

Régénération *in vitro* de plantes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) adaptées au NaCl

Messaï Abir^{1*}, C. Hannachi¹ & E. Zid²

Keywords: Tomato- *In vitro* regeneration- Leaf callus- Internodes callus- Adapted-plant- Salinity- Tunisia

Résumé

Des plantules de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), variété Sabra, issues de semis des graines *in vitro* sont utilisées pour le prélèvement de segments d'entre-nœuds et de fragments de feuilles. Ces deux types d'explants sont cultivés sur le milieu de Murashige et Skoog (17) contenant de l'ANA 0,2 mg.l⁻¹ et de la BA 2 mg.l⁻¹, additionné ou non de NaCl 3 et 6 g.l⁻¹ pour régénérer des plantes tolérantes à la salinité. Les résultats obtenus montrent que les deux types d'explants forment des cals en absence et en présence de NaCl. Cependant le sel du milieu affecte la croissance et la nutrition minérale des cals. La croissance des cals est stimulée par NaCl à 3 g.l⁻¹ et diminuée à 6 g.l⁻¹. La présence de sel dans le milieu de culture augmente significativement les teneurs en Na⁺ et Cl⁻ des deux types des cals, diminue légèrement les teneurs en K⁺, alors qu'il reste sans effet marqué sur celles de Ca²⁺. Les cals foliaires présentent des teneurs en Ca²⁺ et en K⁺ plus élevées et montrent une meilleure tolérance au sel que les cals caulinaires. Ces derniers ne régénèrent des pousses qu'en absence de NaCl alors que les cals foliaires adaptés au NaCl (3 g.l⁻¹) régénèrent des pousses. Cependant la plupart des pousses régénérées sont atteintes d'hyperhydricité. Celles qui échappent à ce phénomène évoluent en plantes entières après enracinement et acclimatation. Cultivées dans la tourbe sous serre, ces plantes tolèrent également 3 g.l⁻¹ de NaCl additionné dans la solution d'irrigation.

Summary

In vitro Regeneration of NaCl-adapted Tomato Plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

In vitro growth seedlings of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Var. Sabra) were used as source of explants: internode segment and leaf fragment. These explants were cultivated into a MS-based medium containing 0.2 mg.l⁻¹ ANA and 2 mg.l⁻¹ BAP, supplemented or not with NaCl at 3 and 6 g.l⁻¹ in order to regenerate salt-tolerant plants. Results show that internode's segment and leaf fragment formed callus both in the control and in the saline media (3 and 6 g.l⁻¹). However NaCl affected calli growth and mineral uptake. The callus growth was stimulated by NaCl at 3 g.l⁻¹, but reduced at 6 g.l⁻¹. Na⁺ and Cl⁻ content of calli increased in saline media with respect to the control. K⁺ content decreased slightly with salinity, but Ca²⁺ content did not change. Leaf callus showed higher K⁺ and Ca²⁺ contents both in the control and saline media and were more salt tolerant than internodes callus. Latest ones regenerated shoots only on control medium. Leaf callus adapted to 3 g.l⁻¹ NaCl were able to regenerate shoots, but with high percentage of hyperhydricity. Regenerated plants were rooted and acclimatized successfully and they tolerated 3 g.l⁻¹ NaCl added to irrigation solution, when cultivated on peat under glasshouse.

Introduction

La tomate est le légume le plus consommé dans le monde après la pomme de terre. Elle est cultivée sous presque toutes les latitudes avec une superficie d'environ 3 millions d'hectares. Sa culture occupe près du tiers des surfaces mondiales consacrées aux légumes. La production mondiale s'élevait en 1994 à 77,5 millions de tonnes (3). En Tunisie, la tomate se cultive sur une superficie de 24.234 hectares et produit 1.040.100 t.an⁻¹. Cependant, cette production se caractérise par des faibles rendements, allant de 33 t.ha⁻¹ (tomate de plein champ: mars à août) à 63 t.ha⁻¹ (tomate de serre: septembre à juin). En effet, les

rendements qu'on souhaite atteindre sont de l'ordre de 40 à 50 t.ha⁻¹ pour les tomates de plein champ et de 120 t.ha⁻¹ pour les tomates de serre (9). Ces faibles rendements sont dus principalement aux températures basses (≤ 10 °C sous serre) et élevées (≥ 30 °C en plein champ) et, à la salinité (apports excessifs des engrais et irrigation avec des eaux saumâtres 3 à 4 g/l). Cette dernière contrainte perturbe plusieurs processus physiologiques de la plante qui se traduisent par une réduction de la croissance et du développement (6, 22).

En vue de surmonter cette difficulté, deux principales

¹Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage de Chott Mariem, Laboratoire de Cultures maraîchères et de Cultures *in vitro*. ESH, 4042 Chott-Mariem, Sousse, Tunisie.

²Faculté des Sciences de Tunis, Unité d'Ecophysiologie et Nutrition des Plantes, Campus Universitaire, 1060 Tunis, Tunisie.

*M^{lle} Messaï Abir, Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage, BP 47, 4042 Chott-Mariem. Sousse. Tunisie. abir132000@yahoo.fr.

Tel. personnel: 216 97313281. Tel. professionnel: 216 73 348544 - 216 73 348544. Fax: 216 73 348 691.

Reçu le 31.08.05 et accepté pour publication le 13.10.05.

méthodes d'amélioration peuvent être proposées: la sélection gamétique par allofécondations, mutations naturelles, mutations induites et croisements dirigés (13) et la sélection par voie biotechnologique, en pratiquant la culture de cellules ou de cals résistants à NaCl (1, 11). Les travaux de recherche portant sur la sélection des plantes tolérantes au stress salin se sont intensifiés mais restent encore à leur début. Par contre, l'introduction des méthodes biotechnologiques (régénération *in vitro* de plantes adaptées au NaCl ...), amorcée depuis une vingtaine d'années pour suppléer les voies classiques de l'amélioration de l'espèce, constitue une étape prometteuse et utile pour l'étude de mécanismes de tolérance au NaCl et pour la régénération de plantes tolérantes à la salinité. La technique de culture *in vitro*, source de variabilité génétique exploitable dans les programmes d'amélioration de la tolérance à la salinité (19), s'est avérée efficace pour isoler des lignées cellulaires tolérantes au stress salin chez la tomate (15), le tabac (18) et la pomme de terre (7). Les résultats des travaux de recherche de Hannachi *et al.* (8) sur la pomme de terre (variété Claustar) ont montré que les plantes régénérées sur cals cellulaires adaptés au NaCl peuvent tubériser au champ lorsqu'elles sont irriguées avec une eau additionnée de NaCl 4 g/l. Des plantes entières de la famille des Solanacées ont été régénérées à partir de lignées cellulaires sélectionnées pour leur résistance à la salinité et la transmission de ce caractère de tolérance à leur descendance a été observée (12, 18). Dans certains cas, la croissance des cals obtenus sous pression de sélection saline est aussi bonne que celle des cals cultivés sur milieu non salé. De plus, ces lignées tolérantes se développent mieux en présence de sel qu'en son absence (20). Pour la tomate, des cellules adaptées au sel, transférées sur milieu dépourvu de NaCl, puis remises en contact du sel, présentent la même activité de croissance que des cellules témoins cultivées en permanence sur un milieu non salé. Ainsi, pour atteindre ce même objectif chez la tomate (variété Sabra), le présent travail vise à régénérer des plantes à partir des cals caulinaires et foliaires préalablement adaptés au NaCl.

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal de tomate appartient à la variété Sabra. Il se compose de segments d'entre-nœuds et de fragments de feuilles. Ces explants sont prélevés sur des plantes-mères, âgées de 4 semaines, issues de la germination *in vitro* des graines en absence ou en présence de NaCl 3 et 6 g.l⁻¹. Les segments d'entre-nœuds de 4 à 5 mm de longueur et 1 mm de diamètre sont posés horizontalement sur le milieu gélosé. Les fragments de feuilles de 6 à 7 mm de longueur et 4 mm de largeur sont découpés et déposés sur la face dorsale. Cette orientation, ainsi que les blessures occasionnées par la section, favorisent l'induction des cals et la régénération de bourgeons (25, 26).

2. Milieux de culture

La culture des segments de tige et de fragments de feuilles ainsi que les cals correspondants est faite dans le milieu de Murashige et Skoog (17) pour les sels minéraux, macro et oligo-éléments, à l'exception du fer. Ce dernier élément est ajouté sous forme chélatée (EDTA). Le milieu contient, en outre, le saccharose 30 g.l⁻¹, la thiamine-HCl 0.4 mg.l⁻¹, le myo-inositol 100 mg.l⁻¹ et l'agar-agar 8 g.l⁻¹. Les hormones de croissance utilisées sont l'ANA à 0,1 mg.l⁻¹ et la BA à 2 mg.l⁻¹. Les pousses régénérées sur cals sont également cultivées sur le milieu MS additionné d'ANA 0,1 mg.l⁻¹, en vue de leur enracinement. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 par NaOH ou HCl 0.1N. Ce milieu est réparti, après cuisson, dans des récipients, puis autoclavé pendant 20 min à une température de 120 °C, sous une pression de 1 bar. La culture des explants est réalisée dans deux types de récipients: des tubes à essai et des bocaux. Les tubes, de 24 mm de diamètre et 150 mm de longueur, sont fermés par des capuchons en plastique autoclavable.

Après enracinement, les vitroplants sont retirés des tubes à essai, rincés à l'eau distillée pour enlever l'excès de milieu, trempés dans une solution de benlate 1 g.l⁻¹ (50% Benomyl) contre les champignons et ensuite repiqués dans des plaques alvéolées, préalablement remplies de tourbe noire désinfectée. Après 3 semaines d'acclimatation, les plantes sont transférées en pots plastiques (diamètre 16 cm, longueur 20 cm) remplis de tourbe noire désinfectée.

3. Protocole expérimental

3.1. Régénération des pousses

Le milieu de culture (milieu MS, tourbe) est dépourvu ou additionné de NaCl 3 ou 6 g.l⁻¹. Dans le milieu MS, trois traitements sont conçus; 0, 3 et 6 g.l⁻¹ de NaCl, chaque traitement est représenté par 18 explants (segment de tige ou fragment de feuille) à raison d'un explant par tube à essai. Les cals foliaires et caulinaires formés sont fragmentés en 5 à 6 microcals, puis transférés pour une deuxième subculture dans les bocaux à raison de 6 microcals par bocal. Chaque traitement (0, 3 et 6 g/l de NaCl) est représenté par 30 explants (cals caulinaires ou cals foliaires).

3.2. Enracinement des pousses

Les pousses régénérées sont transférées dans des tubes à essai pour l'enracinement (24 pousses régénérées sur milieu témoin, 16 pousses sur milieu additionné de 3 g.l⁻¹, aucune pousse n'est obtenue à 6 g.l⁻¹). Les plantes enracinées obtenues sont cultivées sur tourbe dans des pots plastiques. Les concentrations de NaCl d'origine sont conservées.

4. Conditions environnementales

Après une semaine de culture à l'obscurité, les explants sont éclairés avec une intensité de 35 µmol. de photons.m⁻².s⁻¹ (chambre de culture), à une

température de 24 °C, jusqu'à l'apparition des cals. Les vitroplants, cultivés dans des plaques alvéolées sont maintenus à une température de 23 °C et une humidité saturante (chambre de culture) durant 3 semaines puis, ils sont transférés dans une serre plastique (culture dans des pots plastiques) où la température est de 23 °C et l'humidité relative de 76%.

5. Paramètres mesurés

Les masses de matière fraîche et de matière sèche des cals cellulaires sont déterminées à l'aide d'une balance Mettler de précision 0,01 mg. La matière sèche est mesurée après un séjour de 48 h dans une étuve à 80 °C. L'indice de sensibilité au NaCl est calculé par la différence entre la masse de matière sèche des cals obtenus sur NaCl et celles des cals obtenus sur milieu dépourvu de NaCl, exprimée en % du témoin.

6. Extraction et dosage des ions minéraux

Les cals cellulaires séchés sont mis dans des piluliers contenant 25 ml d'acide nitrique 0,1N. L'extraction des ions a lieu à la température ambiante du laboratoire pendant au moins 48 h. Les ions K^+ , Na^+ et Ca^{2+} sont dosés par spectrophotométrie de flamme en émission (photomètre Eppendorf). L'ion Cl^- est dosé par colométrie à l'aide d'un chloridomètre (Buchler-Cotlove). Les teneurs ioniques sont exprimées en $meq.g^{-1}$ MS ou en $\mu eq.g^{-1}$ MS. La fraction ionique équivalente $K/(K+Na)$ est déterminée sur les teneurs ioniques. Rapportée à la fraction ionique $K/(K+Na)$ dans le milieu de culture, elle permet de définir la sélectivité K/Na de l'accumulation des tissus (cals).

Résultats

1. Production de cals

1.1. Observations des cals

Après 4 semaines de culture, les segments de tiges et les fragments de feuilles forment des cals cellulaires aussi bien en absence qu'en présence de NaCl. Le cal caulinaire apparaît au niveau des deux sections, puis se généralise à l'ensemble de l'explant. Le cal foliaire débute à la périphérie de lésions occasionnées, puis s'étend progressivement aux tissus non lésés de l'explant. Les deux types de cals cellulaires sont garnis de nodules verts. En absence de NaCl dans le milieu de culture, les cals issus d'explants foliaires ou caulinaires sont verts et compacts tandis qu'en présence de NaCl à $3g.l^{-1}$, les cals deviennent vert-clair (face supérieure) à jaune (face inférieure) et compacts. En outre, sous la concentration double de NaCl ($6g.l^{-1}$), la majorité des deux types de cals brunissent. La texture friable l'emporte sur la texture compacte. Fragmentés et remis en culture durant 2 semaines en absence ou en présence de NaCl, les cals nodulaires compacts verdâtres ou bruns bourgeonnent et régénèrent des pousses (Figure 1).

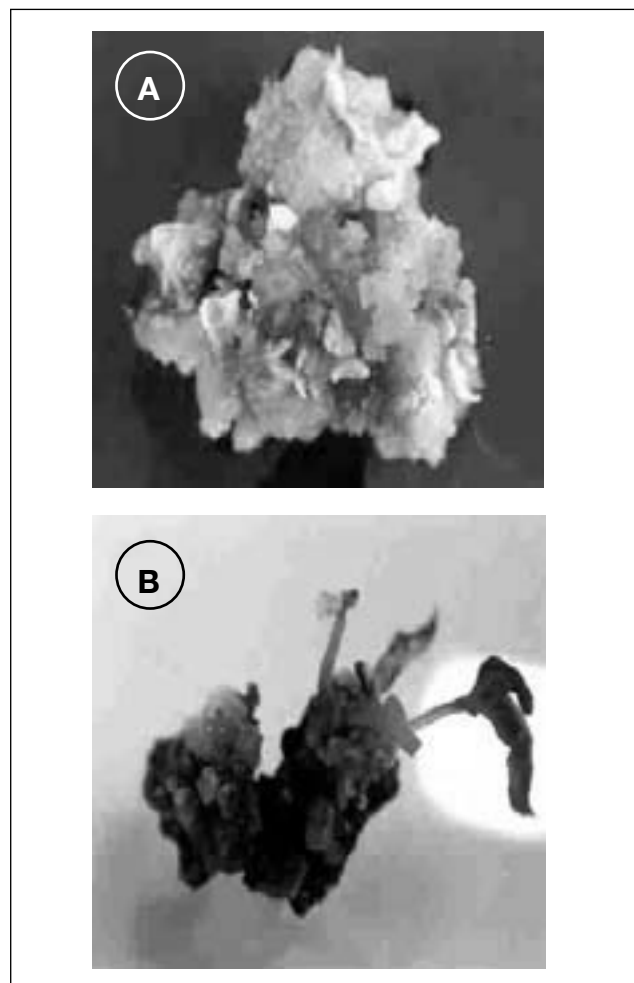


Figure 1: Cals nodulaires compacts, verdâtres et bruns régénérant de pousses, obtenus, en absence (A) et en présence (B) de NaCl $3g.l^{-1}$.

1.2. Croissance des cals

Après 4 semaines de culture, les matières fraîche et sèche des cals caulinaires et des cals foliaires sont déterminées (Figure 2).

En présence comme en absence du sel dans le milieu de culture, les cals caulinaires produisent plus de matière fraîche que les cals foliaires. En effet, sur milieu témoin, la matière fraîche des cals caulinaires est égale à 3.400 mg et seulement 2.900 mg chez les cals foliaires. Sous contrainte saline, la concentration $3g/l$ NaCl stimule significativement la production de biomasse fraîche chez les cals caulinaires (+ 34% par rapport à la biomasse fraîche des cals caulinaires témoins), alors que celle des cals foliaires est peu augmentée (+3,33% uniquement). Par contre, la double concentration ($6g/l$), provoque une diminution significative de la biomasse fraîche des deux types de cals, soit une diminution de 35% au niveau des cals foliaires à 50% au niveau des cals caulinaires (Figure 2a).

Concernant la production de matière sèche, la figure 2b montre qu'en absence du stress salin, les cals caulinaires produisent plus de matière sèche que les cals foliaires (une différence de 20%). L'addition

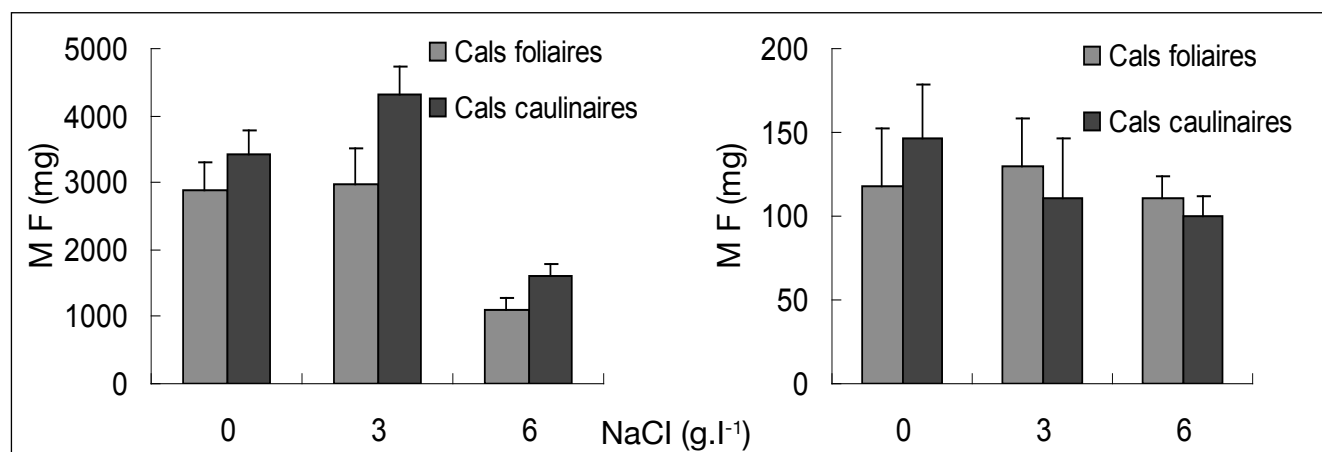


Figure 2: Matière fraîche (a) et sèche (b) des cals foliaires et des cals caulinaires de tomate (var. Sabra) cultivés *in vitro* pendant quatre semaines, en absence et en présence de NaCl (3 g.l⁻¹ et 6 g.l⁻¹).

Chaque histogramme représente la moyenne de 8 échantillons. Les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 95%.

du sel dans le milieu de culture donne une légère stimulation de production chez les cals foliaires (3 g/l) et par contre engendre une diminution de MS (3 et 6 g/l) chez les cals caulinaires.

1.3. Composition minérale des cals

La détermination des teneurs des cals en ions K⁺, Ca²⁺, Na⁺ et Cl⁻ a révélé des différences dans la nutrition minérale des deux types de cals. En effet, en absence comme en présence de NaCl, les cals

foliaires sont plus riches que des cals caulinaires en K⁺. La présence de NaCl dans le milieu de culture, baisse les teneurs en K⁺ des deux types de cals surtout à la concentration 6 g.l⁻¹ (Figure 3). Les teneurs en Ca²⁺ des cals foliaires sont légèrement plus élevées que celles des cals caulinaires. Le sel du milieu de culture des explants, semble avoir peu d'influence sur les teneurs en Ca²⁺ des deux types de cals à la concentration 3 g.l⁻¹. Par contre à 6 g.l⁻¹, un effet légèrement dépressif de NaCl se manifeste (Figure 3).

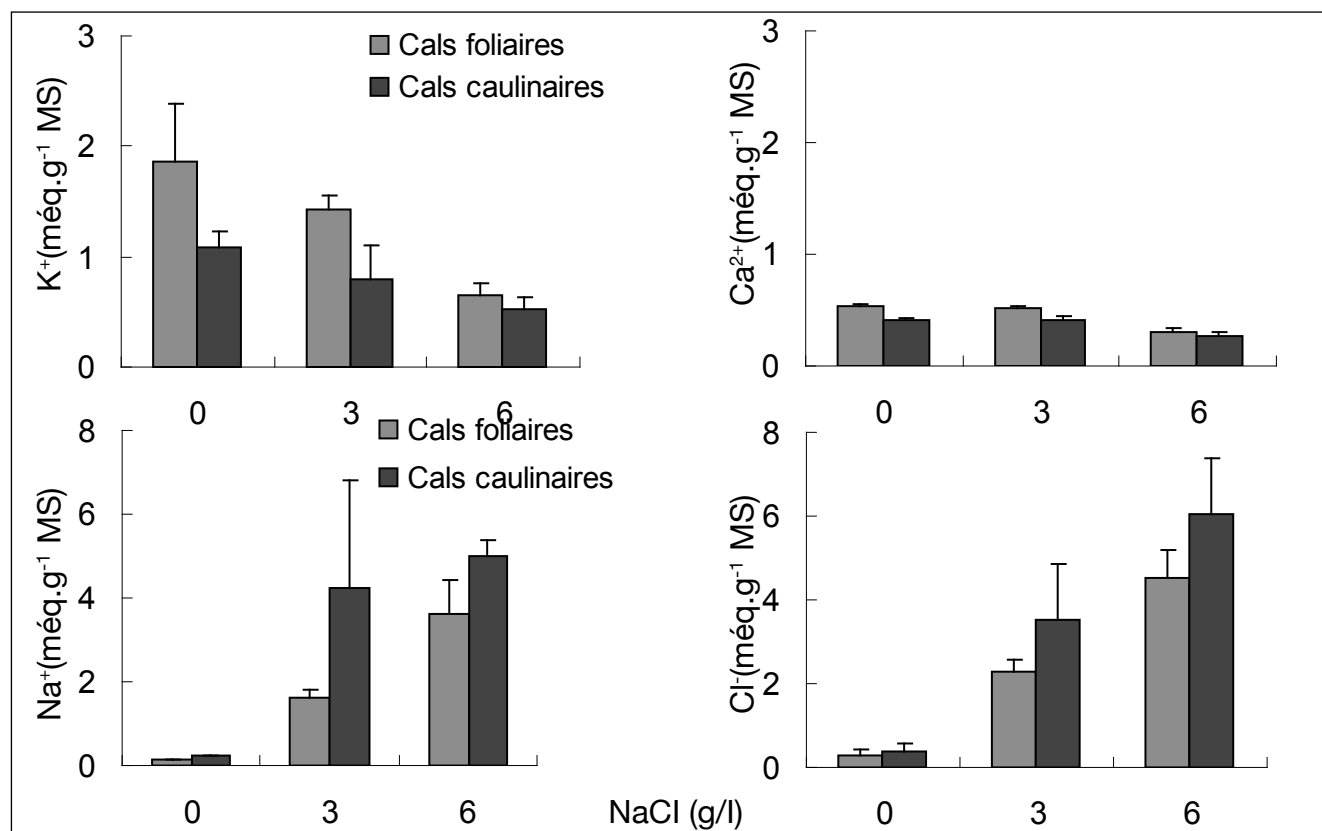


Figure 3: Teneurs en K⁺(a), Ca²⁺(b), Na⁺(c) et Cl⁻(d) des cals foliaires et des cals caulinaires de tomate (var. Sabra) cultivés *in vitro* pendant quatre semaines en absence et en présence de NaCl (3 g.l⁻¹ et 6 g.l⁻¹).

Chaque histogramme représente la moyenne de 8 échantillons. Les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 95%.

Tableau 1
Taux de régénération de cals caulinaires ou foliaires de tomate (var. Sabra),
cultivés en absence ou en présence de NaCl (3 et 6 g.l⁻¹)

NaCl (g.l ⁻¹)	Pourcentage de Cals régénérateurs		Nombre moyen de pousses régénérées par cal	
	Cals caulinaires	Cals foliaires	Cals caulinaires	Cals foliaires
0	26,70	76,7	1,4	12,5
3	0	43,3	0	6,5
6	0	0	0	0

Concernant les deux ions salins, Na⁺ et Cl⁻, en condition témoins, les teneurs en Na⁺ et Cl⁻ des deux types de cals sont très faibles. Sur les milieux enrichis en sel, les cals foliaires et les cals caulinaires accumulent des quantités significativement importantes et comparables de Na⁺ et Cl⁻ surtout avec la plus grande concentration (6 g.l⁻¹). Néanmoins, au niveau des deux concentrations de NaCl, cette accumulation est plus forte au niveau des cals caulinaires (Figure 3).

2. Régénération de pousses

2.1. Morphologie des pousses régénérées

Les pousses régénérées sur milieu témoin à partir de fragments foliaires possèdent des feuilles pétioleées, à limbe plat vert foncé, couvertes de poils sur les deux faces. Celles régénérées en présence de NaCl 3 g.l⁻¹ présentent des feuilles succulentes, munies d'un pétiole charnu et d'un limbe vert clair; d'autres sont anormales et disproportionnées (formées uniquement de feuilles développées dépourvues de pétiole et gorgées d'eau). Ce phénomène d'hyperhydricité est suivi par le dessèchement et le brunissement des pousses.

2.2. Taux de régénération des pousses

Le calcul du pourcentage des cals régénérateurs par rapport au nombre de cals formés montre qu'aussi bien en absence qu'en présence de NaCl, le taux de régénération des cals est nettement plus élevé chez les cals foliaires que chez les cals caulinaires. Néanmoins la présence de NaCl dans le milieu de culture exerce un effet dépressif sur le nombre de cals régénérateurs, ainsi que sur leur capacité régénératrice (Tableau 1). En effet, sur milieu témoin, le pourcentage des cals régénérateurs est de 77% pour les cals foliaires alors qu'il est de 27% seulement pour les cals caulinaires. En présence de NaCl 3 g.l⁻¹, le taux de régénération est réduit de plus de 30% au niveau des cals foliaires et s'annule pour les cals caulinaires. Pour les deux types de cals, la régénération est inhibée en présence de NaCl 6 g.l⁻¹.

La capacité régénératrice des cals, évaluée par le nombre de pousses régénérées par cal, est estimée à un nombre moyen de 12,5 (pousses par cal) pour les cals foliaires et à 1,4 (pousses par cal) uniquement pour

Tableau 2
Indice de sensibilité à NaCl des cals caulinaires et des cals
foliaires de tomate (var. Sabra), après 4 semaines de culture
sur milieux enrichis en NaCl (3 et 6 g.l⁻¹)

NaCl (g.l ⁻¹)	Cals caulinaire	Cals foliaires
3	-24,55	+ 10,03
6	- 5,91	- 6,71

Les signes négatifs et positifs indiquent respectivement une réduction et une stimulation de croissance par NaCl. Chaque valeur représente la moyenne de 8 mesures individuelles.

Tableau 3
Fractions ioniques équivalentaires K/(K+Na) dans les cals
caulinaires et les cals foliaires, après 4 semaines de culture
sur milieux enrichis en NaCl (3 et 6 g.l⁻¹)

NaCl (g.l ⁻¹)	Cals caulinaire	Cals foliaires
3	0,22 ± 0,07	0,45 ± 0,04
6	0,13 ± 0,0	0,13 ± 0,05

les cals caulinaires en conditions témoins. En présence de NaCl 3 g.l⁻¹, le nombre de pousses régénérées sur cal foliaire baisse d'environ la moitié (6 pousses/cal), alors qu'aucune pousse n'est régénérée sur les cals caulinaires. A la concentration 6 g.l⁻¹, les deux types de cals ne régénèrent pas de pousses.

3.3. Evolution des pousses en plantes

Les pousses régénérées en absence, comme en présence de NaCl (Figure 4) sont repiquées sur le milieu d'enracinement correspondants (0 et 3 g.l⁻¹), additionné d'ANA à 0,1 mg.l⁻¹ en absence ou en présence de NaCl. Les pousses témoins s'enracinent au bout d'une semaine alors que les pousses adaptées à 3 g.l⁻¹ ne forment leurs racines qu'après deux semaines de culture et émettent sensiblement moins de racines que les pousses issues de cals témoins. Les pousses adaptées à 3 g.l⁻¹ de NaCl évoluent en plantes entières tolérant la présence de NaCl (3 g.l⁻¹) supplémenté au milieu de culture. Cependant, le nombre de plantes viables obtenues sur sel (NaCl)

3 g.l⁻¹) se trouve réduit par rapport au nombre de pousses initialement cultivées, seulement 13 pousses sur 16 s'enracinent viablement.

Le nombre des plantes adaptées à 3 g.l⁻¹ de NaCl se trouve aussi réduit au cours de l'acclimatation; il a chuté à 6 plantes (Figure 6). Ces plantes présentent

une tige bien vigoureuse et forment de 6 à 7 feuilles pour 8 à 10 feuilles chez les plantes témoins. Elles ont été récupérées et transférées dans des pots de plus grande dimension et cultivées sous serre jusqu'à maturité des fruits à fin de pouvoir étudier leurs caractéristiques physio-agronomiques.

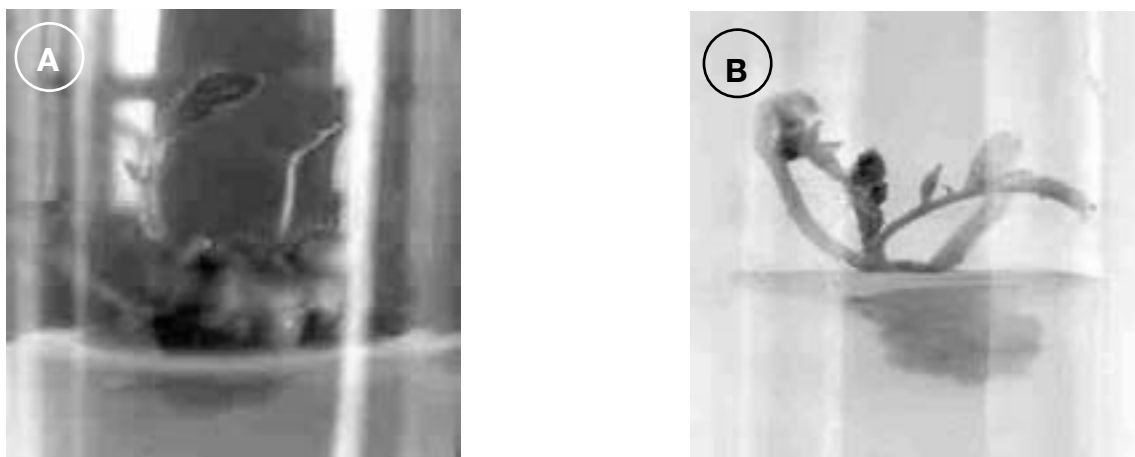


Figure 4: Pousses de tomate régénérées (A) sur milieu témoin et (B) sur milieu contenant NaCl à 3 g.l⁻¹.

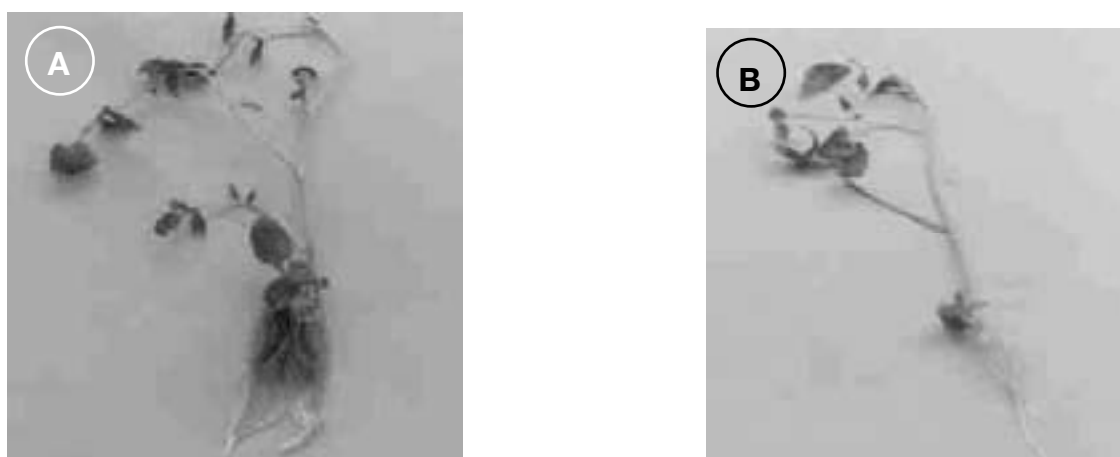


Figure 5: Aspect général de plantules de tomate régénérées sur cal foliaire témoin (A) et cal foliaire adapté à NaCl 3 g.l⁻¹(B).

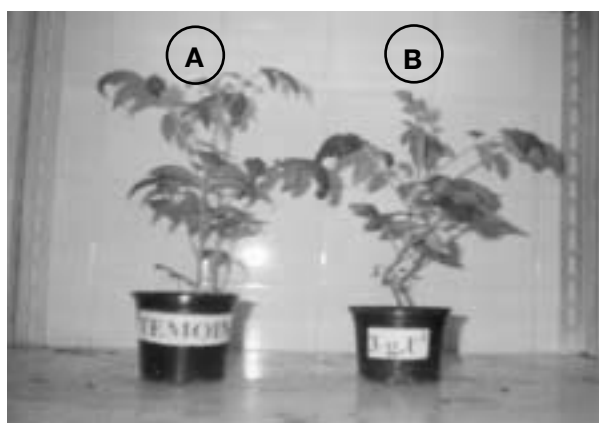


Figure 6: Plantules de tomate (var. Sabra) régénérées sur cal témoin (A) et cal adapté à NaCl 3 g.l⁻¹(B), après acclimatation et culture en pots sur tourbe noire.

Discussion

L'objectif principal de ce travail était de régénérer *in vitro* des plants de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) à partir de cals foliaires ou caulinares préalablement exposés à NaCl 3 et 6 g.l⁻¹. Au cours des étapes nécessaires à la régénération finale, nous avons pu déceler des différences dans les réponses des deux types d'explants à la culture *in vitro* en l'absence et en présence de la contrainte saline.

L'examen de la croissance des deux types des cals montre qu'en l'absence du sel dans le milieu de culture, les cals caulinares produisent plus de biomasse fraîche et sèche que les cals foliaires. Sous stress salin, les cals caulinares produisent plus de matière fraîche mais moins de matière sèche que les cals foliaires. La concentration 3 g/l de NaCl stimule la production de biomasse fraîche (cals caulinares) et sèche (cals foliaires). Taleisnik et Grunberg (23) ont également montré que les faibles concentrations de NaCl, inférieures à 3 g.l⁻¹, peuvent stimuler la croissance des parties aériennes de certains cultivars de tomate (Marmande et la variété Edkawi.) Ce phénomène est interprété comme étant le résultat d'une amélioration des relations hydriques, attribuée à une accumulation d'ions minéraux (4, 16).

Le calcul de l'indice de sensibilité à NaCl (obtenu par la différence entre la masse de matière sèche des cals obtenus sur NaCl et ceux formés sur milieu sans NaCl exprimée en % du témoin) permet de dégager plus clairement les différences entre les deux types de cals cellulaire. En effet, d'après les valeurs du tableau 2, on note que les cals foliaires présentent une meilleure tolérance au sel que ceux des cals caulinares. La croissance des cals foliaires est ainsi donc plus lente, mais moins sensible à NaCl que celle des cals caulinares. D'après Vasil et Vasil (24), cette lenteur est caractéristique des cals morphogènes.

Sur le plan nutritionnel, les cals foliaires sont plus riches en K⁺ et Ca²⁺ que les cals caulinares. Pour les deux types de cals, les modifications de la charge calcique, induites par le sel, sont discrètes et non significatives. Par contre, les cals sont capables d'accumuler des quantités importantes de Na⁺ et Cl⁻. Cet ensemble de données expérimentales indique que les cals foliaires tolèrent mieux que les cals caulinares la contrainte saline, surtout à la concentration 3 g.l⁻¹ pour laquelle les modifications en termes de croissance et d'accumulation d'ion K⁺ par rapport aux cals témoins sont négligeables. Lui et Li (15) trouvent que les cals adaptés à la contrainte saline accumulent autant de Na⁺ et de Cl⁻ et se caractérisent par des teneurs plus élevées en K⁺ et de Ca²⁺ que les cals non adaptés. Le calcul du rapport équivalentaire de l'accumulation K/(K+Na) permet d'arriver à la conclusion que les cals foliaires sont plus sélectifs en faveur de K⁺ que les cals caulinares (Tableau 3). La sélectivité K/Na apparaît ainsi comme un déterminant majeur de la tolérance à NaCl à un niveau cellulaire (1, 2, 15).

Les cals foliaires se montrent aussi plus caulogènes et manifestent une meilleure aptitude à la régénération des pousses que les cals caulinares, en conditions témoins comme en conditions salines. Néanmoins, la présence de NaCl dans le milieu de culture exerce un effet dépressif sur le nombre des cals régénérateurs, ainsi que sur leur capacité régénératrice. Lui et Li (15) ont pu également régénérer des pousses de tomate (variété Beijing Early Red) sur des cals caulinares. De leur côté, Pratta *et al.* (21) ont testé la capacité de régénération de différents génotypes de tomate et sont arrivés à régénérer des pousses à partir de cals foliaires. Par contre chez la pomme de terre, ce sont les segments d'entre-nœuds qui ont montré une meilleure capacité de régénération sur milieu salin que les fragments de feuilles dans le cas de la variété Claustar (7). Le sel du milieu exerce un effet dépressif, voire même inhibiteur sur la régénération; en effet, dès 3 g.l⁻¹, elle est fortement affectée: avortement des bourgeons et formation exclusive de feuilles sessiles ou formation de pousses rapidement atteintes d'hyperhydricité, terme adopté par Debergh *et al.* (5). D'autre part, Harbaoui (10) a montré que ce phénomène peut être atténué chez l'artichaut par l'augmentation de la concentration de l'agar dans le milieu de culture. De même selon Leshem (14), les fortes concentrations de BAP induisent une hyperhydricité chez l'oignon. Dans notre expérimentation sur la tomate, le pourcentage de pousses qui échappent à ce problème et arrivent à s'enraciner correctement est faible par rapport au nombre de pousses régénérées (12% environ). Les plantes correspondantes obtenues forment de nouvelles racines et de nouvelles feuilles; acquièrent une certaine vigueur au cours de l'acclimatation et leur aspect général s'améliore; elles évoluent ensuite en plantes similaires à celles régénérées en absence de sel.

Conclusion

Les explants foliaires et caulinares, prélevés sur les plantes-mères obtenues par germination des graines *in vitro* en absence ou en présence de NaCl (3 et 6 g.l⁻¹), ont été cultivés sur des milieux additionnés ou non de NaCl, (3 et 6 g.l⁻¹). Les deux types d'explants présentent des aptitudes à la callogenèse en absence comme en présence de NaCl. Les cals obtenus au bout de 4 semaines en absence de NaCl sont caractérisés par une structure compacte et une couleur chlorophyllienne. Par contre, la présence de NaCl (6 g.l⁻¹) affecte la texture et la couleur des cals et semble responsable de la friabilité de ces cals et de leur brunissement. En absence de contrainte saline, les cals foliaires produisent moins de biomasse que les cals caulinares mais sont plus tolérants à la présence de NaCl (3 g.l⁻¹) dans le milieu de culture. Les cals foliaires sont capables d'accumuler des quantités plus importantes que les cals caulinares

en ion potassium malgré la prédominance de Na^+ dans le milieu de culture. Ils se montrent aussi plus caulogènes et manifestent une meilleure aptitude à la régénération des pousses que les cals caulinaires, en conditions témoins comme en conditions salines (3 g.l^{-1} de NaCl). La régénération est absente à 6 g.l^{-1} pour les deux types de cals. Les pousses régénérées en présence de NaCl 3 g.l^{-1} sont capables de s'enraciner et d'évoluer en plantes entières cultivées dans la tourbe sous serre. Elles y tolèrent 3 g.l^{-1} de NaCl , additionnée dans l'eau d'irrigation.

Nous nous proposons de suivre le comportement

physiologique et la performance agronomique des plantes régénérées *in vitro*, et en particulier leur croissance, leur développement et leur nutrition en conditions salines, en conditions contrôlées de laboratoire, puis sous serre. La comparaison des plantes régénérées *in vitro* avec celles issues directement de graines permettra d'évaluer l'importance et l'efficacité de la régénération *in vitro* sur l'acquisition de propriétés physiologiques nouvelles et plus particulièrement de tolérance à la salinité de ce matériel obtenu par voie biotechnologique.

Références bibliographiques

- Bourgeais-Chaillou P., Guerrier G. & Strullu D.G., 1987, Adaptation au NaCl de *Lycopersicon esculentum*: étude comparative des cultures de cals ou de parties terminales de tiges. Can. J. Bot. 65, 1989-1997.
- Bourgeais-Chaillou P., Perez-Alfocea P. & Guerrier G., 1990, Tolérance et adaptation au NaCl chez des vitroplants de *Lycopersicon esculentum*: caractères inductibles de l'adaptation au sel. Rev. Cyt. Biol. Vég. 13, 129-141.
- Charrier A., Jacquot M., Hamon S. & Nicolas D., 1997, L'amélioration des plantes tropicales. 591.
- Cuartero J., Yeo A.R. & Flowers T.J., 1992, Selection of donors for salt tolerance in tomato using physiological traits. New. Phytol. 121, 63-69.
- Debergh P., Aitken-Christie J., Cohen D., Grout B., Von Arnold S., Zimmerman R. & Ziv M., 1992, Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. Plant Cell and tissue culture, 30, 135-140.
- Greenway H. & Munns., 1980, Mechanism of salt tolerance in non halophytes. Annu. Rev. Plant. Physiol. 31, 146-190.
- Hannachi C., 1997, Amélioration de la tolérance de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) à la salinité (NaCl) par voie biotechnologique. Thèse de doctorat, Faculté des sciences agronomiques, Gent, Belgique.
- Hannachi C., Debergh P., Zid E., Messai A. & Mehouchi T., 2004, Tubérisation sous stress salin de vitroplants de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 8, 1, 9-13.
- Hannachi C., 2001, Contrat programme de recherche-développement. Projet de développement agricole de Sidi Bouzid. CRDA-PDAI. p. 100.
- Harbaoui Y., 1982, Multiplication *in vitro* et assainissement viral de l'artichaut, *Cynara scolymus* L. Thèse de doctorat, Faculté des sciences agronomiques, Gent, Belgique.
- Hassan N.S. & Wilkins D.A., 1988, *In vitro* selection for salt tolerant lines in *Lycopersicon peruvianum* L. Plant Cell Report, 7, 463-466.
- Jain R.K., Jain S., Nainawatee H.S. & Choudhary J.B., 1990, Salt tolerance *Brassica juncea* L.I. *in vitro* selection, agronomic evaluation and genetic stability. Euphytica, 45, 141-152.
- Kalloo G. & Bergh B.O., 1993, Tomato. In: Genetic improvement of vegetable crops. Oxford, Royaume-Uni, Pergamon Press. 645-666.
- Leshem B., 1983, The carnation succulent plantlets. A stable teratological growth. Ann. Bot. 52, 873-876.
- Liu K.B. & Li S.X., 1991, Effect of NaCl on element balance, peroxidase iso-enzyme and protein banding pattern of *Lycopersicon* leaf cultures and regenerated shoots. Scientia. Horticulturae, 46, 97-107.
- Munns R. & Termaat A., 1986, Whole-plant responses to salinity. Aust. J. Plant Physiol. 13, 143-160.
- Murashige T. & Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.
- Nabors M.W., Gibbs S.E., Bernstein C.S. & Neis M.E., 1980, NaCl -tolerant tobacco plants from cultured cells. Z. P. F. Lauzen. Physiol. 97, 13-17.
- Piri K., 1991, Contribution à la sélection *in vitro* de plantes androgéniques de blé pour leur tolérance au NaCl . Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Faculté des sciences agronomiques de Gembloux, Belgique. 168 p.
- Pius J., Eapen S., George L. & Rao P.S., 1993, Isolation of sodium chloride tolerant cell lines and plants in finger millet. Biol. Plant. 35, 267-271.
- Pratta G., Zorzi R. & Picardi L.A., 1997, Intra and interspecific variability of *in vitro* culture response in *Lycopersicon* (tomatoes). Braz. J. Genet. Vol. 20 n. 1. ISSN 0100-8455.
- Slama F., 1991., Transport de Na^+ dans les feuilles et sensibilité des plantes à NaCl . Evaluation d'un effet piège au niveau des tiges. Agronomie, 11, 275-281.
- Taleisnik E.L. & Grunberg K., 1994, Ion balance in tomato cultivars differing in salt tolerance, I. Sodium and potassium accumulation and fluxes under moderate salinity. Physiol. Plant. 92, 528-534.
- Vasil V. & Vasil I.K., 1984, Induction and maintenance of embryogenic callus culture of gramineae. Cell. Culture and somatic Cell. Genetics of plants. Vol. 1.
- Webb K.J., Osifo O.E. & Henshaw G.G., 1983, Shoot regeneration from leaflet discs of six cultivars of potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*). Plant Sci. Lett. 30, 33-47.
- Wheeler V.A., Evans N.E., Foulger D., Webb K.J., Karp A., Franklin J. & Bright S.W.J., 1985, Shoot formation from explant cultures of fourteen potato cultivars and studies of the cytology and morphology of regenerated plants. Ann. Bot. 55, 309-312.

Messaï Abir, Tunisienne, DEA en Eco-Physiologie végétale, Thèse de Doctorat en Biologie, Enseignement Assistante contractuelle, TP de Biologie cellulaire et TP de Biologie Moléculaire, Faculté de médecine, Monastir, Tunisie.

C. Hannachi, Tunisien, Enseignant, Maître de Conférences à l'Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage de Chott-Mariem, Tunisie.

E. Zid, Tunisien, Enseignant, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis et Chef de l'Unité d'Ecophysiologie et Nutrition des plantes.