais de la biomasse sur pied (ANONYME, 1989).

### **1-4-3- Intérêt économique**

L'importance économique de l'*Atriplex halimus* L. réside dans la récupération et l'utilisation des sols salés en plus d'être une plante fourragère sur pieds surtout pendant les périodes de disette (BEN AHMED *et al.*, 1996).

## 2 – Stress salin

### 2-1– La salinité

BOUABDALLAH (1992) considère comme sol salin tout sol dont la conductivité de l'extrait de pâte saturée est supérieure à 7 mmho/cm.

D'après BOUTEYRE et LOYER (2000), les sols salins ou saliques possèdent un horizon dont la conductivité de l'extrait de pâte saturée est supérieur à 8 ou 15 décisiemens par mètre à 25°C, selon la nature anionique des sels présents (chlorurés, sulfatés, ou bien carbonates). Ces même auteurs, notent que lorsque l'ion sodium ( $\text{Na}^+$ ) occupe plus de 15% de la capacité d'échange cationique du sol, devient sodique. Ces sols sont caractéristiques des climats arides et semi-arides.

Dans les conditions naturelles, les sols salins permettent la croissance d'une végétation tolérante au sel ; qui comprend des arbres, des arbustes et des graminées. Cette végétation sert au pâturage des ovins, des caprins et des camélidés.

Par ailleurs, SEELIG (2000) et KOTUBY-AMACHER *et al.* (1997) notent que le sol à salinité élevée peut causer un déséquilibre nutritionnel. Ce dernier résulte de l'accumulation d'éléments toxiques dans les plantes et la réduction de l'infiltration de l'eau dans le cas où le niveau de sodium est élevé.

### 2-2– Stratégie adaptative des plantes en milieu salin

L'adaptation des végétaux en condition de stress salin diffère d'une espèce à une autre. En outre, la tolérance d'un végétal au sel s'exprime par son taux de croissance et son développement vis-à-vis du niveau de salinité.

La résistance des plantes à la salinité dépend de leur aptitude à se maintenir dans les conditions les moins défavorables à leur fonctionnement, en évitant ou en tolérant de plus ou moins fortes concentrations ioniques à l'intérieur de leurs cellules. Chez ces plantes, les ions toxiques sont exclus des sites sensibles de la cellule, grâce à l'exclusion ou la dilution. Ce processus permet d'éviter les fortes accumulations ioniques dans le cytoplasme (HAMZA, 1980).

Par ailleurs, CHRETIEN (1992) note que les espèces sensibles à la salinité ont tendance à répondre à une augmentation de la teneur en sel du milieu par une croissance modelée de leurs différents organes.

KAPLAN et GALE (1972) notent que les plantes développées dans le milieu salin sont caractérisées par la turgescence des feuilles.

BILLARD *et al.* (1976), montrent que la présence de NaCl dans le milieu extérieur, jusqu'à une concentration de 7,5 g/l, ne peut que favoriser l'assimilation des éléments azotés chez *Suaeda macrocarpa* dont l'halophylie est assurée.

Par ailleurs, FLOWERS *et al.* (1977) précisent que 300 mM de NaCl est effectivement la concentration critique qu'une plante halophyte puisse tolérer à tous les stades de son développement.

D'après YERMANOS *et al.* (1967) in CHRETIEN (1992), chez la plante de joboba, le sel induit une augmentation de l'épaisseur des feuilles et de la taille des cellules palissadiques. Il y a réduction de la densité somatique et du diamètre des tiges.

LEVIGNERON *et al.* (1995) et SEELIG (2000) montrent que le stress salin provoque trois effets chez les plantes :

- Le stress hydrique ; car une forte concentration saline nécessite un ajustement osmotique adapté afin que le potentiel hydrique cellulaire demeure inférieur à celui du milieu extracellulaire.
- Le stress ionique, par l'accumulation de sels dans les tissus, qui va perturber l'activité métabolique ; par conséquent, on aura une toxicité ionique.
- Le stress nutritionnel, car une salinité élevée provoque une altération de nutrition minérale.

En effet, selon CHRETIEN (1992), la réponse du végétal à la salinité dépend de la réponse de chacun de ses éléments constitutifs et de l'interdépendance entre ses différents organes et tissus.

### 3 – Culture *in vitro* :

#### 3-1– Considérations générales sur la culture *in vitro*

Les techniques de culture *in vitro* des végétaux est un ensemble de méthodes qui comprend des cultures d'explants de plantes sur un milieu nutritif synthétique, dans des conditions d'asepsie, dans un environnement contrôlé et dans un espace réduit.

Selon AUGÉ (1984), GOACOLOU et PERDRIZET (1988) toute cellule végétale vivante, quelle que soit sa « spécialisation », est capable de reproduire la plante entière d'où elle provient. C'est grâce à cette totipotentialité que la culture *in vitro* doit toute son extension.

Cependant, la culture *in vitro* d'organe ou de tissus provoque la reprise des mitoses et, en favorisant la dédifférenciation cellulaire, permet l'extension à un grand nombre d'espèces de l'expression de potentialités normalement réprimées (MARGARA, 1989).

ZRYD (1988), énumèrent les diverses modalités de multiplication végétative *in vitro* parmi lesquelles on cite :

- La multiplication par bourgeonnement axillaire.
- La multiplication par bourgeonnement adventif à partir de cal.
- L'embryogenèse somatique.
- La culture de protoplaste.

Toutefois, les difficultés techniques restent nombreuses et de grands efforts doivent être faits pour améliorer la compréhension des phénomènes de totipotence cellulaire et de régénération (TEOULE, 1999).

Selon BIGOT (1980), la multiplication végétative *in vitro* par néoformation de bourgeons ou de racines et l'embryogenèse somatique, à partir de fragments d'organes, nécessite un équipement plus coûteux que celle par les méthodes traditionnelles ; mais elle est caractérisée par un rendement très élevé de multiplication.

### 3-2- Intérêt de la culture *in vitro*

Les diverses techniques de la culture *in vitro* jouent un rôle important dans le cadre d'amélioration des performances des plantes.

La multiplication *in vitro* constitue un outil très puissant pour la multiplication de manière exponentielle et continue un clone sélectionné. Elle est réalisée indépendamment des saisons

D'après AUGÉ *et al.* (1989), la technologie de la culture en masse de micro plantes *in vitro* apporte des avantages considérables pour un grand nombre d'espèces d'intérêt agronomique et horticole. Parmi ces avantages, on a l'efficacité et la rapidité de la multiplication, amélioration de la qualité des produits fournis et économie d'énergie pour les espèces nécessitant l'entretien des pieds mères. Ceux-ci est illustré chez le rosier, dont un seul bourgeon permet d'obtenir 200 à 400 000 rosiers pour la même année (GOACOLOU et PERDRIZET, 1988), et chez *Delpbinium X cultorum* où le taux mensuel de multiplication par bourgeonnement axillaire obtenu est supérieur à 3 pendant 14 mois de suite (ONESTO *et al.*, 1994).

HASSANE (1998), constatent chez l'*Atriplex halimus*, qu'un taux de 458 vitro-plants issus de deux (2) clones sont obtenus après 4 cycles de micro-propagation, pour le milieu M.S./2.

Alors qu'il fallait 10 à 15 ans aux obtenteurs pour mettre sur le marché une variété horticole nouvelle, la culture *in vitro* permet aujourd'hui l'obtention en 1 ou 2 ans, la où il fallait des hectares de pieds mères ou de porte-greffe, quelques dizaines de mètres carrés d'un local climatisé suffisant pour produire le même nombre de plantes, et souvent le greffage devient inutile (GOACOLOU et PERDRIZET, 1988).

Cependant, le développement des techniques de culture *in vitro* a permis de renouveler les possibilités offertes par multiplication végétative dans plusieurs directions.

La multiplication *in vitro* permet de constituer un stock de plantes saines très rapidement, à condition de partir d'une souche saine et contrôlée (AUGÉ *et al.*, 1989).

Par ailleurs, la multiplication *in vitro* maintient la plante dans un état juvénile. En effet, elle en a souvent la morphologie, sinon la physiologie, ce qui lui confère au départ les avantages de la vigueur, un enracinement meilleur que celui d'une bouture ou d'une marcotte (AUGE *et al.*, 1989).

### **3-3- Intérêt de la sélection *in vitro***

Le but de la sélection est de cumuler dans une espèce ou variété donnée des caractères initialement présents dans différentes plantes tel que la résistance à la salinité, à la sécheresse ou encore la résistance aux maladies.

Par ailleurs, plusieurs auteurs (TIRILLY et BOURGEOIS, 1999 et YANCHUK, 2001) soulignent que la sélection réalisée au niveau de plantes entières est souvent nettement plus longue et difficile que celle réalisée à un stade plus précoce : Protoplaste, cellules isolées, cal, voir bourgeons. En outre, la culture *in vitro* de tissus végétaux permet d'amplifier et d'élargir les potentialités de sélection de génotype possédant des caractères intéressants sur le plan agronomique, économique et écologique.

Le développement des techniques *in vitro*, particulièrement la micropropagation et l'embryogenèse somatique, sont généralement utilisées pour la multiplication d'un grand nombre d'individus élites nécessaires pour le repeuplement des régions dégradées.

Pour YANCHUK (2001), la sélection *in vitro* prévoit la sélection d'un caractère particulier (par exemple la tolérance aux métaux lourds ou au sel) à un stade précoce de la phase de micropropagation. Elle constitue un élément de base du processus de présélection pour l'obtention de lignées clonales généralement modifiées.

## **4 – Organogenèse chez les plantes supérieures**

### **4- 1- La caulogenèse et la rhizogenèse**

Sur le plan fondamental, la rhizogenèse, plus accessible à l'expérimentation que la caulogenèse, demeure une bonne voie d'approche du déterminisme de l'organogenèse (MARGARA, 1989). La néoformation des méristèmes de racines résulte toujours d'une dédifférenciation cellulaire poussée qui aboutit à la production de cellule méristématiques primaires et à l'organisation d'une ébauche méristématique (MARGARA, 1989).

L'organogenèse suit généralement la séquence : néoformation de zones méristématiques sur cal, formation des bourgeons puis de tiges et enfin enracinement de ces tiges (TEOULE, 1999).

La caulogenèse comprend deux étapes : la néoformation des bourgeons et leur développement. Cette différenciation des bourgeons est induite par les cytokinines et éventuellement en présence d'une faible dose d'auxine exogènes et endogènes

ELKHIFI (1984) indique que la néoformation de bourgeons, qui se produisait après une phase cal, pouvait être différente de la plante de départ. Les différences peuvent porter sur la structure du patrimoine génétique ou sur son expression.

MARGARA (1989), montre que l'adjonction au milieu de base d'une forte concentration de cytokinine (benzyladenine  $5 \cdot 10^{-6}$  ou  $10^{-5}$ ) peut déclencher la néoformation de bourgeon sur toute la surface de l'explant. Cette caulogénèse est accompagnée par l'inhibition de la rhizogénèse.

Par ailleurs, il existe également chez les plantes une capacité, plus ou moins grande selon les espèces à la néoformation de méristème sur des tissus différenciés qui est largement exploitée en culture *in vitro* (TEOULE, 1999).

Selon MARGARA (1989), la néoformation de bourgeons sur cal n'est aisément observable qu'à partir de tissus floraux.

## 4-2- Embryogénèse somatique

### 4-2-1- Généralité sur l'embryogénèse somatique

Le vocable embryogénèse somatique a été employé par TOKIN (1968) pour désigner (chez les végétaux ou animaux) la formation d'organes à partir d'une seule cellule ou d'un groupe de cellule somatique (MARGARA, 1989).

Cependant, il est généralement admis que l'embryogénèse expérimentale a été observée sur la carotte pour la première fois par REINENT (1958) in MARGARA (1989), puis par STEWART *et al.* (1958) in MARGARA (1989). Les facteurs de l'embryogénèse ont été principalement recherchés dans la rupture des corrélations provenant de l'isolement des cellules en milieu liquide agité, dans l'environnement trophique et dans la composition des milieux de culture.

Chez les végétaux ligneux, l'embryogénèse somatique a été décrite chez de nombreuses espèces (AMMIRATO, 1983) et chez de nombreux conifères (HAKMAN et VON ARNOLD, 1985, GUPTA et DURZAN, 1986) in (BOULAY, 1987) ; ainsi que chez Apiaceae, Ranunculaceae, Solanaceae et Fabaceae parmi les dicotylédones et Poaceae parmi les monocotylédones (RAGHAVAN, 1997). Récemment, elle est réalisée sur *Eluthéroccus senticosus* par l'équipe de CHOI *et al.* (1999) et *Eucalyptus nitens* (BANDYOPADHYAY et HAMILL, 2000).

D'autre part, il existe deux types d'embryogénèse somatique. Le premier type est l'embryogénèse somatique directe où l'embryon est formé directement sur l'explant. Le deuxième type est l'embryogénèse somatique indirecte où la formation de l'embryon se réalise à partir des cals (à partir des cellules différenciées).

- L'embryogénèse somatique directe permet de produire des embryons à partir d'un explant (cellules du nucelle de variétés polyembryogénétiques de *Citrus*, qui peuvent être considérées comme un des cas particuliers d'embryogénèse somatique naturelle et cellules épidermiques d'hypocotyles de carotte sauvage).

- L'embryogenèse indirecte nécessite un passage par un stade de cellules indifférenciées (PIATTI, 1990).

L'embryogenèse somatique adventive (formation d'embryon à partir d'explants de tissus, d'autres embryons issus de cal ou de culture en suspension), peut constituer une dernière source possible d'embryons somatique (PIATTI, 1990).

D'après MARGARA et PIOLLAT (1982), l'apparition d'un bourgeon ou d'un embryon à partir d'un fragment ou d'un cal est un événement complexe, qui est sous la dépendance des conditions intrinsèques, dans ce cas c'est le génotype, et des conditions extrinsèques, tel que le milieu de culture, nature de l'équilibre en régulateurs de croissance et nature de l'environnement.

#### **4-2-2-Comparaison entre l'embryogenèse somatique et l'embryogenèse zygotique**

L'embryogenèse zygotique ou l'obtention d'un zvaote résulte de la fécondation de l'oosphère, située au sein du sac embryonnaire (DUCREUX et al., 1998).

Cependant, l'embryogenèse somatique est une technique de multiplication *in vitro*. Elle consiste à induire des embryons somatiques à partir d'un génotype sélectionné, de le multiplier, de le faire mûrir, puis de les faire germer pour obtenir une plantule.

Tableau 1 : Comparaison entre embryogenèse zygotique et embryogenèse somatique (d'après BOXUS, 1998)

Etapes	embryogenèse zygotique	embryogenèse somatique
<b>Origine</b>	<b>Zygote</b> Au sein de l'ovule	Cellule somatique isolée ou non Cellules haploïdes (microscopore ou jeune gamétophyte)
<b>Initiation</b>	Fécondation (sauf apomixie) Tous les zygotes	Induction hormonale Faible pourcentage Des cellules Dédifférenciation
	Polarité constitutionnelle Division asymétrique (contrôle génétique)	→ polarité ? Division asymétrique ? (glycoprotéines ?)
<b>Construction de l'embryon</b>	Séparation embryon/suspenseur Mise en place axe embryonnaire (contrôle génétique)	Modalités comparables+variation : Absence suspenseur Réorganisation massive embryonnaire Embryogenèse adventive
	Régulation stricte	
<b>Mise en place</b>	Etroitement contrôlée génétiquement 1 racinaire 2 caulinaire	Interactions entre contrôle des méristèmes Génétique et contrôle hormonal → nombreuses anomalies
<b>Maturation</b>	Accumulation de protéines de réserve (contrôle génétique) Déshydratation Dormance (contrôle génétique, ABA) Interaction plantes-embryons	Absence de maturation et endosperme → Induction par effecteurs externes (acides aminés, sucres, ABA, déshydratation)

#### 4-2- – Intérêts de l'embryogenèse somatique

Les intérêts de l'embryogenèse somatique sont multiples. Elle peut être utilisée dans le cadre d'amélioration des plantes, comme un outil pour la recherche fondamentale ou bien pour l'industrie par la production de semence artificielle.

MOHAN JAIN et ISHII (1997) notent que l'embryogenèse somatique peut être utilisée pour la propagation des clones à grande échelle et procurer une fidélité génétique qui peut être assurée et maintenue.

En effet, l'origine uni ou paucicellulaire des embryons somatiques est un atout précieux en particulier pour exploiter des phénomènes initialement réalisés à l'échelle cellulaire (mutation, hybridation somatique, génie génétique (TEOULE, 1999)).

PIATTI (1990), montre que la multiplication *in vitro*, passant par l'embryogenèse somatique, implique l'utilisation d'un matériel juvénile, un cycle de multiplication du végétal sur lui-même relativement court et un nombre d'individus impressionnant (de l'ordre de milliers à un million d'embryons pour 1 litre de milieu). De ce fait, la production de semis peut être rentabilisée.

## **5 – Facteurs influençant l'organogenèse chez les plantes supérieures**

L'orientation des néoformations vers une organogenèse bien déterminée à partir d'un fragment (explant) ou d'un cal dépend de l'interaction complexe des conditions intrinsèques et extrinsèques.

### **5- 1 – Conditions extrinsèques**

La nature de l'environnement (lumière, hygrométrie, et le photopériodisme) et la nature de milieu de culture utilisé ainsi que l'équilibre hormonale jouent un rôle primordial sur le type d'organogenèse à réaliser.

#### **5- 1-1 – Environnement**

Pour une bonne réussite d'organogenèse, tel que l'embryogenèse, les conditions environnementales doivent être contrôlées périodiquement. Parmi ces facteurs nous citons :

##### **5-1-1-1- Température**

En culture *in vitro*, TEOULE (1999) note que les températures classiquement utilisées varient entre 22°C et 26°C.

Les températures qui varient entre 22°C et 25°C sont généralement favorables pour le déroulement de l'embryogenèse somatique (ZRYD, 1988). En outre, une température élevée ( $\pm 30^\circ\text{C}$ ) peut favoriser l'initiation des primordium racinaire alors qu'une température de  $\pm 25^\circ\text{C}$  favoriserait plutôt leur développement (ZRYD, 1988).

D'après PIATTI (1990), quelques expériences ont été conduites en employant des températures qui sont écartés sensiblement pour les phases de germination et d'embryogenèse proprement dites qui se déroulent habituellement à température ambiante.

En effet, ZHANG *et al.* (1987) ont montré l'effet bénéfique des basses températures sur le rendement androgénétique de *Datura innoxia*. Le même traitement fut appliqué à plusieurs espèces et il s'avère qu'il augmente généralement le pourcentage d'anthère embryogène et semble jouer un rôle très important.

### 5-1-1-2- Lumière

La bonne réussite d'un des différents types d'organogénèses ainsi que l'embryogenèse somatique est influencé par l'intensité d'éclairement et le photopériodisme appliqués.

MORET (1988) confirme, qu'après le repiquage, les tubes à essai et les boîtes de pétri placés dans une chambre de culture où la photopériode et la température sont contrôlées, le développement des souches est optimal.

Selon TEOULE (1999), La photopériode appliquée est généralement longue (16 heures d'éclairement et de 8 heures d'obscurité) et l'intensité lumineuse comprise entre 2000 et 6000 lux.

Par ailleurs, l'induction de l'embryogenèse somatique indirecte est liée à l'obscurité chez la patate douce (*Ipomoea batatas* L.) (SIHACMAKR et al., 1995) et le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) (SAKA et al., 1997).

### 5-1-1-3- Potentiel hydrique

Le pH du milieu de culture est aussi un facteur critique. La pratique habituelle fait que l'on ajuste le pH à 5,5 – 5,8 pendant la préparation du milieu (BOCCON-GIBOD, 1984).

D'après BOCCON-GIBOD (1984), plus le pH est bas, plus l'agar-agar tend à devenir liquide.

### 5-1-1-4- Les échanges gazeux

Le choix du volume interne et la forme des récipients, lors de l'élaboration d'une culture cellulaire, sont très importants. BATESON et GROUT (1987) confirment, lors d'une réalisation d'une culture régénérée d'un cal de *Daucus carota*, qu'il existe une corrélation positive entre la diminution du volume du gaz présent au-dessus de la culture et l'élévation du taux de croissance cellulaire.

D'après ZRYD (1988), la taille du flacon (tube, bocal, etc.) influe sur le développement des cultures *in vitro*.

### 5-1-2- Milieu de culture

La nutrition de l'embryon somatique est assurée par les apports externes (substances trophiques et régulateurs de croissance) (NOUAILLE et PETIARD, 1988).

Cependant, la concentration de ces composés varie d'une espèce à l'autre. Ces variations ont une faible incidence sur les réactions des cellules. Les facteurs essentiels sont les régulateurs de croissance qui stimuleront la multiplication cellulaire et orienteront la morphogénèse (AUGE, 1984).

D'après GAUTHERET (1977), l'organogenèse est provoquée par l'emploi de milieux nutritifs renfermant, outre la solution minérale de M.S. et les divers composés organiques, des doses variées d'acide indolylacétique associées à diverses concentrations de kinétine.

### 5-1-2-1- Composition minérale du milieu

D'après HELLER *et al.* (1998), les éléments minéraux sont classés, selon leur importance pondérale, en deux groupes :

- Les macroéléments présentent un taux de l'ordre de quelques pour mille à quelques pour cent de la matière sèche des tissus. Ces éléments sont l'azote, le potassium, le calcium, le magnésium, le soufre et le phosphore.
- Les oligoéléments comprennent une vingtaine d'éléments. Ils se présentent à des taux inférieurs à un pour mille (1 ‰) de la matière sèche des tissus.

CHAUSSAT et BIGOT (1980) indiquent que parmi les ions, le  $K^+$  est le plus important, la croissance maximale des cals étant assurée pour une concentration de 1 mM, alors que celle de l'embryon nécessite 20 mM. Le sulfate et le chlorure sont efficaces.  $Na^+$  et  $NH_4^+$  ne peuvent pas remplacer le  $K^+$ , mais le second renforce l'effet de ce dernier.

D'après MAZLIAK (1981), la carence en ions  $K^+$  entraîne des déficiences dans la synthèse protéique.

Une concentration 1mM en  $K^+$  assure une croissance maximale des cals, alors que celle des embryons nécessite 20 mM. En plus le  $NH_4^+$  renforce l'effet de  $K^+$  (BRAWELEY *et al.*, 1984 in TALAMALI, 1996).

Les micro-éléments jouent un rôle essentiel dans les mécanismes enzymatiques comme activateurs ou constituants de coenzymes. Les principaux d'entre eux sont : le fer, le cuivre, le zinc, le manganèse, le molybdène, et le bore (MARGARA, 1989).

REIMANN et BRECKLE (1993) montrent que le rapport élevé de  $K^+ / Na^+$  dans les hypocotyles est interprété comme une indication de la réabsorption du potassium chez les espèces halophytes tel que l'*Atriplex rosea* et l'*Atriplex prostrata*.

Selon HOUCHI (1986), chez l'*Atriplex halimus* l'addition de NaCl au milieu conduit à une accumulation de  $Na^+$  qui est plus élevée que celle de  $Cl^-$  et dont leur translocation ce fait vers la partie aérienne.

Par ailleurs, l'introduction d'ions  $Ca^{++}$  (sous forme de  $CaCl_2$ ) en quantité importante permet d'enrayer la nocivité du NaCl vis-à-vis de la croissance au point que le milieu contenant 2,5 g/l de NaCl devient le plus favorable au développement du *Cochlearia anglica* (BILLARD *et al.*, 1976).

POURRAT et DUTUIT (1993) montrent que la croissance de la plante d'*Atriplex halimus* est déterminée d'avantage par le  $\text{Ca}^{++}$  du milieu que par le  $\text{Na}^+$ .

L'apport d'azote sous forme  $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NO}_3^-$  est nécessaire pour la formation d'embryons somatiques. En effet, comme la montré DAVID (1972) sur les tissus du Pin maritime, les  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$  serait indispensables à la prolifération des tissus cultivés. KEBOUR (1995) montre que l'augmentation des concentrations en nitrate (1,25 mM) favorise la formation de cal chez les vitro-plants d'*Atriplex halimus*, ainsi que l'apparition des embryons (ZRYD, 1988).

D'après GAUTHERET (1977) et ZRYD (1988), les ions ammoniums sont des facteurs décisifs pour l'embryogenèse somatique et pour le contrôle de la morphogenèse (EVANS, 1992).

### 5-1-2-2- Régulateurs de croissance

Les phytohormones, qui sont des messagers chimiques de l'organisme et leurs actions sont multiples.

Les phytohormones participent au contrôle de nombreuses étapes du développement, qu'il s'agisse de la croissance, de la différenciation des organes végétatifs ou reproducteurs, de la formation des graines, ou de leur germination (HELLER *et al.*, 2000).

En effet, les régulateurs de croissance jouent le rôle d'inducteurs de programmes d'organogenèse en provoquant l'activation de certaines séquences génétiques qui se déploient souvent dans certaines cellules cibles (BIGOT, 1980). Leurs actions dépendent des concentrations endogènes ainsi que des concentrations exogènes apportés dans le milieu de culture (Figure 1).

Parmi les différents types de phytohormones, nous distinguons trois principales classes : les auxines, les cytokinines et les gibbérélines.

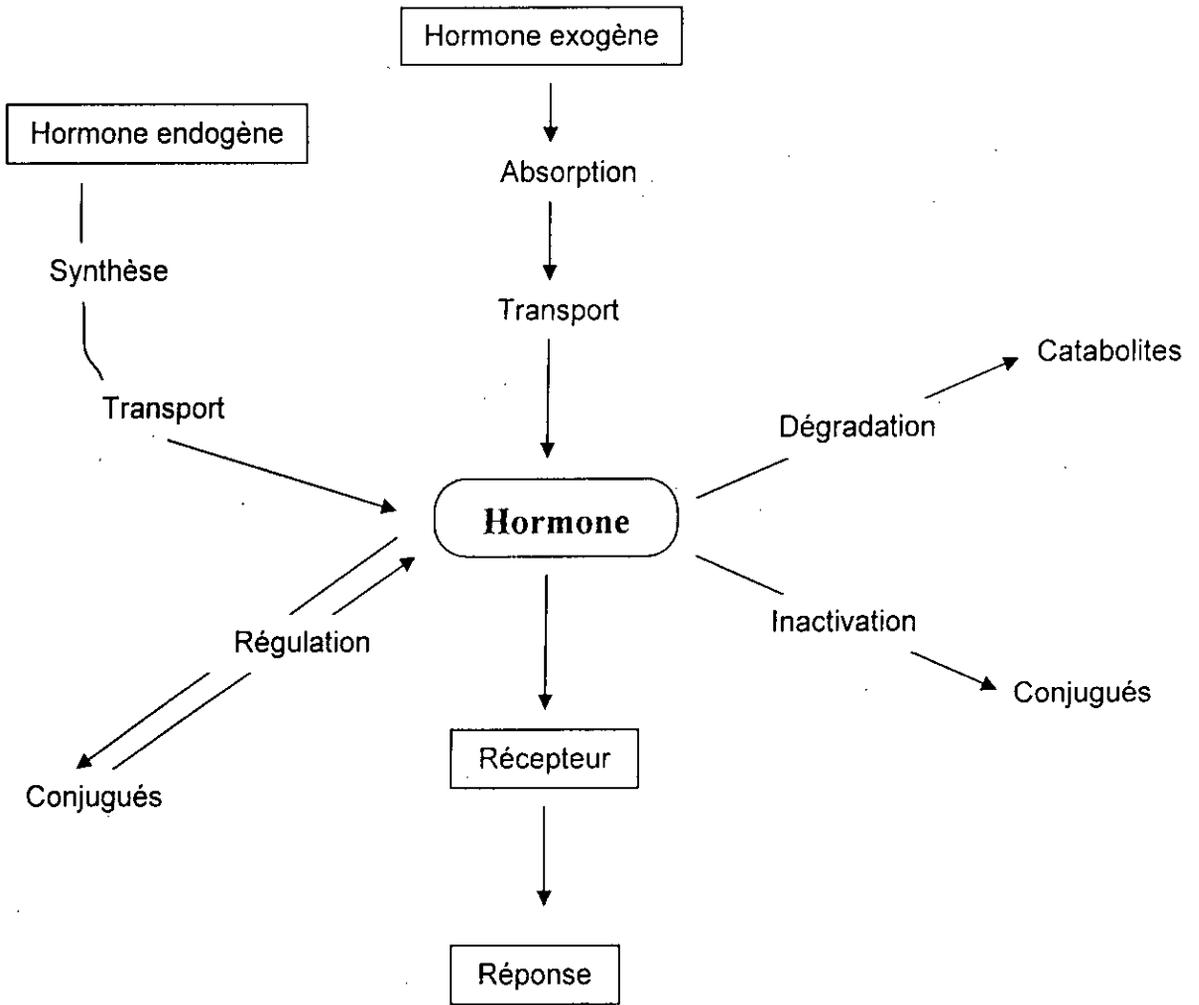


Figure 1 : Facteurs contrôlant la concentration hormonale qui déclenche une réponse d'après HELLER *et al.* (2000)

● Les auxines :

L'auxine a été, en 1934, extraite et identifiée par un groupe de chercheurs néerlandais dirigés par KÖGL et HAAGEN-SMIT (ANONYME, 2001). L'acide indole-acétique "IAA" fut la première hormone végétale dans les années 1920 (HELLER *et al.*, 2000).

Les rôles des auxines sont multiples :

- Stimulation de la division qui y est très marquée sur la prolifération du cambium et l'agrandissement des cellules (HELLER *et al.*, 2000).
- La fixation de l'auxine sur son récepteur entraîne des modifications cellulaires : peu de temps après la fixation le pH de la cellule diminue et provoque une augmentation de la plasticité de la membrane cellulaire ; Cet effet serait consécutif à l'activation d'un transporteur de proton. Enfin, l'auxine stimule la synthèse de différents enzymes du métabolisme (ANONYME, 2001).
- Les auxines contrôlent la croissance apicale, la maturité des fruits ainsi que l'abscission des feuilles. En effet, selon AUGÉ (1989), les concentrations en auxines au niveau de la plante sont plus élevées au niveau des points végétatifs ou inflorescentiels, en d'autres termes, près des lieux de synthèse et qui circule du sommet vers la base des organes où elle est moindre à cause de sa dégradation par auxinases au cours de son transport.
- L'auxine agit très diversement, suivant les tissus, sur la différenciation. Elle facilite la formation des tissus conducteurs, facilite ou inhibe le développement des bourgeons selon les doses et enfin stimule la rhizogénèse (HELLER *et al.*, 1985). En outre, l'auxine agit sur l'expression des gènes codant pour des protéines spécifiques de l'élongation cellulaire. HELLER *et al.* (2000) montrent, d'une façon générale, qu'aux concentrations physiologiques, de l'ordre de  $10^{-7}$  à  $10^{-5}$  g/ml (0,5 à 50  $\mu$ M), l'auxine entraîne non seulement l'élongation cellulaire, mais induit principalement la rhizogénèse.

D'après MARGARA (1989), le choix de l'auxine en fonction de l'objectif de la culture est très important, de ce fait l' "AIA", qui présente l'avantage d'être une substance naturelle, est souvent utilisée dans certaines recherches à caractère physiologiques, alors que, le "2,4-D" qui est une auxine très forte, devient rapidement toxique aux concentrations élevées et provoque la réaction hyperhydrique des tissus ; Son utilisation est préconisée pour la dissociation des tissus ou groupes cellulaires séparés ou pour des travaux sur l'embryogénèse somatique.

D'après HELLER (1985), une dose de  $2 \cdot 10^{-6}$  g/ml d'AIA et de  $2 \cdot 10^{-8}$  g/ml de Kinétine induit la formation des racines sur des cals de tabac.

Cependant, les fortes concentrations de substances de croissances, qui stimulent la néoformation de racines, inhibent celle des bourgeons (CHANPAGNAT *et al.*, 1969).

### ● Les cytokinines

Toutes les plantes possèdent des cytokinines. Ces derniers sont élaborés essentiellement par les racines et également au niveau des embryons (AUGE, 1989).

Concernant les rôles des cytokinine au niveau de l'organisme, CHAUSSAT et **BIGOT** (1980) notent qu'elles induisent la néoformation des bourgeons, levé la dormance de nombreuses graines, provoquent le développement des ébauches florales en conditions photopériodiques défavorables chez certaines espèces et stimulent la transformation des proplastés en chloroplastes ; enfin elles retardent la sénescence des feuilles.

Cependant, les cytokinines en présence d'auxine, stimule la division cellulaire (HELLER *et al.*, 1985). Elles agissent aussi sur l'accroissement cellulaire et stimulent certaines synthèses protéiques (HELLER *et al.*, 1985).

Les interactions des auxines et des cytokinines règlent la morphogénèse des explants mis en culture. Si le rapport entre les deux régulateurs est en faveur de l'auxine, nous observons la naissance de racine ; s'il est en faveur de la cytokinine nous verrons apparaître des bourgeons. S'ils sont en équilibre, ils annulent leur effet morphogène mais conservent leur effet sur la division cellulaire, nous obtiendrons alors des cals.

AUGE *et al.* (1989) signalent, qu'à partir de parenchyme médullaire de tabac,, comment les interactions entre auxines et cytokinine orientent les tissus, tantôt vers la néoformation de racines, tantôt vers un développement continu de tissus indifférenciés et tantôt vers la néoformation de bourgeons (Figure 2). Ce qui y est constaté, aussi, par TOURTE(1998).

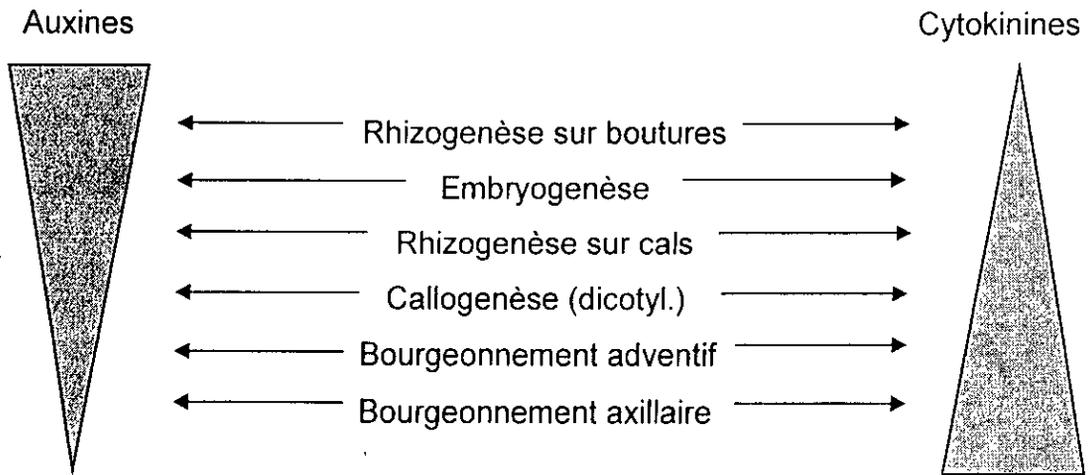


Figure 2 : Types d'organogenèse contrôlés par les concentrations relatives d'auxines et de cytokine d'après ZRYD, 1988.

### ● Les gibbérellines

Les gibbérellines inhibent la formation des embryons somatiques. Par ailleurs, leur forte concentration peut empêcher la formation des racines. L'acide gibbérellique "GA<sub>3</sub>" favorise le développement de bourgeons ou d'apex méristimatiques préformés. Une des actions principales des gibbérellines est l'élongation des tiges.

En effet, CHAUSSAT et BIGOT (1980) montrent que les gibbérellines stimulent la croissance des entre-nœuds.

Les gibbérellines ont été trouvées chez toutes les plantes, où, elles sont inégalement réparties, leurs circulation et non polaire.

D'après HELLER *et al.* (1985), leur synthèse semble possible dans des lieux de divisions actives, particulièrement, dans les apex des jeunes pousses et des racines dans les jeunes feuilles et dans l'embryon (axe et cotylédons) ; ils montrent qu'une gibbérelline appliquée à une forte dose (ou en synergie avec une cytokinine) peut provoquer une croissance des feuilles qui atteignent souvent une surface double de la normale (Trèfle, Radis). Par ailleurs, elles sont généralement utilisées pour hâter la croissance des organes déjà formés.

ELKHIFI (1984) note que cette substance joue un rôle inhibiteur sur l'initiation des méristèmes.

En fait, Les gibbérellines ont la réputation d'inhiber l'organogenèse et en particulier la rhizogenèse (MARGARA, 1989). CHAUSSAT et BIGOT (1980) notent que les gibbérellines inhibent la formation des racines à partir des boutures cultivées *in vitro* et dont l'acide gibbérellique est le plus polyvalent.

ZRYD (1988) soulignent que si on ajoute les gibbérellines au bon moment, elles peuvent stimuler l'initiation des racines.

### **5-1-2-2- Source de carbone**

En générale, le saccharose constitue la meilleure source de carbone et il est apporté généralement à la concentration de 20 g/l (cette concentration peut varier de 5 à 40 g/l ou plus) (MARGARA, 1989).

### **5-2- Les conditions intrinsèques**

L'aptitude à l'organogenèse dépend essentiellement de type, de l'origine de l'explant, de son âge physiologique et de son génotype.

#### **5-2-1- Type d'explant**

Les tissus de racines, tiges, pétioles, feuilles et bourgeon axillaire ont été surtout utilisés chez les espèces favorables (feuilles, tiges, racines, bourgeons axillaires de *Ipomoea batatas* L. (patate douce), SIHACHAKR et al. (1995), des bourgeons apicaux et axillaires du *phoenix dactylifera* L. (palmier dattier), SAKA et al. (1997).

Chez la pomme de terre, les meilleurs résultats obtenus, concernant le nombre de bourgeons sur cal, sont obtenus pour des explants de 5 à 7 mm de long (ELKHIFI, 1984).

D'après LEBRUN (1986), les boutons floraux présentent une bonne aptitude à l'embryogenèse somatique chez la vigne.

#### **5- 2-2- Age physiologique de l'explants**

DAIKH (1983) montre que l'âge du matériel, ainsi que l'origine de l'explant, sa nature et sa position sur la plante mère peuvent avoir une nette influence sur l'aptitude à la callogenèse.

En effet, AUGE et al. (1989) constatent que lorsque les tissus deviennent trop âgés, les réactions de différenciation deviennent incomplètes et très rares.

D'HALLUIN et al. (1980) montrent qu'il existe une relation étroite et toujours respectée entre l'âge physiologique des tubercules, les phénomènes de callogenèse et l'organogenèse des différents plants issus de ces tubercules. Parmi les tiges néoformés sur cals un polymorphisme est observé.

### 5-2-3- Epoque de prélèvement

L'explant ne peut être prélevé en toutes saisons ; cela est dû à des modifications des équilibres internes des régulateurs de croissance lors des différentes saisons. En conséquent, il est souhaitable de travailler sur un matériel pour lequel la dormance a été levée.

Actuellement, les plantes sont traitées par le froid, ou par des éclaircissements spécifiques ou encore par des régulateurs de croissance afin de provoquer un bouleversement de ces équilibres internes et permettre une organogenèse dirigée (PIATTI, 1990).

### 5- 2-4- Génotype

La capacité de fournir des embryons somatiques est liée à l'espèce. Au sein d'une même espèce, un génotype donne des embryons somatiques , tandis qu'un autre ne peut fournir que des bourgeons. Les résultats des dernières années montrent l'influence de la constitution génétique des plantes mères sur la réussite de la culture *in-vitro*. Ce qui y constaté par **TANG et al., 1980** .

Chez le piment, DUMAS DE VAULX et POCHAARD (1986) obtiennent des plantes andogénétiques avec des fréquences variant selon le type des génotypes testés.

LEBRUN (1986) montre que chez la vigne (*Vitis* sp.) l'existence d'un effet très significative du génotype au niveau quantitatif pour l'obtention des cals primaires embryogènes et au niveau de la qualité de l'embryogenèse.

## Chapitre 2

# Matériel et méthodes

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

### 1 – Matériel végétal

Les semences d'*Atriplex halimus* proviennent de la région semi-aride d'EL MESRANE (WILAYA DE DJELFA). La récolte a été effectuée sur un seul pied mère en décembre 2000 (Planche 1).

### 2 – Stérilisation du matériel végétal

Les fruits sont décortiqués manuellement dans le but d'extraire la graine de l'enveloppe.

Les graines sont désinfectées par un trempage dans l'alcool à 70° pendant 10 minutes, puis par un trempage dans l'hypochlorite de calcium à 8% pendant 20 minutes. Elles sont ensuite rincées cinq fois avec de l'eau distillée stérile.

### 3 – Germination

Les graines stérilisées sont mis dans des boîtes de pétri stériles qui contiennent chacune trois couches de papier filtre stérile imbibées d'eau distillée stérile, puis ont été mises dans la chambre de culture à une température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 4 – Repiquage

Après 5 jours de germination, les plantules obtenues sont repiquées dans des tubes à essai contenant les milieux de culture de base de MURASHIGE et SKOOG (1962) additionné de différentes concentrations en NaCl (0, 5, 10, 15 et 20 g/l) (Figure 3 et figure4)

### 5 – Origines des explants

Après 45 jours de mis en culture, sept (7) plantules présentant les meilleures caractéristiques (développement et croissance) sont sélectionnées et multipliées par micro-bouturage pour aboutir à l'obtention sept (7) clones suivants :

- L<sub>0</sub>, P<sub>1</sub> et P<sub>1</sub>' Clones développés sur le milieu témoin (M.S.)
- L<sub>1</sub> Clone développés sur le milieu M.S. + 5g/l(de NaCl)
- L<sub>2</sub> Clone développés sur le milieu M.S. + 10g/l(de NaCl)
- L<sub>3</sub> Clone développés sur le milieu M.S. + 15g/l(de NaCl)
- L<sub>4</sub> Clone développés sur le milieu M.S. + 20g/l(de NaCl)

Les explants issus des clones L<sub>0</sub>, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> et L<sub>3</sub> sont utilisés pour l'étude de la callogenèse dans un milieu salin ; De la même manière, les explants issus des clones P<sub>1</sub> et P<sub>1</sub>' sont utilisés pour les essais d'obtention des cals embryogénèse, en raison de leur homogénéité phénotypiques (croissance normale, présence de racines, nombre de feuilles et leur coloration). Concernant le clone L<sub>4</sub>, il est utilisé pour l'obtention des plants développés à partir des bourgeons adventifs (Figure 4).

Les explants mis en culture pour l'étude de la callogenèse proviennent des plantules âgées de 5 jours pour les feuilles cotylédonaires (F.C.) et les hypocotyles (Hyp.) et 45 jours pour les entre-nœuds (EX<sub>1</sub>), les fragments de racines (EX<sub>2</sub>) et les feuilles (EX<sub>3</sub>) (Figure 5).

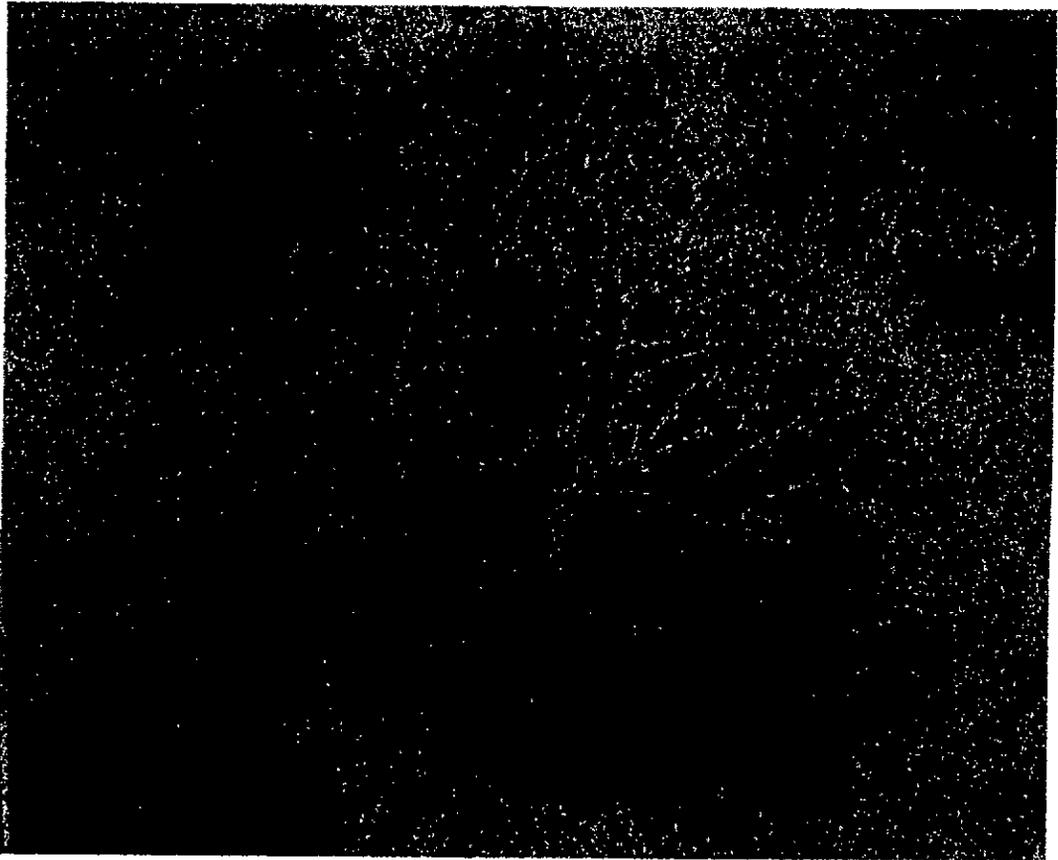


Planche 1 : Aspect morphologique du pied-mère d'*Atriplex halimus*

Essais d'obtention des cals embryogènes et de régénération  
de plants résistants à la salinité chez l'*Atriplex halimus* L.

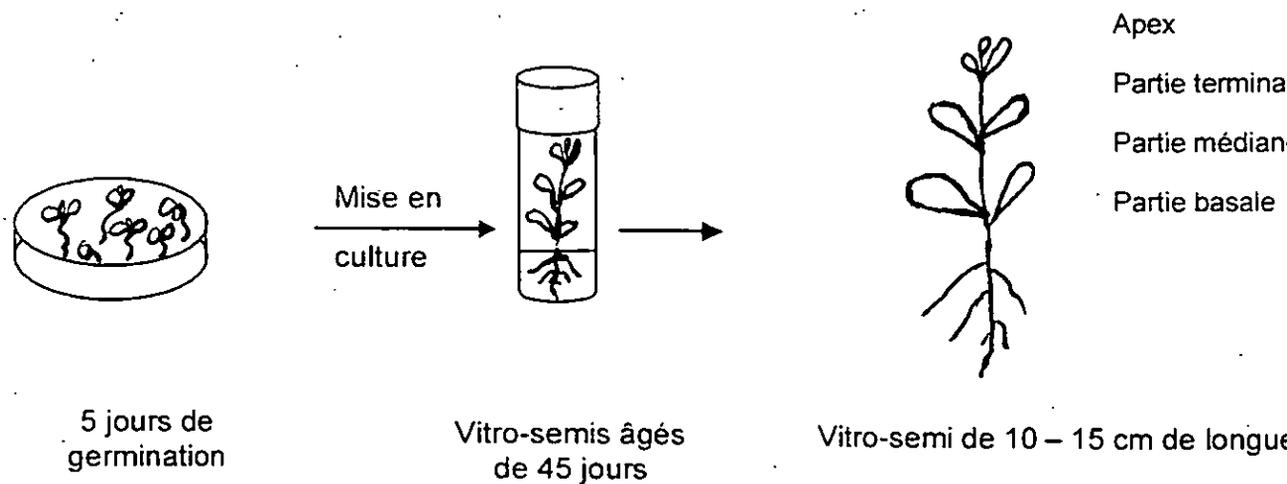


Figure 3: Présentation schématique d'obtention des vitro-plants

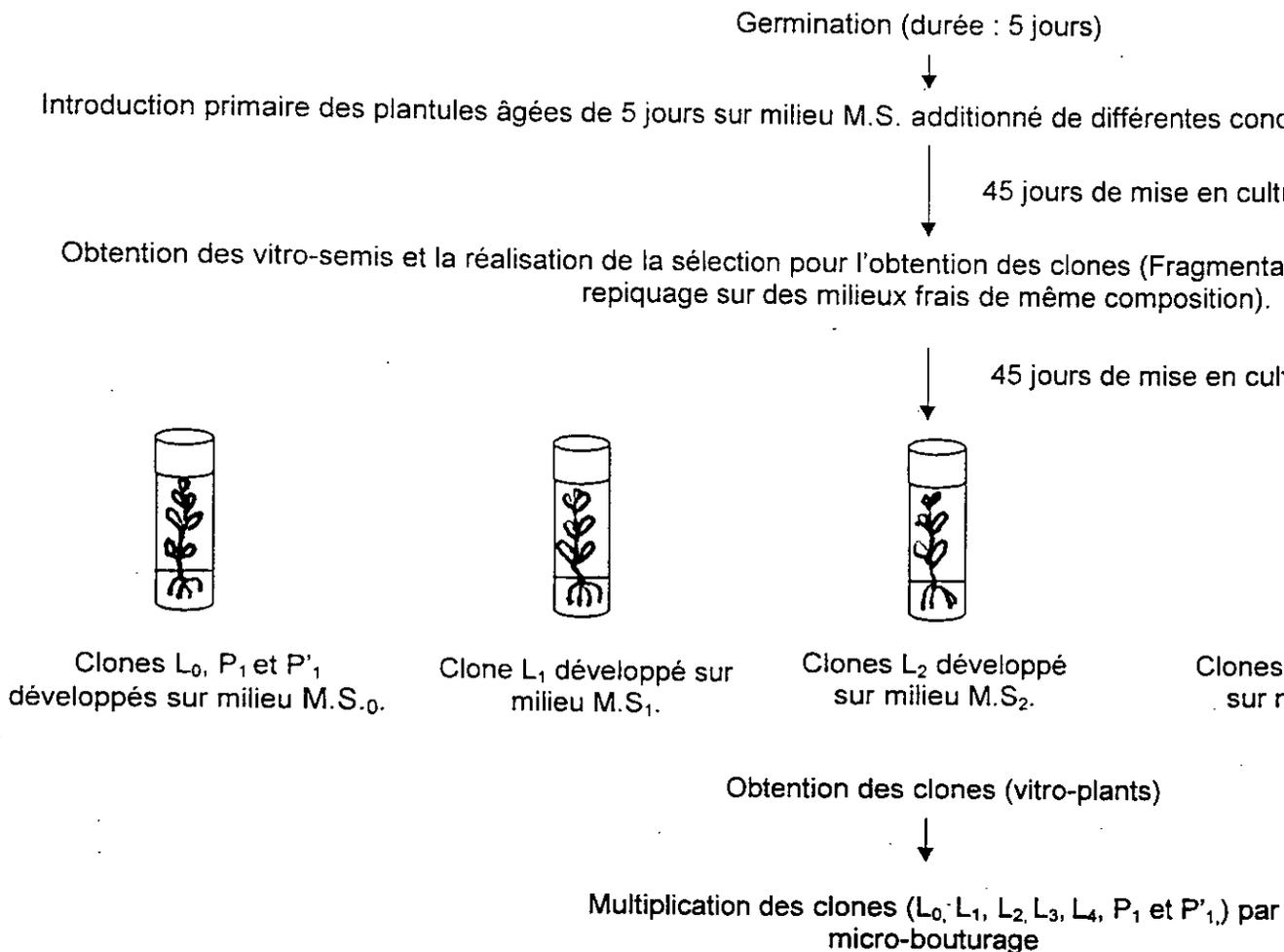


Figure 4 : Présentation schématique de l'obtention des clones sélectionnés pour leur m  
en milieu salin en plus du milieu témoin.

Essais d'obtention des cals embryogènes et de régénération de plants résistants à la salinité chez l'*Atriplex halimus* L.

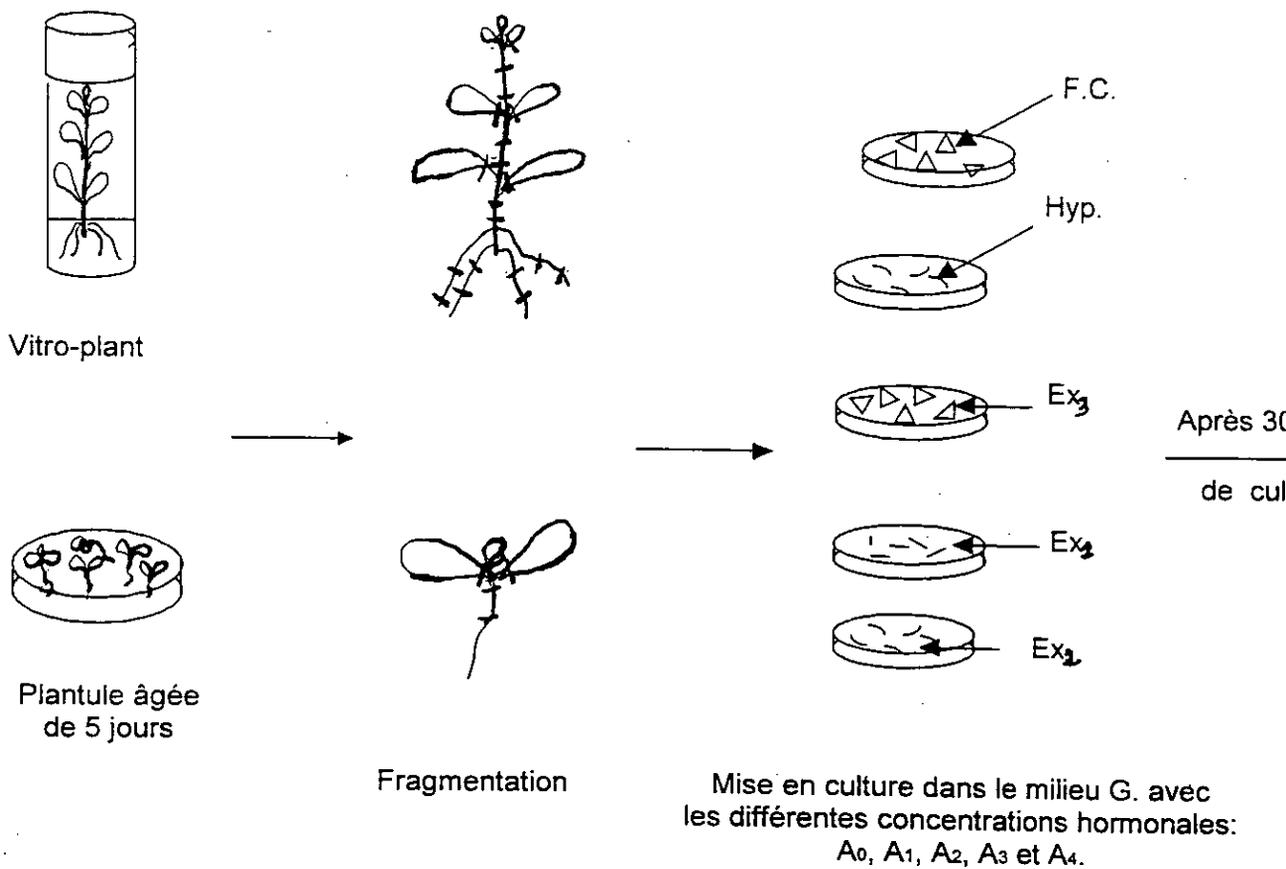


Figure 5 : Schéma présentant les différentes étapes de la callogenèse et l'obtention

## 6 – Milieu de culture

Le choix de nos milieux de culture est basé sur les travaux d'embryogenèse somatique ultérieurs (HAMDANI, 1997 ; DJAADI, 2001 ; OUAÏSSA, 1999 et BOUZOUOLA, 2000).

Deux milieux de culture sont utilisés qui ne se différencient que par les macroéléments.

- Les macroéléments utilisés sont ceux de MURASHING et SKOOG (1962) et ceux de GAMBORG (1968).
- Les Oligo-éléments utilisés sont ceux de MURASHING et SKOOG (1962).

### 6-1- Composition minérale

Tableau 2 : composition de solution minérales de MURASHING et SKOOG en mg / l.

Sel minéral	Concentration en mg/l
Macroélément de MURASHING et SKOOG	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	440
Mg SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Micro-élément de MURASHING et SKOOG	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
Mn SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	16,9
Zn SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	8,6
KI	0,83
Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,25
Cu SO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,025
CaCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,025

Tableau 3 : Composition de solutions minérales de GAMBORG en mg/l.

Macroéléments de GAMBORG	
Sels minéraux	Concentration en mg/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	150
KNO <sub>3</sub>	3000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	150
Mg SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	500

Tableau 4 : Composition de la solution stock du fer : Fe – EDTA en mg/l.

Sels minéraux	Concentration en mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA	3730
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2780

Tableau 5 : Composition de la solution de vitamines de MOREL (1952) in GAUTHRET (1959) en mg/100 ml.

Produits	Concentration en mg/100ml
Méso-inostol	5000
Pantothinate de calcium	50
Acide nicotinique	50
Pyridoxine (vitamine B <sub>6</sub> )	50
Thiamine (vitamine B <sub>1</sub> )	50
Biotine	0,5

## 6-2- Composition organique des milieux de base

### 6-2-1- Source de carbone

La faible assimilation chlorophyllien ou son absence nécessite l'apport de carbone sous forme organique.

Pour cette raison, nous ajoutons aux milieux de culture de base une source de carbone qui est sous forme de saccharose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>), à une concentration de 20g/l pour les étapes de micro-propagations des vitro plants et 30g /l pour les essais d'embryogenèse somatique.

### 6-2-2- La gélose

Pour la solidification des milieux de culture nous avons utilisé l'Agar-agar à raison de 8g/l.

### 6-2-3- Les combinaisons hormonales

Pour l'étude de l'embryogenèse somatique, nous avons repiqués les différents types d'explants (feuilles, entre-nœuds et racines) sur le milieu de culture de base GAMBORG (1968) avec les différentes combinaisons et concentrations en régulateurs de croissance qui sont :

- **1<sup>ère</sup> Combinaison :**

- A<sub>1</sub> : 1mg/l (2,4-D) + 1mg/l (kinétine).
- A<sub>2</sub> : 2mg/l (2,4-D) + 2mg/l (kinétine).

- **2<sup>ème</sup> Combinaison**

- A<sub>3</sub>: 1mg/l (2,4-D) + 1mg/l (BAP).
- A<sub>4</sub>: 2mg/l (2,4-D) + 2mg/l (BAP).

Concernant la recherche des embryons à partir de feuilles cotylédonaire et hypocotyles, nous avons choisis les mêmes combinaisons et concentrations en régulateurs de croissance que ceux précédemment décrites.

Donc pour cette partie, nous avons 5 milieux de culture a testé avec le milieu témoin (A<sub>0</sub> : milieu GAMBORG sans régulateur de croissance (Figure 6).

Pour l'étude du stress salin, nous avons utilisé le milieu de culture de base MURASHING et SKOOG (1962) et pour l'initiation des cals nous avons choisis le 2,4-D comme auxine et la kinétine comme cytokinine dont la concentration est la suivante :

- S: 1mg/l (2,4-D) + 1mg/l (kinétine)

Les concentrations en sel (NaCl) utilisés durant notre expérimentation sont : 0, 5, 10, 15 g de NaCl/l. Donc les milieux de culture sont :

- S<sub>0</sub> : sans NaCl (1mg/l (2,4-D) + 1mg/l (kinétine)).
- S<sub>1</sub> : 1mg/l (2,4-D) + 1mg/l (kinétine) + 5 g/l.
- S<sub>2</sub> : 1mg/l (2,4-D) + 1mg/l (kinétine) + 10 g/l.
- S<sub>3</sub> : 1mg/l (2,4-D) + 1mg/l (kinétine) + 15 g/l.

Essais d'obtention des cals embryogènes et de régénération  
de plants résistants à la salinité chez l'*Atriplex halimus* L

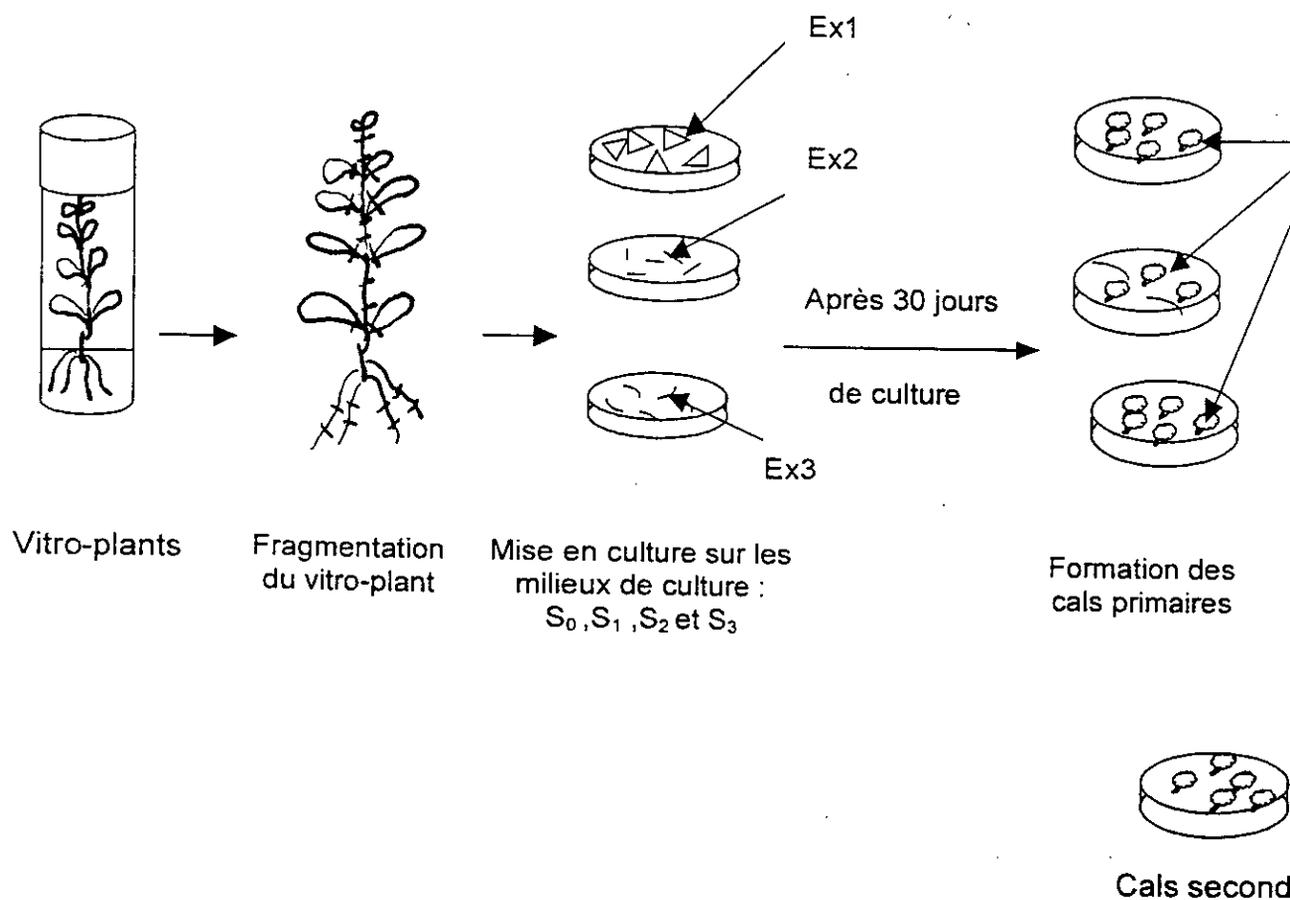


Figure 6 : Présentation schématique des étapes de callogenèse et de régénération

Les essais de régénération à partir des cals verts (développés sur milieu de callogenèse additionné de 5 g/l de NaCl) obtenues est réalisé dans le but de provoquer la caulogenèse (initiation de bourgeons) (Figure 6). Pour cela, ces cals sont fragmentés et repiqués sur le milieu de culture de base MURASHING et SKOOG (1962) avec Les combinaisons et concentrations en régulateurs de croissance (auxine et cytokinine), ainsi qu'avec les différentes concentrations en gibbérelline suivantes :

- **1<sup>ere</sup> Combinaison :**  
-M<sub>1</sub> : 0,5mg/l (2,4-D) + 1mg/l (kinétine).
- **2<sup>eme</sup> Combinaison :**  
-M<sub>2</sub> : 1mg/l (2,4-D) + 1mg/l (BAP).
- **3<sup>eme</sup> Combinaison :**  
-M<sub>3</sub> : 1mg/l (AIA) + 1mg/l (kinétine).

- **Concentrations en gibbérelline**

Nous avons utilisé comme acide gibbérellique l'AG<sub>3</sub> avec les concentrations suivantes:

- B<sub>1</sub> : 1,5 mg/l
- B<sub>2</sub> : 2,0 mg/l
- B<sub>3</sub> : 3,0 mg/l
- B<sub>4</sub> : 4,0 mg/l

## 7 – Le pH

Le potentiel hydrogène de tous les milieux de culture est ajusté à 5,8.

## 8 – Condition de culture

### 8-1– Température

La température de la chambre de culture est de l'ordre de  $25 \pm 1$  °C.

### 8-2– Lumière

L'intensité d'éclairage est assurée par une série de néons (lampes) d'une intensité lumineuse de l'ordre de 20.000 à 25.000 lux.

La photopériode est de l'ordre de 16 heures et 8 heures d'obscurité.

## **9 – Paramètres étudiés**

Après un mois de culture, les observations sont faites sur les paramètres suivantes :

- Calculer le pourcentage des cals qui nous indique sur l'aptitude des explants et des clones à donner des cals en fonction des différentes concentrations en hormones de croissance.
- Calculer le poids frais et le poids sec des cals primaires et secondaires qui nous informe sur le pouvoir callogène des différents types d'explants et de clones.
- Observer la couleur et la texture des cals qui nous permettent de connaître les caractéristiques morphologiques des cals embryogènes et des cals caulogènes (régénérants).

## **10 – Mode d'expression des résultats**

Les résultats obtenus au cours de nos essais ont été analysés statistiquement d'après un dispositif aléatoire complet en randomisation totale avec 3 répétitions. Pour chaque répétition nous avons 3 boîtes de pétri contenant chacune 5 explants.

Les analyses statistiques des résultats sont traitées par une analyse de variance au seuil de 5%. Le test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5% est utilisé pour la comparaison des moyennes.

# Chapitre 3

## Essais d'embryogenèse somatique

## Chapitre 3 : Essais d'embryogenèse somatique

### Introduction

La maîtrise de l'embryogenèse somatique permet d'avoir un taux de multiplication de génotypes sélectionnés supérieur à celui d'autres méthodes de vitroproragation.

En général, les embryons somatiques sont produits à partir des cals comportant des nodules embryonnaires.

Par ailleurs, l'embryogenèse somatique dépend, à la fois, de l'état physiologique et génétique de l'explant ainsi que de type de combinaison et concentration en hormone de croissance exogène.

Notre travail consiste à indiquer la meilleure combinaison et concentration en auxine et cytokinine en vue d'obtention des cals embryogènes.

### 1 – Recherche des embryons somatiques à partir de feuilles, entre-nœuds et racines de deux clones sélectionnés

#### 1-1– Effets des hormones de croissance sur le pourcentage des cals

Afin de déterminer l'effet des différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance, nous avons effectués l'analyse de variance des facteurs influençant l'aptitude à la callogenèse (Tableau 6).

Tableau 6 : Analyse de variance du pourcentage des cals issus des différents types d'explant des deux clones développés sur différents milieux de culture.

	DDL	S.C.E.	Carrés Moyens	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var. Totale	89	122607,73	1377,61				
Var. Facteur1	1	1,10	1,10	0,02	0,8946		
Var. Facteur2	2	886,69	443,34	6,54	0,0028		
Var. Facteur3	4	100535,78	25133,95	370,83	0,0000		
Var. Inter F.1.2	2	975,54	487,77	7,20	0,0017		
Var. Inter F.1.3	4	3182,18	795,54	11,74	0,0000		
Var. Inter F2.3	8	8602,09	1075,26	15,86	0,0000		
Var. Inter F1.2.3	8	4357,69	544,71	8,04	0,0000	8,23	10,9%
Var. Résiduelle	60	4066,66	67,78				

Facteur 1 : Clones

Facteur 2 : Explants

Facteur 3 : Différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance.

A l'issue de cet essai, les résultats obtenus (tableau 6) montrent que pour les deux clones testés, l'analyse de variance ne révèle aucune différence significative.

L'analyse de variance des différents types d'explants utilisés révèle l'existence d'une action très significative sur le pourcentage des cals. L'analyse de variance des différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance révèle, aussi, l'existence d'une action très hautement significative sur le pourcentage des cals.

Concernant l'effet des interactions factorielles, nous pouvons tirer du tableau 6 les observations suivantes :

L'analyse de variance inter facteurs F1.2.3 montre que la modification des combinaisons et concentrations en hormones de croissance sur les différents types d'explants des deux clones entraînent une action très hautement significative sur le pourcentage des cals obtenus.

Nous remarquons que l'analyse de la variance des trois types d'explants repiqués dans les cinq milieux de culture, montre une différence très hautement significative sur le pourcentage des cals.

De même, les deux clones et les différentes combinaisons et concentrations hormonales exercent une action très significative sur le pourcentage des cals. Tandis que l'analyse de variance inter facteurs F1.2 montre une action significative sur le pourcentage des cals.

### **1-1-1- Effet des hormones de croissance sur le pourcentage des cals issus des deux clones**

Les deux clones sélectionnés présentent des réactions similaires vis à vis des différentes combinaisons et concentrations hormonales (Annexe 1 et figure 7).

Nous remarquons que les deux clones testés expriment une meilleure aptitude à la callogenèse sur les différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance par rapport au milieu témoin (Annexe et figure 7).

Le pourcentage maximal des cals (100 %) est obtenu par le clone P<sub>1</sub> avec la combinaison hormonale A<sub>3</sub>. En seconds, le clone P'<sub>1</sub> sur le milieu A<sub>3</sub> présente un pourcentage moyen de cals de l'ordre de 98,89 %. Tandis que le milieu témoin induit une très faible aptitude à la callogenèse avec un pourcentage moyen de cals variant entre 0 % et 17,78 % obtenus respectivement à partir du clone P'<sub>1</sub> et P<sub>1</sub>. Les autres milieux présentent des pourcentages de cals intermédiaires pour les deux clones (Annexe 1 et figure 7).

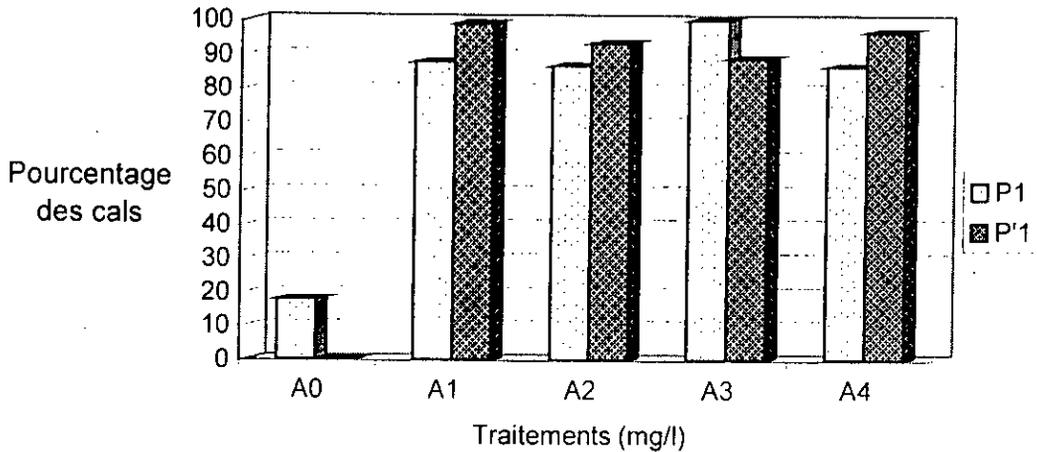


Figure 7 : Effet des hormones de croissance sur le pourcentage des cals issus des deux clones

### 1-1-2- Effets des hormones de croissance sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants

La réponse des trois types d'explants aux différentes combinaisons et concentration hormonales est hétérogène. Cette constatation est révélée par le test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5% pour la comparaison des pourcentages moyens des cals issus des différents types d'explants et développés sur les différents milieux (Annexe 2 et figure 8).

L'annexe 2 indique que les pourcentages moyens des cals obtenus à partir des fragments de racines ( $Ex_2$ ) et des entre-nœuds ( $Ex_1$ ) sont respectivement de 78,67 % à 77,00 %. Ces derniers présentent une meilleure aptitude à donner des cals par rapport aux feuilles ( $Ex_3$ ) (71,33 %).

Quant à l'étude de ces deux facteurs ensemble, l'annexe 2 et la figure 8 montrent que la meilleure aptitude à la callogenèse (qui varie de 96,67 % à 100 %) est obtenue pour les deux types de combinaisons ( $A_2$ ,  $A_3$  et  $A_4$ ) à partir des fragments de racines. Les feuilles mises en culture sur le milieu  $A_1$  montrent, aussi, une bonne aptitude à développer des cals (98,33 %).

Par ailleurs, le milieu témoin n'a pas permis aux entre-nœuds et aux fragments de racines d'exprimer leur aptitude à la callogenèse. Par contre, avec ce même milieu ( $A_0$ ), les feuilles présentent une faible aptitude à former des cals avec un pourcentage moyen de cals égal à 26,67 % (Annexe 2 et figure 8).

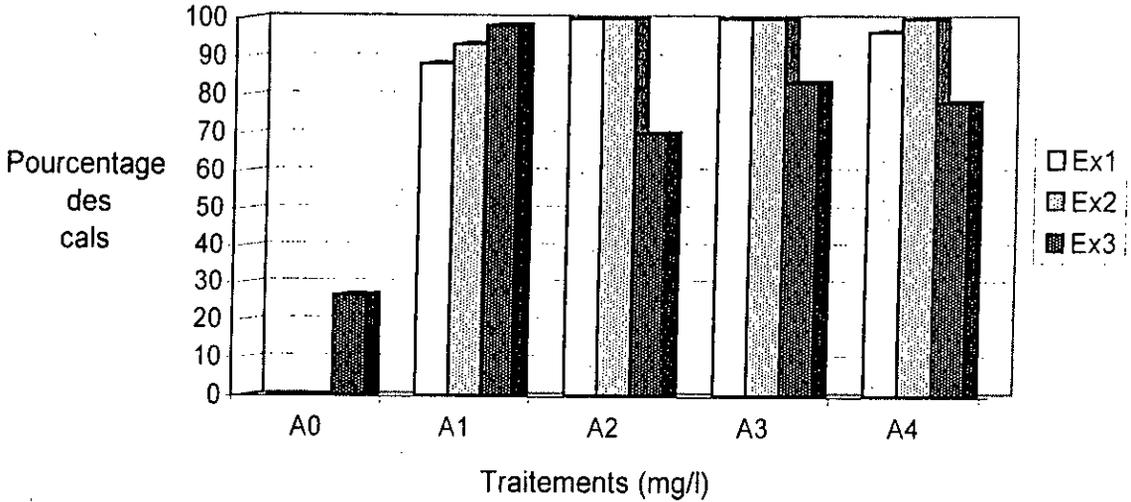


Figure 8 : Effet des hormones de croissance sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants

### 1-1-3- Effets des hormones de croissance sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants des deux clones

La figure 9 et l'annexe 3 permettent de tirer les observations suivantes :

Le pourcentage de cals maximal (allant de 90,00 % à 100 %) est obtenu à partir des entre-nœuds et des fragments de racines des deux clones vis-à-vis des milieux A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> et A<sub>4</sub>. En outre, il est obtenu par ces mêmes types d'explants sur le milieu A<sub>1</sub> et à partir des feuilles issus des clones P<sub>1</sub> et P'<sub>1</sub> repiqués respectivement sur les milieux A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub>.

Par ailleurs, tous les types d'explants, issus du clone P'<sub>1</sub>, ne manifestent aucune aptitude à former des cals. Tandis que les feuilles issues du clone P<sub>1</sub>, présentent une aptitude à la callogenèse avec un pourcentage moyen des cals égal à 53,33 %.

Essais d'obtention des cals embryogènes et de régénération de plants résistants à la salinité chez l'*Atriplex halimus* L.

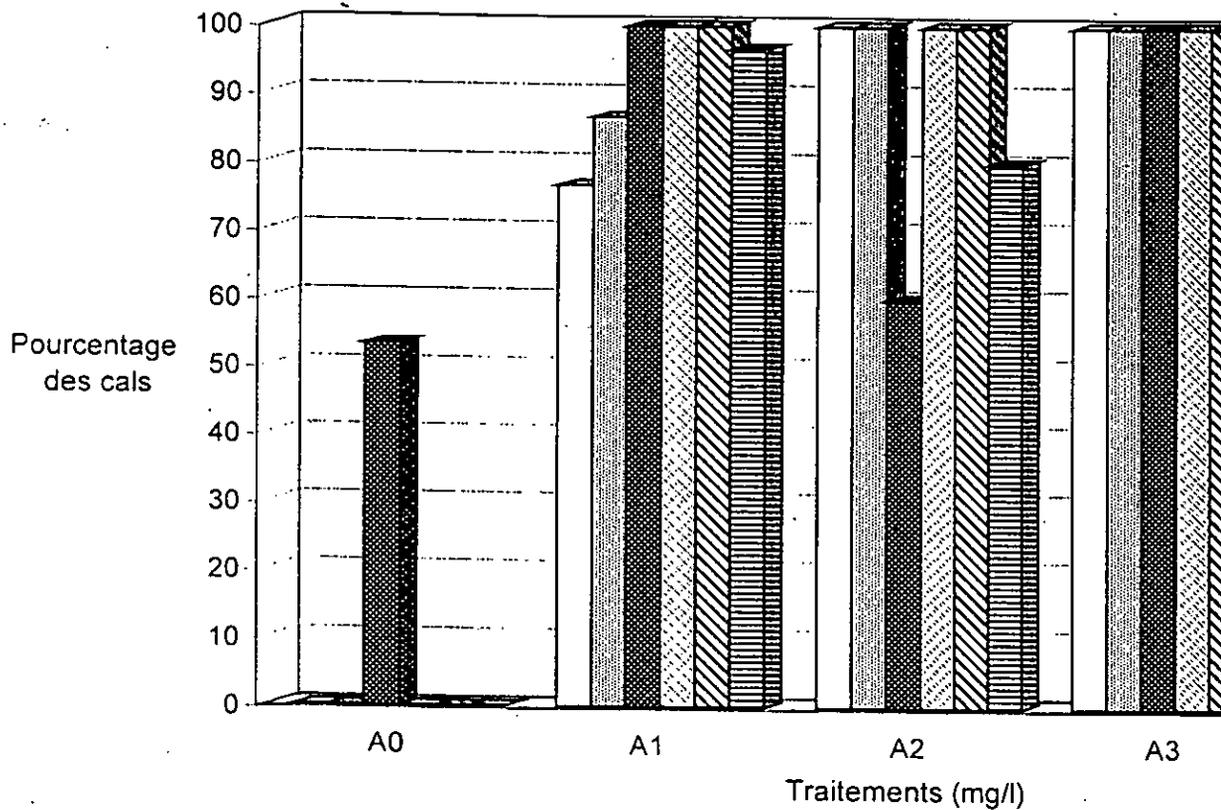


Figure 9 : Effet des hormones de croissance sur le pourcentage des différents types d'explants des deux clones

## 1-2- Effets des hormones de croissance sur le poids frais des cais

Après un mois de mise en culture, l'évaluation de l'effet des hormones de croissance est effectuée par l'analyse de variance indiquée dans le tableau 7.

Tableau 7 : Analyse de variance du poids frais des cais issus des différents types d'explants des deux clones développés sur les différents milieux de culture

	DDL	S.C.E.	Carrés Moyens	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var. Totale	89	3917140,00	44012,81				
Var. Facteur1	1	38071,50	38071,50	3,31	0,0702		
Var. Facteur2	2	110678,00	55339,00	4,82	0,0114		
Var. Facteur3	4	1046790,00	261697,50	22,78	0,0000		
Var. Inter F.1.2	2	158494,75	79247,38	6,90	0,0021		
Var. Inter F.1.3	4	734229,75	183557,44	15,98	0,0000		
Var. Inter F2.3	8	455506,25	56938,28	4,96	0,0001		
Var. Inter F1.2.3	8	684224,25	85528,03	7,45	0,0000		
Var. Résiduelle	60	689145,50	11485,76			107,17	39,9%

Facteur 1 : Clones

Facteur 2 : Explants

Facteur 3 : Différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance.

L'analyse de la variance des deux clones utilisés montre une différence non significative sur le poids frais des cais. Tandis que l'analyse de variance des différents types d'explants montre une variation significative sur le paramètre étudié. L'analyse de variance des différentes combinaisons et concentrations hormonales présentent une action très hautement significative sur le poids frais des cais (Tableau 7).

En ce qui concerne les analyses de variance inter factorielles, le tableau 7 montre que les différentes combinaisons et concentrations en hormonales, qui sont appliquées sur les différents types d'explants des deux clones, entraînent une action très hautement significative sur le poids frais des cais.

La variance l'interaction entre clones et explants révèle l'existence d'une action significative sur le poids frais des cais. L'analyse de variance interfactorielle F1.3 (clones - différentes combinaisons et concentrations hormonales) montre l'existence d'une action très hautement significative sur le poids frais des cais. Cela est obtenu également pour la variance de l'interaction entre les différents types d'explants vis-à-vis des différents milieux utilisés (Tableau 7).

### 1-2-1- Effet des hormones de croissance sur le poids frais des cals issus des deux clones

Les combinaisons et les concentrations hormonales utilisées au cours de notre expérience n'exercent pas le même effet sur le pouvoir callogène des deux clones étudiés (Annexe 4) (Figure 10).

Les différentes combinaisons et concentrations hormonales présentent un potentiel de callogenèse nettement supérieur à celui de milieu témoin. Ce dernier induit un développement de cals avec un poids frais moyen égal à 57,69 mg (Annexe 4 et la figure 10).

Nous remarquons (Annexe 4 et figure 10) que la combinaison hormonale ("2,4-D" + "kinétine") présente le meilleur pouvoir callogène pour les deux clones, dont le poids frais moyen des cals varie entre 417,15 mg et 476,78 mg (obtenu dans l'ordre à partir du clone P<sub>1</sub> pour le milieu A<sub>1</sub> et P<sub>1</sub> pour le milieu A<sub>2</sub>). En seconde position, la combinaison hormonale ("2,4-D" + "BAP") avec ses différentes concentrations induit un développement de cals homogène où le poids frais moyen varie de 351,23 mg (obtenu chez le clone P<sub>1</sub> pour le milieu A<sub>4</sub>) à 352,28 mg (obtenu chez le clone P'<sub>1</sub> pour le milieu A<sub>3</sub>).

Concernant le milieu témoin et les deux clones étudiés simultanément, le potentiel callogène est nul chez le clone P'<sub>1</sub>, tandis que le clone P<sub>1</sub> présente un pouvoir callogène avec un poids frais moyen des cals égal à 115,38 mg.

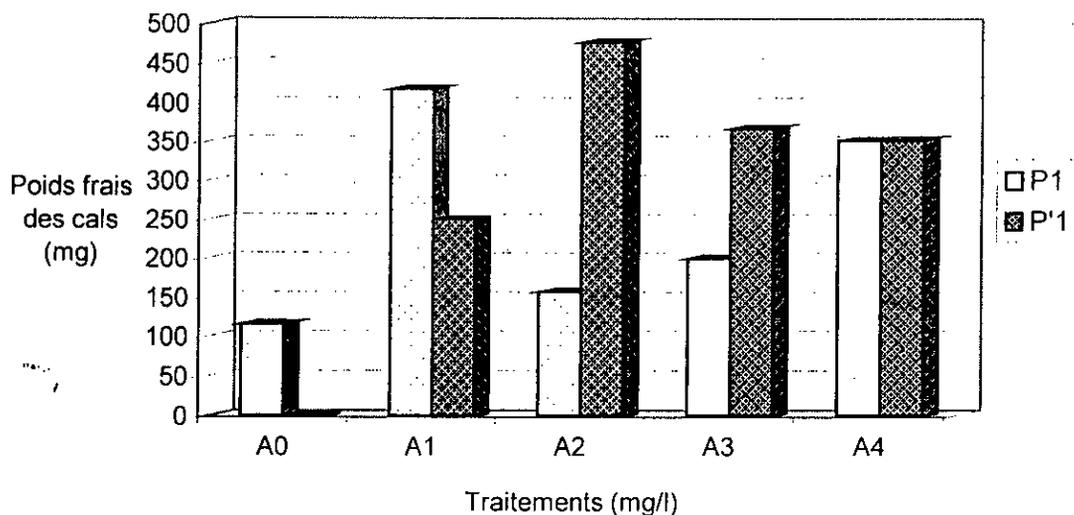


Figure 10 : Effet des hormones de croissance sur le poids frais des cals issus des deux clones

### 1-2-2- Effets des hormones de croissance sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants

Après un mois de mise en culture, les cals développés à partir des trois types d'explants sur les différents milieux de culture présentent des poids frais moyens avec des différences significatives entre les différents traitements utilisés.

L'annexe 5 et la figure 11 nous indiquent que le meilleur potentiel callogène est obtenu par les entre-nœuds ( $Ex_1$ ) repiqués sur les milieux  $A_1$  (453,97 mg) et  $A_4$  (441,82 mg), ainsi qu'avec les feuilles ( $Ex_3$ ) repiqués sur le milieu  $A_3$  (427,87 mg).

Concernent les entre-nœuds et les feuilles mises en culture sur le milieu témoin  $A_0$ , le potentiel callogène est nul (Annexe 5 et figure 11).

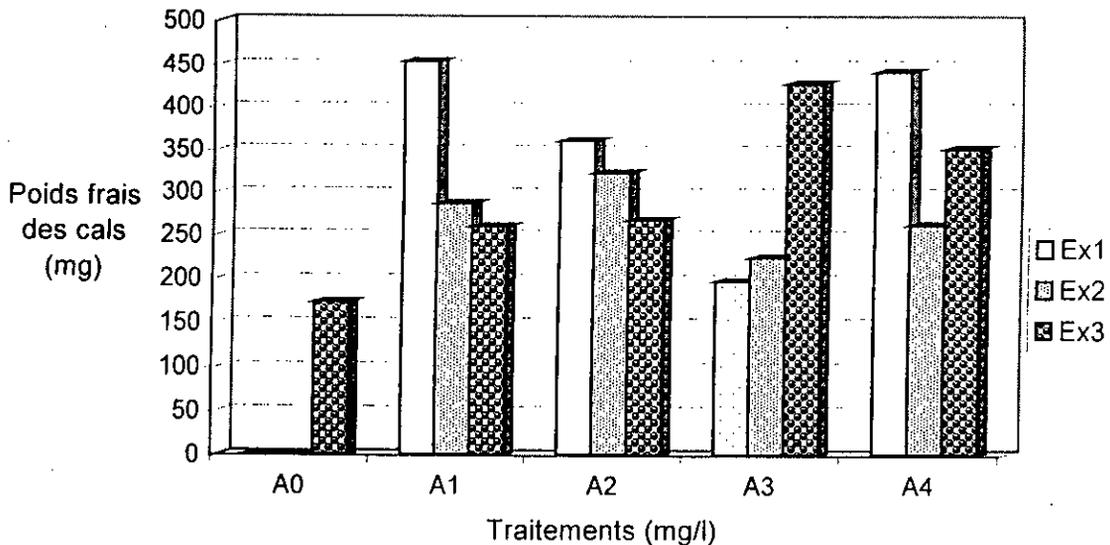


Figure 11 : Effet des hormones de croissance sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants

### **1-2-3- Effets des hormones de croissance sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants des deux clones**

Les résultats obtenus (Annexe 6 et figure 12) montrent que les différents types d'explants, issus des clones  $P_1$  et  $P'_1$ , présentent des potentialités de callogenèse plus importantes par rapport au milieu témoin pour les différentes combinaisons et concentrations hormonales.

Les entre-nœuds ( $Ex_1$ ) issus du clone  $P_1$  sur le milieu  $A_1$  présentent le poids frais moyen des cals le plus élevé (747,83 mg). Ils sont suivis des feuilles ( $Ex_3$ ) issues du clone  $P'_1$  sur le milieu  $A_3$  (655,70 mg). Or, le milieu témoin ( $A_0$ ) n'a pas permis aux trois types d'explants issus du clone  $P'_1$  d'exprimer leur potentiel callogène. Par ailleurs, les feuilles issues du clone  $P_1$  expriment une potentialité à la callogenèse avec un poids frais moyen des cals égal à 346,13 mg (Annexe 6 et figure 12).

Essais d'obtention des cals embryogènes et de régénération de plants résistants à la salinité chez l'*Atriplex halimus* L.

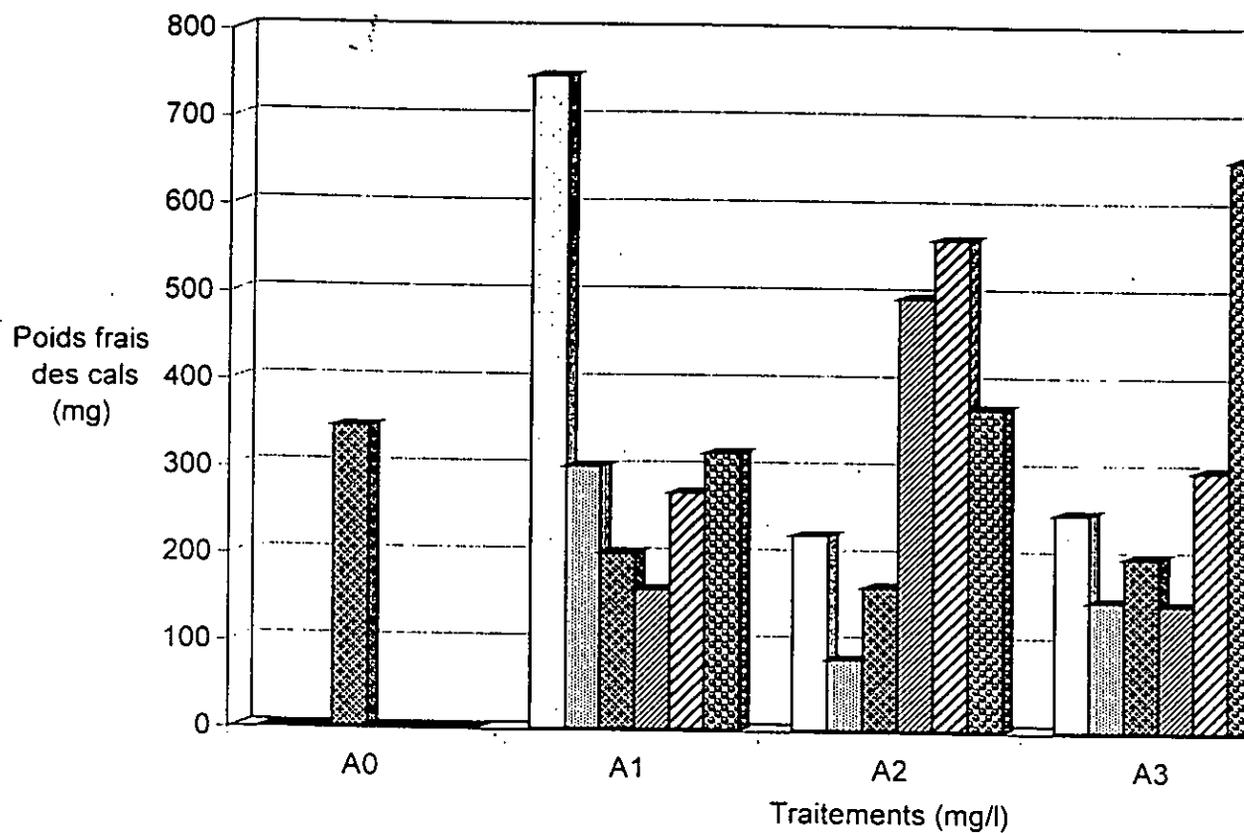


Figure 12 : Effet des hormones de croissance sur le poids frais des cals issus de deux types d'explants des deux clones

### 1-3- Effets des hormones de croissance sur le poids sec des cals.

Les effets des hormones de croissance sur le poids sec des cals sont présentés par l'analyse de variance indiquée dans le tableau 8.

Tableau 8 : Analyse de variance du poids sec des cals issus des trois types d'explants des deux clones développés sur différents milieux de culture.

	DDL	S.C.E.	Carrés Moyens	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var. Totale	89	13312,00	149,57				
Var. Facteur1	1	72,18	72,18	1,34	0,2499		
Var. Facteur2	2	582,57	291,29	5,42	0,0070		
Var. Facteur3	4	5459,28	1364,82	25,39	0,0000		
Var. Inter F.1.2	2	326,75	163,38	3,04	0,0540		
Var. Inter F.1.3	4	1217,84	304,46	5,66	0,0007		
Var. Inter F2.3	8	946,91	118,36	2,20	0,0396		
Var. Inter F1.2.3	8	1480,87	185,11	3,44	0,0026		
Var. Résiduelle	60	3225,59	53,76			7,33	38,5%

Facteur 1 : Clones

Facteur 2 : Explants

Facteur 3 : Différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance.

L'analyse de la variance des différentes combinaisons et concentrations en hormone de croissance montre une différence très hautement significative sur le poids sec des cals. L'analyse de variance des différents types d'explants montre une différence significative sur le poids sec des cals (Tableau 8).

Par ailleurs, d'après l'analyse de variance des deux clones utilisés, il n'existe aucune différence entre les traitements sur le poids frais des cals.

Quant aux interactions entre ces facteurs, les trois types d'explants issus des deux clones et repiqués sur les différents milieux de culture révèlent l'existence d'une action significative sur le poids sec des cals. Tandis que l'analyse de variance des deux clones avec les différents types d'explants, nous montre qu'il n'existe aucune différence significative entre les différents traitements.

Les différentes combinaisons et concentrations hormonales avec les trois types d'explants exercent une action très significative sur le poids frais des cals.

### 1-3-1- Effets des hormones de croissance sur le poids sec des cals issus des deux clones

L'annexe 7 et la figure 13 montrent que les cals issus du clone P<sub>1</sub>, développés sur le milieu A<sub>3</sub>, présentent le meilleur potentiel callogène (29,14 mg). Or, ce clone sur le milieu témoin n'induit aucun potentiel callogène. Les cals issus du clone P<sub>1</sub>, sur le milieu A<sub>3</sub>, présentent un poids sec moyen des cals de l'ordre de 21,36 mg. Ce clone manifeste un faible pouvoir callogène (7,31 mg) pour le milieu témoin (Annexe 7 et figure13).

Les différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance induisent des pouvoirs callogènes similaires avec des poids secs moyen des cals variants de 21,86 mg à 25,25 mg obtenus dans l'ordre par les milieux A<sub>2</sub> et A<sub>3</sub>. Ces valeurs sont nettement supérieures à ceux obtenus par le milieu témoin (Annexe 7).

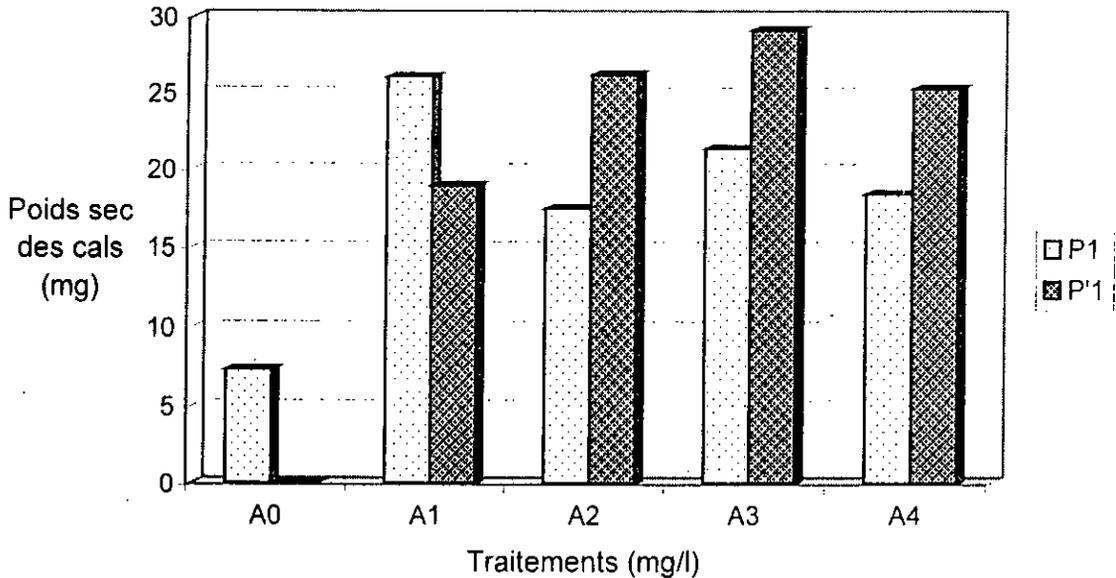


Figure 13 : Effet des hormones de croissance sur le poids sec des cals issus des deux clones

### 1-3-2- Effets des hormones de croissance sur le poids sec des cals issus des différents types d'explants

Après un mois de mise en culture, les cals développés à partir des trois types d'explants présentent des poids secs moyens avec des différences significatives. D'après l'annexe 8 et la figure 14, les différentes combinaisons et concentrations hormonales permettent aux entre-nœuds d'exprimer leurs meilleures potentialités callogènes avec une valeur maximale égal à 29,97 mg, obtenu avec le milieu A<sub>2</sub>.

Les feuilles (Ex<sub>3</sub>) expriment un même effet sur les différentes combinaisons et concentrations hormonales vis-à-vis du poids sec moyen des cals avec une valeur maximale de l'ordre de 23,40 mg obtenu pour le milieu A<sub>1</sub>. Alors qu'elles expriment un faible pouvoir callogène pour le milieu témoin (10,97 mg), par rapport aux entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) et aux racines (Ex<sub>2</sub>) qui ne manifestent aucune potentialité à former des cals (Annexe 8 et figure 14).

Par ailleurs, les entre-nœuds et les feuilles induisent des poids secs moyens des cals similaires (qui sont respectivement 21,63 mg et 19,89 mg), suivi des fragments de racines (15,58 mg) (Annexe 8 et figure 14).

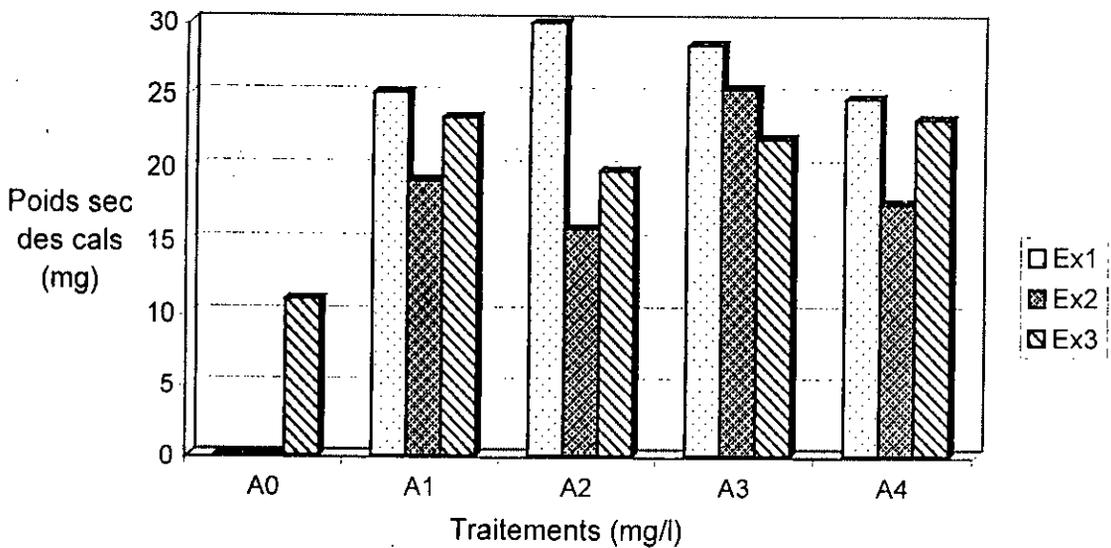


Figure 14 : Effet des hormones de croissance sur le poids sec des cals issus des différents types d'explants

### **1-3-3- Effets des hormones de croissance sur le poids sec des cals issus des différents types d'explants des deux clones**

Les différents types d'explants des deux clones ne réagissent pas de la même manière sur le poids sec des cals en ce qui concerne les différentes combinaisons et concentrations hormonales. D'après l'annexe 9 et la figure 16, la valeur maximale du poids sec moyen des cals (37,33 mg) est obtenue par entre-nœuds ( $Ex_1$ ) de clone  $P_1$ . Ces cals sont développés sur le milieu  $A_1$ . En seconde position, le poids sec moyen des cals issus des entre-nœuds du clone  $P'_1$  est égal à (32,90 mg). Les cals issus de ces entre-nœuds sont développés sur milieu  $A_3$ . Ce dernier ne diffère du milieu  $A_1$  que par le type de cytokinine utilisé. Pour le milieu  $A_0$ , seul les feuilles issues du clone  $P_1$  manifeste un pouvoir callogène avec un poids sec égal à 21,93 mg.

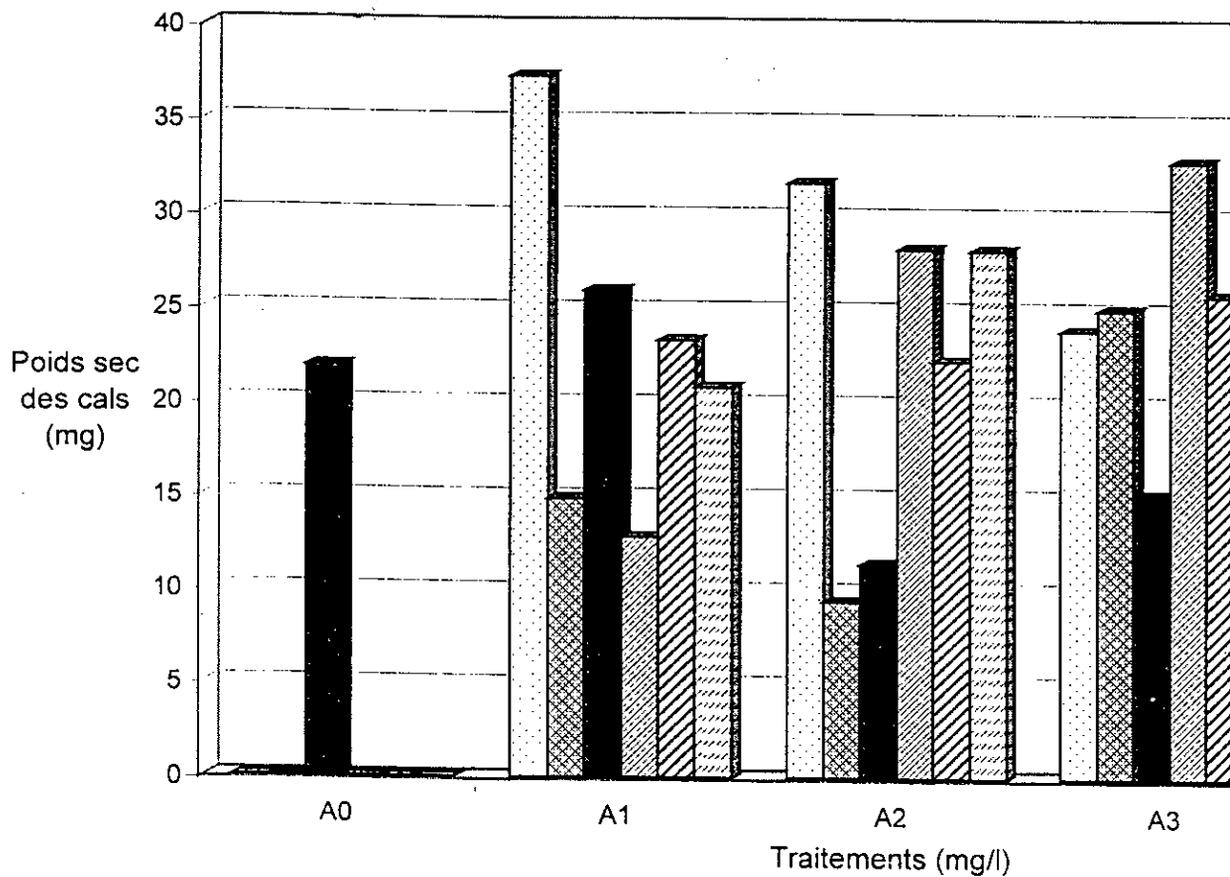


Figure 15 : Effet des hormones de croissance sur le poids sec des cals issus de deux types d'explants des deux clones

### 1-4- Effets des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals

Les cals issus des différents types d'explants des deux clones présentent des caractéristiques morphologiques variées pour les différentes combinaisons et concentrations utilisées au cours de notre expérience.

#### 1-4-1- Effets des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals issus du clone P<sub>1</sub>

Les cals issus de différents milieux présentent des caractéristiques morphologiques variées (tableau 9).

Tableau 9 : Couleurs et textures des cals issus des différents types d'explants du clone P<sub>1</sub>

Explants	Milieu	Couleur	Texture
Entre-nœuds	A <sub>0</sub>	—	—
	A <sub>1</sub>	Beige	Friable
	A <sub>2</sub>	Beige	Friable
	A <sub>3</sub>	Vert clair	Friable
	A <sub>4</sub>	Beige	Friable
Fragments de racines	A <sub>0</sub>	—	—
	A <sub>1</sub>	Beige	Friable
	A <sub>2</sub>	Vert clair à beige	Friable
	A <sub>3</sub>	Beige	Friable
	A <sub>4</sub>	Vert clair à beige	Friable
Feuilles	A <sub>0</sub>	Beige	Friable
	A <sub>1</sub>	Beige	Friable
	A <sub>2</sub>	Vert clair à beige	Friable
	A <sub>3</sub>	Vert clair à blanc	Noduleuse
	A <sub>4</sub>	Vert	Ferme

La dédifférenciation des différents types d'explants à l'état de cellules indifférenciées aboutit à la formation des cals de couleur et de texture variables. Le milieu A<sub>1</sub> induit la formation des cals de couleur beige et texture friable, caractéristiques morphologiques des cals embryogènes, quelque soit le type d'explant utilisé (Planche 2 : A). Les milieux A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> et A<sub>4</sub> induisent la formation des cals de couleur et de texture variant selon le type d'explant utilisé.

Le milieu A<sub>2</sub> induit la formation des cals de couleur beige à texture friable pour les entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) et les feuilles (Ex<sub>3</sub>), tandis que les cals issus des fragments de racines (Ex<sub>2</sub>) sont de couleur vert clair à beige.

Concernant le milieu A<sub>3</sub>, les cals issus des feuilles et développés sont de couleur vert clair à blanc et de texture noduleuse, caractéristique des cals caulogènes. Alors que les cals issus des entre-nœuds et des fragments de racines sont de couleur qui varie de vert clair à beige et de texture friable (Planche 2 : B).

Le milieu A<sub>4</sub> présente des cals de couleur beige et verte avec une texture qui varie de friable (pour les cals issus des entre-nœuds et des racines) à ferme (pour les cals issus des feuilles).

Il faut noter que le milieu témoin A<sub>0</sub> n'a pas permis aux entre-nœuds et aux fragments de racines de se transformer en cals. Il se nécrose après une semaine de leur mise en culture.

#### 1-4-2- Effets des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals issus de feuilles du clone P'<sub>1</sub>

Les cals développés sur les différents milieux présentent des caractéristiques morphologiques variées (Tableau 10).

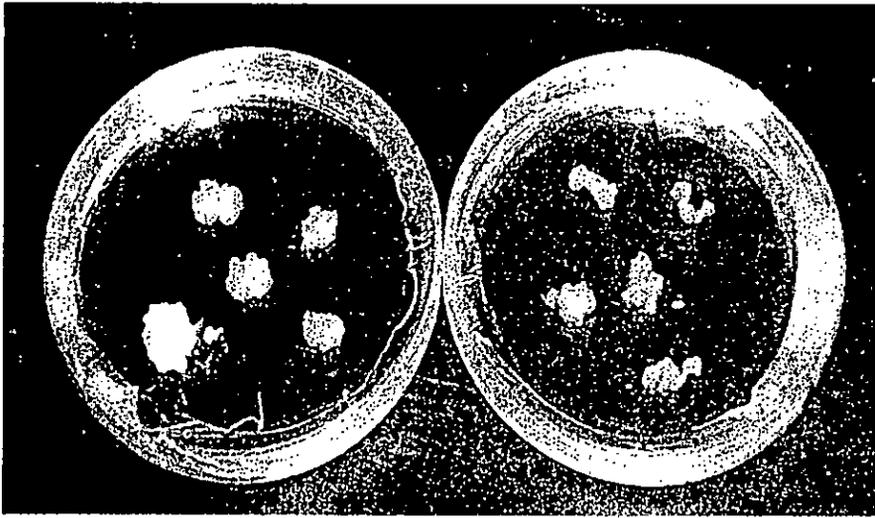
Tableau 10 : Couleurs et textures des cals issus des différents types d'explants du clone P'<sub>1</sub>

Explants	Milieu	Couleur	Texture
Entre-nœuds	A <sub>0</sub>	—	—
	A <sub>1</sub>	Beige	Friable
	A <sub>2</sub>	Beige	Friable
	A <sub>3</sub>	Vert clair	Friable
	A <sub>4</sub>	Vert clair	Friable
Fragments de racines	A <sub>0</sub>	—	—
	A <sub>1</sub>	Beige à blanc	Noduleuse
	A <sub>2</sub>	Vert clair à beige	Friable
	A <sub>3</sub>	Vert	Ferme
	A <sub>4</sub>	Vert	Ferme
Feuilles	A <sub>0</sub>	—	—
	A <sub>1</sub>	Beige à blanc	Noduleuse
	A <sub>2</sub>	Vert clair à beige	Friable
	A <sub>3</sub>	Vert	Ferme
	A <sub>4</sub>	Vert	Ferme

Nous remarquons que les combinaisons hormonales A<sub>1</sub> (1 mg/l "2,4-D + 1 mg/l "Kinétine" et A<sub>2</sub>(2 mg/l "2,4-D + 1 mg/l "Kinétine") conduit à la formation des cals de couleur beige à vert clair dont la texture est friable. Alors que les combinaisons hormonales A<sub>3</sub> (1 mg/l "2,4-D + 1 mg/l" "BAP") et A<sub>4</sub> ( 2 mg/l "2,4-D + 2 mg/l "BAP ") conduit à la formation des cals de couleur vert clair à vert dont la texture varie entre friable (pour les cals issus des entre-nœuds) et ferme(pour les cals issus des fragments de racines et des feuilles) (Tableau 10).

Au cours de notre expérience nous avons noté que le milieu témoin A<sub>0</sub> n'a pas permis aux trois types d'explants d'exprimer leur pouvoir callogène.

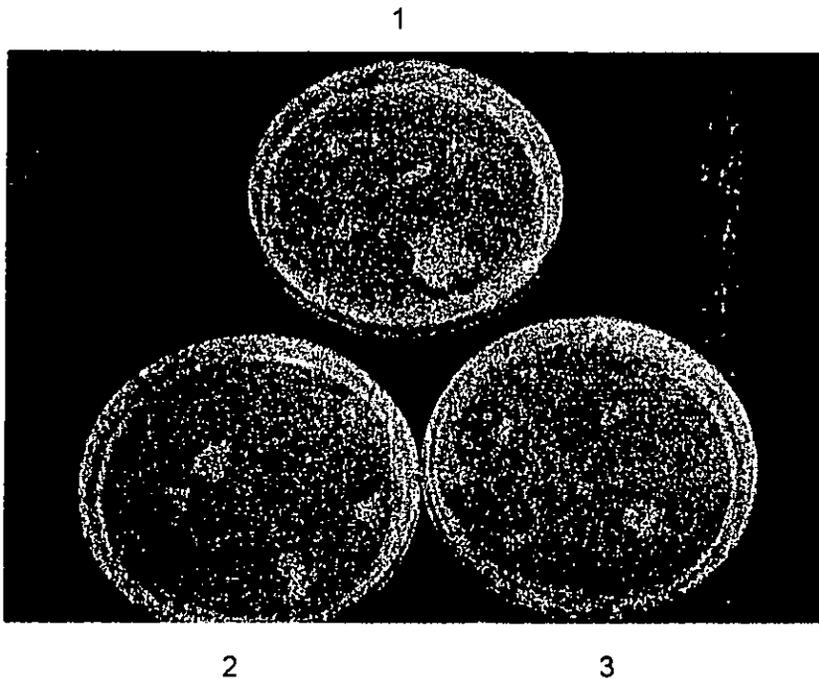
## Planche 2



**A** : Aspects morphologiques des cals embryogènes développés sur  $A_1 = G. +1 \text{ mg/l "2,4-D"} + 1 \text{ mg/l "Kinétine"}$ .

(1) Cals issus d'entre-nœuds.

(2) Cals issus de fragments de racines.



**B** : Aspects morphologiques des cals développés sur

$A_3 = G. +1 \text{ mg/l "2,4-D"} + 1 \text{ mg/l "BAP"}$ . (1) Cals issus de feuilles.

(2) Cals issus d'entre-nœuds.

(3) Cals issus de fragments de racines.

## 1-5-Discussion

A partir de cette étude, nous constatons que la sélection des clones (Clones homogènes) permet de mettre en évidence l'influence non seulement du milieu de culture (combinaison et concentration hormonales), mais aussi le type d'explant sur l'aptitude à la callogenèse.

Une production de cals à des taux appréciables (atteignant les 100%) est obtenue à partir des entre-nœuds suivis des fragments de racines. Elle est induite pour la combinaison hormonale " 2,4-D + BAP" avec ses deux concentrations et avec la combinaison et la concentration (1mg/l "2,4-D" + 1mg/l "kinétine").

Selon NOVAK et KONECMA (1982) et DAIKH (1983), les fragments prélevés à différents niveaux de la plante donnent des résultats différents sur un même milieu concernant la callogenèse. Cela est dû à l'état physiologique interne des cellules de l'explant (TISSERAT, 1979 et NOVAK et KONECMA, 1982). Ces explants sont constitués de cellules différenciées avec une structure génétique qui n'est pas toujours homogène.

DEMARLY (1982) et ZAID (1991) notent que plus le fragment prélevé est petit, plus le réseau des signaux est réduit, plus, les cellules du fragment redeviendraient jeunes et plus le risque de dérive génétique augmenterait.

En outre, l'équilibre particulier de l'explant dépend de sa structure, de l'âge de la plante mère et de l'emplacement du prélèvement. Cette hypothèse est confirmée par DEMARLY (1982), BENLHABIB (1983) et DAIKH (1983).

D'après nos résultats obtenus pour le poids frais, le poids sec des cals, la meilleure combinaison et concentration hormonale induisant un bon pouvoir callogène est 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinétine. Nous constatons qu'avec cette même combinaison et concentration hormonale, les entre-nœuds développent des cals de couleur beige et de texture friable caractéristique morphologique des cals embryogènes.

D'après D'HALLIUN *et al.* (1980), chez le céleri blanc et la rave, la formation de cals embryogènes par une fréquence de 50 % des explantats se produit sur un milieu contenant soit 1 mg/l de kinétine + 0,5 2,4-D, soit 1mg/l 2,4-D.

BOULAY (1987), MARGARA (1989), RAGHVAN (1997) et CHOI *et al.* (1999) montrent que le 2,4-D est l'agent principal de formation des cals embryogènes.

Cependant, TOURTE (1998) montre que le processus d'embryogenèse somatique se manifeste très tôt par la formation de petits nodules de cellules méristématiques ; Ces derniers participent à l'élaboration des embryons somatiques tout en réalisant une structure polaire. En effet, ces cals sont formés de pro-embryons bloqués au stade globulaire (LEBRUN, 1986).

SAKA *et al.* (1997) notent que seuls les cals de texture nodulaire et de couleur blanche à brun sont embryogènes.

Par ailleurs, DUCREUX *et al.* (1998) confirment que chez la carotte, qui est considéré comme l'un des systèmes les plus performants, le pourcentage de cellules embryogènes n'excède pas 1 à 2 %.

Il faut noter aussi que le milieu témoin induit une callogenèse avec un pourcentage moyen des cals de l'ordre de (53,33) %, qui est obtenu à partir des feuilles de clone P<sub>1</sub>.

En effet, BENREBIHA *et al.* (1992) constatent par la composition de trois milieux de culture vis à vis de l'aptitude à la callogenèse où seul les macroéléments de GAMBORG induisent la formation des cals. Ils montrent, en fait, que le choix de macroéléments est très important pour la callogenèse, car, ils ont un rôle au niveau de la membrane cellulaire par un effet indirect sur les balances hormonales internes.

## 2 – Recherche des embryons somatiques à partir de différents types d'explants

Dans cette partie, nous avons utilisé les mêmes types d'explants. Les entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>), fragments de racines (Ex<sub>1</sub>) et feuilles (Ex<sub>1</sub>) sont issus d'un mélange de lignées qui appartiennent au même pied mère. Nous avons utilisés aussi les hypocotyles et des feuilles cotylédonaire. Les cinq types d'explants ont été mis en culture pendant un mois dans les mêmes milieux utilisés pour la première partie.

### 2-1– Effets des hormones de croissance sur le pourcentage des cals

Pour déterminer les effets des hormones de croissance sur les différents types d'explants, nous avons effectués l'analyse de variance (Tableau 11).

Tableau 11 : Analyse de variance du pourcentage des cals issus des différents types d'explants développés sur différents milieux de culture.

	DDL	S.C.E.	Carrés Moyens	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var. Totale	74	94465,44	1276,56				
Var. Facteur1	4	6573,32	1643,33	9,78	0,0000		
Var. Facteur2	4	74398,52	18599,63	110,71	0,0000		
Var. Inter F.1.2	16	5093,28	318,33	1,89	0,0437		
Var. Résiduelle	50	8400,00	168,00			12,96	19,2%

Facteur 1 : Explants

Facteur2 : Différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance.

L'analyse de la variance (Tableau 11) nous montre que les différents types d'explants ainsi que les différentes combinaisons et concentrations hormonales exercent une action très hautement significative sur le pourcentage des cals. L'analyse de variance inter factorielle montre qu'il existe une action significative entre les différents traitements.

En ce qui concerne l'effet des différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance sur les différents types d'explants sur l'aptitude à la callogenèse, l'annexe 10 et la figure 16 montrent que le pourcentage moyen des cals obtenus à partir des entre-nœuds, des fragments de racines et des feuilles variant entre 76,67 % et 72,67 % (obtenus respectivement à partir des entre-nœuds et les feuilles). Ces pourcentages moyens de callogenèse sont supérieurs à ceux obtenus à partir des hypocotyles (60,00 %) et les feuilles cotylédonaire (52,67 %).

Essais d'obtention des cals embryogènes et de régénération de plants résistants à la salinité chez l'*Atriplex halimus* L.

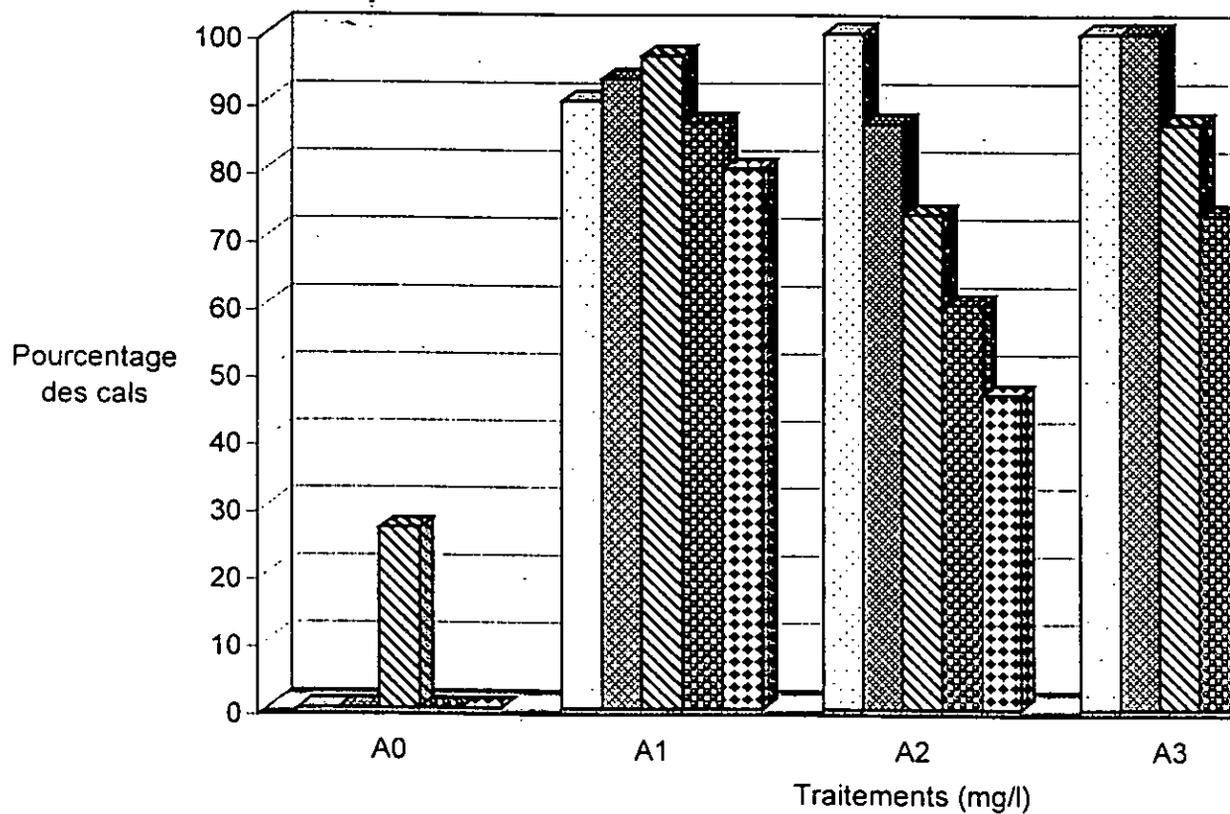


Figure 16 : Effet des hormones de croissance sur le pourcentage de différents types d'explants

## 2-2- Effets des hormones de croissance sur le poids frais des cals

Les résultats obtenus après un mois de mise en culture sont analysés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Analyse de variance du poids frais des cals issus des différents types d'explants développés sur différents milieux de culture

	DDL	S.C.E.	Carrés Moyens	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var. Totale	74	4274518,20	57763,76				
Var. Facteur1	4	740238,52	185059,63	29,86	0,0000		
Var. Facteur2	4	1824425,70	456106,44	73,60	0,0000		
Var. Inter F.1.2	16	1399985,20	87499,08	14,12	0,0000		
Var. Résiduelle	50	309868,50	6197,37			78,72	22,9%

Facteur 1 : Explant

Facteur 2 : Différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance.

L'analyse de la variance des différents types d'explants et l'analyse de la variance des différents milieux, ainsi que l'analyse de la variance des deux facteurs étudiés simultanément révèlent l'existence d'une action très hautement significative entre les différents traitements sur le poids frais des cals (Tableau 12).

Après un mois de mise en culture, les cals développés à partir des cinq types d'explants sur les différents milieux de culture présentent des poids frais moyens variables pour les différents traitements utilisés.

L'annexe 11 et la figure 17 montrent que la combinaison (1 mg/l "2,4-D" + 1 mg/l "BAP") présentent le meilleur pouvoir callogène avec un poids frais moyen des cals égal à 443,57 mg obtenu à partir du milieu A<sub>3</sub>.

Quant aux différents types d'explants, les feuilles cotylédonaire et les hypocotyles expriment les meilleures potentialités à développer des cals avec respectivement des poids frais moyens des cals égaux à 453,81 mg et 444,79 mg (Annexe 11 et figure 17).

La combinaison hormonale "2,4-D + kinétine" permet aux hypocotyles (Hyp.), aux entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) et aux feuilles cotylédonaire (F.C.) d'exprimer un meilleur potentiel callogène avec une valeur maximale représentée par le premier type d'explant (les hypocotyles) de l'ordre de 770,20 mg. De même, la combinaison hormonale (1 mg/l "2,4-D" + 1 mg/l "BAP") induit un meilleur pouvoir callogène chez les feuilles cotylédonaire avec un poids frais moyen des cals de l'ordre de 714,70 mg (Annexe 11 et figure 17).

Par ailleurs, nous remarquons que pour le milieu témoin, les entre-nœuds, les fragments de racines, les hypocotyles et les feuilles cotylédonaire ne manifestent aucun pouvoir callogène. Alors que pour les feuilles, nous avons obtenu un faible pouvoir callogène (199,47 mg). Ce dernier est supérieur à celui obtenu pour les fragments de racines ( $Ex_2$ ) mises en culture sur le milieu  $A_2$  (82,53 mg). Les autres interactions (milieu, explant) présentent des potentialités callogènes intermédiaires avec des poids frais moyens des cals qui variés de 233,83 mg à 612,00 mg (obtenu dans l'ordre par les fragments de racines et les hypocotyles repiqués sur le même milieu  $A_3$ ) (Annexe 11 et figure17).

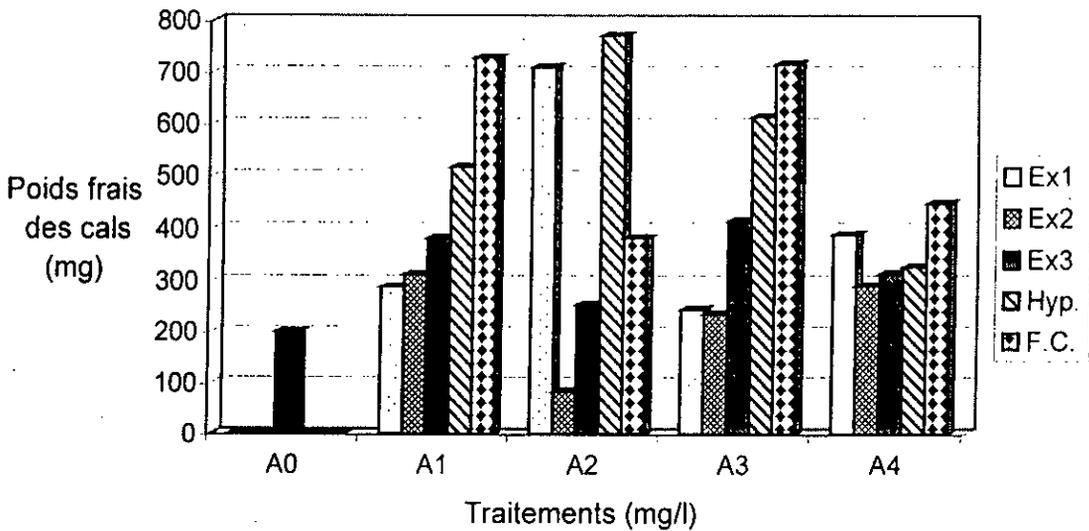


Figure 17 : Effet des hormones de croissance sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants

### 2-3- Effets des hormones de croissance sur le poids sec des cals

Après un mois de culture nous avons obtenus les résultats indiqués sur le tableau ci-après.

Tableau 13 : Analyse de variance du poids sec des cals issus des différents types d'explant développés sur différents milieux de culture.

	DDL	S.C.E.	Carrés Moyens	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var. Totale	74	13274,86	179,39				
Var. Facteur1	4	1951,20	487,80	20,60	0,0000		
Var. Facteur2	4	7310,36	1827,59	77,17	0,0000		
Var. Inter F.1.2	16	2828,96	176,81	7,47	0,0000		
Var. Résiduelle	50	1184,00	23,68			4,87	22,4%

Facteur 1 : Explant

Facteur 2 : Différentes combinaisons et concentrations en hormones de croissance.

Les analyses de variance explant, de variance milieu ainsi que la variance inter factorielle (explants, milieux) exercent un effet très hautement significative entre les différents traitement sur le poids sec des cals (Tableau 13).

D'après l'annexe 12 et la figure 18, les cinq types d'explants induisent des poids secs moyens des cals avec des différences significatives. Les valeurs maximales du poids sec moyen des cals sont obtenues pour des cals issus de feuilles cotylédonaire (26,30 mg) et les hypocotyles (Hyp.) (28,41 mg). La valeur minimale de poids sec moyen des cals est obtenue pour des cals issus des fragments de racines (14,2 mg).

Concernant les différentes combinaisons et concentrations hormonales, le milieu A<sub>3</sub> manifeste le meilleur pouvoir callogène exprimé en poids frais moyen des cals (29,57 mg). Tandis que le milieu témoin A<sub>0</sub> permet d'exprimer le plus faible pouvoir callogène (2,41 mg) (Annexe 12 et figure18).

L'étude de l'interaction factorielle F1.2 (Explant – combinaisons et concentrations en hormones de croissance), révèle que le meilleur pouvoir callogène, exprimé en poids sec moyen des cals, est obtenu pour les cals issus des feuilles cotylédonaire (F.C.) développés sur le milieu A<sub>3</sub> (44,10 mg). Les cals issus des hypocotyles développés sur le milieu A<sub>2</sub> présentent un poids frais des cals égal à 40,27 mg et 37,07 mg pour le milieu A<sub>3</sub> (Annexe 12 et figure18).

Quant aux autres interactions (explants, combinaisons et concentrations hormonales), elles présentent des potentialités callogènes nettement supérieures à celles du milieu témoin pour les différents types d'explants avec des poids secs moyens des cals variant de 14,00 mg à 34,93 mg (obtenus respectivement par les fragments de racines (Ex<sub>2</sub>) sur le milieu A<sub>0</sub> et les entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) sur le milieu A<sub>1</sub>). Exception pour les cals issus des fragments de racines sur le milieu A<sub>2</sub> qui présentent un poids sec moyen des cals inférieurs (9,30 mg) à celui des cals issus des feuilles (Ex<sub>3</sub>) (12,07 mg) repiqués sur le milieu témoin. (Annexe 12 et figure 18)

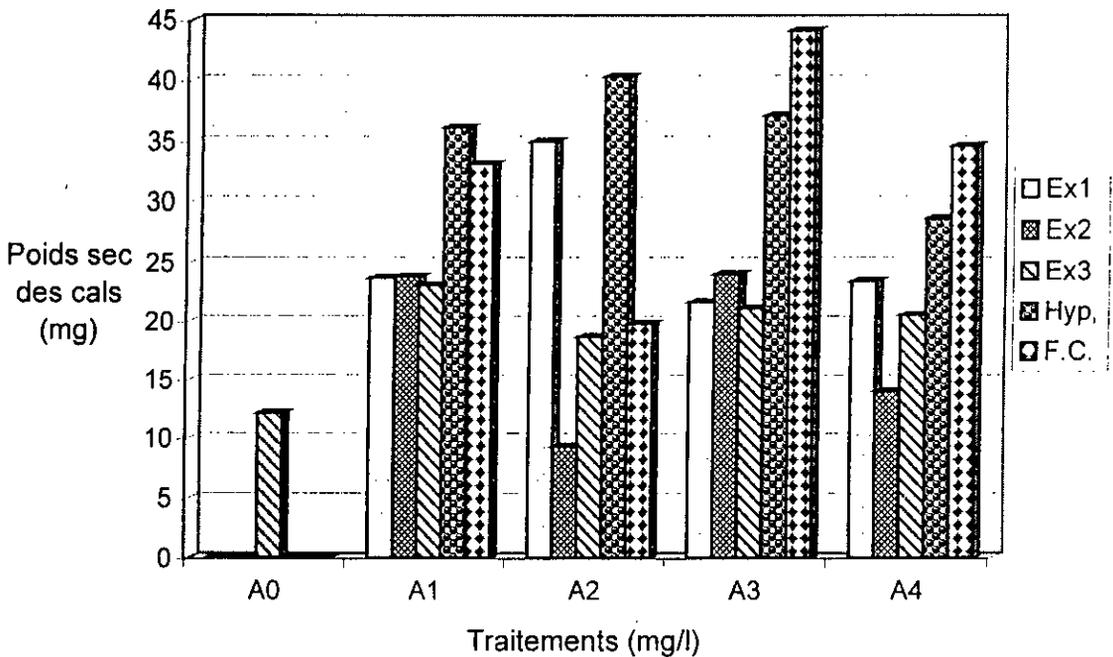


Figure 18 : Effet des hormones de croissance sur le poids sec des cals issus des différents types d'explants

### 2-4- Effets des hormones de croissance sur la couleur et la texture des cals issus des différents types d'explants

Les cals développés sur les différents milieux de culture avec les différentes combinaisons et concentrations hormonales présentent des couleurs et des textures variées (Tableau 14).

Tableau 14 : Couleurs et textures des cals issus des différents types d'explants développés sur les différentes combinaisons et concentrations hormonales

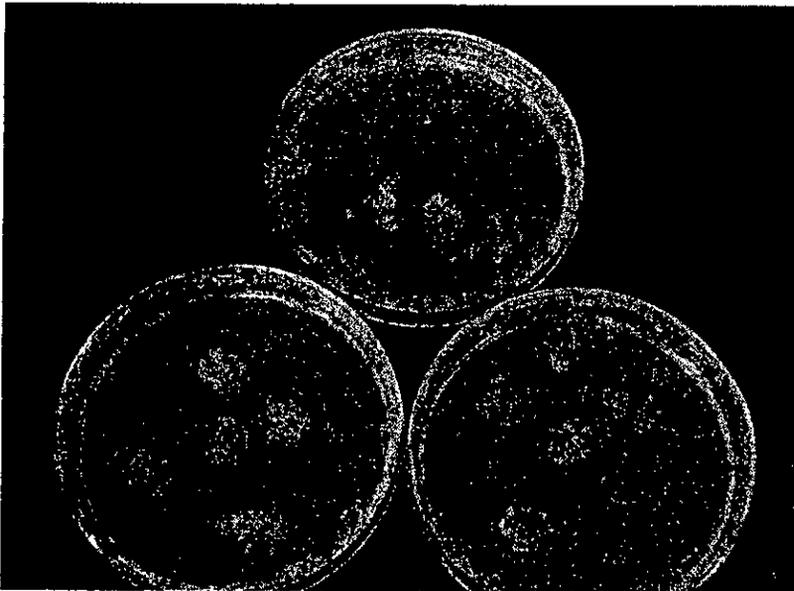
Explants	Milieu	Couleur	Texture
Entre-nœuds	A <sub>0</sub>	—	—
	A <sub>1</sub>	Beige	Friable
	A <sub>2</sub>	Beige	Friable
	A <sub>3</sub>	Vert clair	Friable
	A <sub>4</sub>	Vert clair à beige	Friable
Fragments de racines	A <sub>0</sub>	—	—
	A <sub>1</sub>	Beige	Friable
	A <sub>2</sub>	Vert clair à beige	Friable
	A <sub>3</sub>	Beige	Friable
	A <sub>4</sub>	Vert clair à beige	Friable
Feuilles	A <sub>0</sub>	Beige	Friable
	A <sub>1</sub>	Beige	Friable
	A <sub>2</sub>	Beige	Friable
	A <sub>3</sub>	Vert clair	Noduleuse
	A <sub>4</sub>	Vert	Noduleuse
Hypocotyles	A <sub>0</sub>	—	—
	A <sub>1</sub>	Vert clair à blanc	Noduleuse
	A <sub>2</sub>	Vert	Ferme
	A <sub>3</sub>	Vert clair à blanc	Noduleuse
	A <sub>4</sub>	Vert clair à blanc	Noduleuse
Feuilles cotylédonaire	A <sub>0</sub>	—	—
	A <sub>1</sub>	Vert clair à blanc	Friable à noduleuse
	A <sub>2</sub>	Vert clair à blanc	Friable à noduleuse
	A <sub>3</sub>	Vert	Ferme
	A <sub>4</sub>	Vert	Ferme

Nous constatons (Tableau 14) que les cals beiges à texture friable sont développés à partir des entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>), des fragments de racines (Ex<sub>2</sub>) et des feuilles (Ex<sub>3</sub>) pour le milieu A<sub>1</sub>, ainsi que par les fragments de racines repiqués sur le milieu A<sub>2</sub> et les feuilles repiquées sur les milieux A<sub>0</sub> et A<sub>2</sub>.

Nous remarquons (Tableau 14) que les cals verts clairs à beige de texture friable sont développés à partir des entre-nœuds sur le milieu A<sub>4</sub> et les fragments de racines sur les milieux A<sub>2</sub> et A<sub>4</sub>. Par ailleurs, les feuilles donnent des cals verts à verts clairs de texture noduleuse pour les combinaison hormonale "2,4-D + BAP" (Planche 3).

Les hypocotyles (Hyp.) et les feuilles cotylédonaires (F.C.) développent des cals de couleur allant de verts, verts clairs à blancs. Leur texture varie entre friable, noduleuse et ferme et cela pour les différentes combinaisons et concentrations hormonales. La coloration verte indique sur la présence d'une activité photosynthétique. Cependant, la coloration blanche induite au niveau des cals verts clairs revient à la formation des nodules indiquant les capacités de ces cals à se régénérer.

1



2

3

**Planche 3 :** Aspects morphologiques des cals développés sur A<sub>4</sub>= G. +2 mg/l "2,4-D" + 2 mg/l "BAP".

- (1) Cals issus de feuilles.
- (2) Cals issus d'entre-nœuds.
- (3) Cals issus de fragments de racines.

## 2-5-Discussion

Les résultats de cet essai montre que les différents types d'explants testés avec les différentes combinaisons et concentrations en régulateurs de croissance ne donnent pas obligatoirement tous des cals embryogènes.

Nous constatons que les entre-nœuds mis en culture sur les milieux A<sub>1</sub> (GAMBORG +2 mg/l "2,4-D" + 2 mg/l "BAP") et A<sub>3</sub> (GAMBORG +2 mg/l "2,4-D" + 2 mg/l "BAP") induisent une meilleure aptitude à la callogenèse. Les cals obtenus avec ces deux milieux sont de couleur beige à texture friable, caractéristique morphologique des cals embryogènes. Par contre, les hypocotyles et les feuilles cotylédonaire présentent un meilleur pouvoir callogène exprimé en poids frais et poids sec des cals. Ces derniers sont de couleur verte à texture noduleuse, caractéristique morphologique des cals organogènes.

D'après KINET *et al.* (1998), chez l'*Atriplex halimus*, la production de cals est réalisable pour tous les types d'explants et plus particulièrement pour les hypocotyles. En outre, CHOI *et al.* (1999) obtiennent des résultats intéressant pour l'embryogenèse somatique à partir des hypocotyles d'*Eleutherococcus senticosus*.

En effet, SHARP (1980) et EVENS (1981) notent que les cellules initiatrices sont déjà différenciées, mais dépourvues de capacité embryogène.

Par ailleurs, selon WILLIAMS et MAMES WARNER (1986), les embryons zygotiques immatures et les organes issus de plantules (les cotylédons ou les hypocotyles) expriment une très forte aptitude à l'embryogenèse somatique.

D'après LUTZ (1985), NOZERAN (1985) et BIGOT (1980); les bouleversements de comportement de l'implant semblent être essentiellement liés aux coupures des corrélations de celui-ci et la plante mère, ainsi qu'à son nouvel environnement.

## Conclusion

Les résultats obtenus à partir des essais de callogenèse et l'obtention des cals embryogènes, nous montrent que le choix de type d'explant et les substances de croissance jouent un rôle très important sur la formation des cals embryogènes.

Les deux (2) clones réagissent de manière homogène sur la callogenèse pour les deux combinaisons hormonales

Nous constatons que toutes les parties de la plante (entre-nœuds, feuilles, fragments de racines, hypocotyles et feuilles cotylédonaire) sont apte à former des cals avec des taux qui atteignent les 100 % et cela pour les deux (2) combinaisons hormonales testées.

Les cals de couleur beige et de texture friable, qui présentent des caractéristiques morphologique des cals embryogènes, sont induit par la combinaison hormonale (2,4-D, kinétine) pour les entre-nœuds, les fragments de racines et les feuilles. Par contre, les hypocotyles et les feuilles cotylédonaire induisent la formation de cals verts à texture variant de noduleuse à ferme, qui sont caractéristique morphologique des cals de type organogène (caulogène).

Concernent le milieu témoin, il faut noter que les feuilles du clone P<sub>1</sub> induisent une callogenèse moyenne. Tandis, que le clone ne manifeste aucune aptitude à former des cals.

## Chapitre 4

Sélection de calcs résistants  
au chlorure de sodium (NaCl)

## Chapitre 4 : Sélection de cals résistants au chlorure de sodium (NaCl)

### Introduction

L'utilisation de technique de culture *in vitro* permet l'identification des relations entre les réponses au niveau cellulaire et au niveau d'organes différenciés correspondants, ainsi que le comportement de cals obtenus à partir d'explants différents. Cette technique permet un gain de temps pour la sélection de clones résistant au sel (NaCl).

Pour cette raison, nous nous proposons d'étudier l'influence des différentes concentrations en sel (NaCl) sur l'aptitude et le pouvoir d'*Atriplex halimus* à la callogenèse ainsi qu'à l'organogenèse. De ce faite, les explants utilisés sont prélevés de quatre clones sélectionnés vis-à-vis du sel (NaCl) (indiquées dans le chapitre 2 pages 26 et 31).

### 1 – Effets de différentes concentrations en NaCl sur le pourcentage des cals

Afin d'étudier l'influence des différentes concentration en NaCl sur l'aptitude des différents clones sélectionnés, nous avons effectué l'analyse des variances (Tableau 15).

Tableau 15 : Analyse de variance du pourcentage des cals issus des différents types d'explants des clones et développés sur différentes concentrations en NaCl.

	DDL	S.C.E.	Carrés Moyens	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var. Totale	143	203596,88	1423,75				
Var. Facteur1	3	20960,78	6986,93	42,63	0,0000		
Var. Facteur2	2	10054,00	5027,00	30,67	0,0000		
Var. Facteur3	3	125681,04	41893,68	255,62	0,0000		
Var. Inter F.1.2	6	2651,14	441,91	2,70	0,0184		
Var. Inter F.1.3	9	10399,96	1155,55	7,05	0,0000		
Var. Inter F2.3	6	2529,16	421,53	2,57	0,0235		
Var. Inter F1.2.3	18	15587,15	865,95	5,28	0,0000		
Var. Résiduelle	96	15733,34	163,89			12,80	21,9%

Facteur 1 : Clones

Facteur 2 : Explants

Facteur 3 : Différentes concentrations en sel (NaCl).

Les analyses de la variance clones, la variance explants et de la variance des différentes concentrations en NaCl montrent une action très hautement significative sur le pourcentage des cals (Tableau 15).

La variance interfactorielle F1.2.3 (Clones – types d'explants – concentrations en NaCl) montre une action très hautement significative sur le pourcentage des cals (Tableau 15).

La variance d'interaction entre les différents clones et les différents milieux, exerce un effet hautement significatif sur le pourcentage des cals. L'analyse de variance interfactorielle F1.2 (Différents clones avec leurs différents types d'explants) et l'analyse de variance interfactorielle F2.3 (Différents types d'explants repiqués sur les différents milieux) montrent une action significative sur le pourcentage des cals (Tableau 15).

### **1-1- Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents clones**

Les clones testés présentent des réponses assez hétérogènes vis-à-vis des différentes concentrations en NaCl sur le pourcentage moyen des cals. L'annexe 13 et la figure 20 montrent que les clones sélectionnés ( $L_1$ ,  $L_2$  et  $L_3$ ) à partir des milieux salins (5, 10 et 15g de NaCl/l) expriment une meilleure aptitude à la callogenèse par rapport au clone témoin ( $L_0$ ). Par ailleurs, le clone  $L_3$  exprime une meilleure aptitude à la callogenèse par rapport aux autres clones avec un pourcentage moyen de cals de l'ordre de 74,72 %. En second, le clone  $L_2$  présente un pourcentage moyen des cals égal à 63,89 % (Annexe 13 et figure 19).

En ce qui concerne les milieux de culture, le milieu  $S_1$  présente une aptitude à la callogenèse (81,94 %) similaire à celle du milieu témoin (82,78 %). Par contre, les autres milieux  $S_2$  et  $S_3$  présentent une aptitude à former des cals avec des pourcentages moyens de cals inférieurs à celui du milieu témoin. Le pourcentage moyen est obtenu par l'utilisation du milieu  $S_2$  présente un pourcentage moyen de cals égal à 58,6 % (Annexe 13 et figure 19).

L'étude de l'interaction entre les clones et les milieux de culture, nous montre que les clones  $L_2$  et  $L_3$  sur le milieu  $S_1$  expriment les meilleurs aptitude à la callogenèse avec des pourcentages moyens des cals qui sont respectivement de l'ordre de 100 % et 98,89 %. Ces mêmes clones expriment une faible aptitude à la callogenèse pour le milieu  $S_3$ , dont les pourcentages moyens des cals sont respectivement de l'ordre de 21,11 % et 18,89 %. Tandis que les clones  $L_0$  et  $L_1$  n'expriment aucune aptitude à la callogenèse pour le même milieu ( $S_3$ ) (Annexe 13 et figure 19).

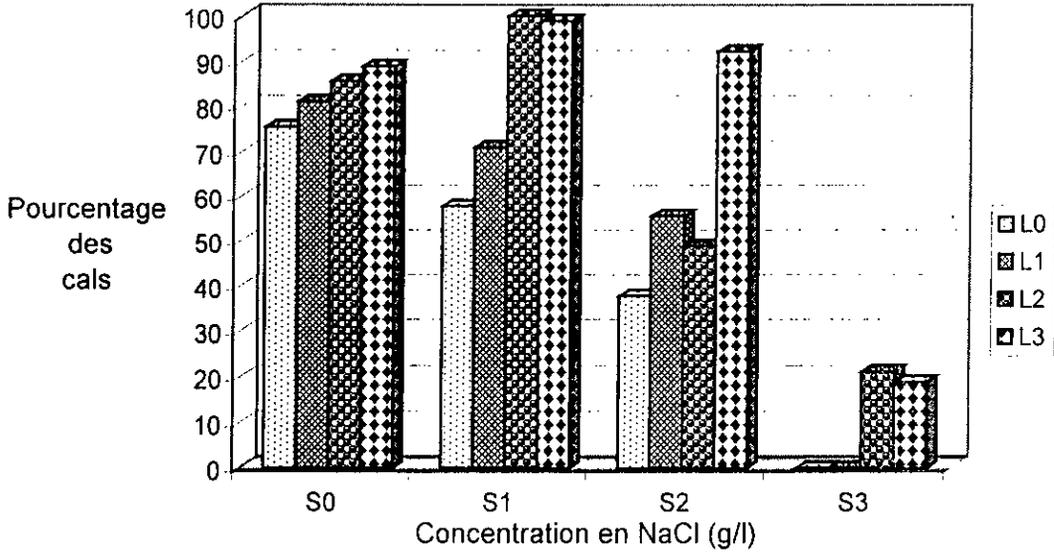


Fig. 19 : Effet du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents clones

### 1-2- Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants

Les résultats indiqués sur l'annexe 14 et la figure 20 montrent que le meilleur pourcentage moyen des cals (68,96 %), est obtenu par les entre-nœuds, suivi respectivement par les feuilles (57,50 %) puis les fragments de racines (48,54%).

Cependant, les entre-nœuds ( $Ex_1$ ) mis en culture dans le milieu  $S_0$  donnent le meilleur pouvoir callogène avec un pourcentage moyen des cals de l'ordre de 97,50 %, suivi des feuilles mise en culture dans les milieux  $S_0$  et  $S_1$ , présentant respectivement les pourcentages moyens de cals 83,33 % et 85,83 %. Alors que le pourcentage moyen des cals est nul pour les fragments de racines sur le milieu  $S_3$  (Annexe 14 et figure 20).

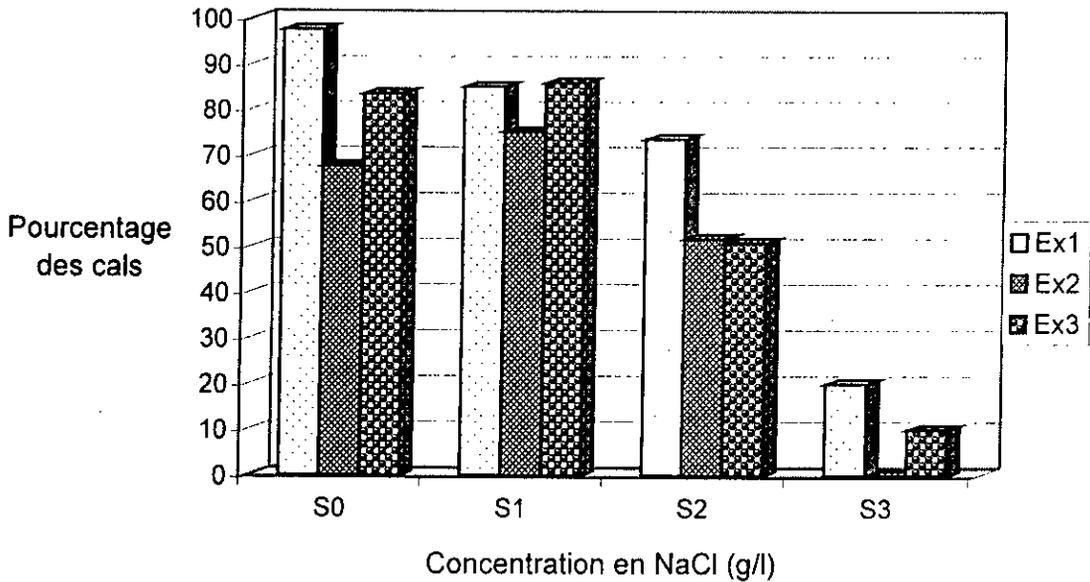


Fig. 20 : Effet du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants

### 1-3- Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants des différents clones

L'aptitude à former des cals à partir des différents types d'explants est influencée par le clone dont ils sont issus ainsi que par les concentrations en sel (NaCl) utilisés (Annexe 15 et figure 21).

Lorsque les trois facteurs sont étudiés simultanément, ils exercent des effets très distincts entre les différents traitements sur le pourcentage des cals.

#### 1-3-1- Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>0</sub>

Les entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) présentent le pourcentage maximal pour le milieu témoin (S<sub>0</sub>) qui est égal à 100 %. Les fragments de racines (Ex<sub>2</sub>) ne présentent aucune aptitude à la callogène pour les milieux S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub>. De même, les entre-nœuds et les feuilles (Ex<sub>3</sub>) ne manifestent aucune aptitude à former les cals sur le milieu S<sub>3</sub>. Les autres milieux induisent des pourcentages moyens des cals avec des valeurs intermédiaires (Annexe 15 et figure 21).

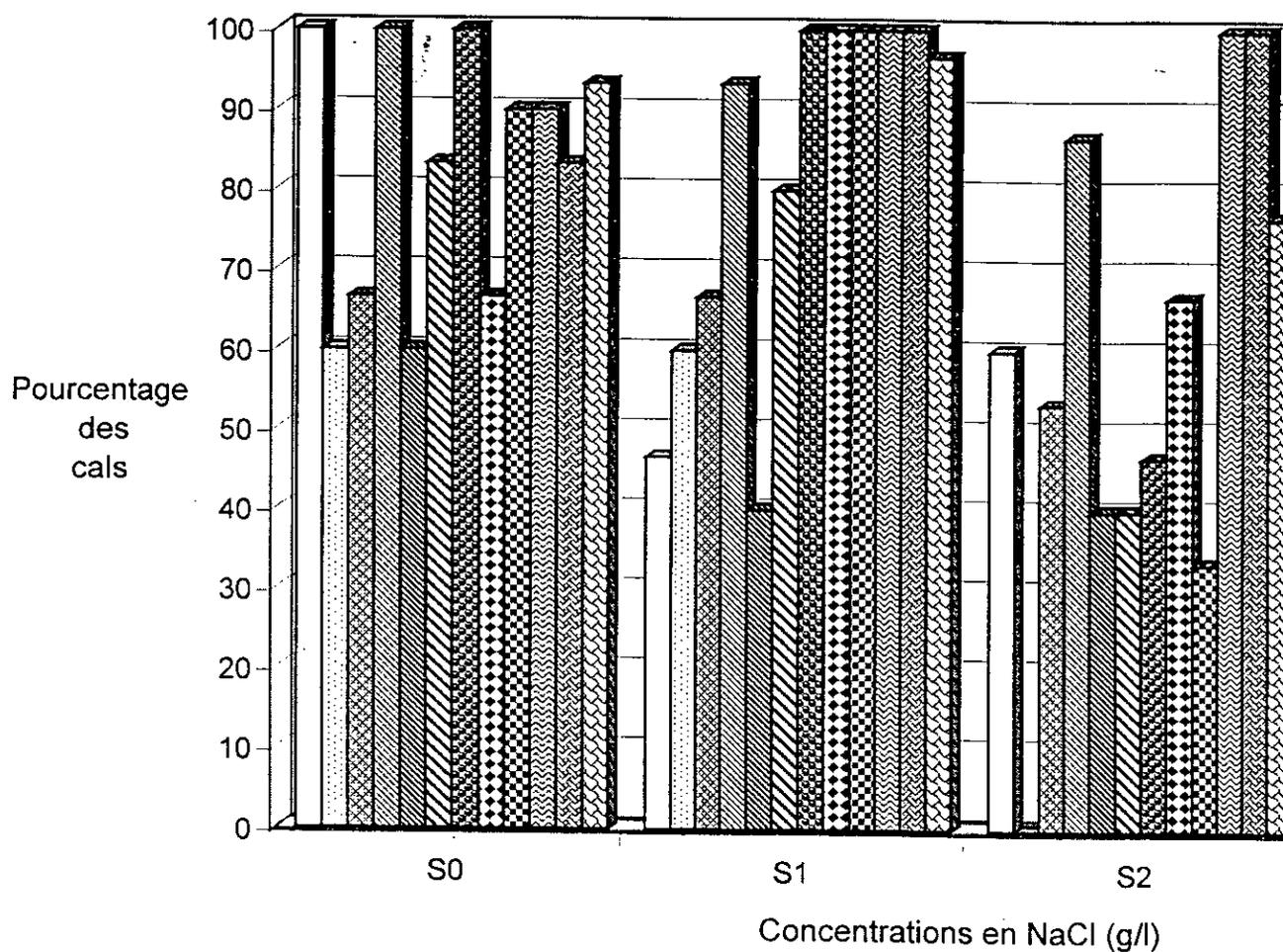


Figure 21 : Effet du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents clones

### **1-3-2- Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>1</sub>**

D'après l'annexe 15 et la figure 21, la meilleure aptitude à la callogenèse est obtenue par les entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) pour les milieux S<sub>0</sub> et S<sub>1</sub> (pourcentage moyen des cals variant de 93,33 % à 100 %) (Annexe 15 et figure 21).

Par ailleurs, les cals issus des feuilles et développés sur le milieu témoin présentent une bonne aptitude à la callogenèse (83,33 %). Les cals issus de ce explant, développés sur le milieu S<sub>1</sub>, présentent un pourcentage de cals de l'ordre de 80,00 %.

Nous remarquons que la concentration S<sub>3</sub> n'a donnée aucune aptitude à former des cals quelque soit le type d'explant utilisé.

### **1-3-3- Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>2</sub>**

Le pourcentage des cals maximal (100 %) est obtenu pour des trois types d'explants sur le milieu S<sub>1</sub> et les entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) sur le milieu témoin. Tandis que les feuilles (Ex<sub>3</sub>) et les fragments de racines (Ex<sub>2</sub>) sur le milieu témoin viennent en second avec des pourcentages moyens de cals qui sont respectivement de l'ordre de 90,00 % et 66,67 %. Cette dernière valeur est obtenue également par les fragments de racines sur le milieu S<sub>2</sub> (Annexe 15) (figure 21).

Par ailleurs, les fragments de racines ne manifestent aucune aptitude à la formation des cals pour le milieu S<sub>3</sub>. Par contre, les entre-nœuds et les feuilles donnent une faible aptitude à la callogenèse avec des pourcentages moyens des cals qui sont respectivement de l'ordre de 40,00 % et 23,33 % (Annexe 15 et figure 21).

### **1-3-4- Effets du NaCl sur le pourcentage des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>3</sub>**

Le milieu S<sub>1</sub> induit le pourcentage de cals maximal ( Variant de 96,67 %, pour les feuilles (Ex<sub>3</sub>), à 100, %, pour les entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) et les fragments de racines (Ex<sub>2</sub>). Le milieu témoin donne des pourcentages de cals inférieurs à ceux obtenus par le milieu indiqué précédemment et qui varient de 83,33 % (obtenu à partir des fragments de racines) à 93,33 % (obtenu à partir des feuilles) (Annexe 15 et figure 21).

Concernant le milieu S<sub>3</sub>, les feuilles présentent un pourcentage de cals inférieur (16,67 %) à celui obtenu chez le clone P<sub>4</sub> (Annexe 15 et figure 21).

Quant aux entre-nœuds et aux fragments de racines, repiqués sur le milieu S<sub>2</sub>, le pourcentage de cals est maximal (100 %). Les feuilles présentent une aptitude à donner de cals inférieure qui est égal à 76,67 % (Annexe 15 et figure 21).

## 2 – Effets du NaCl sur le poids frais des cals

Afin de déterminer l'effet des différentes combinaisons et concentrations en NaCl, nous avons effectués l'analyse de variance (Tableau 16).

Tableau 16 : Analyse de variance du poids frais des cals issus des différents types d'explants des clones étudiés et développés sur différentes concentrations en NaCl.

	DDL	S.C.E.	Carrés Moyens	Test F	Proba.	E.T.	C.V.
Var. Totale	143	7501669,00	52459,22				
Var. Facteur1	3	470409,00	156803,00	88,38	0,0000		
Var. Facteur2	2	534297,50	267148,75	150,58	0,0000		
Var. Facteur3	3	2586429,00	862143,00	485,94	0,0000		
Var. Inter F.1.2	6	303163,00	50527,17	28,48	0,0000		
Var. Inter F.1.3	9	1386429,00	154047,67	86,83	0,0000		
Var. Inter F2.3	6	1202064,50	200344,08	112,92	0,0000		
Var. Inter F1.2.3	18	848556,00	47142,00	26,57	0,0000		
Var. Résiduelle	96	170321,00	1774,18			42,12	33,4%

Facteur 1 : Clone

Facteur 2 : Explant

Facteur 3 : Différentes concentrations en sel (NaCl).

Nous constatons que l'analyse de variance montre l'existence d'une action très hautement significative entre les différentes concentrations en NaCl et les différents types d'explants des différents clones, ainsi qu'entre les clones sur le poids frais des cals.

L'analyse de variance inter factorielle révèle l'existence d'une différence très hautement significative entre les différents traitements sur le poids frais des cals.

### 2-1– Effets du NaCl sur le poids frais des cals issus des différents clones

Les différents types d'explants des clones étudiés ont des réponses assez hétérogènes vis-à-vis des différentes concentrations en NaCl sur le pourcentage moyen des cals. L'annexe 16 montre que le milieu de culture témoin présente le meilleur pouvoir callogène exprimé en poids frais moyen des cals (347,63 mg). Ce poids frais moyen des cals diminue avec l'augmentation de la concentration de NaCl dans le milieu jusqu'à la valeur 8,71 mg (obtenue avec l'utilisation de la concentration S<sub>3</sub> égal à 15 g de NaCl / l) où le pouvoir callogène est le plus faible (Annexe 16 et figure 22).

Le clone  $L_0$  présente un meilleur pouvoir callogène exprimé en poids frais moyen des cals (217,29 mg), suivi du clone  $L_3$  avec un poids frais moyen des cals égal à 124,96 mg. Par contre, le clone  $L_1$  donne un faible pouvoir callogène avec un poids frais moyen des cals égal à 62,10 mg.

Les deux facteurs étudiés simultanément exercent une influence, également, très significative sur le poids frais des cals. Le plus grands poids frais moyen des cals (710,99 mg) est induit par le clone  $L_0$  sur le milieu témoin, présentant ainsi le meilleur pouvoir callogène.

Par ailleurs, les milieux  $S_2$  induit une faible potentialité callogène pour tous les clones avec des poids frais moyens variant de 12,03 mg (obtenue par le clone  $L_0$ ) à 44,28 mg (obtenue par le clone  $L_1$ ). Les deux clones ( $L_0$  et  $L_1$ ) ne manifestent aucun développement de cals sur le milieu (Annexe 16 et figure 22).

## **2-2- Effets du NaCl sur le poids frais des cals issus de différents types d'explants**

Les concentrations en sel testées n'exercent pas le même effet sur les trois types d'explants en ce qui concerne le paramètre étudié. D'après l'annexe 17 et la figure 23, le plus grand poids frais moyen des cals (201,61 mg) est obtenu par les entre-nœuds ( $Ex_1$ ) suivi des feuilles ( $Ex_3$ ) (112,61 mg) et les fragments de racines ( $Ex_2$ ) (59,22 mg).

L'étude de ces deux facteurs ensembles (NaCl – type d'explant) fait apparaître que le poids frais moyen des cals obtenu à partir des entre-nœuds sur le milieu de culture témoin ( $S_0$ ) est nettement supérieur (640,89 mg) aux autres traitements. Pour ce même milieu de culture, les feuilles induisent un poids frais moyen des cals égal à 205,58 mg.

Cependant, les milieux  $S_2$  et  $S_3$  présentent des effets similaires vis-à-vis du poids frais moyen des cals avec des valeurs qui varient de 7,28 mg (obtenu à partir des feuilles sur le milieu  $S_3$ ) jusqu'à 37,46 mg (obtenu à partir des feuilles sur le milieu  $S_2$ ). Les fragments de racines mis en culture sur le milieu  $S_3$  ne révèlent aucune potentialité callogène. Les autres concentrations en NaCl et les types d'explant présentent des poids frais moyens des cals avec des valeurs intermédiaires (Annexe 17 et figure 23).

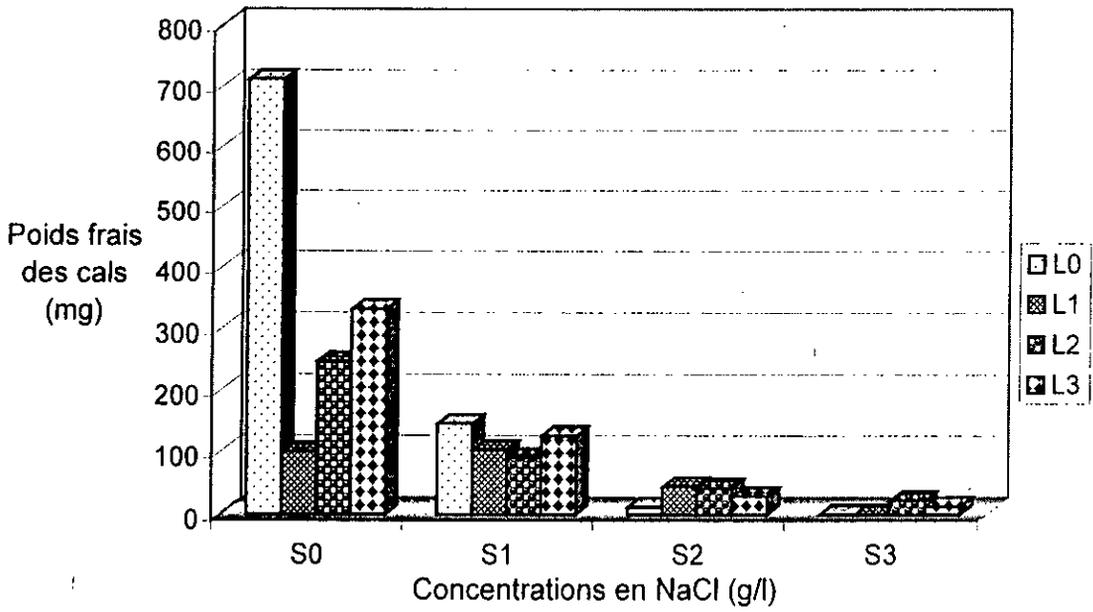


Figure 22 : Effet du NaCl sur le poids frais des cals issus des différents clones

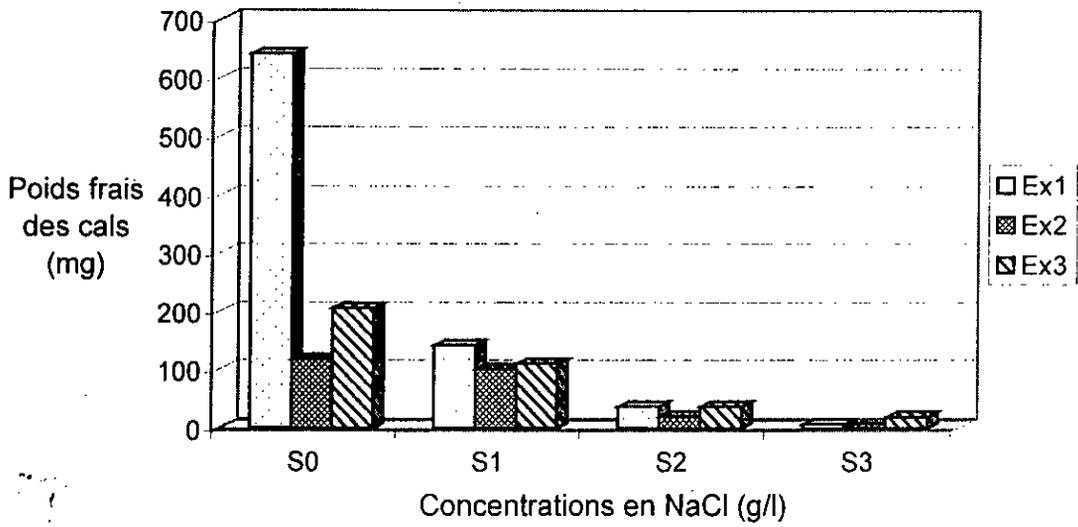


Figure 23 : Effet du NaCl sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants

## **2-3 – Effets du NaCl sur le poids frais des cals issus de différents types d'explants des différents clones**

L'annexe 18 et la figure 24 font apparaître que le pouvoir callogène diminue avec l'augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu de culture pour les différents clones :

### **2-3-1 – Effets du NaCl sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>0</sub>**

Pour le milieu témoin (S<sub>0</sub>), les cals obtenus à partir des entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) présentent le poids frais maximal (1343,93 mg), suivi des cals obtenus à partir des feuilles (Ex<sub>3</sub>). Par ailleurs, les différents types d'explants ne présentent aucune potentialité à développer des cals pour le milieu de culture S<sub>3</sub> (Concentration en NaCl est égale à 15 g/l) ; ceci est, également, observé pour les fragments de racines (Ex<sub>2</sub>) repiqués sur le milieu S<sub>2</sub> (Concentration en NaCl est égale à 10 g/l) (Annexe 18 et figure 24).

### **2-3-2– Effets du NaCl sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>1</sub>**

Les entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) présentent le meilleur pouvoir callogène (Poids frais moyen des cals égal à 212,10 mg) pour le milieu témoin par rapport aux autres types d'explants. Pour ce même milieu de culture (S<sub>0</sub>), le poids frais moyen des cals issus des entre-nœuds est le plus faible par rapport à ce même type d'explant issus des clones L<sub>0</sub>, L<sub>2</sub> et L<sub>3</sub> (Annexe 18 et figure 24).

Par ailleurs, les fragments de racines (Ex<sub>2</sub>) expriment un faible pouvoir callogène par rapport aux entre-nœuds et aux feuilles (Ex<sub>3</sub>) concernant les milieux S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> avec un poids frais moyen des cals variant de 113,63 mg (obtenus sur le milieu S<sub>2</sub>) à 36,20 mg (obtenus sur le milieu S<sub>0</sub>) (Annexe 18 et figure 24).

Quand aux différents types d'explants repiqués sur le milieu S<sub>3</sub>, ils ne manifestent aucun pouvoir callogène (Annexe 18 et figure 24).

### **2-3-3– Effets du NaCl sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>2</sub>**

Le meilleur pouvoir callogène, exprimé en poids frais moyen des cals, est toujours obtenu par les entre-nœuds (Ex<sub>1</sub>) sur le milieu témoin (423,10 mg). Le plus faible poids frais moyen des cals (16,77 mg) est obtenu à partir des entre-nœuds sur le milieu S<sub>3</sub>. Pour ce dernier, les fragments de racines ne présentent aucun pouvoir callogène. Les feuilles donnent des cals avec un poids frais moyen des cals égal à 49,87 mg (Annexe 18 et figure 24).

### **2-3-4- Effets du NaCl sur le poids frais des cals issus des différents types d'explants du clone L<sub>3</sub>**

L'annexe 18 et la figure 24 montrent que le meilleur poids frais moyen des cals (584,77 mg) est obtenu toujours à partir des entre-nœuds sur le milieu S<sub>0</sub>. Suivi des feuilles qui présentent un poids frais moyen des cals de l'ordre de 261,23 mg.

Concernant les fragments de racines, nous remarquons que le milieu de culture S<sub>1</sub> (Concentration en NaCl égale à 5g/l) présente un meilleur pouvoir callogène (199,80 mg) par rapport au milieu témoin (150,00 mg). Par ailleurs, ce même type d'explant ne donne aucune formation de cals pour le milieu S<sub>3</sub> (Annexe 18 et figure 24).

Les entre-nœuds mis en culture sur le milieu de culture S<sub>3</sub> présentent le plus faible pouvoir callogène avec un poids frais moyen des cals égal à 12,37 mg. Les feuilles mises en culture sur le même milieu de culture (S<sub>3</sub>) présentent un poids frais moyen des cals de l'ordre de 25,57 mg (Annexe 18 et figure 24).



Annexe 9 : Poids sec des cals (en mg) issus des différents types d'explants des deux clones et développés sur les différentes combinaisons et concentrations hormonales.

F <sub>1</sub>		P <sub>1</sub>			P' <sub>1</sub>		
F <sub>2</sub>		EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>
F <sub>3</sub>	A <sub>0</sub>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	21,93 ± 9,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	G. H.	C	C	ABC	C	C	C
	A <sub>1</sub>	37,33 ± 14,74	14,87 ± 3,39	25,97 ± 14,52	12,80 ± 0,75	23,33 ± 7,29	20,83 ± 10,54
	G. H.	A	BCD	ABC	BCD	ABC	ABC
	A <sub>2</sub>	31,70 ± 6,10	9,40 ± 0,66	11,40 ± 4,87	28,23 ± 7,51	22,27 ± 8,59	28,17 ± 8,40
	G. H.	ABC	CD	BCD	ABC	ABC	ABC
	A <sub>3</sub>	23,90 ± 12,41	25,00 ± 7,74	15,17 ± 4,25	32,90 ± 3,67	25,77 ± 8,64	28,77 ± 8,01
	G. H.	ABC	ABC	ABCD	AB	ABC	ABC
	A <sub>4</sub>	22,30 ± 8,33	12,37 ± 2,06	20,70 ± 9,61	27,13 ± 5,18	22,77 ± 6,78	25,93 ± 5,60
	G. H.	ABC	BCD	ABC	ABC	ABC	ABC

Annexe 10 : Pourcentage des cals issus des différents types d'explants et développés sur les différentes combinaisons et concentrations hormonales.

F <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	Hyp.	F.C.	Moyenne F <sub>1</sub>
A <sub>0</sub>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	26,67 ± 11,55	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	5,33 ± 4,36
G.H.	E	E	DE	E	E	C
A <sub>1</sub>	90,00 ± 10,00	93,33 ± 11,55	96,67 ± 5,77	86,67 ± 11,55	80,00 ± 20,00	89,33 ± 10,69
G.H.	AB	AB	AB	AB	ABC	A
A <sub>2</sub>	100,00± 0,00	86,67 ± 23,09	73,33 ± 11,55	60,00 ± 20,00	46,67 ± 11,55	73,33 ± 13,09
G.H.	A	AB	ABC	BC	CD	B
A <sub>3</sub>	100,00± 0,00	100,00± 0,00	86,67 ± 11,55	73,33 ± 23,09	76,67 ± 15,28	87,33 ± 11,34
G.H.	A	A	AB	ABC	ABC	A
A <sub>4</sub>	93,33 ± 5,77	93,33 ± 4,08	80,00 ± 10,00	80,00 ± 20,00	60,00 ± 20,00	81,33 ± 12,91
G.H.	AB	AB	ABC	ABC	BC	AB
Moyenne F <sub>2</sub>	76,67 ± 5,77	74,67 ± 10,69	72,67 ± 8,73	60,00 ± 14,47	52,67 ± 12,91	Moy. Générale : 67,33
G.H.	A	A	A	B	B	

Annexe 11 : Poids frais des cals (en mg) issus des différents types d'explants et développés sur les différentes combinaisons et concentrations hormonales.

F <sub>2</sub>	F <sub>1</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	HYp.	F.C.	Moyenne F <sub>2</sub>
	A <sub>0</sub>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	199,47 ± 11,41	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	39,89 ± 4,31
G. H.		G	G	EF	G	G	C
	A <sub>1</sub>	287,50 ± 57,22	311,90 ± 29,59	380,57 ± 3,93	515,87 ± 98,41	727,07 ± 131,48	442,58 ± 107,56
G. H.		DE	CDE	CDE	BC	A	A
	A <sub>2</sub>	708,35 ± 158,05	82,53 ± 5,30	253,43 ± 71,64	770,20 ± 105,82	380,90 ± 22,36	439,12 ± 66,69
G. H.		A	FG	DEF	A	CDE	A
	A <sub>3</sub>	243,60 ± 15,81	233,83 ± 96,15	413,73 ± 80,50	612,00 ± 21,03	714,70 ± 116,29	443,57 ± 77,31
G. H.		DEF	DEF	CDE	AB	A	A
	A <sub>4</sub>	387,53 ± 11,18	289,23 ± 7,90	312,53 ± 29,37	325,87 ± 56,46	446,40 ± 164,49	352,31 ± 80,81
G. H.		CDE	DE	CDE	CDE	CD	B
	Moyenne F <sub>1</sub>	325,34 ± 83,54	183,50 ± 38,88	311,95 ± 42,46	444,79 ± 59,17	453,81 ± 91,31	Moy. Générale : 343,90
G. H.		B	C	B	A	A	

Annexe 12 : Poids sec des cals (en mg) issus des différents types d'explants et développés sur les différentes combinaisons et concentrations hormonales.

F <sub>2</sub>	F <sub>1</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	Hyp.	F.C.	Moyenne F <sub>2</sub>
A <sub>0</sub>		0,00	0,00	12,07	0,00	0,00	2,41
		±	±	±	±	±	±
G. H.		0,00	0,00	0,90	0,00	0,00	0,34
		H	H	FG	H	H	C
A <sub>1</sub>		23,63	23,77	23,07	36,10	33,10	27,93
		±	±	±	±	±	±
G. H.		2,10	6,54	0,98	5,09	8,67	4,62
		CDEF	CDEF	CDEF	AB	ABCD	AB
A <sub>2</sub>		34,93	9,30	18,67	40,27	19,77	24,59
		±	±	±	±	±	±
G. H.		5,06	0,70	1,53	6,96	2,93	3,49
		ABC	GH	EFG	AB	DEFG	B
A <sub>3</sub>		21,60	24,00	21,07	37,07	44,10	29,57
		±	±	±	±	±	±
G. H.		2,07	5,50	6,81	5,81	5,22	5,74
		DEFG	CDEF	DEFG	AB	A	A
A <sub>4</sub>		23,40	14,00	20,53	28,60	34,57	24,22
		±	±	±	±	±	±
G. H.		1,46	1,04	5,35	4,16	4,71	4,24
		CDEF	FG	DEFG	BCDE	ABC	B
Moyenne F <sub>1</sub>		20,71	14,21	19,08	28,41	26,31	Moy. Générale : 21,74
		±	±	±	±	±	
G. H.		5,05	3,30	3,36	4,23	4,36	
		B	C	B	A	A	

Annexe 13 : Pourcentage des cals issus des quatre (4) clones développés sur les différentes concentrations en NaCl.

F <sub>3</sub>	F <sub>1</sub>	L <sub>0</sub>	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	Moyenne F <sub>3</sub>
S <sub>0</sub>		75,56	81,11	85,56	88,89	82,78
		±	±	±	±	±
		15,28	12,58	16,07	10,80	13,24
G. H.		BC	BC	ABC	AB	A
S <sub>1</sub>		57,78	71,11	100,00	98,89	81,94
		±	±	±	±	±
		12,91	15,28	0,00	2,89	9,66
G. H.		D	C	A	A	A
S <sub>2</sub>		37,78	55,56	48,89	92,22	58,61
		±	±	±	±	±
		5,77	15,28	17,32	2,89	11,46
G. H.		E	D	DE	AB	B
S <sub>3</sub>		0,00	0,00	21,11	18,89	10,00
		±	±	±	±	±
		0,00	0,00	10,41	10,41	7,04
G.H.		G	G	F	F	C
Moyenne F <sub>1</sub>		42,78	51,94	63,89	74,72	Moy. Générale : 58,33
		±	±	±	±	
		9,95	11,85	12,34	7,43	
G. H.		D	C	B	A	

Annexe 14 : Pourcentage des cals issus des différents types d'explants et développés sur les différentes concentrations en NaCl.

F <sub>3</sub>	F <sub>2</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	Moyenne F <sub>3</sub>
S <sub>0</sub>		97,50	67,50	83,33	82,78
		±	±	±	±
		4,26	16,88	15,95	13,24
G. H.		A	C	B	A
S <sub>1</sub>		85,00	75,00	85,83	81,94
		±	±	±	±
		6,96	8,53	13,26	9,66
G. H.		B	BC	B	A
S <sub>2</sub>		73,33	51,67	50,83	58,61
		±	±	±	±
		6,96	15,57	11,28	11,46
G. H.		BC	D	D	B
S <sub>3</sub>		20,00	0,00	10,00	10,00
		±	±	±	±
		12,06	0,00	3,48	7,04
G.H.		E	F	EF	C
Moyenne F <sub>2</sub>		68,96	48,54	57,50	Moy. Générale : 58,33
		±	±	±	
		7,81	11,85	11,55	
G. H.		A	C	B	

Annexe 15 : Pourcentage des cals issus des différents types d'explants des quatre (4) clones et développés sur les différentes concentrations en NaCl.

F <sub>1</sub>	L <sub>0</sub>			L <sub>1</sub>			L <sub>2</sub>			L <sub>3</sub>		
	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>
F <sub>2</sub>	100,00	60,00	66,67	100,00	60,00	83,33	100,00	66,67	90,00	90,00	83,33	93,33
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
S <sub>0</sub>	0,00	0,00	30,55	0,00	20,00	15,28	0,00	30,55	10,00	10,00	15,28	11,55
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
G. H.	A	ABCDE	ABCDE	A	ABCDE	AB	A	ABCDE	AB	AB	AB	A
	46,67	60,00	66,67	93,33	40,00	80,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	96,67
S <sub>1</sub>	11,55	0,00	23,09	11,55	20,00	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,77
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
G. H.	CDEFG	ABCDE	ABCDE	A	DEFG	ABC	A	A	A	A	A	A
	60,00	0,00	53,33	86,67	40,00	40,00	46,67	66,67	33,33	100,00	100,00	76,67
S <sub>2</sub>	0,00	0,00	11,55	11,55	20,00	20,00	11,55	30,55	11,55	0,00	0,00	5,77
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
G. H.	ABCDE	H	BCDEF	AB	DEFG	DEFG	CDEFG	ABCDE	FGH	A	A	ABCD
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	40,00	0,00	23,33	40,00	0,00	16,67
S <sub>3</sub>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,00	0,00	5,77	20,00	0,00	5,77
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
G. H.	H	H	H	H	H	H	DEFG	H	FGH	DEFG	H	GH

Annexe 16 : Poids frais des cals issus des quatre (4) clones et développés sur les différentes concentrations en NaCl.

F <sub>3</sub>	F <sub>1</sub>	L <sub>0</sub>	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	Moyenne F <sub>3</sub>
S <sub>0</sub>		710,99 ± 90,06	100,33 ± 21,75	247,19 ± 54,46	332,00 ± 47,81	347,63 ± 56,24
G. H.		A	DE	C	B	A
S <sub>1</sub>		146,12 ± 38,26	103,78 ± 48,14	90,88 ± 28,24	126,37 ± 38,68	116,79 ± 37,26
G. H.		D	DE	E	DE	B
S <sub>2</sub>		12,03 ± 4,40	44,28 ± 16,43	41,80 ± 21,37	28,83 ± 11,83	31,74 ± 14,23
G. H.		F	F	F	F	C
S <sub>3</sub>		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	22,21 ± 21,25	12,64 ± 6,47	8,71 ± 10,62
G.H.		F	F	F	F	D
Moyenne F <sub>1</sub>		217,29 ± 46,83	62,10 ± 26,45	100,52 ± 32,63	124,96 ± 30,10	Moy. Générale : 126,22
G. H.		A	D	C	B	

Annexe 17 : Poids frais des cals issus des différents types d'explants et développés sur les différentes concentrations en NaCl.

F <sub>3</sub>	F <sub>2</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	Moyenne F <sub>3</sub>
S <sub>0</sub>		640,98 ± 73,20	116,33 ± 30,68	205,58 ± 61,35	347,63 ± 56,24
G. H.		A	C	B	A
S <sub>1</sub>		141,05 ± 28,20	99,94 ± 49,51	109,37 ± 34,23	116,79 ± 37,26
G. H.		C	C	C	B
S <sub>2</sub>		37,13 ± 8,70	20,62 ± 8,43	37,46 ± 22,30	31,74 ± 14,23
G. H.		D	D	D	C
S <sub>3</sub>		7,28 ± 3,81	0,00 ± 0,00	18,86 ± 18,55	8,71 ± 10,62
G.H.		D	D	D	D
Moyenne F <sub>2</sub>		206,61 ± 38,23	59,22 ± 28,47	112,82 ± 36,77	Moy. Générale : 126,22
G. H.		A	C	B	

Annexe 18 : Poids frais des cals issus des différents types d'explantats des quatre (4) clones et développés sur les différentes concentrations en NaCl.

F <sub>1</sub>	L <sub>0</sub>			L <sub>1</sub>			L <sub>2</sub>			L <sub>3</sub>			
	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	
F <sub>2</sub>	S <sub>0</sub>	1343,93	146,97	645,07	212,10	61,57	27,33	423,10	106,77	211,70	584,77	150,00	261,23
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		135,05	51,23	107,62	29,71	26,29	17,90	60,41	5,23	90,49	81,89	42,83	24,63
	S <sub>1</sub>	A	FGHI	B	DEF	HIJK	HIJK	C	FGHIJK	DEF	B	FGH	DE
		116,87	30,77	290,73	177,23	113,63	20,47	138,07	55,57	79,00	132,03	199,80	47,27
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	S <sub>2</sub>	12,62	3,95	75,36	45,67	84,50	6,63	42,73	35,15	11,36	17,41	71,35	24,31
		FGHIJK	HIJK	D	EFG	FGHIJK	IJK	FGHIJ	HIJK	GHIJK	FGHIJK	DEF	HIJK
		20,93	0,00	15,17	60,43	36,20	36,20	48,03	27,13	50,23	19,13	19,10	48,23
	S <sub>3</sub>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		5,97	0,00	6,45	19,25	18,80	18,82	2,00	5,49	42,33	2,58	2,85	23,37
		G.H.	IJK	JK	HIJK	HIJK	HIJK	HIJK	HIJK	HIJK	IJK	IJK	HIJK
G.H.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	16,77	0,00	49,87	12,37	0,00	25,57	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,17	0,00	41,70	3,61	0,00	12,43	
G.H.	K	K	K	K	K	K	IJK	K	HIJK	JK	K	HIJK	

Annexe 19 : Poids sec des cals issus des quatre (4) clones et développés sur les différentes concentrations en NaCl.

F <sub>3</sub>	F <sub>1</sub>	L <sub>0</sub>	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	Moyenne F <sub>3</sub>
S <sub>0</sub>		36,51	14,92	22,80	18,33	23,14
		±	±	±	±	±
		4,87	3,30	1,40	3,11	3,25
G. H.		A	D	B	C	A
S <sub>1</sub>		12,69	13,07	8,63	11,56	11,49
		±	±	±	±	±
		3,71	2,40	1,27	3,89	2,88
G. H.		D	D	E	D	B
S <sub>2</sub>		1,94	5,63	5,49	3,60	4,17
		±	±	±	±	±
		0,66	2,01	1,63	0,73	1,33
G. H.		G	F	F	FG	C
S <sub>3</sub>		0,00	0,00	2,76	1,66	1,10
		±	±	±	±	±
		0,00	0,00	1,73	0,40	0,85
G.H.		H	H	FG	G	D
Moyenne F <sub>1</sub>		12,79	8,41	9,92	8,79	Moy. Générale : 9,98
		±	±	±	±	
		2,94	2,18	1,45	2,42	
G. H.		A	B	B	B	

Annexe 20 : Poids sec des cals issus des différents types d'explants et développés sur les différentes concentrations en NaCl.

F <sub>3</sub>	F <sub>2</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	Moyenne F <sub>3</sub>
S <sub>0</sub>		30,11	13,83	25,49	23,14
		±	±	±	±
		3,45	3,12	3,46	3,25
G. H.		A	C	B	A
S <sub>1</sub>		11,93	10,68	11,88	11,49
		±	±	±	±
		1,79	3,58	3,22	2,88
G. H.		CD	CD	CD	B
S <sub>2</sub>		4,68	3,31	4,52	4,17
		±	±	±	±
		0,70	1,19	1,92	1,33
G. H.		E	EF	E	C
S <sub>3</sub>		0,86	0,00	2,45	1,10
		±	±	±	±
		0,47	0,00	1,44	0,85
G.H.		FG	G	EFG	D
Moyenne F <sub>2</sub>		11,89	6,95	11,09	Moy. Générale : 9,98
		±	±	±	
		1,92	2,37	2,57	
G. H.		A	B	A	

Annexe 18 : Poids sec des cals issus des différents types d'explants des quatre (4) clones et développés sur les différentes concentrations en NaCl.

F <sub>1</sub>	L <sub>0</sub>			L <sub>1</sub>			L <sub>2</sub>			L <sub>3</sub>		
	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>
F <sub>2</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>	EX <sub>1</sub>	EX <sub>2</sub>	EX <sub>3</sub>
	57,00 ± 6,24	23,60 ± 6,73	28,93 ± 3,24	14,93 ± 3,06	5,03 ± 3,69	24,80 ± 5,37	22,63 ± 1,16	18,30 ± 0,85	27,47 ± 2,41	25,87 ± 3,55	8,37 ± 2,32	20,77 ± 4,56
	G.H	A	BCD	B	EF	BC	BCD	CDEF	B	B	GH	BCDE
F <sub>3</sub>	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>
	11,67 ± 1,45	3,63 ± 0,78	22,77 ± 7,23	13,33 ± 3,06	13,33 ± 3,69	12,53 ± 0,35	10,43 ± 1,08	8,20 ± 1,70	7,27 ± 1,55	12,27 ± 2,23	17,53 ± 7,31	4,97 ± 1,50
	G.H	FGHI	JK	BCD	FGH	FGHI	GH	GH	HIJK	HIJK	FGHI	DEF
F <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>0</sub>
	3,50 ± 0,85	0,00 ± 0,00	2,33 ± 1,01	6,57 ± 1,25	5,13 ± 2,49	5,20 ± 2,91	5,60 ± 0,53	5,33 ± 1,15	5,53 ± 3,01	3,03 ± 0,31	2,77 ± 0,55	5,00 ± 1,31
	G.H	JK	JK	HIJK	LJK	LJK	LJK	LJK	LJK	JK	JK	LJK
F <sub>3</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>
	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,93 ± 1,02	0,00 ± 0,00	6,33 ± 3,31	1,05 ± 0,44	0,00 ± 0,00	3,47 ± 0,68
	G.H	K	K	K	K	K	K	K	HIJK	K	K	JK

Annexe 22 : Poids frais des cals secondaires développés sur différents milieux de culture.

Milieux	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	Moy. G.
Moy. et écart-type	893,63 ± 26,25	1486,07 ± 116,55	870,00 ± 154,40	847,57 ± 109,23	1001,13 ± 90,18	879,57 ± 82,66	1020,63 ± 48,84	999,80
G. H.	B	A	B	B	B	B	B	

Annexe 23 : Poids sec des cals secondaires développés sur différents milieux de culture.

Milieux	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	Moy. G.
Moy. et écart-type	80,30 ± 5,28	51,23 ± 9,35	94,40 ± 2,52	39,30 ± 1,25	50,20 ± 4,73	32,70 ± 4,16	44,83 ± 4,60	56,14
G. H.	B	C	A	CD	C	D	C	

## RESUME

L'*Atriplex halimus* L., Chénopodiacée halophyte, présente un grand polymorphisme qui mérite d'être exploité dans le cadre de réhabilitation des zones semi-arides et arides. Par ailleurs, l'embryogenèse somatique, chez l'*Atriplex halimus* L., permet d'amplifier et d'élargir les potentialités de sélection de génotypes résistants au stress salin. En vue d'obtenir des cals embryogènes, deux combinaisons (2,4-D, kinétine ; 2,4-D, BAP), ajoutés au milieu de culture GAMBORG (G.) sont testés sur les différents types d'explants issus de deux clones sélectionnés (Plantules développées sur milieu de culture de MURASHIGE et SKOOG) âgés de 45 jours, ainsi que sur les hypocotyles et les feuilles cotylédonaires de plantules âgés de 5 jours. Les résultats obtenus révèlent que toutes les parties de la plante sont aptes à la callogenèse avec des taux atteignant les 100 %. Le meilleur pouvoir callogène (exprimé en poids frais et en poids sec des cals) est obtenu pour les deux combinaisons. Les cals beiges de texture friable (cals embryogènes) sont induit par la combinaison ("2,4-D", "kinétine") pour les entre-nœuds et les fragments de racines.

Les différentes concentrations en sel (0, 5, 10, 15 et 20 g/l de NaCl) induisent un effet très significatif sur la callogenèse, à partir de différents types d'explants issus de clone témoin et d'autres clones résistants au NaCl. Celle-ci est influencée par la complexité physiologique et génétique de la plante entière. En effet, la meilleure aptitude et le meilleur pouvoir callogène sont présentés par le clone sélectionné sur milieu de culture de base MURASHIGE et SCKOOG (M.S.) additionné de 15 g/l de NaCl. Ces potentialités callogènes diminuent avec l'augmentation de la concentration saline dans le milieu jusqu'à s'annulées à 15 g/l de NaCl dans le milieu de callogenèse (M.S. + (1mg/l"2,4-D" + 1 mg/l"BAP").

Quant aux essais de régénération de plantules à partir de cals verts (cals caulogènes développés sur milieu de callogenèse additionné de 5 g/l de NaCl), les différentes combinaisons hormonales ("2,4-D", "AIA", "kinétine" et "BAP") ainsi que les différentes concentrations en AG<sub>3</sub>, induisent une importante croissance des cals. Par ailleurs, les cals développés sur la partie sectionnée des plantules, qui appartiennent au clone développé sur le milieu M.S. additionné de 20 g/l de NaCl, développent deux types de plantules. Le premier type présente des plantules identiques à la plante mère; tandis que le deuxième type présente des plantules sous forme de rosette.

**Mots clés :** *Atriplex halimus* L., Embryogenèse somatique, callogenèse, caulogénèse, salinité.

## SUMMARY

The *Atriplex halimus* L., Chénopodiacée halophyte, presents a big polymorphisme that deserves to be exploited in the setting of semi-arid and arid zone rehabilitation. Otherwise, the somatic embryogenesis, at the *Atriplex halimus* L., permits to amplify and to widen potentialities of resistant genotype selection to the saline stress. In order to get cales embryogènes, two combinations (2,4-D, kinétine ; 2,4-D, BAP), added in the middle of GAMBORG culture (G.) are tested on the different types of explants descended of two clones selected (Plantules developed on middle of culture of MURASHIGE and SKOOG) ages of 45 days, as well as on hypocotyles and leaves cotyledonaires of plantules aged of 5 days. The gotten results reveal that all parts of the plant are capable to the callogène with rates reaching the 100%. The best power callogeny (expressed in cool weight and in dry weight of cales) is gotten for the two combinations. The beige cales of crumbly texture (cales embryogènes) are misled by the combination ("2,4-D", "kinétine") for enter - noeuds and fragments of roots.

The different concentrations in salt (0, 5, 10, 15 and 20 g/l of NaCl) mislead a very meaningful effect on the callogenesis, from different types of explants descended of clone witness and other resistant clones to the NaCl. This one is influenced by the physiological and genetic complexity of the whole plant. Indeed, the best faculty and the best power callogeny are presented by the clone selected on middle of culture of MURASHIGE and SCKOOG basis (M.S.) added of 15 g/l of NaCl. This potentialities callogenes decrease with the increase of the saline concentration in the middle until annulled himself to 15 g/l of NaCl in the middle of callogenesis (M.S. + (1mg/l "2,4-D" + 1 mg/l "kinetine").

As for tests of plantules regeneration from green cales (cales caulogènes developed on middle of callogenesis added of 5 g/l of NaCl), the different hormonal combinations ("2,4-D", "AIA", "kinétine" and "BAP") as well as the different concentrations in "AG<sub>3</sub>", mislead an important growth of cales. Otherwise, cales developed on the part sectioned of plantules, that belong to the clone developed on the M.S. middle added of 20 g/l of NaCl, develop two types of plantules. The first type presents some identical plantules to the plant mother; while the second type presents plantules under shape of bow.

**Words clés :** *Atriplex halimus* L., somatic Embryogenesis, callogenesis, caulogenesis, saltiness.

## ملخص

*Atriplex halimus* L. ، لفصيلة الرمرامية هي نباتات ملحية. إنها تحتوي على أشكال جد متنوعة تستحق أن تستغل في إطار اعتبار المناطق الشبه الجافة و الجافة. من جهة أخرى، التوليد الجنيني من الخلايا الجسدية، عندا لـ *Atriplex halimus* L. تسمح بمضاعفة و توسيع المقدرة على انتقاء الأنماط الوراثية المقاومة للإجهاد الملحي من أجل الحصول على كالوس جنيني بالتأليفين ( "2,4-D" - "BAP" و "2,4-D" - "kinétine" ) مضافة إلى الوسط الزرع GAMBORG، ثم اختبارهم على أجزاء نباتية مأخوذة من كلونين منتقيين (نبات نامي في وسط زرع MURASHIGE و SKOOG ) عمرهما 45 يوم و على السويقات الجنينية السفلى و الأوراق الفلجية مأخوذة من نبت عمره 5 أيام. فقد بينت النتائج المحصل عليها أن كل أجزاء النبتة قادرة على تكوين الكالوس بنسبة عالية وإلى 100%. أحسن قدرة على تكوين الكالوس (عبر عنها بوزن الرطب و الوزن الجاف للكالوس) حصل عليه باستعمال التأليفين. أما الأسمر الفاتح ذو البنية القابلة للتفتت (كالوس جانيني) فقد حصل عليه باستعمال التأليفة ( "2,4-D" - "kinétine" ) على أجزاء النبت ما بين العقد و أجزاء الجنور.

كما نجد أن مختلف التراكيز الملحية (0 ، 5 ، 10 ، 15 ، 20 غ NaCl/l) أثرت على تكوين الكالوس من طرف الأجزاء النباتية المأخوذة من الكلون الشاهد و الكلون المقاوم للـ NaCl. حيث أن هذه الأخيرة متأثرة بالتعقد الفيزيولوجي و الوراثي للنبتة كلها. هكذا فإن أحسن استعداد و أحسن قدرة على تكوين الكالوس مثلت من طرف الكلون المنتقى على وسط الزرع القاعدي MURASHIGE و SKOOG مضاف إليه 15 غ NaCl/l. هذه القدرات على تكوين الكالوس تتناقص مع تزايد التراكيز الملحية في وسط تكوين الكالوس (M.S. + 1مغ/l "2,4-D" + 1مغ/l "kinétine").

أما بالنسبة إلى تجارب إعادة تكوين النبت من طرف الكالوس الأخضر ( كالوس تكوين النبت و المتطور في وسط تكوين الكالوس مضاف إليه 5 غ NaCl/l )، فمختلف التأليفات الهرمونية ( "4,2-D" ، "AIA" ، "kinétine" و "BAP" ) وكذلك مختلف تراكيز الـ "AG<sub>3</sub>" أحدثت نمو كبير للكالوس. من جهة أخرى الكالوس المتطور على الجزء المجروح للنبتة، والتي تنتمي إلى الكلون النامي في الوسط S.M مضاف إليه 20 غ NaCl/l طور نوعين من النبت. النوع الأول عبارة عن نبت مشابه للنبتة الأم. أما النوع الثاني، فهو عبارة عن نبت على شكل عقدة وردية.

الكلمات الدالة : *Atriplex halimus* L. ، التوليد الجنيني من الخلايا الجسدية، تكوين الكالوس، كالوس تكوين النبت، الملوحة