

**Micropropagation d'un arbuste sylvo-pastoral, *Atriplex halimus* L.  
(Chénopodiacées)**

Souayah N., Khouja M.L., Rejeb M.N., Bouzid S.

*in*

Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.).  
Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens

Zaragoza : CIHEAM  
Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62

2004  
pages 131-135

Article available on line / Article disponible en ligne à l'adresse :

<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=4600145>

To cite this article / Pour citer cet article

Souayah N., Khouja M.L., Rejeb M.N., Bouzid S. **Micropropagation d'un arbuste sylvo-pastoral, *Atriplex halimus* L. (Chénopodiacées)**. In : Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). *Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens*. Zaragoza : CIHEAM, 2004. p. 131-135 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62)



<http://www.ciheam.org/>  
<http://om.ciheam.org/>

# Micropropagation d'un arbuste sylvo-pastoral, *Atriplex halimus* L. (Chénopodiacées)

N. Souayah\*, M.L. Khouja\*, M.N. Rejeb\* et S. Bouzid\*\*

\*Institut National de Recherches en Génie Rural, Eaux et Forêts, BP 2, Ariana, Tunisie

\*\*Faculté des Sciences de Tunis

---

**SUMMARY** – "*Micropagation of a sylvopastoral shrub, Atriplex halimus L. (Chenopodiaceae)*". *Atriplex halimus L.*, is a fodder shrub tolerating severe conditions of drought and salinity. This species constitute the best material to valorize degraded and marginal areas and to contribute to the improvement of phytomasse and cattle size. The aim of this work is to optimize different *in vitro* micropropagation techniques and to obtain performed and homogenous plants. Therefore, acclimatized and transplanted plants in the field were obtained, by axillary bud micropropagation. During these experiments, the role playing by endogenous and exogenous factors as well as their interdependency has been shown up.

**Key words:** *Micropagation, vitroculture, Atriplex halimus, forage shrubs.*

---

## Introduction

*Atriplex halimus* L. est un arbuste fourrager autochtone qui tolère bien les conditions d'aridité (sécheresse, salinité,...). Cette espèce peut contribuer à la valorisation des sols marginaux et dégradés et à l'amélioration des productions végétale et animale dans plusieurs régions démunies (Le Houérou, 1992). La propagation d'*Atriplex halimus* par la voie sexuée donne une descendance très hétérogène. La maîtrise de différentes techniques de multiplication végétative s'impose-t-elle pour pallier ces difficultés. La micropropagation *in vitro* est une voie de multiplication qui permet d'obtenir rapidement et en grande quantité des clones homogènes et performants. Plusieurs espèces du genre *Atriplex* ont fait l'objet de travaux de recherche. Les premiers travaux ont porté sur l'aspect fourrager et la nutrition minérale, la résistance et la tolérance à la salinité et à la sécheresse (Le Houérou, 1992). Le polymorphisme prononcé chez ce genre a également intéressé les taxonomistes et les généticiens (Runciman et Malcolm, 1989). Toutefois, on signale peu de travaux consacrés à la multiplication végétative *in vitro* (Wochoc et Sluis, 1980 ; Stringi *et al.*, 1994 ; Kenny et Caligari, 1996 ; Reddy *et al.*, 1996). Chez *A. halimus* les travaux effectués se sont intéressés au phénomène de callogenèse (Ben Rebiha *et al.*, 1992) et à l'étude de comportement des graines, des cals et des fragments de plantules relatifs vis à vis d'un stress salin (Souayah *et al.*, 1996). Dans ce travail nous présenterons une approche biotechnologique des différentes étapes de la micropropagation.

## Matériel et méthodes

Le matériel végétal est prélevé sur des pieds-mère adultes âgés d'une dizaine d'années, sélectionnés et mis en défens dans le périmètre pastoral d'El-Alam, de la région de Kairouan (Centre de la Tunisie). Cette région est située dans le bioclimat aride supérieur et caractérisée par un régime pluviométrique irrégulier et des sols salins. Les rameaux prélevés, débarrassés de leurs feuilles, sont stérilisés et débités en microboutures de nœuds, de 1,5 à 2 cm de longueur. Le milieu de culture de base renferme les macroéléments minéraux de Murashige et Skoog (1962) dilués de moitié (M1). Ce milieu peut renfermer 3 g<sup>l</sup><sup>-1</sup> de NaCl (M2). Des régulateurs de croissance (benzyl-aminopurine ou BAP; acide naphthalène acétique ou ANA) sont additionnés aux milieux de culture avec diverses concentrations et combinaisons. Ces différents milieux sont complétés avec une solution vitaminique, de 20 g<sup>l</sup><sup>-1</sup> de saccharose et solidifiés avec de la gélose à 7 g<sup>l</sup><sup>-1</sup>. Le pH est ajusté à 5,7 avant autoclavage pendant 20 minutes à 115°C. Les microboutures (herbacées ou semi-ligneuses) ont été repiquées verticalement en polarité normale. Les cultures ont été placées dans des enceintes climatisées maintenues à 26°C +/- 1 et éclairées pendant 16 heures / 24 heures. Après un trempage dans l'alcool 70°, les boutures sont d'abord placées dans une solution de chlorure de mercure (Hg Cl<sub>2</sub>) à 1% pendant 15 minutes, puis dans une solution d'hypochlorite de calcium (70 g<sup>l</sup><sup>-1</sup>) pendant 20

ou 30 minutes. Les boutures sont ensuite rincées quatre fois dans l'eau distillée stérile. L'étape de la multiplication consistait à chercher les conditions optimales de caulogenèse en fonction de l'âge des microboutures et des différents milieux de culture. L'étape de l'enracinement a porté sur deux types d'explants : les microboutures initiales d'une part, et les pousses axillaires, obtenues *in vitro* d'autre part. L'étape de l'acclimatation des vitroplants est précédée d'une phase de pré-acclimatation. Plusieurs substrats ont été utilisés (sable stérile, 1/2 sable + 1/2 tourbe, 1/3 sable + 2/3 tourbe, tourbe) dans différentes conditions de culture.

## Résultats

Les résultats obtenus montrent que les cultures herbacées sont les moins infectées mais également les plus sensibles aux traitements prolongés. Chez les microboutures semi-ligneuses, le taux de cultures aseptiques et viables a atteint 92%. Par contre, les microboutures ligneuses sont difficiles à aseptiser.

### Phase de multiplication

La culture des microboutures sur les milieux M1 ou M2 permet le débourrement des bourgeons existants à l'aisselle des feuilles. Les résultats obtenus montrent que le temps de réaction des bourgeons est d'autant plus réduit que le milieu de culture renferme une solution minérale diluée. On observe le développement de 2 à 3 pousses axillaires par explant. Ces pousses paraissent identiques au pied-mère, présentant des noeuds bien espacés et des feuilles généralement alternes et bien chlorophylliennes. Au cours des essais préliminaires effectués sur des milieux de culture renfermant les éléments minéraux de MS entier, un nombre élevé des pousses axillaires qui se sont développées présente des tiges et des feuilles gorgées d'eau, cassantes et moins chlorophylliennes. Ce phénomène appelé vitrification a diminué considérablement au niveau des milieux M1 et M2. L'addition de la BAP améliore le taux de débourrement. La multiplication axillaire est élevée pouvant atteindre un multiple de 13 (Fig. 1), dès la première culture. Le nombre de pousses axillaires vigoureuses et non vitrifiées augmente lorsque la concentration de BAP diminue. Les microboutures semi-ligneuses sont plus réactives et donnent plus de pousses que les microboutures herbacées. Chez ces dernières, le débourrement est plus rapide. L'addition de NaCl à  $3 \text{ g l}^{-1}$  est également favorable à la caulogenèse. Sur les milieux enrichis de substances de croissance, les pousses axillaires présentent souvent des feuilles opposées qui rappellent la morphologie juvénile de la plante.



Fig. 1. Multiplication axillaire.

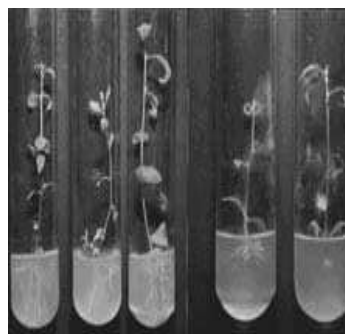


Fig. 2. Enracinement des vitropousses.

### Multiplication des vitropousses

Les pousses axillaires séparées, débitées et repiquées de nouveau sur le milieu M1 ou le milieu M2 développent de plus en plus de pousses axillaires avec un taux de multiplication qui varie entre 2 et 5 (Tableau 1). En présence de la BAP, seule ou en combinaison avec l'ANA, le taux de multiplication peut atteindre 8 à 13. Le meilleur taux est obtenu en présence de  $(2 \text{ ANA } 10^{-7} \text{ M} + \text{BAP } 10^{-6} \text{ M})$ . Les pousses peuvent s'enraciner et continuer de croître de façon régulière, en se ramifiant, surtout dans la partie basale. Les explants subcultivés sur un milieu renfermant seulement la BAP

sont bien allongés et bien chlorophylliens et ne présentent pas de callogenèse. Par contre, au niveau des milieux renfermant simultanément auxine et cytokinine, le taux de multiplication est plus élevé, mais l'hyperhydricité, la callogenèse et la pigmentation bétainée sont plus importantes. Pour éviter ce phénomène de vitrification, les pousses feuillées sont transférées dans les bocaux renfermant le milieu de culture de base (M1 ou M2).

Tableau 1. Effet des milieux de culture sur le taux de multiplication à partir de pousses axillaires d'*Atriplex halimus* L.

Milieux de culture	Nbre total de noeuds cultivés	Nbre d'explants non développés	Nbre total de noeuds obtenus	Nbre moyen de noeuds	Nbre total de pousses axillaires	Taux de multiplication
M1	31	4	160	4,16	32	2,6
	33	3	174	4,27	34	2,8
M2	32	0	182	4,68	35	2,9
	32	2	176	4,5	32	2,6
M1+ (BAP) $10^{-7}$	33	1	322	9,75	104	8,6
	32	2	310	9,68	98	8,16
M2 + (BAP) $10^{-7}$	30	1	274	9,13	92	7,66
	33	1	266	8,06	95	7,9
M1 + (ANA) $10^{-7}$ + (BAP) $10^{-6}$	32	0	372	11,6	125	10,41
	33	1	387	11,72	122	10,16
M1 + 2(ANA) $10^{-7}$ + (BAP) $10^{-6}$	32	0	484	15,12	158	13,16
	34	1	478	14,05	143	11,91

## Phase de la rhizogenèse

Des racines se sont développées à la base des microboutures initiales, qui ont été prélevées sur les pieds-mère. L'enracinement est observé même sur les milieux M1 et M2. Le taux d'enracinement s'améliore en diluant la solution minérale. Nous avons noté que, dans 99% des cas la première racine s'initie du côté du bourgeon. Nous observons même des alignements de racines du côté du bourgeon. De même, les pousses feuillées prélevées au niveau des aisselles des microboutures développent des racines sur les milieux de culture dépourvus d'hormones avec un taux de 60% (Tableau 2).

Tableau 2. Effet du milieu de culture sur l'enracinement des pousses axillaires chez *Atriplex halimus* L.

Milieux de culture	Nbre d'explants enracinés	Enracinement en %	Nbre total de racines	Nbre moyen des racines
M1	29	60	95	3,29
M2	35	73	150	4,28
M2 + (ANA) $10^{-7}$	43	89	428	9,95
M2 + (ANA) $10^{-6}$	37	77	225	6,08
M2 + (ANA) $10^{-5}$	22	46	78	3,54

L'addition de l'ANA à  $10^{-7}$  M permet d'améliorer ce taux jusqu'à 100%. Les racines apparaissent après 2 à 3 jours de culture. Le nombre et la longueur moyenne des racines sont également améliorés. Il faut noter que les doses élevées d'auxines (M2 + ANA  $10^{-5}$  M) sont inhibitrices de la rhizogenèse et les racines se développent à partir d'un cal. Dans les conditions les plus favorables (M2 + ANA  $10^{-7}$  M), aucun cal n'est visible à la base des explants. Les racines se développent rapidement et la tige feuillée s'allonge bien. Ce comportement met en évidence la bonne connexion entre les deux parties des vitroplants, dont la probabilité d'être acclimatés devient élevée.

## Phase de l'acclimatation

Les vitroplants enracinés atteignant 6 à 10 cm sont prélevées des tubes à essais ou des bocaux

pour être acclimatés. Le meilleur taux de vitroplants acclimatés est obtenu avec un conditionnement progressif à l'étape *ex-vitro* et un substrat bien structuré (2/3 tourbe et 1/3 sable stérile). Ces vitroplants présentent plus au moins des modifications morphologique et physiologique. Les feuilles de ces vitroplants sont de petite taille et possède un épiderme simple. En pépinière, après 4 à 6 mois, les axillaires de la base démarrent et développent des tiges orthotropes. Les plants présentent un développement basitone (Fig. 3). L'observation de ces plants après leur transfert au champ (Fig. 4), durant deux années montre qu'ils sont homogènes et conformes au pied-mère.



Fig. 3. Acclimatation en pépinière.



Fig. 4. Plants d'*Atriplex halimus* installés au champ.

## Discussion et conclusion

Les microboutures herbacées sont les moins infectées mais également les plus sensibles aux traitements prolongés. Par contre, les microboutures ligneuses sont difficiles à aseptiser. La propension à bourgeonner peut être expliquée par une croissance continue chez cette espèce arbustive, ainsi que la présence de plusieurs bourgeons au niveau d'une aisselle foliaire (Souayah, 2000). C'est ce qui expliquerait la disposition de ses rameaux imbriqués et l'aspect de son port. En présence de BAP, ce comportement morphogénétique est amplifié. Ce phénomène a été observé, *in vitro*, chez *Acacia cyanophylla* (Souayah, 1993). De même, l'état physiologique et la période de prélèvement influencent considérablement cette étape du fait de l'intervention des substances de croissance endogènes surtout au niveau des explants semi-ligneux. En effet, la période printanière qui correspond à une activité physiologique importante et un flux ascendant est la période la plus favorable à une multiplication intense d'axillaires. Les vitropousses présentent souvent des feuilles opposées qui rappellent la morphologie juvénile de la plante. Ceci dénote une certaine réjuvenisation qui peut avoir des conséquences positives sur les expériences ultérieures. Cependant, *A. halimus* fait partie des espèces qui présentent un phénomène de vitrification des pousses feuillées (Wochoc *et al.*, 1980), qu'il faut réduire en utilisant une solution diluée et de faibles concentrations hormonales. L'addition de NaCl a réduit également ce phénomène. La rhizogenèse, phénomène plutôt difficile chez la majorité des ligneux est obtenu au niveau de microboutures initiales, chez cette espèce. Les résultats ont montré que l'enracinement s'améliore en diluant la solution des macro-éléments, en présence de l'ANA. Ces résultats mettent en évidence la grande aptitude de cette espèce pionnière, le rôle du milieu de culture ainsi que l'état physiologique de l'explant dans l'organogenèse racinaire. Au niveau des pousses qui sont herbacées et présentant un certain rajeunissement, l'enracinement est plus rapide et plus important. Au cours de la phase d'acclimatation, les plants présentent au début de leur développement des feuilles de petite taille, un état herbacé et un port prostré. Ces modifications sont dues aux conditions de miniaturisation (Coudret et Sallanon, 1992) et de croissance en milieu de culture saturé en eau. Elles disparaissent progressivement et les plants ressemblent de plus en plus aux pieds-mère.

La micropropagation d'*Atriplex halimus* L. a permis d'obtenir un nombre élevé de clones conformes aux pieds-mère adultes sélectionnés. Ainsi, en tenant compte des conditions de culture optimales, des capacités endogènes des explants de nœuds et des pertes qui peuvent survenir au cours des différentes étapes (infection, vitrification, plantule chétive, nécrose des plants pendant la pré-acclimatation, le sevrage ou le transfert au champ...), une estimation théorique pourrait être effectuée pour évaluer le nombre de vitroplants acclimatés possible à obtenir en une année. En considérant un taux moyen de 4 à 5 pendant toutes les 4 à 5 semaines au cours de 9 mois, il serait possible d'obtenir un nombre de plants de l'ordre de 18.000 par an.

## Remerciements

Les auteurs remercient le Professeur Pierre Dutuit de l'Université de Paris-Sud XI pour la lecture du manuscrit. Ce travail a été co-financé par le Projet Européen STD3 N°TS.CT94-0264.

## Références

- Ben Rebiha F., Pourrat Y. et Dutuit P. 1992. Induction de la callogenèse chez l'*Atriplex halimus* sur des milieux de culture dépourvus d'hormones de croissance. Rôle des éléments minéraux. *Bull. Soc. Bot. Fr*, 139, *Lettres Bot.*, (3) : 219-222.
- Coudret A. et Sallanon H. 1992. Relation entre la physiologie, la morphogénèse des *vitro*-plants et leur environnement gazeux. *Bull. Soc. Bot. Fr*, 139, *Lett. bot.*, (4/5) : 397-411.
- Le Houérou H.N. 1992. The role of saltbushes (*Atriplex* spp) in arid lands rehabilitation in the mediterranean Basin : a review. *Agroforestry Systems*, 18 : 107-148.
- Kenny L. et Caligari P.D.S. 1996. Androgenesis of the salt tolerant shrub *Atriplex glauca*. *Plant Cell Reports*, 15(11) : 829-832.
- Murashige T. et Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15 : 473-497.
- Reddy M.P., Rao U.S., Ungar E.R.R. 1996. *In vitro* propagation and related biochemical changes in *A. nummularia* L, in Saline conditions. *Ind. J. of Pl. Physiol.*, (1) : 10-13.
- Souayah N.; 1993. Essais de multiplication végétative et étude du comportement morphogénétique *in vivo* et *in vitro* de l'*Acacia cyanophylla* L. D.E.A. Fc.Sc.T. 80 pp.
- Souayah. N. 2000. Nouvelles possibilités d'obtention et de multiplication rapide de clones d'*Atriplex halimus* L. par micropropagation *in vitro* à partir d'organes végétatifs et reproducteurs. Approches morphogénétique et physiologique. Thèse de Doctorat en Biologie. Fac.Sc. de Tunis. TUNISIE. 172 pp.
- Souayah N., Moran Robles M., Bajji M., Kinet J.M. 1996. Approche pour la sélection de lignées cellulaires sensibles ou résistantes au stress salin. Deuxième Séminaire du Réseau ATRIPLEX-STD-3, Louvain la Neuve -Belgique. pp. 68-83.
- Stringi L., Accardo A. and Giambalvo D. 1994. Breeding methodology in forage shrubs. *Cahiers options méditerranéennes*, vol 4 : 13-34.
- Wochoc Z. S. and Sluis C.J. 1980. Gibberellic acid promotes *Atriplex* shoot multiplication and elongation. *Plant Science letters*, 17 : 363-369.
- Zaafouri M.S., Akrimi N., Le Floch C.F.E. et Pontannier R. 1994. Les plantations sylvo-pastorales en Tunisie présaharienne. *Sécheresse*, 5 : 265-275.