



MINISTER DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Agronomie

THÈSE

De Doctorat en Sciences Agronomiques

Option : Biotechnologie Végétale

Intitulée :

**Production de variants de pommes de terre
(*Solanum tuberosum* L.) tolérants au stress salin**

Présentée le 09 - 10 - 2014

par : Mme GHOMARI samia

Devant le jury composé de :

Nom et prénom	Grade	Qualité	Appartenance administrative
- Mr BERKANI Abdallah	Professeur	Président	Univ. Mostaganem
- Mr LATRECHE Ali	Professeur	Examineur	Univ. Sidi Bel Abbés
- Mr MEHDADI Zoheir	Professeur	Examineur	Univ. Sidi Bel Abbés
- Mr SAHNOUNE Mohamed	Professeur	Examineur	Univ. Tiaret
- Mr LOTMANI Brahim	Professeur	Rapporteur	Univ. Mostaganem
- Mr LABDI Mohamed	Directeur de recherche	Co-rapporteur	INRAA, Sidi Bel Abbés

2014 – 2015

Un bon scientifique n'est pas celui qui réussit dans sa recherche, mais qui apprend de ses erreurs, et accepte les critiques des autres.

SAMIA GHOMARI

Remerciements

Je voudrais, en tout premier lieu, remercier mon directeur de thèse monsieur le professeur LOTMANI.B, auquel sans lui cette thèse n'aurait pu exister, pour son soutien, sa confiance et ses conseils. Je le remercie pour tous ses efforts et sa contribution au bon déroulement des procédures administratives ayant abouti à la soutenance de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse : Le Professeur BERKANI.A de m'avoir honoré d'accepter de présider le jury ; les Professeurs MAHDADI.Z et MAATOUGUE.M pour avoir accepté de lire et de porter des jugements à cette modeste thèse.

Je voudrais aussi remercier Monsieur LABDI.M directeur de recherche, de l'INRAA de Sidi Bel Abbés qui, en agissant à titre de co-directeur, a fortement aidé à l'aboutissement de cette thèse. Je le remercie ainsi, pour le temps et la patience qu'il m'a accordés tout au long de ces années de recherche, d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir fourni d'excellentes conditions de travail au sein de son équipe à l'INRAA de Sidi Bel Abbés. De plus, un grand merci s'adresse au Docteur HADDAD.M pour les conseils clairs et enrichissants qu'il m'a procurés tout au long de la pratique et de la rédaction.

J'adresse mes plus sincères remerciements à toute ma famille, particulièrement ma mère, et mon mari pour leur soutien morale et de m'avoir poussé à finir cette étude. Je n'oublierai pas les aides permanentes reçues par ma meilleure amie et ma confidente Melle BENNABI.F, et qui m'a soutenue durant toute la période d'étude. J'aimerais formuler ma gratitude à toutes les équipes de recherches de l'INRAA de Sidi Bel Abbés, mes pensées s'adressent particulièrement à Melle LABDI.N, Mme HAMDI.S, Mme BELAHCEN.N, Mr BENJEDDA.M, et tous mes étudiants. Mes pensées les plus profondes à Mr TEGGAR, que Dieu ai pitié de son âme.

Cette thèse m'a donné l'occasion de rencontrer et de travailler avec des personnes absolument épatantes. Il est difficile de leur dire ici à quel point j'ai été touchée par tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Résumé

La production de plants de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est un sujet d'actualité en Algérie. Le stress salin étant un des facteurs limitants, incite l'Etat à investir dans des projets d'amélioration variétale. L'induction de variants peut aboutir à une adaptation assez expressive envers certains stress comme le stress salin. La micropropagation en milieu MS2, et la microtubérisation en milieu MS4 ont permis la disponibilité permanente du matériel végétal.

L'induction de variants somaclonaux *in vitro*, nécessite un choix rigoureux de l'explant et une interaction hormonale bien déterminée. L'organogenèse du cal, dépend des conditions du milieu de culture, notamment de la température d'incubation *in vitro*. Nous avons initié la callogenèse des variétés Spunta et Kondor à partir de segments d'entre-nœuds et de feuilles, sur un milieu de culture à base de MS additionné de BAP (0,5 mg.L⁻¹) et de 2.4-D (0,5 mg.L⁻¹). Les cultures d'explants ont été soumises à des températures variables d'incubation de : 22±1°C, 25±1°C et 28±1°C. Les cals obtenus ont été placés dans le même milieu de culture avec la modification de la concentration en 2.4-D (0,2 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 mg.L⁻¹). L'analyse statistique a montré que la température d'incubation de 25±1°C est la plus propice pour la néoformation organogène des cals. L'embryogenèse somatique s'est établie uniquement sur cal caulinaire. Par contre l'induction de bourgeons somatiques a été favorable chez les deux variétés. Toutefois, la variété Kondor s'est révélée plus apte à l'organogène que la variété Spunta. Ainsi, l'explant tige est plus opportun à l'induction de cal organogène que l'explant feuille. *S.tuberosum* est une espèce qui présente une meilleure régénération de ces variants par bourgeonnement méristématique.

L'induction de variants somaclonaux tolérants *in vitro* au stress salin nécessite une sélection de lignées cellulaire tolérantes. Une application de stress salin a été pratiquée sur les cals induits, en additionnant au même milieu les différentes concentrations de NaCl (de 0 à 14 g.L⁻¹). Pour les concentrations allant de T1 à T7, les cals tolérants

présentent une texture similaire au témoin : compacte, globulaire et de couleur verdâtre. A partir de T8 la texture a été modifiée en un cal friable, lisse et de couleur brunâtre. L'analyse statistique des résultats a permis de délimiter le seuil de tolérance, en le situant entre 4 g.L⁻¹ et 7 g.L⁻¹. Une deuxième sélection de ces cals repiqués sur ces concentrations s'est effectuée, et a favorisé la délimitation du seuil de tolérance entre 4 et 5 g.L⁻¹. Ainsi, l'induction de bourgeons méristématiques n'est favorable qu'à partir de la troisième génération de ces cals tolérants, ce qui n'est pas le cas des cals non stressés induisant une organogenèse dès la première génération. De ce fait, les cals caulinaires sont plus aptes à s'adapter au stress et, présentent une organogenèse somatique plus productive que les cals foliaires.

L'amélioration variétale par sélection de génotypes a été testée également et s'est révélée plus intéressante. L'exposition répétée des vitroplants aux mêmes concentrations décrites préalablement, a favorisé la sélection de génotypes ayant toléré la concentration sub-létale de 4 g.L⁻¹. Ce résultat étant très encourageant, a permis l'induction de microtubercules tolérants. Le milieu MS4' s'est révélé le plus propice pour ce type de stress. Toutefois, la variété Kondor est plus tolérante *in vitro* au stress salin que la variété Spunta.

Mots clés : température d'incubation, stress salin, callogenèse, variants somaclonaux, sélection de génotypes, *Solanum tuberosum* L.

summary

The seedling production potato (*Solanum tuberosum* L.) is a topical issue in Algeria. Salt stress is one of the limiting factors prompting the state to invest in projects varietal improvement. The variants induction may result in expressive enough adaptation to some stress such as salt stress. Micropropagation in MS2 medium and microtuberization in MS4 have led to the permanent availability of plant material.

The induction of *in vitro* somaclonal variants requires a careful selection of the explant and a definite hormonal interaction. Organogenesis callus depends on the conditions of the culture medium, including the *in vitro* incubation temperature. We initiated callogenesis varieties Spunta and Kondor from segments of internodes and leaves, on a culture medium containing MS supplemented with BAP (0,5 mg.L⁻¹) and 2.4-D (0,5 mg.L⁻¹). The explant crops have been exposed to varying temperatures of incubation: 22±1°C, 25±1°C and 28±1°C. The calluses obtained were placed in the same culture medium with the change in the concentration of 2.4-D (0,2; 0,5; 1; 1,5 and 2 mg.L⁻¹). Statistical analysis showed that incubation of 25±1°C is the most suitable for organogenic neoformation of the calluses. Somatic embryogenesis was established only on meristem callus. But the induction of somatic buds was favorable in both varieties. However, Kondor variety was more suitable than the Spunta variety. Thus, the stem is most suitable explant to the induction of organogenic callus than the leaf explants. *S.tuberosum* is a species which has a better regeneration of these variants by budding meristematic.

The induction of somaclonal variants tolerant to *in vitro* salt stress requires a selection of tolerant cell lines. An application of salt stress was performed on callus induced by adding to the same medium with the various concentrations of NaCl (from 0 to 14 g.L⁻¹). For concentrations from T1 to T7, tolerant callus had a similar texture to the witness: compact, globular and greenish color. From T8 texture was changed to a friable callus, smooth and brownish. Statistical analysis of the results allowed defining the tolerance threshold, between 4 g.L⁻¹ and 7 g.L⁻¹. A second selection of these callus subcultured on these concentrations is performed, and favored the delimitation of tolerance threshold between 4 and 5 g.L⁻¹. Thus, induction of meristematic buds has favored until the third generation of tolerant callus, which is not the case unstressed callus inducing

organogenesis in the first generation. Therefore, the stem calluses are more able to adapt to stress and having a more productive than the leaf callus somatic organogenesis.

Varietal improvement by selection of genotypes was also tested and proved to be more interesting. Repeated vitroplants the same concentrations previously described exposure favored the selection of genotypes having tolerated the sub-lethal concentration of 4 g.L⁻¹. This result is very encouraging, led to the induction of tolerant microtubers. The medium MS4 'proved to be the most suitable for the type of stress. However, the Kondor variety occurs more tolerant *in vitro* salt stress that Spunta variety.

Keywords: incubation temperature, salt stress, callus, somaclonal variants, selection of genotypes, *Solanum tuberosum* L.

خلاصة

يعتبر انتاج بذور البطاطة (*Solanum tuberosum* L.)، موضوع شيق في الجزائر. إن الإجهاد الملحي، عامل من عوامل المقيدة، مما دفع الدولة للإهتمام بمشاريع تحسين الأصناف. الاستحثاث الصنفي تعتبر طريقة تستعمل لتكيف معتبر إلى بعض الاجهاداد، مثل الإجهاد الملحي، إن استعمال MS2 للإكثار الدقيق، و MS4 لإنتاج الدرنة الدقيقة يسمح بالتوفير المستمر للنبات المستعمل.

يتطلب استحثاثا المتغيرات ، عن طريق الأنسجة في المخبر، الإحكام في اختبار الأعضاء النباتية و الهرمونات. يعتمد تكون الأعضاء على الكالس، على نوعية محلول الزراعي، و على درجة حرارة الحضانة في المستخبر. لقد بادرنا بإنتاج الكالس الخاص بسبونتا و كوندور باستعمال الساق و الأوراق النباتية، ثم بوضعهم في وسط زراعي متكون من MS، مستكمل بالهرمونات BAP (0.5 مغ.ل⁻¹) و 2.4-D (0.5 مغ.ل⁻¹) .

تعرضت المنتوجات الزراعية إلى مختلف درجات حرارة الحضانة: 1±22 درجة مئوية، 1±25 درجة مئوية ، 1±28 درجة مئوية ، ثم وضع الكالسات المتحصلة عليها في نفس الوسط الزراعي، مع تغير تركيزات الهرمون 4.2-D (0.2، 0.5، 1، 1.5، و 2 مغ.ل⁻¹). أظهرت الإحصائيات أن 1±25 درجة مئوية هي الأنسب للحث على التكوين العضوي للكالسات. تم ظهور الجنين النسيجي فوق الكالسات الساقية.لكن، ظهور البراعم الجنسية كانت ملحوظة على جميع أصناف البطاطة المستعملة. مع ذلك ، أظهرت كوندور امكانيات خاصة للتكوين العضوي. إن النتائج المتحصلة عليها أظهرت أن الساق يعتبر الأنسب للإنتاج الكالسي العضوي *Solanum tuberosum* L. هو صنف يسمح بالتكاثر عن طريق البراعم النسيجية.

لإنتاج المستحثات النسيجية تتحمل درجة الملوحة عالية في المخبر، يتطلب اختبار مجموعة خلايا قابلة للملوحة.تم تطبيق إجهاد ملحي على الكالسات المنتجة بإضافة كميات مختلفة من NaCl (من 0 إلى 14 غ.ل⁻¹).إن التركيزات من T1 إلى T7 أدت إلى إنتاج كالسات ذوا مظهر مطابق للشاهد: مدمج، كروي، و بلون أخضر . انطلاقا من T8 ، تم تغير مظهر الكالس لمظهر : قابل للتفتيت، ناعم، و بني اللون. سمح التحليل الإحصائي بتحديد نسبة الحد الأعلى للتحمل بين 4 و 7 غ.ل⁻¹. و بالتالي ، تم تحديد مجموعة من الجيل الثاني من تلك الكالسات : مما حدده درجة التحمل بين 4 و 5 غ.ل⁻¹. لقد لوحض تحريض برعم نسبي ابتداء من الجيل الثالث من الكالسات المتحملة

للملوحة ، بالتالي، الكالسات الساقية تعتبر الأكثر عرضة للتكيف للتوتر الملحي، كما لها أكثر قابلية لتكوين الأعضاء النسيجية.

تم اختبار تحسين الأصناف عن طريق انتقاء الطرز الوراثي : كما ثبت أنه أكثر إثارة للاهتمام .
سمح التكاثر الدقيق المستمر للنباتات المخبرية، في نفس الوسط الزراع المالح ، إلى تصنيف الطرز الوراثي المتحمل لدرجة الملوحة الشبه-قاتلة بـ 4 غ.ل⁻¹. هذه النتيجة المشجعة قد سمحت بإنتاج الدرن الدقيق، قابل التحمل. مع ذلك اعتبر 'MS4' الوسط الزراعي الأنسب لهذا النوع من الإجهاد .
في النهاية، تعتبر كوندور الأكثر تحملا لدرجة الملوحة مخبريا من سبونتنا.

كلمات مفتاح: درجة حرارة الحضانة، الإجهاد الملحي، إنتاج الكالسي، المستحثات النسيجية

، انتقاء الطرز الوراثة. *Solanum tuberosum* L.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Normes applicables aux classements provisoire des cultures destinées à la production de plants (CNCC, 1995).	13
Tableau 2 : Tolérances maximales pour les tubercules de classes SE, E et équivalentes.	14
Tableau 3 : Tolérances Maximales pour les tubercules de classes A et B.	15
Tableau 4 : Seuil de tolérance à la salinité de certaines cultures.	22
Tableau 5 : Caractéristiques des variétés Spunta et Kondor.	39
Tableau 6 : les milieux de cultures testés.	51
Tableau 7 : Fréquence du nombre de nœuds par vitroplants en fonction du milieu de culture.	56
Tableau 8 : Estimation des différentes évolutions morphologiques des méristèmes de Spunta et Kondor après 20 jours de croissance en milieux MB et MC.	59
Tableau 9 : Calibre des microtubercules obtenus dans le milieu MS3 et MS4.	66
Tableau 10 : Poids des microtubercules obtenus en fonction du calibre.	66
Tableau 11 : résultats de l'induction d'embryons somatiques à partir d'explants tige et feuilles des variétés Spunta et Kondor.	70
Tableau 12 : Résultats d'induction de méristèmes somatiques chez Spunta et Kondor.	74
Tableau 13 : Mesure de l'indice de tolérance du stress salin (ITS) sur les cals des deux variétés.	79
Tableau 14 : Indice de tolérance au stress salin causé par NaCl de la première génération de Spunta et Kondor.	87
Tableau 15 : Résultats de l'analyse de la variance à trois facteurs : la concentration en NaCl, du temps d'exposition à ce stress et des variétés de <i>S.tuberosum</i> .	90

Tableau 16 : Résultat de la comparaison des moyennes de hauteurs des tiges en fonction du temps et des variétés Spunta et Kondor.	91
Tableau 17 : Résultat de la comparaison des moyennes de hauteurs des tiges selon la variété.	91
Tableau 18 : Résultat de la comparaison des moyennes de hauteurs des tiges selon la concentration en NaCl pour les variétés Spunta, kondor.	92
Tableau 19 : Influence de la longueur des tiges en fonctions de la variété et la concentration (Test de Newman et Keuls).	93
Tableau 20 : Evaluation de l'indice de tolérance au stress salin des vitroplants de la deuxième génération des deux variétés.	94
Tableau 21 : Taux de microtubérisation chez les vitroplants tolérants de Spunta et Kondor.	97
Tableau 22 : calibrage des microtubercules de Spunta et Kondor en milieu salin.	99
Tableau 23 : Microtubercules récolté selon le calibre en milieu MS4'.	99

Liste des figures

Figure 1 : Répartition de la production à travers le monde de la pomme de terre en 2009	05
Figure 2 : les productions de la culture pommes de terre durant la période 2000-2012	07
Figure 3 : Principales étapes de la culture in vitro de la pomme de terre en vue de la production de la semence	25
Figure 4 : Présentation schématique des principales étapes pour l'induction de microtubercules et de variants	36
Figure 5 : Principales étapes suivies pour l'étude du stress salin chez <i>S.tuberosum</i>	37
Figure 6 : Méristème adventif de la variété Spunta dénudé de sa feuille	42
Figure 7 : Prélèvement de méristème de la variété Kondor sous loupe binoculaire grossi deux fois en conditions aseptiques	43
Figure 8 : Taux de reprise des bourgeons caulinaires des variétés Spunta et Kondor en fonction des milieux de culture testés.	53
Figure 9 : Longueurs moyennes des tiges et nombre de nœuds des vitroplants de 30 jours de croissance en fonction des milieux de cultures	54
Figure 10 : Aspects des vitroplants de Kondor, après 25 jours de croissance dans les milieux de cultures MS, MS1 et MS2	55
Figure 11 : Pourcentage d'enracinement des vitroplants en fonction des milieux de cultures MS, MS1 et MS2	57
Figure 12 : Croissance de la Rhizogenèse de vitroplants de Spunta après 10 jours de culture	58
Figure 13 : Evolution des méristèmes des deux variétés après 15 jours de culture en milieu MB.	60
Figure 14 : Présentation d'un cal de Kondor de 25 jours de croissance dans le milieu MC	60
Figure 15 : Evolution caulinaire de Spunta et Kondor en milieu MB et MC, après 20 jours de croissance	61

Figure 16 : Evolution racinaire des vitroplants sur les 2 milieux MD et ME	62
Figure 17 : Evolution rhizogène des vitroplants de Spunta en milieux MD et ME	63
Figure 18 : Microtubercules issus de vitroplants, de Spunta et Kondor, cultivés en milieu MS3 après 30 jours de croissance	64
Figure 19 : Microtubercules des 2 variétés Spunta et Kondor, obtenus après 90 j de croissance	65
Figure 20 : Microtubercules pré-germés	67
Figure 21 : Induction de cal sur les explants tiges (a) et de feuilles (b) de la variété Kondor	68
Figure 22 : Projection des températures d'incubation et des cals des explants tiges et feuilles sur l'axe factoriel de l'ACP.	69
Figure 23 : Formation d'embryon somatique (ES) sur cals caulinaire et foliaire des 2 variétés	23
Figure 24 : Formation de méristèmes somatique (MS) sur cals caulinaires et foliaires de Spunta et Kondor	73
Figure 25 : Projection des milieux de cultures et des néoformations organogènes des cals sur l'axe factoriel de l'ACP	75
Figure 26 : Présentation de cals tolérants à 5 g.L ⁻¹ de NaCl et de cals brunis à 12 g.L ⁻¹ de NaCl	76
Figure 27 : Projection de la sensibilité des cals de la G1(A) et de la G2 (B) au stress salin sur l'axe factoriel de l'ACP.	78
Figure 28 : Différenciation des cellules de cals témoins de 25 jours de croissance de Spunta et Kondor	80
Figure 29 : Coupe longitudinale d'un globule d'un cal caulinaire de Kondor	81
Figure 30 : Passage de cellules non plasmolysées à 5 g.L ⁻¹ de NaCl de cals caulinaires vers des cellules plasmolysées à 8, 12 et 15 g.L ⁻¹ de NaCl chez la variété Kondor	82
Figure 31 : présentation de l'évolution des zones de générations (ZG) et formation des canaux de trachéides	83
Figure 32 : Nombre de méristèmes induits sur cals tolérants selon les générations (de G1 à G9)	84

Figure 33 : Vitroplants tolérants à T4 et T5 induits à partir de cals caulinaire de Kondor, après vingt jours de croissance	85
Figure 34 : Enracinement des variants de cals de feuilles de dix jours de croissance dans T4 pour Kondor et dans T5 pour Spunta	85
Figure 35 : Présentation de la longueur moyenne des tiges de vitroplants de 32 jours de croissance en milieux salins variables	87
Figure 36 : Croissance des vitroplants en milieu T4	88
Figure 37 : Chlorose d'un vitroplants de Spunta exposé à 1g.l^{-1} de NaCl	88
Figure 38 : Nombre de racines des vitroplants de 32 jours de croissance exposées au NaCl	89
Figure 39 : Croissance de vitroplants de 32 jours tolérants à T2	89
Figure 40 : Rhizogenèse des vitroplants de Spunta et Kondor en deuxième génération après 32 jours de croissance en milieu salin de T0 à T5.	94
Figure 41 : Chlorose de vitroplants de Kondor en milieu T2	95
Figure 42 : Evaluation de la chlorose de vitroplants en milieu salin	96
Figure 43 : Microtubercules de Kondor à T2	97
Figure 44 : Microtubérisation des vitroplants à T4 en milieu MS4'	98
Figure 45 : Déroulement progressif de la microtubérisation, cas de Kondor à T3	98

Introduction

INTRODUCTION

La pomme de terre, *Solanum tuberosum* L., est parmi les quatre cultures alimentaires les plus importantes au niveau mondial après le blé, le riz et le maïs. Du point de vue de sa production et de son importance économique, la pomme de terre reste une culture stratégique en Algérie. Cette culture a pris de l'extension dans les régions du Nord et se développe actuellement dans le Sud algérien. Sa production reste très variable selon les années, allant de 1,5 million de Tonnes à près de 2 millions de tonnes, pour une superficie fluctuant entre 85 000 à 100 000 ha pour les 3 types de production (Primeur, Saison, Arrière-saison) (CNCC, 2013).

Avec son intensification dans des zones agro-climatiques très diverses, la culture est affectée par de nombreux ravageurs, maladies fongiques et virales, qui affectent directement la production et la qualité des tubercules. En plus de ces problèmes pathologiques, la pomme de terre est confrontée aux conditions du milieu de production. Sa productivité est très dépendante en particulier de la salinité du sol et de la qualité de l'eau d'irrigation. La salinité se manifeste par des troubles physiologiques, entraînant une réduction du nombre de tubercules et du calibre.

En Algérie, l'érosion des terres, la salinisation, ainsi que la désertification menacent 3,2 millions d'hectares de terres, de parcours et le couvert forestier de la région Nord (Akesbi *et al*, 2007). C'est le cas également : d'un million d'hectare au niveau de la steppe, 400 000 hectares dans la région Ouest, et 100 000 hectares dans le sud du pays (Ministère de l'Agriculture, 2005). Cette salinisation des zones arides ou semi-arides est due principalement à la forte évaporation des eaux qui favorise la concentration des sels totaux dans l'eau et leur remontée à la surface des sols (IRD, 2008).

Le stress salin induit une augmentation de la pression osmotique de la solution du sol, ce qui perturbe le mécanisme physiologique de la plante, et constitue un facteur limitant majeur de la production (Messai, 2006). En résumé, lorsqu'une plante est agressée par un stress environnemental, elle subit une perte importante d'eau au niveau des cellules, ce qui provoque des tensions (entre la membrane plasmique et la paroi), un dysfonctionnement de la photosynthèse, de la croissance et, par conséquent des baisses

de rendement (IBV, 2013). Ainsi, la tolérance des plantes cultivées demeure limitée, compte tenu de la complexité des mécanismes impliqués dans la tolérance des plantes au sel (Denden *et al.*, 2005). Pour se défendre, certains végétaux ont une capacité plus ou moins grande en synthétisant :

- des protéines spécifiques ;
- des osmoprotecteurs, comme la proline qui permettent de maintenir l'équilibre en eau entre la cellule végétale et l'environnement extérieur ;
- des acides gras afin de modifier la perméabilité de la membrane et tenter de résister aux chocs extérieurs (IBV, 2013).

La richesse en sels solubles et les qualités physiques défavorables des sols sodiques conduisent à une certaine toxicité spécifique de certains ions, comme le bore et surtout l'ion chlore à une forte concentration (Calvet, 2003). Ce type de stress affecte le rendement d'un grand nombre de cultures telles que la pomme de terre. Cette culture est l'une des plus sensibles au stress salin, son niveau de tolérance varie de 1,5 à 2 g.L⁻¹ de NaCl (Maas, 1986).

Dès lors que les mécanismes de réponse sont connus, il est intéressant de chercher à développer les aptitudes de tolérance aux conditions peu favorables. Dans ce sens, les biotechnologies pourraient apporter des améliorations au niveau des rendements des plantes cultivées en y intégrant des gènes impliqués dans les réponses aux stress. Actuellement, aucune variété transgénique tolérante n'est encore commercialisée. Une variété de maïs tolérante à la sécheresse est annoncée après 2012 aux USA (IBV, 2013). Toutefois, aucune plante génétiquement modifiée n'est destinée à la consommation directe humaine, mais plutôt pour l'animal. En biotechnologie on utilise ainsi la culture *in vitro* de tissus somatiques, la sélection de lignées peut être appliquée dans le cadre de l'amélioration à la tolérance au stress salin (Lutts *et al.* 1999) par callogenèse. Nous citons en exemple l'induction de cals tolérants de pomme de terre par Benavides *et al.* (2000); de tournesol par Alvarez *et al.* (2003); et de blé dur par Koutoua *et al.* (2012).

Par ailleurs, une importance particulière doit être réservée au choix de l'explant destiné à l'étude du stress salin *in vitro*. Cela permet une meilleure connaissance du mécanisme de la tolérance au stress salin, un gain relatif de temps et d'espace pour la sélection d'espèces tolérantes, ainsi qu'un meilleur contrôle du milieu.

C'est dans ce contexte que notre étude cherche à induire des variants de pomme de terre *in vitro*, tolérants au stress salin chez deux variétés de pomme de terre : Spunta et Kondor. Ce sont les deux variétés les plus cultivées actuellement. A cet effet, les principaux points que nous essayons de développer se résument comme suit :

- 1- la mise au point de la technique de culture méristématique;
- 2- la micropropagation de vitroplants et leur microtubérisation ;
- 3- L'induction de callogenèse à partir des explants : tiges et feuilles ;
- 4- Application du stress salin sur le matériel végétal : (cals et vitroplants), et sélection des individus tolérants ;
- 5- L'organogenèse des cals tolérants ;
- 6- Identification des milieux de cultures favorables à la croissance des individus tolérant ;
- 7- Exposition des vitroplants au stress salin et sélection de géotypes tolérants ;
- 8- Confirmation de la stabilité du caractère tolérance par micropropagation de ces géotypes tolérants ;
- 9- Induction de microtubercules tolérants.

Chapitre I : Partie
bibliographique

1. LA POMME DE TERRE

1.1. Description botanique

La pomme de terre est une culture à cycle annuelle, elle est caractérisée par la présence de stolons, inducteurs de tubercules. Les tiges aériennes sont généralement au nombre de deux à dix, parfois davantage avec un port plus ou moins dressé et une section irrégulière. Les feuilles sont composées et permettent par leur aspect et leurs colorations, de caractériser les variétés. Les fleurs dont la couleur et le nombre caractérisent les variétés sont généralement autogames. Elles peuvent être de couleur blanche, bleue, violette ou rose suivant les variétés. Les fruits ou baies contiennent des graines sans intérêt en culture, mais essentielles en sélection amélioratrice (Elzebroek et Wind, 2008).

Le système souterrain comprend les racines, les tiges souterraines (stolons) et les tubercules. Les racines nombreuses et fines sont fasciculées et peuvent pénétrer facilement le sol s'il est suffisamment meuble. Les stolons sont plus ou moins courts et leurs extrémités se renflent pour former les tubercules : ce sont les organes de conservation qui permettent de classer la pomme de terre parmi les plantes vivaces. C'est dans cet organe que la plante accumule toutes ses réserves nutritives (Atef, 2009).

1.2. Classification taxonomique :

La classification taxonomique de la pomme de terre est représentée par APG III (2009) comme suit :

Règne :	Plantae
Embranchement :	Spermatophytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotyledones
Sous-classe :	Asterideae
Ordre :	<i>Solanales</i>
Famille :	<i>Solanaceae</i>
Sous-famille :	<i>Solanoideae</i>
Genre :	<i>Solanum</i>
Espèce :	<i>Solanum tuberosum</i> L.

1.3. La pomme de terre dans le monde

La culture de la pomme de terre est l'une des principales cultures alimentaires dans le monde. Sa production mondiale est passée de 334,0 millions de tonnes en 2009 à 374,4 millions de tonnes en 2011 (FAOSTAT; 2013). Le secteur de la pomme de terre est en pleine évolution.

Jusqu'au début des années 90, la plupart des variétés étaient cultivées et consommées en Europe, en Amérique du Nord et dans les pays de l'ex-Union Soviétique. Depuis lors, la production et la demande de pommes de terre ont enregistré une forte croissance en Asie, en Afrique et en Amérique latine, où la production est passée de près de 30 millions de tonnes au début des années 60 à plus de 165 millions de tonnes en 2007 (UNPT, 2009).

L'Asie et l'Europe étaient en 2009, les deux principales régions productrices de pommes de terre dans le monde, avec plus de 80% de la production mondiale (figure 1). Les récoltes de l'Afrique et de l'Amérique latine, quoique nettement inférieures, ont atteint leur niveau de production record en 2009 (UNPT, 2009).

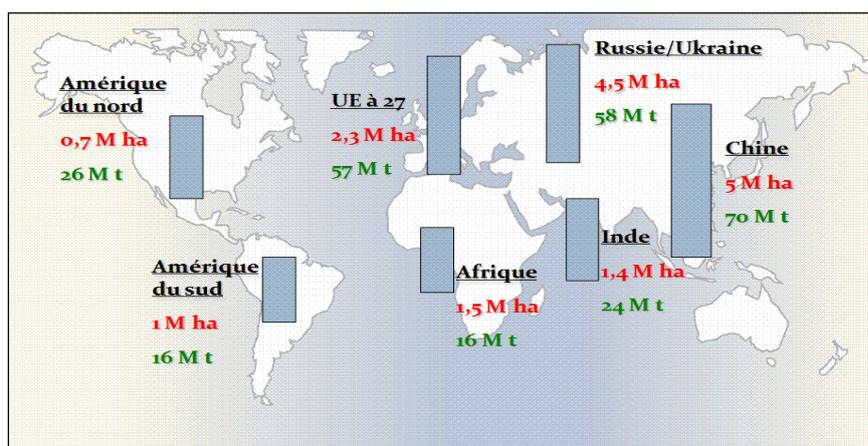


Figure 1 : Répartition de la production de la pomme de terre à travers le monde en 2009 (UNPT, 2009).

Aujourd'hui, la culture de la pomme de terre prend une importance économique et géostratégique majeure, car elle peut contribuer à apporter une réponse à la pénurie

des denrées alimentaires dans certaines régions du monde. Cette culture, présente un rendement potentiel à l'hectare très élevé. Elle est également utilisée dans d'autres domaines comme celui de la chimie, la pharmacie ou la papeterie.

1.4. La pomme de terre en Algérie

La culture fut introduite en Algérie au milieu du XIXème siècle, l'essentiel de la production était expédié vers la France. En 1962, lorsque le pays acquit son indépendance, il produisait 250 000 tonnes par an et en exportait environ le tiers (FAOSTAT, 2008).

Depuis, la pomme de terre est devenue une des principales cultures destinées à la consommation domestique et en 2006 la production a atteint le chiffre record de 2,18 millions de tonnes. En 2008, La superficie cultivée était de 90 000 ha (FAOSTAT, 2008). Cette culture peut être plantée et récoltée durant toute l'année, selon les différentes zones agro-climatiques. Elle est surtout cultivée sur le littoral méditerranéen, jouissant d'un climat tempéré propice à sa plantation tout au long de l'année. Les grandes productions de saison se trouvent dans les zones intérieures (monts de l'Atlas telliens et les hauts plateaux). La consommation annuelle, qui était de 35 kg/par habitant en 1990, est passée à 57 kg en 2005 (FAOSTAT, 2008).

Le Conseil National Interprofessionnel de la Filière Pomme de Terre (CNIFPT, 2013), annonce que la production nationale de pomme de terre a fluctué de 3,2 millions de tonnes en 2010 à 4,22 millions de tonnes en 2012 (figure 2). Le Centre National de Contrôle et de Certification (CNCC, 2013) déclarait, lors d'une réunion de coordination des producteurs de plants de pommes de terre, que les superficies destinées à la reproduction sont passées de 8 000 ha en 2011-2012 à 17 000 ha en 2012-2013. A l'échelle du Maghreb, selon Mellah (2008), l'Algérie se classe en deuxième position après l'Egypte en matière de surface et de production, mais occupe le dernier rang en matière de rendement.

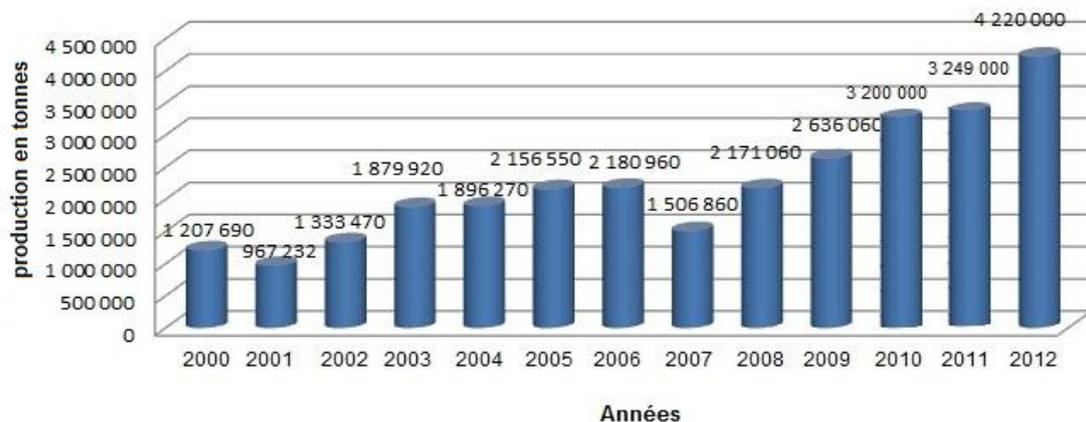


Figure 2 : Les productions de la culture pommes de terre durant la période 2000- 2012 (CNIFPT, 2013 ; FAOSTAT, 2008).

En Algérie, la pomme de terre se cultive dans toutes les saisons :

- Les cultures de saison (représentent 65 % en surface) sont réalisées entre Janvier et Avril ;
- Les cultures d'Arrière-saison (représente 20 à 25 % en surface) dont la période de plantation se situe de Juin à Septembre ;
- les cultures de primeur (limitées aux zones littorales, sublittorales et au sud) dont les plantations se situent entre Octobre et Décembre (représente 10 à 15 % en surface) (CNCC, 2013).

1.5. La semence de pommes de terre en Algérie

La production de semences de pomme de terre a fait et reste toujours un sujet d'actualité. Jusqu'à 2008, l'Algérie couvrait plus de 80% des besoins en semences par des importations généralement de l'Europe. Jusqu'à l'heure actuelle, plus de 70 millions de Dollars, sont consacrés chaque année pour l'importation des semences. Il est cependant difficile d'envisager l'évolution du marché de la pomme de terre de consommation, ni une transformation à des fins agro-alimentaires sans assurer en parallèle une production constante, régulière et de qualité en semences. De ce fait, l'Etat algérien a fait exécuter des programmes de production de semences dirigés et suivis par une structure interprofessionnelle, la filière de pomme de terre. Le rôle principal de cette filière est l'amélioration de la production qualitative des semences et, l'intégration des fermes

pilotes dans le programme de multiplication de semences pour sécuriser l'approvisionnement en semences de base (Abbas, 2011). La production et la commercialisation de la semence de pomme de terre nécessite un suivi rigoureux du règlement technique pour son contrôle et sa certification. Ce règlement porte principalement sur la valorisation des variétés localement adaptées (INRAA, 2006).

Le CNCC (2013), annonce que la production nationale de la semence multipliée à partir de celles importées a été estimée à 300 000 tonnes par an. L'Algérie dispose actuellement de 131 variétés homologuées, dont une trentaine est reproduite. Cela dit, l'importation de la semence de la classe "A" a atteint 120 000 tonnes en 2011-2012 et, près de 165 000 tonnes en 2012-2013. Ces importations ont été effectuées en particulier à partir de la Hollande, du Danemark et de la France.

1.6. Le mode de reproduction

1.6.1. Reproduction classique

- Elle peut être sexuée : en passant par les graines du fruit, sous forme de baie sphérique ou ovoïde de 1-3 cm de diamètre, de couleur vert brun violacée et, jaunissant à la maturité. La graine peut contenir jusqu'à 200 graines (Rousselle *et al.*, 1996). La pomme de terre est très peu produite par graines dans la pratique agricole (Bernhardes, 1998).

- Comme elle peut être végétatif : en passant par quatre phases :

- Phase de croissance : le tubercule germé et planté en terre, dont les bourgeons axillaires germent et donnent au-dessus du sol des rameaux et au-dessous des stolons ;
- Phase de tubérisation : selon la variété et le milieu de culture les extrémités des stolons cessent de croître et se renflent pour former en une ou deux semaines les ébauches des tubercules ;
- Entrée en repos végétatif des tubercules : dans ce cas, la tubérisation se prolonge jusqu'au flétrissement de la plante, dans les conditions optimales de température et d'humidité ;

- Phase de germination : après une évolution physiologique interne, les tubercules deviennent capables d'émettre des bourgeons, plus couramment appelés germes: c'est la germination (Soltener, 2005).

1.6.2. Micropropagation in vitro

Au niveau du laboratoire, un microbouturage s'effectue en milieu aseptique. Les germes des tubercules indemnes de toute affection sont désinfectés et repiqués en milieu gélosé adéquat, pour être mis en culture dans des conditions de croissance déterminées. Les vitroplants se développent et produisent des microtubercules (génération G0).

Récemment, la production de la G0 se fait en culture hydroponique, par l'utilisation d'une solution nutritive, régulièrement oxygénée. Les vitroplants sont disposés par-dessus la solution, pour produire par la suite des microtubercules. Lors de la levée de la dormance, ces microtubercules sont cultivés en serre hors-sol pour obtenir la G1 puis la G2. Par la suite, cette dernière est cultivée dans le champ pour avoir la SE (semence Super Elite).

Cette méthode a l'avantage d'être rapide quantitativement (500 000 à un million de plants) en conditions contrôlés (INRAA, 2013).

1.7. Maladies et ennemies de la pomme de terre

La pomme de terre est l'une des cultures, la plus exposée aux agents de maladies appartenant à des groupes taxonomiques les plus divers que nous énumérons selon le GNIS et la FNPPT (2006) comme suit :

- Les virus : PVY, PVYⁿ, PLRV, PVS, PVA, PVX, PVM, PR, PMTV, TSWV ;
- Viroïde des tubercules en fuseau ;
- Mycoplasmes : Stolbur et autres MLO ;
- Bactéries : Gales communes, Jambe noire, Pourriture brune, Pourriture annulaire ;
- Champignons : Alternariose, Dartrose, Fusarioses, Gale argentée, Gale poudreuse), Galle verruqueuse (maladie de quarantaine en Algérie), Gangrène, Mildiou, Oosporiose, Pythiales, Rhizoctone brun et violet, Sclérotiniose, Verticilliose ;

- Ravageurs : Nématodes à kyste, Nématodes à galle, Nématodes libres, Taupins, Teigne, pucerons.

1.8. La culture face aux stress abiotiques

Divers désordres physiologiques, dont l'origine n'est pas parasitaire, peuvent être provoqués par les conditions de l'environnement, de la nutrition, et les conditions de conservation des tubercules. Une mauvaise conservation des tubercules ou durant une phase trop longue entraîne le boulage (formation de tubercules fils à partir de tubercules mères sans développement caulinaire ou foliaire). Une conservation à très basse température où l'égermage répété favorise également ce phénomène, qui est lié à la sensibilité variétale à l'incubation. D'autres symptômes apparaissent dans ces conditions comme les nécroses et parfois enfoncement de la peau (GNIS et FNPPT, 2006).

Lors de la plantation de tubercules dans un sol froid, ce qui est notamment le cas de saison précoce, on observe parfois une non-émergence ou des retards à la levée dus à une croissance anormale des germes entraînant l'enroulement des germes (en anneaux notamment). Ces conditions sont favorables au Rhizoctone sur les tiges à la levée.

Une alternance des périodes froides et chaudes entraîne le blocage de la croissance des tubercules. Une stabilisation de la température, par la suite, favorise la relance de la croissance rapide de ces tubercules entraînant leur déformation en : diabolos, excroissance, fissures ou fentes de croissance (GNIS et FNPPT, 2006).

Les gelées matinales causent des dégâts considérables, entraînant des brûlures sur les feuilles supérieures, les feuilles inférieures se fanent et tombent, et les tubercules deviennent mous. En cas de gel partiel, des taches grises à noirâtres apparaissent dans le tubercule.

Une longue exposition à une forte température, les tubercules prennent un "coup de chaud". Leur aspect devient métallique, avec un brunissement des tissus sous-jacent. Les tissus superficiels sèchent et les tubercules se conservent mal. Les fortes chaleurs peuvent aussi provoquer le cœur noir et la filiosité des germes.

Un arrosage excessif ou la présence d'une humidité excessive du sol pendant plusieurs jours favorisent un agrandissement des lenticelles sur les tubercules, qui

déprécie l'aspect de la récolte et favorise la pénétration d'agents de pourriture (GNIS et FNPPT, 2006).

Les symptômes des carences alimentaires se distinguent des autres dégâts (maladies, insectes) par leur manifestation sous forme d'une disposition symétrique sur les feuilles :

- *Carence en azote* : développement très faible de pétioles et des racines, coloration rougeâtre ou orange ; les feuilles sont minces, défoliation précoce ;
- *Carence en phosphore* : les feuilles sont étroites et petites, défoliation prématurée des feuilles les plus anciennes, retard dans la floraison, coloration foncée des feuilles, tubercules peu nombreux et restent petits. Parfois le limbe est bronzé et les nécroses brunâtres apparaissent sur les feuilles ;
- *Carence en potassium* : les déficiences en K se manifestent tardivement sur la plante, modification de la couleur des tissus ou organes les plus âgés qui sont affaiblis, suivie de nécroses et de déformation ;
- *Carence en magnésium* : apparition de chloroses ou de teinte vive sur le feuillage avec formation de nécroses, suite à la disparition du pigment chlorophyllien (Mg est l'élément constituant de la molécule chlorophyllienne) (CIPT LIMA, 1987).

1.9. Règlementation de la production en Algérie

L'autorité responsable du contrôle est le Centre National du Contrôle et Certification des plants et semences (CNCC). Il est sous l'autorité du Ministère de l'Agriculture. Créé seulement en 1992, sa mission est de proposer la réglementation technique relative aux procédures d'inscription et/ou la radiation des espèces et variétés cultivées.

Le conseil d'orientation est composé par les représentants des Ministères de l'Agriculture (président), Finance, Commerce, Planification, des personnels techniques et administratifs de Centres et des Organismes opérateurs dans les filières des semences et plants (CNCC, 1995).

L'arrêté N°250 du 03 octobre 1995, fixe le règlement technique spécifique relatif à la production, au contrôle et à la certification des plants de pomme de terre ; le CNCC est chargé d'assurer les contrôles :

- La présence d'un minimum de pureté variétale ;
- La présence d'un bon état physiologique et sanitaire des tubercules.

Les agréments et admissions au contrôle peuvent être prononcées séparément ou simultanément pour les catégories d'établissements producteurs de plants de : pré-base, de base (E et SE), et plants certifiés (classe A et B).

Schéma de la production de la pomme de terre

Les producteurs de semences doivent se référer à toutes les prescriptions réglementaires par :

- Le choix adéquat de la variété ;
- Le respect de l'itinéraire technique, de la protection sanitaire, et du calibre de la semence ;
- L'emploi judicieux d'un stockage conforme.

Le système adopté pour la production de plants repose sur la sélection généalogique. Les étapes de multiplication sont résumées comme suit :

- 1- Point de départ : G0 (génération du départ) qui se fait au laboratoire ;
- 2- Plants de pré-base : production de la G1, la G2 et la G3 au niveau de la serre, protégée contre les insectes vecteurs de viroses ;
- 3- Plants de base : la culture passe au champ et nous obtenant la SE (Super Elite) et la E (Elite) ;
- 4- Plants certifiés :
 - La classe A, récolte issue de plants de classe E certifiée ;
 - La classe B, récolte issue de plants de classe A (CNCC, 1995).

Les principaux contrôles

➤ Contrôle en végétation : Une déclaration au CNCC doit être faite préalablement des superficies de cultures, accompagnée de l'analyse du sol (Nématodes à Kyste en particulier). Les contrôles sont en nombre de trois minimum pour les plants produisant la SE et de deux pour ceux aboutissant aux classes E, A et B. Les plants de pomme de terre doivent être indemnes de toute affection pathologique notamment celles mentionnées dans le tableau 1. Dans ces conditions, un Certificat d'Agréage Provisoire (CAP) est établi. Dans le cas contraire, le refus est notifié aux établissements producteurs et, aux multiplicateurs (CNCC, 1995).

Tableau1 : Affections pathologiques contrôlées sur les plants de pommes de terre (CNCC, 1995).

VIRUS	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Potato yellow dwarf virus</i> - <i>Potato spindle tuber viroid</i> - <i>Potato vein yellowing virus</i> - <i>South american potato virus</i> - <i>Stolbur mycoplasma</i>
BACTERIES	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Corynebacterium sepedonicum</i> - <i>Pseudomonas solanacearum</i>
CHAMPIGNONS	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Angiosorus solani</i> - <i>Synchytrium endobotcum</i> - <i>Phoma exigua var foveata</i>
INSECTES	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Leptinotarsa decemlineata</i>
NEMATODES	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Ditylenchus destructor</i> - <i>Globodera rostochiensis</i> - <i>Globodera pallide</i>

➤ Contrôle sur la récolte : Des échantillons de tubercules sont prélevés au champ, traités pour lever la dormance et sont plantés en plein champ (nommée : pré-culture). Cela permet de maîtriser les phénomènes de la germination. Parmi les conditions à ne pas négliger est de limiter les pertes lors de la récolte, ainsi que d'éviter les mélanges des parcelles. Une estimation de la récolte est effectuée pour la récolte en totalité et par calibre. Une identification des récoltes est établie par l'attribution d'un numéro affecté à chaque agriculteur-multiplicateur ;

- Contrôle avant expédition : les contrôles se poursuivent et des déclassements peuvent avoir lieu si la qualité des tubercules ne répond pas aux normes au moment de la mise en vente résumées dans le tableau 2 et 3.
- Les tubercules doivent présenter un calibre compris entre 30 et 60 mm. Le sac de stockage de 50 kg doit comporter entre 700 et 900 tubercules.
- L'issu du contrôle final et, à la sortie du produit conditionné, un Certificat d'Agréage Définitif (CAD) est établi pour tout lot répondant aux prescriptions réglementaires (CNCC, 1995).

Tableau 2 : Tolérances maximales pour les tubercules de classes SE, E et équivalentes (CNCC, 1995).

Anomalies	Tolérances % poids	Spécifications	Tolérances dans le cumul
Rhizoctone	6	1/20 de la surface du tubercule	
Gale argentée	6	1/3 de la surface du tubercule	
Pourritures sèche et humides	1	0,5% de chacune de : Fusariose, Alternariose et Mildiou ; 0,25% pour jambe noire	Cumul 6%
Gale commune	4	1/3 de la surface du tubercule	
Gale poudreuse	0,25	1 à 2 pustules par tubercule	
Teigne	2	plus de 1 galerie nette ou 2 yeux altérés	
Taupins	4	5 piqûres par tubercules	
Diffformes	3		
Blessures	2	Blessures graves ou blessures légères non cicatrisées	
Noircissement interne (blow)	5	> 5 mm de profondeur	
Hors calibre	2		
Terre, corps étrangers	0,5		

Tableau 3 : Tolérances Maximales pour les tubercules de classes A et B (CNCC, 1995).

Anomalies	Tolérances % poids	Spécifications	Tolérances dans le cumul
Rhizoctone	10	1/20 de la surface du tubercule	
Gale argentée	10	1/3 de la surface du tubercule	
Pourritures sèche et humides	1,5	1% de chacune de : Fusariose, Alternariose et Mildiou ; 0,25% pour jambe noire	Cumul Classe A : 7% Classe B : 8%
Gale commune	6	1/3 de la surface du tubercule	
Gale poudreuse	0,25	1 à 2 pustules par tubercule	
Teigne	2	plus de 1 galerie nette ou 2 yeux altérés	
Taupins	5	5 piqûres par tubercules	
Difformes	5		
Blessures	3	Blessures graves ou blessures légères non cicatrisées	
Noircissement interne (blow)	6	> 5 mm de profondeur	
Hors calibre	2,5		
Terre, corps étrangers	0,5		

2. LE STRESS SALIN

Le stress salin est un phénomène abiotique, résultant d'une absence ou de la présence excessive des sels minéraux au niveau du sol ; à ne pas confondre avec la salinisation des sols, qui est une présence outrancière de sels minéraux dans le sol. Une longue exposition du végétal à ce stress peut nuire à son bon fonctionnement physiologique.

Le sol est une ressource vitale pour le règne végétal. Il représente l'un des facteurs écologiques déterminant pour le développement quantitatif et qualitatif du végétal. Actuellement, les différentes interventions de l'homme et les mauvaises gestions des

ressources naturelles ont fait que le sol agricole se détériore. Ainsi, ces sols subissent différentes formes de dégradation, le plus souvent irréversibles.

2.1. La salinisation des terres agricoles en Algérie

La salinisation des sols est un fléau qui prend de l'ampleur en Algérie. L'irrigation par les eaux saumâtres, l'utilisation parfois excessive des engrais en relation avec la diminution des précipitations conduisent à l'installation des sels minéraux dans la couche superficielle des terres agricoles fertiles.

L'Algérie, dont une grande partie des régions agricoles se caractérise par un climat aride et semi-aride, est touchée par le processus de la salinisation secondaire. En 2005, la FAO a déclaré que les terres agricoles avoisinant les bassins côtiers oranais et ceux du Chélif sont les plus affectés par les sels. Plus de 82% des surfaces sont atteints par la salinisation dans cette région (Douaoui *et al.*, 2006), et près de 3,2 millions d'hectares sont menacés de salinisation (Benmahiou, 2009). La région de Mina (Relizane) est également affectée et les surfaces cumulées représentent 84,65 % en 2011. Ainsi, les teneurs élevées en argile des sols de la zone reste une problématique pour la gestion hydroagricole (Benkhelifa *et al.*, 2012).

Généralement, l'irrigation agricole par les eaux souterraines est effectuée pour une agriculture intensive, conduisant à des risques de pollution des nappes par les engrais azotés. Les petites exploitations familiales, qui ont des capacités de creuser des puits, sont les plus vulnérables à de tels usages non durables des eaux et des sols. En l'absence d'une gestion de cet usage, c'est toute l'économie agricole locale qui est fragilisée, avec des effets en cascade sur le développement rural.

Les nitrates polluent la nappe de la Mitidja dans ses parties Est et Ouest. L'eau du barrage de Keddara est particulièrement dure. Enfin, les taux de manganèse et de chlorures dans l'eau d'alimentation de Constantine sont proches du maximum de la norme admise par l'Organisation Mondiale de la Santé (Aquastat, 2005). A cela, vient s'ajouter les eaux de la nappe phréatique de la cuvette de Ouargla avec le faciès chloruré sodique, par conséquent, à la sodisation des sols dans cette région (Nezli *et al.*, 2007). Ces

régions sahariennes situées au centre (Oued Rhir) et au nord Sahara (Oued Souf, Biskra) sont de mauvaises qualités et leur teneur en sels peut dépasser les 7 g/l au niveau de la région de Oued Rhir. Cette forte teneur en sels conjuguée à la présence d'une nappe phréatique proche de la surface du sol, est l'une des principales causes de la stérilisation des sols de plusieurs zones agricoles (Khadraoui, 2010).

Cette circonstance a poussé les chercheurs à l'initiation d'un projet CEE ; STD 0108 F sur « la salure des sols du Maghreb » en 1992, dirigé par le Professeur Claude Cheverry de ENSA –Rennes (France) avec les partenaires algériens Dellal A, Halitim A, Daoud Y. Le manque d'une cartographie précise des sols salés et d'un suivi de l'évolution temporelle de la salinité dans les zones irriguées ne permet pas de juger des risques, ni d'ailleurs des efforts entrepris de restauration des sols salés, et encore moins d'anticiper le phénomène avec l'extension de l'irrigation (Bouchenafa et Dellal, 2012).

2.2. La salinisation des terres dans le monde

La salinisation des terres est un problème majeur à l'échelle du globe. Selon la FAO et les estimations les plus récentes, elle affecte déjà au moins 400 millions d'ha et en menace gravement une surface équivalente. Elle est donc très importante quantitativement puisque encore une fois, nous n'avons qu'un milliard et demi d'ha cultivés sur la Terre (Legras *et al.*, 2012).

Les causes techniques les plus importantes à l'origine de la diminution de la production agricole, particulièrement dans les zones arides et semi-arides, sont l'engorgement, la salinisation et la sodification. Chaque minute, 3 ha de terres arables du monde se perdent à cause de la salinité (Iptrid, 2006).

Les régions du monde les plus affectées par la salinisation sont la Tunisie, l'Égypte, l'Iraq, l'Iran, le Pakistan et la Californie (Davoust, 2006).

2.3. Types de salinisation

Les sols sont dit salés ou sols halomorphes ou sols salsodiques, lorsque la concentration en sels des solutions dépasse 0.5 g.L^{-1} . Selon Iptrib (2006), l'accumulation des sels sur les terres peut être de deux origines :

1- Salinisation primaire ou naturelle : 80% des terres salinisées ont une origine naturelle.

On parle alors de salinisation "primaire", due aux sels se formant lors de l'altération des roches ou à des apports naturels externes tel que :

- ✓ dans les régions côtières, intrusion d'eau salée ou submersion des terres basses
- ✓ inondations périodiques par de l'eau de mauvaise qualité
- ✓ remontée d'une nappe phréatique salée près de la zone racinaire

2- Salinisation secondaire, induite par l'activité humaine, liée aux pratiques agricoles et en particulier à l'irrigation fertilisante.

2.4. Origine de la salinisation des terres

La salinisation a été identifiée comme un processus majeur de la dégradation des terres. Les causes techniques les plus importantes à l'origine de la diminution de la production sur de nombreux périmètres irrigués, particulièrement dans les zones arides et semi-arides.

A mesure que les roches et les sols sont érodés par l'eau, de petites quantités des sels minéraux qu'ils contiennent, sont entraînées jusque dans les fleuves et les couches aquifères, s'infiltrant ainsi dans l'eau d'irrigation. Si on utilise trop peu d'eau dans un champ, les sels s'incrustent dans le sol. Mais le plus grave danger pour le sol est l'eau en trop grande quantité qui cause son engorgement et élève, à son tour, le niveau de la nappe phréatique. Le sol fonctionne alors comme une éponge, aspirant l'eau dans la rhizosphère par capillarité. Cet effet peut attirer l'eau à la surface sur environ 1,5 m, selon les sols. L'eau s'évapore et le sel reste autour des racines, entravant leur capacité

d'absorber l'eau. Ce processus se produit en particulier dans les régions arides (FAO, 2002).

2.5. Unités de mesure de salinité

Les degrés de salinité sont résumés comme suit :

- La concentration en sel est donnée par le TDS (Quantité Totale de Matière Dissoutes) exprimé en mg de sel par litre d'eau (mg.L^{-1}) ou en grammes de sel par mètre cube d'eau (g.m^{-3}) ($\text{mg.L}^{-1} = \text{g.m}^{-3} = \text{ppm}$) (Copyright, 2012).
- La concentration en sel peut aussi être mesurée grâce à la conductivité électrique de l'eau d'irrigation (CE) (Copyright, 2012).
- La conductivité électrique est exprimée en millimhos par centimètre (mmhos.cm^{-1}) ou deciSiemens par mètre (dS.m^{-1}) ou microSiemens par centimètre ($1\text{dS.m}^{-1} = 1000\mu\text{S.cm}^{-1}$). La relation entre la concentration en sel (C) et la conductivité électrique (EC) est approximativement : $C = 640 \text{ EC}$ (Copyright, 2012).

2.6. Effets secondaires de la salinisation

La salinisation peut entraîner :

- Un accroissement de la pression osmotique qui rend l'eau plus difficilement mobilisable par les plantes ; et provoque une plasmolyse des cellules, parfois irréversible et qui peut aboutir à la mort du végétal (IRD 2008);
- Une toxicité de certains ions pour les végétaux (Cl^- , Na^+ , etc) ; s'accumulant dans les feuilles et peuvent provoquer des dommages métaboliques) (IRD 2008) ;
- Une dégradation du sol : modifications de l'état structural, diminution de la conductivité hydrique, la diminution de l'activité microbienne du sol, la nitrification et la production de CO_2 et une augmentation des composés organiques solubles avec une diminution des composés humiques polycondensés (IRD 2008).

2.6.1. Effet de la salinisation sur les microorganismes édaphiques

La qualité des sols, leurs services écosystémiques et leur aptitude à faire face à ces différentes menaces dépend en grande partie de leur microflore. Celle-ci présente en particulier des capacités cataboliques qui participent aux cycles biogéochimiques. Les microorganismes sont donc utilisés comme bio-indicateurs lors de l'évaluation de «la santé» et de «la qualité» d'un sol (Chapman *et al.*, 2007). Généralement, la salinisation du sol incite à sa dégradation biologique, se traduisant par une diminution du taux de la matière organique ; corrélativement une diminution de la faune et de la flore, et un appauvrissement biologique conduisant à la stérilisation partielle du sol (Bouchenafa et Dellal, 2012).

La salinité a été également identifiée comme un important facteur abiotique stressant l'environnement des microorganismes du sol aride. La concentration de la solution en sels entraîne une augmentation de la pression osmotique (Calvet, 2003).

Hormis la tension osmotique élevée caractérisant les sols salés, ces sols constituent un milieu défavorable pour les microorganismes en raison de la présence des ions toxiques et de leur pH très basique ainsi que leur structure asphyxiante. Un pH compris entre 8 et 9 est reconnu, généralement comme limite de la dégradation de la structure (Aubert, 1983).

Dans ces sols, les activités microbiologiques en particulier les processus de dégagement de CO₂ (minéralisation du carbone) et celui de la minéralisation de l'azote (notamment la nitrification), subissent à la fois l'influence négative des paramètres de la salinité et ceux de la sodicité. Toutefois, la sensibilité des micro-organismes à l'égard de la salinité est différentielle suivant les degrés de la salure et suivant l'espèce microbienne (Chapman *et al.*, 2007).

2.6.2. Effet de la salinisation sur le végétal

Chez plusieurs espèces végétales, les dégâts produits par le stress salin se manifestent communément par une séquence de changements morphologiques et physiologiques (Levigneron *et al.*, 1995). Les effets néfastes de la salinité sur la croissance

des végétaux sont généralement associés au faible potentiel osmotique de la solution du sol et au niveau élevé de toxicité du sodium (et du chlore pour certaines espèces) qui provoquent des perturbations multiples sur le métabolisme, la croissance et le développement des plantes aux niveaux moléculaire, biochimique et physiologique (Yancey *et al.*, 1982, Patridge, et Wilson, 1987 ; Thamir *et al.*, 1992).

Selon Smillie et Nott (1982), la présence des sels solubles dans la solution du sol abaisse son potentiel osmotique et induit au niveau de la plante un état de «sécheresse» physiologique qui se traduit par une réduction de l'activité métabolique et une altération des pigments. La salinité réduit l'absorption de l'eau par les racines ; la turgescence cellulaire est abaissée, ce qui entraîne un phénomène de plasmolyse. Mais, certains végétaux sont capables d'ajuster plus ou moins rapidement leur potentiel osmotique à celui du milieu extérieur, de manière à maintenir le gradient de potentiel hydrique entre la plante et le milieu. Les ions chlorure et sodium peuvent être stockés chez les plantes dites inclusives, soit au contraire peu retenus et mobilisés par la sève phloémique jusqu'aux racines chez les plantes dites exclusives (Doudech *et al.*, 2008). NaCl est un agent influençant l'enracinement de certaines espèces, une augmentation de la concentration saline au-delà du seuil de tolérance favorise la réduction significative du nombre de racines et de leur longueur (Doudech *et al.*, 2008)..

Chez les glycophyte la réalisation de l'ajustement osmotique lors d'un stress salin conduit à l'accumulation de solutés organiques, tels que des glucides solubles et des polyols (Greenway et Munns, 1980) ou encore certains acides aminés et leurs dérivés bétaïniques (Stewart et Larher, 1980). Parmi ces acides aminés la proline, de teneur habituellement faible dans les tissus des plantes cultivées sur milieu dépourvu de sel et donc peu contraignant sur le plan hydrique, se trouve accumulée de façon spectaculaire en réponse au stress salin (Hernandez *et al.*, 2000). Cela dit, un phénomène de perturbation nutritionnelle minérale s'installe chez les végétaux. Une compétition nutritionnelle est engendrée par les ions Na^+ et Cl^- constitutifs du NaCl vis-à-vis des cations (Ca^{2+} , K^+ , Mg^+ ...) et des anions (NO_2^- , NO_3^- , PO_4^- ...), aboutissant à un déficit minéral de la plante (Levigneron *et al.*, 1995). Le NaCl provoque, notamment, la hausse des teneurs des composés glucidiques, protéiques et phénoliques des cultures. Il induit en

revanche, des pertes chlorophylliennes des plantes (jaunissement des feuilles) (Lepengue *et al.*, 2012).

Les cultures peuvent tolérer la salinité jusqu'à certains niveaux sans perte mesurable dans leurs rendements (seuil de salinité). Quand le seuil de salinité est dépassé, le rendement des récoltes est réduit linéairement à mesure que la salinité augmente. Le tableau 4 résume le seuil de tolérance de certaines espèces de cultures.

Tableau 4 : Seuil de tolérance à la salinité de certaines cultures (Copyright, 2012).

Nom commun du végétal	Seuil moyen de salinité (CE)
<i>Culture de plein champ</i>	
- Coton	7,7 (+)
- Blé	6
- Tournesol	5,5
- Riz	3
- Maïs	1,7
- Canne à sucre	1,7 (-)
<i>Fruits</i>	
- Olive	4 (+)
- Pêche	3,2
- Pamplemousse	1,8
- Orange	1,7
- Raisin	1,5
- Pomme	1 (-)
<i>Légumes</i>	
- Courgette	4,7 (+)
- Brocoli	2,8
- Pois	2,5
- Tomate	2,3
- Pomme de terre	1,7
- Oignon	1,2 (-)

3. LA CULTURE *IN VITRO*

La multiplication végétative *in vitro* est un mode de reproduction asexuée artificielle, elle comprend un ensemble de méthodes faisant intervenir, d'une part des éléments d'asepsie, et d'autre part la mise en place d'un environnement parfaitement contrôlé : milieux définis pour chaque espèce végétale, conditions optimales de température, photopériode, d'humidité,... Ces méthodes s'appliquent autant à des fragments de plante (tissus ou organes), qu'à des cellules isolées ou à des protoplastes (Dutuit et Gorenflot, 2008).

La culture *in vitro* doit toute son extension à la totipotence cellulaire des végétaux. Toute cellule d'une plante peut, dans certaines conditions, se différencier pour devenir une cellule œuf, appelée cellule embryogène, capable de générer un nouvel individu. Ainsi peut-on obtenir à partir d'un fragment végétal plusieurs dizaines de milliers de plantules (Guyot et *al.*, 2003).

Chez la pomme de terre, on peut repiquer des fragments de germes comportant un nœud, qu'on appelle explants, munies d'une petite feuille et d'un bourgeon adventif. La plante issue, appelée vitroplant, peut être à son tour fragmenter, et conduit à d'autres vitroplants. Un seul bourgeon permet de produire en moins d'un an, 2 millions de plantes, toutes identiques à la plante mère sur des milieux nutritifs artificiels (Cevie, 1997).

3.1. Les applications de la culture *in vitro* pour une amélioration variétale

Les applications sont nombreuses aujourd'hui tant dans le domaine de l'horticulture que dans celui de la recherche (notamment en amélioration des plantes), ou encore pour conserver la diversité variétale (Conservatoires) pour sauvegarder des espèces menacées (conservations *ex-situ*). Ces techniques exigent la connaissance des facteurs de l'environnement (température, lumière, composition du milieu...) du fragment de plante mis en culture afin de l'orienter vers un programme d'évolution déterminé (Dellaa, 2013).

La culture *in vitro*, peut être utilisée pour :

- Reproduire de façon identique, une espèce et la multiplier en grande quantité, et à moindre coût pour la mettre sur le marché dans les plus courts délais. On parle d'une micropropagation rapide ;
- Préserver des espèces anciennes et menacées, pour conserver la biodiversité ;
- Elaborer de nouvelles variétés de plantes plus rapidement ;
- Assainir des plantes virosées et conserver des plantes saines (Agnès *et al.*, 2013).

3.1.1. Micropropagation

Les plantes se multiplient par semis ou par multiplication végétative. La micropropagation *in vitro*, apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé et en un temps plus réduit (Ochette, 2005). La technique consiste à proliférer des bourgeons axillaires préexistants sur l'explant mère. Ceci offre une parfaite garantie de conformité génétique et une bonne stabilité des caractères au cours des repiquages successifs (Demol *et al.*, 2008). L'application de la technique de la micropropagation des plantes ligneuses ; fruitiers, forestiers et d'ornement permet l'amélioration de leurs capacités d'enracinement notamment sur le porte greffe reconnue difficile (Soltener, 2005). Cette technique permet la multiplication végétative de plusieurs plantes alimentaires, médicinales, horticoles, agroforestières,... (Bretaudeau, 2006).

Chez la pomme de terre, cette technique est actuellement utilisée pour la production de semences de base (figure 3). Désormais les pommes de terre poussent aussi en pots et produisent des tubercules de la même manière que celles qui sont produites en terre.

D'un point de vue pratique, ce système de production de semences représente sans nul doute une alternative intéressante et efficace pour constituer rapidement un stock de matériel de qualité sanitaire irréprochable. Il peut être aisément intégré dans le cadre d'un approvisionnement en plants de base de haute qualité destiné à la production de semences certifiées (Changins, 2011).

3.1.2. Culture méristématique

Les méristèmes qui sont des tissus de formation, en expansion continue, confèrent à la plante une organogenèse permanente chez les végétaux supérieurs. Ils représentent des petits massifs de cellules indifférenciées (0,1 mm à 0,5 mm) et, conservent la capacité de se diviser activement. Ces zones méristématiques gardent jusqu'à leur mort le caractère juvénile. Elles jouent un rôle capital dans le développement végétal puisqu'elles édifient tous les organes (Margara, 1989 ; Zryd *et al.* 1988).

La culture de méristème est la méthode la plus généralisable et la plus sûre pour éviter l'apparition de plantes non conformes à la plante mère ou variants (Saadi, 1991). En multipliant le méristème prélevé au sommet d'une plante ou dans le bourgeon axillaire, le plus souvent indemne de maladies. On pourra très rapidement obtenir de nombreuses plantes, toutes semblables du point de vue génétique et débarrassées de maladies dont elles étaient affectées (Sama *et al.*, 1998)

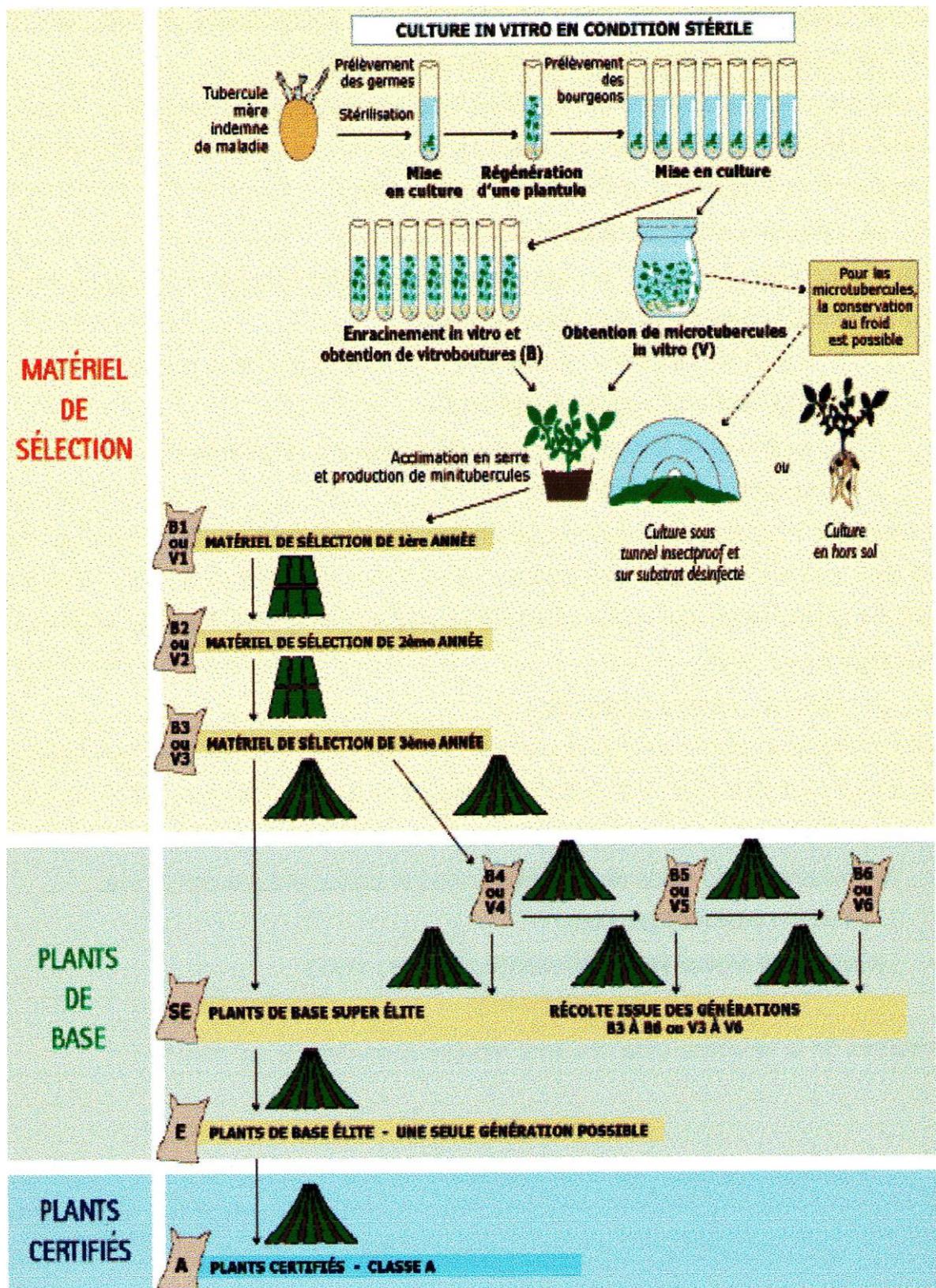


Figure 3 : Principales étapes de la culture *in vitro* de la pomme de terre en vue de la production de la semence (Corringan et Trillion, 2005).

En conditions aseptiques et sous une loupe binoculaire, le dôme du méristème (partie centrale du bourgeon) est prélevé et placé en milieu artificiel. Selon les objectifs, le milieu de culture est modifié périodiquement, afin d'aboutir à un jeune plant. La culture méristématique permet donc, d'obtenir une plante identique à la plante initiale. Lorsqu'une plante est atteinte par un virus ou une bactérie, les méristèmes restent indemnes, car ils ne sont pas encore infectés du fait que leur multiplication est plus rapide que la prolifération des virus pathogènes. La culture de cette structure aboutit alors à une plante saine (Agnès *et al.*, 2013 ; Schmid et Keller, 1984 ; Sama *et al.*, 1998).

3.1.3. Embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est une forme de multiplication végétative permettant d'obtenir des plantules génétiquement identiques à la plante mère. Dans une graine, on trouve la future plante sous forme d'embryon (embryon zygotique) qui résulte de la reproduction sexuée. Cette technique consiste alors à provoquer l'apparition d'embryons à partir des tissus végétaux mis en culture *in vitro* qui provoquent de nombreuses divisions cellulaires. Cette embryogenèse somatique génère alors des embryons dans ces divisions cellulaires ou dans les cals, c'est-à-dire un amas de cellules indifférenciées (qui ont été dédifférenciées sur l'explant de la plante mère avec le phénomène de totipotence végétale). Sous certaines conditions, les cultures cellulaires s'organisent ensuite en nombreux petits massifs à structure bipolaire nommés embryons somatiques (avec un méristème de tige et un méristème de racine). Comme les embryons zygotiques (présents dans les graines), les embryons somatiques, obtenus à partir de cellules non sexuées (sans fécondation), se développent en un nombre illimité de plantes génétiquement identiques. C'est actuellement la technique la plus performante pour la multiplication végétative des conifères (Agnès *et al.*, 2013).

3.1.4. Variation somaclonale ou vitrovariation

La variation somaclonale, induite lors d'une culture cellulaire plus ou moins longue en conditions artificielles, est bien connue chez les plantes. On parle dans ce cas d'une mutation induite (Une partie de cette variation est due à des mutations accidentelles des gènes. Les différents mutagènes augmentent la fréquence des mutations qui peuvent être soumises à la sélection, mais aucun n'est spécifique d'un type de mutation. La

plupart des mutations induites sont récessives : elles correspondent à la perte d'un segment d'ADN (délétion) ou à son altération (mutation ponctuelle) (Bouharmont, 1986 ; Doctrinal, 2013).

Ces mutations ne diffèrent pas essentiellement de celles qui apparaissent spontanément en condition naturelle de certaines espèces. Pour autant que la régénération des plantes à partir des cultures soit efficace, la variation somaclonale est une source de diversité complémentaire, parfois utilisable en sélection, en raison du grand nombre de cellules susceptibles d'être atteintes. Son utilisation se justifie surtout lorsque le caractère recherché peut être sélectionné par des pressions appliquées en répétition aux cultures cellulaires elles-mêmes (Bouharmont, 1991).

La variation somaclonale est induite pendant la phase de callogenèse des cellules végétales cultivées *in vitro*. Elle apparaît parfois comme étant un phénotype changé dans les plantes régénérées à partir des cultures (Agnès *et al.*, 2013). Généralement, cela consiste à l'exposition répétée des cultures de cals au stress tel que le froid, des toxines, de la salinité. Au moment de la régénération, on peut obtenir des plantes nouvelles avec des caractères de résistance. Pour de nombreuses espèces cultivées : tabac, tomate, céleri, canne à sucre, fenouil, laitue, pomme de terre etc. des variations somaclonales ont stimulé de nouveaux caractères intéressants : résistance aux maladies, précocité de floraison, couleur et forme des fleurs, accroissement de vigueur, résistance au sel, à la sécheresse (Doctrinal, 2013).

3.2. Organogenèse

L'organogenèse est la base fondamentale de la multiplication végétative, laquelle s'appuie toujours sur la formation de méristèmes nouveaux (Margara, 1989). En partant d'un explant, on aboutit à la formation d'un nouvel individu par l'élaboration de bourgeons (caulogenèse) et de racine (rhizogenèse).

3.2.1. Caulogenèse

La caulogenèse désigne à la fois l'initiation et le développement des bourgeons terminaux, axillaires, adventifs ou néoformés sur un cal. Les bourgeons terminaux dérivent de la gemmule de l'embryon. Les bourgeons axillaires sont produits

généralement par les deux ou trois assises cellulaires superficielles de la tige. Les bourgeons adventifs sont formés à partir d'organes différenciés de la plante (entre nœuds, tubercules, racines). Ils peuvent avoir pour origine des massifs cellulaires restés méristématiques ou bien provenir d'une différenciation de certaines cellules (Caraglio, 2012).

Les bourgeons néoformés *in vitro* peuvent apparaître sur l'explant initial ou sur un cal, ils peuvent être considérés comme un cas particulier de bourgeons adventifs (Boxus, 1995). Ils sont induits sur tout type d'organe ou de tissu y compris sur ceux qui ne les produisent pas dans les conditions naturelles (Margara, 1989).

Les études cytologiques, conduites dans le but de déterminer l'origine des bourgeons néoformés à partir d'un fragment d'organe contenant divers tissus, montrent souvent que l'aptitude à la caulogenèse se manifeste à partir de certaines catégories de tissus telle que: le cambium, le parenchyme vasculaire ou libérien (Fortes et Pais, 2000).

L'intensité de cette néoformation est nettement dépendante de la nature des tissus contenue dans l'explant. Elle est maximale pour les tissus cambiaux, élevée pour les tissus du phloème et du xylème, très faible ou nulle pour le parenchyme cortical ou médullaire (Margara, 1989) .

3.2.2. Rhizogenèse

La rhizogenèse désigne la néoformation et la croissance de racines. Les méristèmes de racines se répartissent en plusieurs catégories selon leurs origines. En culture *in vitro*, de fortes concentrations en auxines accompagnées ou non à de faibles concentrations en cytokinines, nous permettent d'obtenir l'enracinement des tiges feuillées (Cedevit, 2013)

La rhizogenèse est un phénomène complexe, il comporte différentes phases : la dédifférenciation, formation d'amas de cellules méristématiques, différenciation et organisation des amas méristématiques en primordium racinaire qui se développeront en jeunes racines (Margara, 1989; Boxus, 1995). L'assise génératrice libéro-ligneuse (cambium) donne des tissus de bonne aptitude callogène. Le cal est formé essentiellement de cellules de type méristématique secondaire, qui incorporent certaines

cellules voisines parenchymateuses. Les cellules méristématique se différencient par la suite et s'organisent pour donner naissance à une nouvelle racine (Boxus, 1995).

3.3. Facteurs de la régénération

Les facteurs influant sur la régénération *in-vitro* peuvent être répartis en 2 groupes :

- 1- Les facteurs internes, liés à la plante : concerne d'une part le génotype, la nature et l'âge ontogénique de l'explant et d'autre part l'état physiologique de la plante mère sur laquelle, l'explant a été prélevé ;
- 2- Les facteurs externes qui englobent, les milieux de cultures (notamment leur composition en régulateurs de croissance et les sucres) et les conditions de la mise en culture.

3.3.1. Effet de l'explant

Un des atouts majeurs de la culture *in-vitro* est de montrer que, les cals pouvaient produire soit des embryons somatiques, soit des bourgeons et dont le développement permet de régénérer des plantes conformes à la plante mère. Pratiquement, n'importe quel organe (bourgeon, racine, feuille, anthère, etc.) ou fragment d'organe (explant), prélevé sur celle-ci, peut être cultivé isolément sur milieu nutritif synthétique, mais le choix de celui-ci est d'une importance primordiale. On retiendra cependant que la réponse *in-vitro* est sous la dépendance de nombreux facteurs (Saadi et Hamdani, 2007).

✚ L'âge physiologique et ontogénique de l'organe

Généralement dans les cultures *in-vitro*, les explants les plus jeunes (embryons immatures, jeunes feuilles, méristèmes etc.) sont les plus privilégiés. Leur état juvénile favorise plus de possibilités de régénération. (Vidalis *et al.*, 1989). Souvent, ce sont les tissus provenant d'embryons qui expriment le plus souvent, d'une manière nette et reproductible, l'aptitude à la régénération, suivis de loin par les cotylédons (Saadi et Hamdani, 2007).

L'époque du prélèvement

Ce problème se pose surtout pour les espèces vivaces, on peut distinguer un stade de vie active et un stade de vie ralentie de la plante ce qui conduit les explants à développer des réactions différentes en culture *in-vitro*. Cette différence peut être expliquée par la modification des équilibres internes des régulateurs de croissance (auxines, cytokinines, gibbérelline ...) lors des différentes saisons (Vidalis *et al.*, 1989).

La taille de l'explant

Plus la taille est importante et plus les équilibres endogènes sont déterminants et les conditions extérieures seront influentes. La taille choisie variera selon la nature de l'explant. Si l'explant est de nature reproducteur, le prélèvement devrait engendrer l'organe en sa totalité (un nœud, un apex, ou un bourgeon entier). mais dans le cas d'un tissu différencié (feuilles, tige, racines, inflorescence...) des fragments de 5 à 10 mm suffiront (Vidalis *et al.*, 1989; Saadi et Hamdani, 2007).

D'une manière générale, il existe des tissus privilégiés appelés "tissus cibles" qui répondent à un stimulus inducteur qui orientera son programme morphogénétique vers une voie particulière de développement, contrairement à certains tissus récalcitrants aux manipulations *in-vitro*, dues essentiellement à un manque de compétence cellulaire (Webb *et al.*, 1989; Wheeler *et al.*, 1985).

3.3.2. Effet du génotype

La plupart des plantes montrent une régénération génotypique spécifique liée à l'espèce. A l'intérieur d'une même espèce, un génotype donne des bourgeons tandis qu'un autre ne peut fournir que des embryons (Boxus, 1995). Cependant, plusieurs auteurs mentionnent que seulement certains génotypes paraissent posséder la capacité d'induire une embryogenèse somatique. Cette capacité, chez beaucoup d'espèces semble être génotypiquement contrôlée (Isac *et al.*, 1994 ; Vidalis *et al.*, 1985 ; Caraglio, 2012).

3.3.3. Effet du milieu de culture

Avec le développement des cultures de tissus, divers milieux de base comprenant des sels inorganiques, des composés organiques (sucres, vitamines et régulateurs de croissance) ont été progressivement utilisés. Les milieux de culture sélectionnés doivent être adaptés aux besoins nutritifs de la plante soumise à l'étude, afin de laisser s'exprimer pleinement son potentiel génétique.

Les principaux constituants d'un milieu de culture sont généralement représentés par : macro et les micro-éléments, sources carbonée et azotée, vitamines et régulateurs de croissance (Vidalis *et al.*, 1989).

Dans 70% des cultures, le milieu Murashige et Skoog (MS) est utilisé comme milieu de base pour tout type de culture *in vitro*. Ce milieu est essentiellement conseillé pour le déclenchement de l'organogenèse, en particulier pour la néoformation de bourgeons, il s'est révélé nettement supérieur à d'autres milieux (Margara, 1989).

Le milieu de Murashige et Skoog est caractérisé principalement par une très forte teneur en sels minéraux, en particulier en potassium et par une concentration élevée en azote (sous forme de nitrate et d'ammonium) dont 1/3 apporté sous forme réduite (ions NH_4^+). Le rapport nitrate/ammonium, dans ce milieu est très favorable à l'induction de l'embryogenèse somatique (Dal-Vesco et Guerra, 2001).

3.3.4. Les régulateurs de croissance

Un régulateur de croissance, appelé également "phytohormone", est défini comme étant, une substance qui, suivant sa concentration absolue ou relative dans le milieu, peut supprimer, permettre ou modifier sous certaines conditions les processus de différenciations (Vidalis *et al.*, 1989).

L'induction d'embryons somatiques et la formation de plantules sont très sensibles aux conditions de cultures dont principalement la composition hormonale du milieu. Le développement *in vitro* d'espèces végétales dépend essentiellement des taux d'auxines et de cytokinines (équilibre hormonal) (Staritsky et Van Hassel, 1980).

L'influence de ce rapport hormonal n'est, cependant, pas une règle générale pour toutes les espèces végétales. En effet, il suffit, dans certains cas, de modifier la concentration de l'un des régulateurs pour parvenir à une réponse morphogénétique (Dal-Vesco et Guerra, 2001).

Par ailleurs, il est important de dire, en se basant sur la diversité des réponses obtenues dans ce domaine, qu'il n'existe pas de règle générale, concernant l'efficacité des différentes auxines et cytokinines sur la caulogenèse ou sur la rhizogenèse. Les effets paraissent varier essentiellement avec le matériel végétal employé. Il est utile de rappeler, que les auxines les plus souvent utilisées en organogenèse ou en embryogenèse somatique sont le 2.4-D, l'AIA, l'AIB et l'ANA. A cause de son bon pouvoir inducteur, le 2.4-D semble détenir, le record d'utilisation dans les études portant sur l'embryogenèse somatique ; puisque 57 % des travaux de recherche l'utilisent comme régulateur. Quant aux cytokinines, elles sont représentées par la Kinétine, la benzyladenine (BA), la 2-isopentenyladénine et la zéatine (Vidalis *et al.*, 1989).

Outre, les auxines et les cytokinines, d'autres régulateurs de croissance peuvent intervenir dans le processus d'organogenèse ou d'embryogenèse somatique tels que les gibbérellines (GA) et l'acide abscissique (ABA) ; cependant, leur utilisation reste limitée. Les gibbérellines, selon Jayasree *et al.*, 2001, stimulent fortement la production de bourgeons néoformés chez la pomme de terre lorsqu'elles sont combinées aux cytokinines. Par contre, d'après Margara (1989), les gibbérellines ont la réputation d'inhiber l'organogenèse et particulièrement la rhizogenèse chez le Chou-fleur. L'acide abscissique (ABA) quant à lui, est employé par certains auteurs dans le but de corriger ou d'améliorer la qualité morphologique des embryons (Unnikrisham *et al.*, 1990; Dodeman *et al.*, 1997). Son usage peut inhiber, en même temps, le déclenchement éventuel d'une embryogenèse secondaire et empêche la germination précoce des embryons somatiques (Svobodova *et al.*, 1999).

3.4. Facteurs d'incubation

3.4.1. La photopériode

La lumière est un facteur déterminant pour la culture *in vitro* des plantes. La durée de la photopériode affecte la prolifération, la vigueur et la croissance des cals (Lepoivre, 2003). De façon générale, le début de croissance nécessite une faible intensité lumineuse (500 à 1000 lux) avec 12 à 16 heures de photopériode (Bommineni et Jauhar, 2003). Pour la rhizogenèse, l'auxine endogène produite par les plantes pourrait être plus active lorsqu'elles séjournent à l'obscurité. L'obscurité limite l'oxydation des composés phénoliques et optimise l'expression des phytohormones. Ceci impliquerait que l'obscurité réduirait la dominance apicale de la pousse primaire et favoriserait par conséquent la prolifération du tissu méristématique (Kone *et al.*, 2010). Chez la pomme de terre, la dominance apicale est atténuée en présence d'une photopériode régulière combinée à une température modérée (5 à 10 °C) (Rousselle *et al.*, 1996).

3.4.2. La température

La température de beaucoup de chambres de culture est constante de l'ordre de 22° à 25°C (Kone *et al.*, 2010). Mais, selon Lê (1994), des faibles températures de 15° à 20°C stimulant la microtubérisation chez la pomme de terre. Tchetché (2008) explique dans ces travaux que l'incubation des vitroplants à des températures non régulières incite la non régularité de l'évapotranspiration du plant, et par conséquent une diminution de sa croissance.

3.5. Les applications actuelles de la biotechnologie végétale

Parmi les applications les plus classiques, nous retrouvons la sélection *in vitro*. Celle-ci a pour but de sélectionner du matériel génétique en imposant des pressions spécifiques aux cultures tissulaires dans des conditions de laboratoire. De récentes publications signalent des corrélations intéressantes entre les réactions *in vitro* et l'expression des caractéristiques recherchées sur le terrain, le plus souvent la résistance à la maladie. On obtient également des résultats positifs pour la tolérance aux herbicides, aux métaux, à la salinité et aux faibles températures. S'agissant des critères de sélection généralement importants pour les essences forestières (notamment la vigueur, la forme

du tronc et la qualité du bois), le manque de corrélation avec les réponses de terrain fait encore obstacle à la sélection *in vitro*. Cette méthode pourrait toutefois s'avérer utile dans les programmes de foresterie pour déceler la résistance à la maladie et la tolérance à la salinité, au gel et à la sécheresse (Greenfacts, 2013).

Les percées les plus remarquables des biotechnologies agricoles sont dues aux recherches sur la structure du génome et sur les mécanismes génétiques qui sous-tendent les caractéristiques importantes au plan économique. Autant de connaissances qui vont de plus en plus guider l'application des biotechnologies dans tous les secteurs agricoles (Greenfacts, 2013). Une équipe internationale de scientifiques du Potato Genome Sequencing Consortium (PGSC) a annoncé qu'elle a publié la première ébauche de séquence du génome de la pomme de terre. Ce résultat pourrait révolutionner les programmes de sélection de la pomme de terre, une espèce « clé » de la famille des Solanacées. L'accès à la séquence du génome de pomme de terre, au "code génétique" de la façon dont une plante croît et se reproduit, aidera les scientifiques dans l'amélioration de cette espèce pour le rendement, la qualité, la valeur nutritive et la résistance aux maladies. Le PGSC a été lancé en Janvier 2006 par le Département de la sélection végétale de l'Université de Wageningen et de la recherche dans les Pays-Bas et s'est développé en un consortium mondial de groupes de recherche provenant de 14 pays. Le génome de pomme de terre possède 12 chromosomes et est estimé à 840 millions de paires de base (AFBV-1, 2013).

En ce qui concerne les maladies, le mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestas*) est un champignon particulièrement virulent qui peut occasionner des pertes de rendement importantes et qui nécessite de nombreux traitements fongicides. En 2007 et 2008, années favorables à cette maladie cryptogamique. BASF Agro a lancé une autorisation européenne pour la culture et la consommation d'une variété de pomme de terre génétiquement modifiée résistante au mildiou. La pomme de terre GM baptisée « Fortuna » est une variété dérivée de la variété conventionnelle « Fontane », à qui l'on a transféré deux gènes de résistance au mildiou issus d'une pomme de terre sauvage d'Amérique du sud. Les méthodes de sélection par voie classique ne sont jamais parvenues à conférer une résistance au mildiou. La pomme de terre GM « Fortuna » a été

testée pendant 6 ans sur le terrain et BASF Agro espère une mise en marché en 2014/2015. Le dossier de demande d'autorisation va être d'abord examiné pour avis par l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments) pour évaluer la sécurité pour l'homme, l'animal et l'environnement. La transformation a été réalisée *in vitro* par agroinfection (souches AGLO, AGL1, LBA4404) puis régénération de plantules après sélection par l'Imazamox. Les inserts contenus dans les clones transformés comprennent une ou deux copies de l'ADN T. Il a été vérifié par PCR en temps réel qu'il n'y avait pas de séquences extérieures à l'ADN T (AFBV-2, 2013).

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. OBJECTIF DU TRAVAIL

L'objectif de cette présente étude est d'obtenir des vitroplants sains, ayants acquis une tolérance au stress salin et produisant des microtubercules conformes et juvéniles.

Suivant les organigrammes présentés en figure 4 et 5, les démarches d'application ont été réparties en deux phases :

A. Première étape : Induction de microtubercules et de variants somaclonaux ;

Mise en culture *in vitro* des germes de tubercules (figure 4), suivie par un assainissement des vitroplants par la culture méristématique. Après une micropropagation, les microtubercules induits (génération G0), conservés à 4°C pendant 30 jours, sont pré-germés afin d'évaluer la viabilité des tubercules. Une callogenèse a été induite à partir de différents explants. Ces cals étaient à la fois destinés au stress salin et à l'induction de variants somaclonaux.

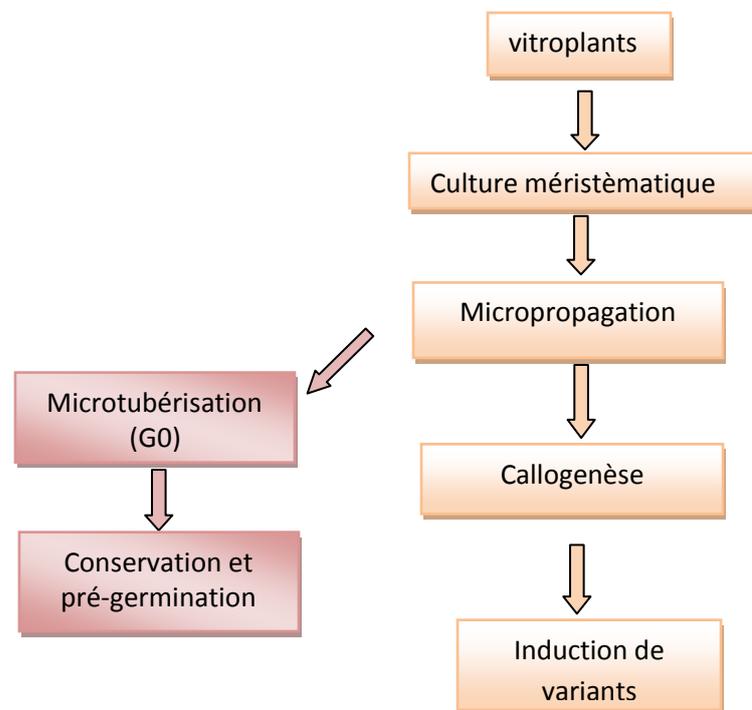


Figure 4 : Présentation schématique des principales étapes pour l'induction de microtubercules et de variants.

B. Deuxième étape : Induction de microtubercules tolérants au stress salin

- L'étude du stress salin chez *Solanum tuberosum* L. s'articule sur trois phases (figure 5) :
 - Sélection des géotypes tolérants, en exposant les vitroplants à différentes concentrations de NaCl ;
 - Sélection de variants tolérants induit sur cals exposés à ces concentrations de NaCl.

Les vitroplants reconnus tolérants sont par la suite multipliés, pour obtenir des microtubercules capables de se développer en serre.

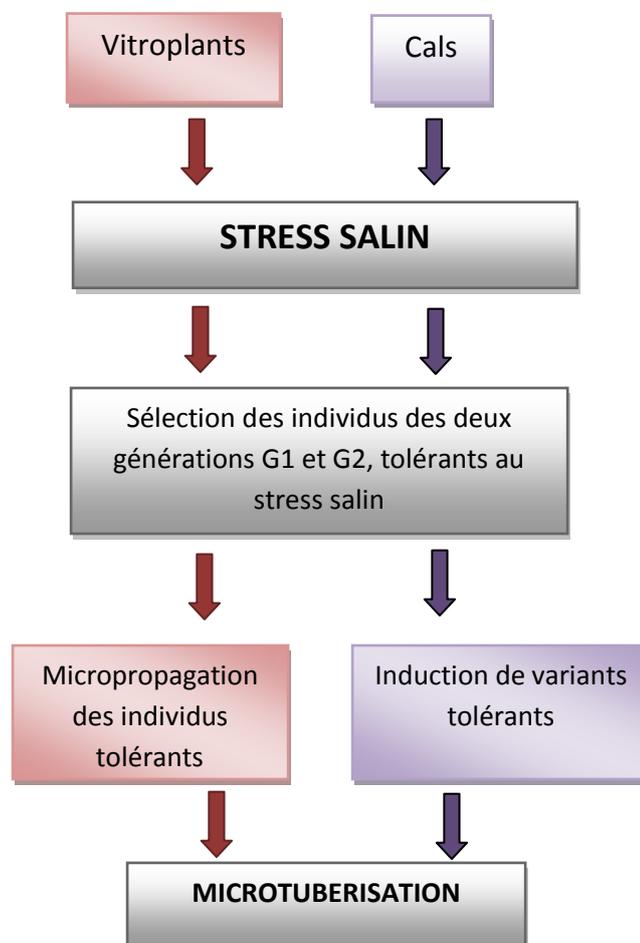


Figure 5 : Principales étapes suivies pour l'étude du stress salin chez *S.tuberosum*.

2. CONTEXTE DU TRAVAIL

Le sujet de cette présente thèse fait partie du projet de recherche PNR «induction de variants de *Solanum tuberosum* tolérants au stress salin» financé par la Direction Générale de la Recherche Scientifique et technique (DGRST). Les applications se sont déroulées au niveau du laboratoire de l'INRAA de Sidi Bel Abbés sur deux variétés Spunta et Kondor.

3. MATERIEL VEGETAL

Les variétés Spunta et Kondor (tableau 5) ont été choisies pour cette recherche, car elles sont appréciées par les consommateurs et les agriculteurs. Ces variétés, de classe E, en provenance de Hollande, nous ont été procurées par l'INRAA de Sidi Bel Abbés.

Hans *et al.*, (2011) ont résumé la description morphologique de ces variétés comme suit :

3.1. Spunta

- **Plante** - taille haute, tiges à port semi-dressé à dressé, feuilles grandes à moyennes, vert foncé, silhouette mi-ouverte ; floraison abondante à modérée, coloration anthocyanique absente ou très faible sur la face intérieure de la corolle de la fleur et moyenne sur feuille.
- **Tubercules** – de forme allongée ; peau jaune, lisse ; chair jaune pâle ; yeux très superficiels.
- **Germe** - grand, cylindrique et gros, forte coloration anthocyanique et forte à moyenne pubescence de la base ; bourgeon terminal grand à moyen et coloration anthocyanique moyenne à faible ; racelles abondantes à assez nombreuses.

3.2. Kondor

- **Plante** - taille haute à moyenne ; tiges port semi-dressé, feuilles grandes, vert foncé à vertes, silhouette mi-ouverte; floraison abondante à modérée,

coloration anthocyanique très forte à forte sur la face intérieure de la corolle de la fleur, forte à moyenne sur feuilles.

- **Tubercules** – de forme ovale à allongée ; peau rouge, lisse à assez lisse ; chair jaune pâle ; yeux mi-profonds.
- **Germe** - grand, conique, forte coloration anthocyanique et forte pubescence de la base ; bourgeon terminal grand à moyen et coloration anthocyanique moyenne; racelles assez nombreuses.

Les caractéristiques phytosanitaires de ces variétés sont résumées dans le tableau

5.

Avant la mise en pré-germination à la lumière et à la température ambiante du laboratoire, les tubercules ont subi une désinfection par un passage rapide dans l'hypochlorite de sodium à 10%, suivi de plusieurs rinçages à l'eau distillée. Après 30 jours, les germes de 4 cm de longueur ont été utilisés pour la micropropagation *in vitro*. Les explants *in vitro* des entre-nœuds, feuilles et racines étaient les principaux organes utilisés dans cette étude.

Tableau 5 : Caractéristiques des variétés Spunta et Kondor (Hans *et al.*, 2011)

Variétés	SPUNTA	KONDOR
Origine génétique	Bea x USDA x 96-56	61333 x Wilja
Maturité	Mi-précoce	Mi-précoce à mi-tardive
Dormance	Mi-longue à longue	Longue
Rendement	Elevé	Très élevé
Matière sèche	Bonne à moyenne	Basse
Résistance à l'enroulement	Assez bonne résistance	Résistance moyenne
Résistance au virus A	Résistant	Résistant
Résistance au virus X	Résistance moyenne	Résistance moyenne
Résistance au virus Yⁿ	Assez bonne résistance	Résistance moyenne
Résistance au mildiou sur feuillage	Assez sensible	Résistance moyenne
Résistance au mildiou sur tubercule	Sensible	Assez bonne résistance
Galle verruqueuse	Résistant	Résistant
Gale commune	Assez sensible	Assez sensible
Résistance au noircissement interne	Bonne résistance	Bonne résistance

4. METHODOLOGIES

4.1 Culture *in vitro*

La culture *in vitro* est une phase qui permet d'assainir le matériel végétal (germes de tubercules), et d'obtenir par la suite des vitroplants. A cet effet, il est nécessaire de mettre en évidence le milieu de culture le plus adéquat pour cette culture.

4.1.1. Milieux de culture

Trois milieux de cultures sont testés afin d'assurer une micropropagation très favorable, avec une croissance végétative optimale :

- ✓ **MS** : milieu de Murashige et Skoog (MS) (1962) (annexe 1) avec 20 g.L⁻¹ de saccharose (Sihachakr, 2002) ;
- ✓ **MS1** : milieu MS avec les vitamines de Morel et Wetmore (1951) (annexe2), et 25 g.L⁻¹ de saccharose (Haïcour, 2002).
- ✓ **MS2** : milieu MS1 avec 20 g.L⁻¹ de saccharose et de 10 g.L⁻¹ de fructose.

4.1.2 Désinfection des germes

La désinfection a été effectuée en conditions aseptiques, par des passages successifs dans les solutions (en utilisant les béciers de 50 ml), selon les étapes suivantes :

- 1- La mise en place des germes dans l'eau distillée non stérile durant 15 mn, en remuant de temps en temps, afin d'éliminer les impuretés et l'air emprisonnée entre les poils ;
- 2- Dans la hotte à flux laminaire, les germes sont replacés dans une autre solution composée de 10 ml d'eau distillée plus 2 gouttes du détergeant liquide, durant 5mn ;
- 3- Passage dans une solution à base de Mercryl ou de Dermacide, dilué à 30% pendant 3 mn;
- 4- Rinçage à l'eau distillée stérile pendant 5 mn;
- 5- Passage dans l'hypochlorite de sodium à 3° pendant 5mn;

6- 4 rinçages successif dans l'eau distillée stérile durant 5mn chacun.

4.1.3. Technique de culture in vitro

Sur une plaque de verre stérile ou sur du papier filtre stérile, les germes désinfectés ont été fragmentés au niveau des entre- nœuds d'une taille allant de 0,5 à 1 cm de longueur. Les explants étaient placés, par la suite, dans des bocaux en verre, comportant 100 ml de milieu de culture de la micropropagation stérile.

Les bocaux ont été exposés, durant 30 jours, à une photopériode de 12 h avec une intensité lumineuse de 72 Watt/m² et à une température d'incubation de 25±2°C

Ainsi, une fois le milieu de culture adéquat est déterminé, il sera utilisé pour micropropager les vitroplants obtenus par la culture méristématique.

4.1.4. Paramètres de suivi et de mesure

- ✓ Taux de reprise des vitroplants ;
- ✓ Croissance et développement des vitroplants.

4.2. Culture méristématique et micropropagation

La culture méristématique est une étape qui a surtout des implications importantes dans les procédés de micropropagation ; cela se résume dans l'éradication de nombreuses maladies (viroses, mycoses, mycoplasmoses et bactérioses), et permet le retour à l'état juvénile de la plante (Zrýd *et al.*, 1988). De ce fait, cette culture méristématique a été prise en considération dans notre étude, permettant d'accéder à la micropropagation des vitroplants obtenus.

4.2.1. Milieux de culture

La néoformation organogène du méristème est incitée par l'emploi de régulateurs de croissance. De ce fait, et suite à des expériences préliminaires, les régulateurs de croissance tel que l'ANA et la GA3 ont été choisis. En totalité, six milieux de cultures ont été testés :

- Pour l'initiation
 - ✓ **MA** : MS demi concentré

- Pour la croissance des méristèmes :
 - ✓ **MB** : MS demi concentré + 0,1 mg.L⁻¹ de GA3
 - ✓ **MC** : MS demi concentré + 0,1 mg.L⁻¹ de GA3 + 1 mg.L⁻¹ de ANA
- Pour l'enracinement des vitroplants
 - ✓ **MD** : MS1 + 0,2 mg.L⁻¹ de GA3
 - ✓ **ME** : MS1 + 0,5 mg.L⁻¹ de GA3

4.2.2. Technique d'application

- ✓ Selon Zrýd *et al.* (1988), et en conditions stériles, le vitroplant de 3 à 4 semaines de croissance est immobilisé à sa base. Les feuilles sont, par la suite, éliminées dans le sens opposé de leur croissance. Cela permet de libérer les méristèmes (figure 6).

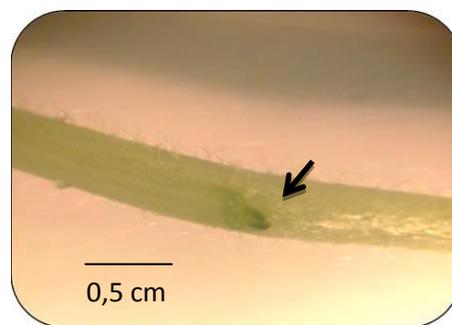
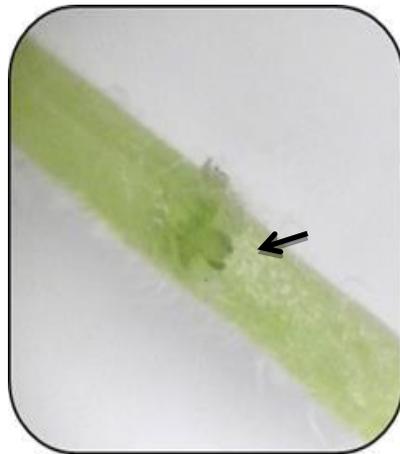


Figure 6 : Méristème adventif de la variété Spunta dénudé de sa feuille.

- ✓ A l'aide d'une aiguille de seringue stérile et sous loupe binoculaire, la paire suivante d'ébauches foliaires du méristème ont été excisées (figure 7 - 3) ;
- ✓ Avec le scalpel, le méristème a été sectionné transversalement en dessous de la première paire de primordia foliaire ; la hauteur de l'explant est comprise entre 0,2 à 0,4 mm ;
- ✓ Le méristème a été transféré rapidement sur le milieu MA dans une boîte de Pétri (Figure 7 - 4).
- ✓ Après 3 à 4 jours de cicatrisation, les méristèmes ont été replacés dans les milieux de culture MB et MC en boîtes de Pétri pour inciter la différenciation cellulaire caulinaire ;

- ✓ Les vitroplants de 4 semaines de croissances ont été repiqués dans les milieux MS1, MD et ME en tubes à essais afin d'initier la rhizogenèse.

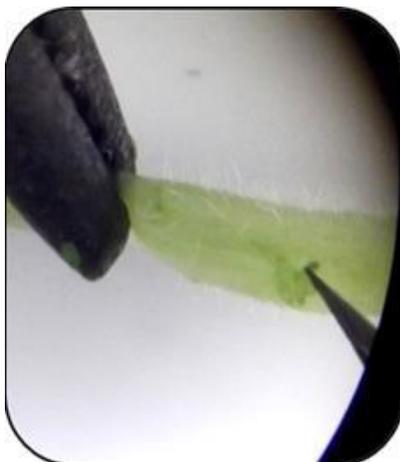
Ainsi, les vitroplants obtenus ont été repiqués dans le milieu de culture MS2, avec un renouvellement du milieu tous les 30 jours. Cela a favorisé la disponibilité permanente du matériel végétal.



(1) méristème



(2) sous loupe binoculaire



(3) élimination des ébauches foliaires



(4) prélèvement du méristème

Figure 7 : Prélèvement de méristème de la variété Kondor sous loupe binoculaire grossi deux fois en conditions aseptiques.

4.2.3. Paramètres de suivi

Le suivi des résultats a été effectué après 30 jours de la mise en culture

- ✓ Taux de reprise et évolution morphologique des méristèmes ;
- ✓ Evolution de la croissance des vitroplants.

4.3. Microtuberisation et adaptation *in vivo*

Cette étape permet le passage de l'*in vitro* à l'*in vivo*. Les microtubercules obtenus *in vitro* sont soumis aux conditions de serre *in vivo*, afin d'aboutir à la génération G1. Celle-ci peut être facilement cultivée, par la suite, dans les conditions naturelles au champ pour la reproduction de la semence de pomme de terre.

4.3.1. Milieux de culture

Dans cette étape deux milieux de culture ont été testés. Cela nous a permis de mesurer l'importance de l'utilisation des régulateurs de croissances dans la production de microtubercules. Ces milieux sont comme suit :

- ✓ **MS3** : le milieu MS avec la double concentration des macroéléments +5 mg.L⁻¹ de BAP + 80 g.L⁻¹ de saccharose (Sidikou *et al.*, 2003) ;
- ✓ **MS4** : le milieu MS1 avec 80 g.L⁻¹ de saccharose (Amroise, 2002).

4.3.2. Technique utilisée

Le repiquage des vitroplants en milieu de culture destiné à la microtubérisation se fait de façon similaire à celui de la micropropagation.

Les conditions de la mise en culture sont respectées selon le protocole expérimental des auteurs cités. Toutefois, la température et l'intensité lumineuse restent les mêmes :

- ✓ Les bocaux à milieu de culture MS3 sont placés durant 15 jours à une photopériode de 12h, pour être replacés à l'obscurité. ;

- ✓ Les bocalux portant le milieu de culture MS4 sont placés dans les mêmes conditions que ceux de la micropropagation ;
- ✓ Les microtubercules obtenus sont conservés à 4°C durant 30 jours à l'obscurité, pour être par la suite mis en pré-germination dans un endroit propre et à l'ombre.

4.3.3. Paramètres de suivi

Au cours de cette étape, nous avons évalué les paramètres suivants :

- ✓ pourcentage de tubérisation ;
- ✓ Poids et calibre des microtubercules ;
- ✓ pourcentage de tubercules conservés et pré-germés.

4.4. Callogenèse

L'induction des cals permet d'obtenir un nombre élevé de variants, parfois plus tolérants aux stress, en un temps restreint, Selon Özgen *et al.* (1996), ce type de régénération permet également une augmentation de la variabilité génétique de l'espèce.

La callogenèse a été effectuée à partir de 2 types d'explants *in vitro* (tige et feuille) des deux variétés. Au cours de cette phase, la croissance des cals a été évaluée en fonction de la température d'incubation.

4.4.1. Milieux de culture

MSC : MS2 + 0,5 mg.L⁻¹BAP + 0,5 mg.L⁻¹ 2.4-D (Seabrook et Douglass, 2001).

4.4.2. Technique utilisée

- ✓ Chez les deux variétés, les cals ont été initiés sur les deux types d'explants (tige et feuille), à partir de vitroplants de 4 semaines de croissance. L'induction des cals est effectuée selon la technique adoptée par Webb *et al.* (1983) et Wheeler *et al.* (1985). Les segments d'entre-nœuds (4 à 5 mm) ont été disposés horizontalement sur le

milieu de culture. Les fragments de feuilles (5 à 6 mm) sont disposés sur la face inférieure. L'orientation des explants et les blessures occasionnées par la section favorisent l'induction des cals.

- ✓ L'incubation a été effectuée à une photopériode de 12 heures et une intensité lumineuse de 15 000 Lux.

4.4.3. Effet de la température d'incubation sur la callogenèse

Dans la phase callogenèse, les explants ont été soumis à différentes températures d'incubation, à raison de 30 explants par test (5 cals par boîte de Pétri et répétés 6 fois). Ces températures sont les suivantes : T1= 22±1°C (Seabrook et Douglass, 2001); T2= 25±1°C (Vargas *et al.*, 2005) et T3= 28±1°C (Koutoua *et al.*, 2012).

4.4.4. Paramètres de suivi

- ✓ Croissance des cals
- ✓ La texture et la couleur des cals obtenus ;
- ✓ Etude statistique par ACP de la croissance des cals en fonction de la température d'incubation, par le logiciel STATISTICA.

4.5. Régénération des cals (Morphogénèse)

La régénération des cals a été incitée en utilisant l'hormone de croissance BAP et l'apport de différentes concentrations de 2.4-D.

4.5.1. Milieux de culture

- Organogénèse des cals: Les cals induits sont repiqués sur
 - ✓ **MSC**
 - ✓ **MSC1** : MS2 + 1 mg.L⁻¹ BAP + 0,2 mg.L 2.4-D (Asakavičiūtė, 2007);
 - ✓ **MSC2** : MS2 + 1 mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg.L⁻¹ 2.4-D (Vargas *et al.*, 2008);
 - ✓ **MSC3** : MS2 + 1 mg.L⁻¹ BAP + 1,5 mg.L⁻¹ 2.4-D;
 - ✓ **MSC4** : MS2 + 1 mg.L⁻¹ BAP + 2 mg.L⁻¹ 2.4-D;

- Croissance des méristèmes : les méristèmes obtenus sont repiqués dans :
 - ✓ **MSA** : MS2 + 0,5 mg.L⁻¹ de GA3 (Schäfer-Menuhr *et al.*, 2003);

4.5.2. Technique utilisée

- La morphogenèse somatique des cals de quatre semaines de croissance a été établie en plaçant les cals dans les différents milieux de culture précédemment présentés, à raison de 30 cals par test.
- Après 20 jours de croissance, les cals ont été replacés à l'obscurité durant 25 jours pour activer le processus d'organogenèse selon Vargas *et al.* (2008). La formation des embryons primaires et des bourgeons somatiques a fait l'objet d'une étude histologique.
- Les cals organogènes sont repiqués tous les 30 jours dans le milieu MSC sur trois générations, afin de mesurer l'intensité organogène en fonction des générations.
- les méristèmes obtenus sont repiqués dans le milieu MSA pour favoriser la formation de vitroplants.

4.5.3. Les coupes histologiques

Les coupes histologiques sont effectuées selon la méthode classique, mais avec quelques modifications. Les échantillons de 25 jours de croissance sont placés durant 24 heures, à la température ambiante, dans le fixateur Dubosq de Brésil (Langeron., 1949) : dix volumes de la solution de réserve (1g d'acide picrique et 150 ml d'éthanol à 80°), auxquels on additionne quatre volumes de formol à 35° et un volume d'acide acétique cristallisable. Par la suite, les échantillons sont déshydratés dans l'éthanol à des concentrations croissantes (80°, 96°, et 99,8°) durant 40 minutes pour chacune d'entre elles. La longue période de 24 heures d'exposition à l'éthanol absolu est évitée afin d'empêcher le durcissement des tissus pouvant provoquer des difficultés au cours de la coupe. Par la suite, les échantillons subissent trois bains successifs de toluène de vingt minutes chacun. Le passage au paraffinage se fait sans l'utilisation de la pompe à vide, ce qui nous mène à faire plusieurs essais afin d'évaluer le temps d'immersion nécessaire au paraffinage. La finalité est d'imprégner le matériel végétal dans deux bains successifs de paraffine à 65°C (1 fois pendant 24 heures, et une seconde fois pendant 48 heures). Enfin,

le moulage des échantillons, des sections de 7 μm d'épaisseur sont faites à l'aide du microtome.

Selon Bensalem (1998), le déparaffinage s'établit par trois bains successifs de toluène de 10 minutes chacun, suivi d'une réhydratation par l'éthanol à des degrés décroissants (99,8° pendant 05 mn, 90° pendant 05 minutes, et 75° pendant 10 mn). Un mordantage est fait par la suite avec l'Alun de fer à 3% durant 10 minutes. Les coupes sont colorées par le bleu de toluidine. Afin de conserver les coupes, un montage est effectué avec du Baume de Canada après une déshydratation rapide des tissus colorés par l'éthanol à 99,8°.

4.5.4. Les paramètres de mesure

- ✓ Le mode de régénération en fonction de la température d'incubation et de la concentration du 2.4-D ;
- ✓ Etude microscopique des tissus en phase de différenciation ;
- ✓ Comparaison du taux organogène des cals caulinaires et foliaires chez les deux variétés ;
- ✓ Etude statistique par ACP de la régénération des cals en fonction des milieux de cultures par le logiciel STATISTICA.

4.6. Sélection de cals tolérants au stress salin

L'objectif de cette phase est d'obtenir des variants à partir de cals tolérants capables de croître et de tubériser en milieu salin. Les cals induits à partir de feuilles et de tiges des deux variétés ont été choisis pour cette phase d'étude.

4.6.1. Milieux de culture

- Stress salin : Les cals induits dans le milieu de culture MSC sont repiqués dans le milieu **MSR** qui est le MSC auquel sont ajoutées les concentrations de NaCl suivantes : T0 (0g.L⁻¹), T1 (1g.L⁻¹), T2 (3g.L⁻¹), T3 (3g.L⁻¹), T4 (4g.L⁻¹), T5 (5g.L⁻¹), T6 (6g.L⁻¹), T7 (7g.L⁻¹), T8 (8g.L⁻¹), T9 (9g.L⁻¹), T10 (10g.L⁻¹), T11 (11g.L⁻¹), T12 (12g.L⁻¹), T13 (13g.L⁻¹) et T14 (14 gr.⁻¹) ;

- Organogénèse des cals tolérants : induite sur cals tolérants sélectionnés par leur repiquage dans le même milieu de culture MSR.
- Caulogénèse : les méristèmes obtenus sont repiqués dans les milieux suivants :
 - ✓ **MSB** : MSA + la concentration de NaCl (Tx) utilisée dans le test de salinité du milieu MSR ;
 - ✓ **MSE** : MSB avec la modification de 450 mg.L⁻¹ en MgSO₄ + 1 mg.L⁻¹ de ANA + 12 mg.L⁻¹ d'urée.
- Rhizogénèse : repiquage des vitroplants dans :
 - ✓ **MSE 1** : MSE + 18 mg.L⁻¹ANA.

4.6.2. Technique utilisée

Les cals induits sont soumis à un stress salin en les repiquant, à raison de 30 cals par test, sur le milieu de culture codifié MSR avec les différentes concentrations de NaCl mentionnées ci-dessus. Dans ce même milieu, le repiquage des cals tolérants a été réalisé tous les 30 jours durant 9 générations. Les méristèmes induits sur cals tolérants sont mis en culture durant 20 jours dans le milieu caulogène, puis dans les milieux rhizogènes.

L'incubation a été soumise à une photopériode de 12 heures, à une intensité lumineuse de 15000 Lux, et une température de 25±1°C.

4.6.3. Les coupes histologiques

La même méthode décrite préalablement (P.47, paragraphe 3. 4. 5) sur les cals témoins a été appliquée sur des cals de 25 jours de croissance, exposés à différentes concentrations. Le colorant utilisé pour ces coupes dans cette partie est le bleu de Toluidine et l'Hématoxyline Eosine.

4.6.4. Les paramètres de mesure

- Les observations et les mesures relatives des cals tolérants et, la croissance des vitroplants ont été évaluées au terme d'un mois de culture ;
- Une analyse microscopique des tissus de cals exposés au stress salin a été effectuée sur les coupes histologiques établis ;
- L'estimation de la tolérance des cals au stress salin a été effectuée en appliquant l'Analyse en Composantes Principales (ACP) par le logiciel STATISTICA version 10. Cette

analyse a concerné les deux générations de cals en milieu salin. Une évaluation de l'Indice de Tolérance au Stress salin des cals (ITS) a été établie en appliquant la règle suivante :

$$ITS = \frac{\text{Poids moyens des cals témoins} \times \text{poids moyen des cals tolérants au stress}}{(\text{poids moyen de tous les cals})^2}$$

(Moghaddam et Hadizadeh ; 2002).

- La croissance des vitroplants tolérants au sel a été estimée selon les paramètres de mesure suivants : pourcentage d'induction, taux de survie, longueur de la partie aérienne et racinaire des vitroplants.

4.7. Sélection des géotypes tolérants

L'espèce *S.tuberosum* peut contenir une diversité physiologique intéressante pour le stress salin. Afin de sélectionner des géotypes qui présentent un seuil de tolérance élevé, nous avons exposé un nombre important de vitroplants à des concentrations croissantes de salinité. La sélection des géotypes des deux variétés Spunta et Kondor qui répondent le mieux au but recherché, a été faite par la mesure de tolérance des vitroplants, ceci est nécessaire pour permettre de définir les seuils de tolérance.

4.7.1. Milieux de culture

MS2S : MS2 + la concentration de NaCl (de T0 à T10) utilisées dans le test de salinité des cals.

4.7.2. Technique utilisée

Les vitroplants micropropagés des deux variétés sont fragmentés en conditions aseptiques, pour obtenir des explants à un ou deux nœuds. Ces explants sont repiqués dans des bocal en verre; à raison de 50 explants par test, contenant les milieux salins MS2S pour les tests suivants : T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9 et T10 .

Les plants sont soumis, durant 30 jours, à une photopériode de 12 h d'une intensité lumineuse de 72 Watt/m², et une température d'incubation de 25±2°C.

4.7.3. Les paramètres de mesures

- ✓ Croissance des tiges ;
- ✓ La capacité d'enracinement ;
- ✓ Evaluation de l'Indice de Tolérance au Stress salin des géotypes (ITS) ;
- ✓ Taux de chlorose ;

4.8. Microtubérisation des géotypes tolérants

L'initiation à la microtubérisation est une étape qui permet de confirmer la tolérance des vitroplants au milieu riche en NaCl.

4.8.1. Milieux de culture

Deux milieux de cultures ont été testés :

- ✓ **MS2S** : MS2 + la concentration de NaCl (de T0 à T4) ;
- ✓ **MS4'** : le milieu MSE avec 80 g.L⁻¹ de saccharose + 4g.L⁻¹ de NaCl.

4.8.2. Technique utilisée

Pour le milieu MS2S, le repiquage des vitroplants se fait de façon similaire à celui de la microtubérisation des témoins. Afin de forcer la tubérisation en concentrations non tolérantes, nous nous sommes limité à la concentration en NaCl à 4g.L⁻¹ de NaCl et, avons utilisé le milieu MS4'.

4.8.3. Paramètres de suivi

Au cours de cette étape, nous avons évalué les paramètres suivants :

- ✓ Taux de tubérisation ;
- ✓ Calibre des microtubercules ;

5. RECAPITULATIF DES MILIEUX DE CULTURE TESTES

Pour mieux cerner la composition des milieux de cultures testés en cette étude, le tableau 6 résume les principales phases d'applications avec les milieux concernés

Tableau 6 : Les milieux de culture testés

PHASES DE L'ETUDE	MILIEU DE CULTURE	
	Nom	Composition
Culture <i>in vitro</i>	MS	milieu de Murashige et Skoog + 20 g.L ⁻¹ saccharose
	MS1	MS + vitamines de Morel et Wetmore + 25 g.L ⁻¹ saccharose
	MS2	MS1 + 20 g.L ⁻¹ saccharose + 10 g.L ⁻¹ fructose
Culture méristématique	MA	MS demi concentré
	MB	MS demi concentré + 0,1 mg.L ⁻¹ GA3
	MC	MS demi concentré + 0,1 mg.L ⁻¹ GA3 + 1 mg.L ⁻¹ ANA
	MD	MS1 + 0,2 mg.L ⁻¹ GA3
	ME	MS1 + 0,5 mg.L ⁻¹ de GA3
Microtubérisation	MS3	MS avec la double concentration des macroéléments +5 mg.L ⁻¹ BAP + 80 g.L ⁻¹ saccharose
	MS4	MS1 avec 80 g.L ⁻¹ de saccharose
Callogenèse	MSC	MS2 + 0,5 mg.L ⁻¹ BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ 2.4-D
Régénération des cals	MSC	
	MSC1	MS2 + 1 mg.L ⁻¹ BAP + 0,2 mg.L ⁻¹ 2.4-D
	MSC2	MS2 + 1 mg.L ⁻¹ BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ 2.4-D
	MSC3	MS2 + 1 mg.L ⁻¹ BAP + 1,5 mg.L ⁻¹ 2.4-D
	MSC4	MS2 + 1 mg.L ⁻¹ BAP + 2 mg.L ⁻¹ 2.4-D
	MSA	MS2 + 0,5 mg.L ⁻¹ de GA3
Sélection de cals tolérants au stress salin	MSR	MSC avec les concentration de NaCl : T0 (0 g.L ⁻¹), T1 (1 g.L ⁻¹), T2 (2 g.L ⁻¹), T3 (3 g.L ⁻¹), T4 (4 g.L ⁻¹), T5 (5 g.L ⁻¹), T6 (6 g.L ⁻¹), T7 (7 g.L ⁻¹), T8 (8 g.L ⁻¹), T9 (9 g.L ⁻¹), T10 (10 g.L ⁻¹), T11 (11 g.L ⁻¹), T12 (12 g.L ⁻¹), T13 (13 g.L ⁻¹) et T14 (14 g.L ⁻¹)
Régénération des cals tolérants	MSR	
	MSB	MSA + la concentration de NaCl (Tx) utilisée dans le test de salinité du milieu MSR
	MSE	MSB avec 450 mg.L ⁻¹ MgSO ₄ + 1 mg.L ⁻¹ ANA + 12 mg.L ⁻¹ urée
	MSE1	MSE + 18 mg.L ⁻¹ ANA
Sélection des génotypes tolérants	MS2S	MS2 + T (de T0 à T4) de NaCl

Microtubérisation des géotypes tolérants	MS2S	
	MS4'	le milieu MSE avec 80 g.L ⁻¹ de saccharose + 4 g.L ⁻¹ de NaCl

Chapitre III : Résultats et
Discussion

- **RESULTATS**

- A. PREMIERE ETAPE**

- 1. CULTURE *IN VITRO***

- 1.1. Taux de reprise**

La modification de la composition du milieu de culture a été d'une influence significative sur l'émergence des bourgeons caulinaires. Cette émergence n'a été favorable qu'à partir du 5^{ème} jour de culture dans le milieu MS ; avec un taux assez faible de 49 % pour Spunta, et de 55 % pour Kondor. La figure 8 met en considération le milieu MS2, avec la reprise d'un nombre très important des bourgeons, dès le 3^{ème} jour de culture. Les résultats obtenus avec MS1 se rapprochent de ceux du MS2, avec une diminution du taux de reprise de 2 % chez Kondor et de 8 % chez Spunta.

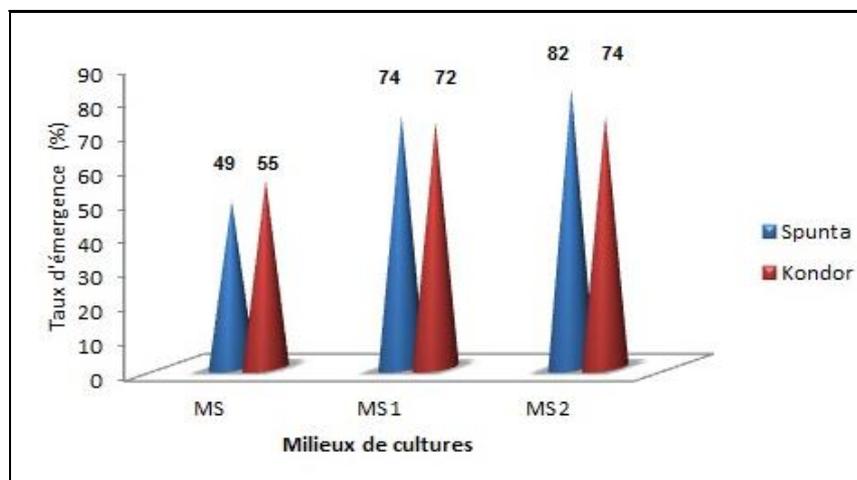


Figure 8 : Taux de reprise des bourgeons caulinaires des variétés Spunta et Kondor en fonction des milieux de culture testés.

- 1.2. Croissance et développement des vitroplants**

Une différence considérable de croissance des vitroplants a été observée au cours de cette étape. Celle-ci a été évaluée par : la vigueur des vitroplants, la longueur des tiges, le nombre de nœuds et des feuilles et, enfin l'évolution de la rhizogenèse. Les observations faites nous ont menées à dire que, les vitroplants ont mieux évolués en MS2 à partir du 5^{ème} jour de croissance. Ce développement a progressé à la 2^{ème} semaine de croissance. le

milieu MS1 a été moins favorable à la croissance, puisque la croissance n'a été positive qu'à partir du 7^{ème} jour de la mise en culture.

1.2.1 Longueur des tiges

La figure 9 indique que le milieu MS2 a favorisé la croissance caulinaire moyenne de 5,4 cm pour Kondor et de 5,8 cm pour Spunta. Dans ce milieu, les vitroplants sont constitués par une tige vigoureuse, de couleur vert foncé (figure 10). Une faible différence de croissance avait été enregistrée entre MS2 et MS1, de l'ordre de 1 cm. Les vitroplants du milieu MS1 présentaient le diamètre de la tige moins développé, et d'un vert plus clair. Contrairement à cela, le milieu MS s'est révélé défavorable pour la croissance caulinaire, par la production de vitroplants très vulnérables, très minces avec une couleur verte très claire (figure 10).

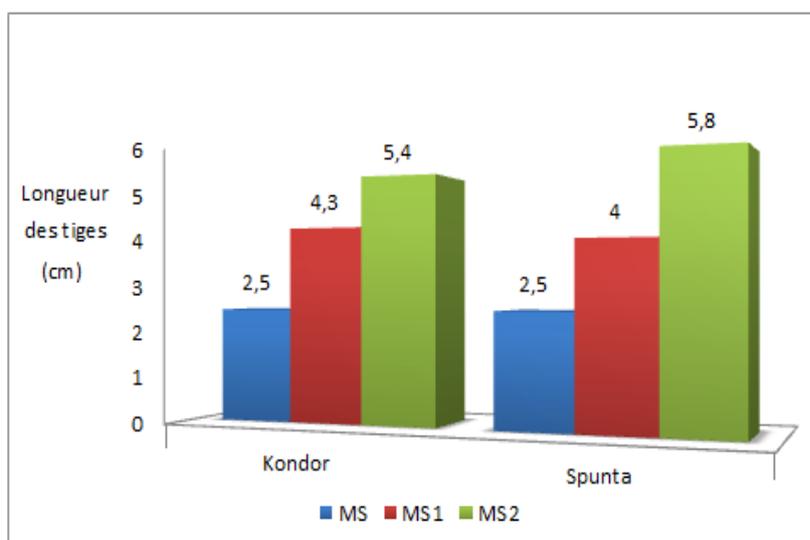
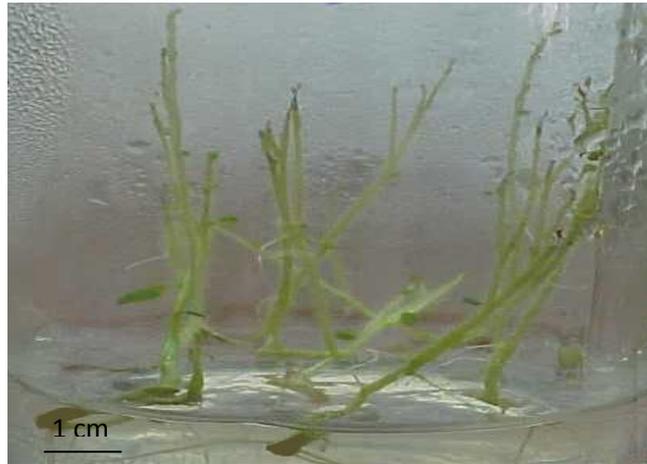


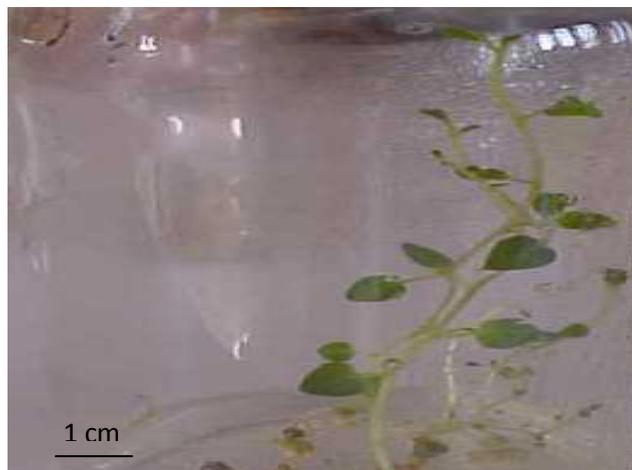
Figure 9 : Longueurs moyennes des tiges et nombre de nœuds des vitroplants de 30 jours de croissance en fonction des milieux de culture.



MS



MS1



MS2

Figure 10 : Aspects des vitroplants de Kondor, après 25 jours de croissance dans les milieux de cultures MS, MS1 et MS2.

1.2.2. Nombre de nœuds

Selon le tableau 7 et en milieu MS2, 37 % de Spunta avaient formés un taux maximal de nœuds entre 8 à 9 nœuds par vitroplant ; chez 30 % de Kondor, le maximum englobe 6 à 7 nœuds par vitroplant. En milieu MS1, il a été enregistré un taux maximal de 36 % de Spunta et 37 % de Kondor pour les vitroplants ayants 4 à 5 nœuds. Pour le milieu MS, un maximum de nœuds entre 4 à 5 par vitroplant a été retrouvé chez 34 % de Spunta. Par contre, chez 50 % Kondor le nombre de nœuds maximal a été retrouvé entre 2 à 3 nœuds par vitroplant.

Tableau 7 : Fréquence du nombre de nœuds par vitroplants en fonction du milieu de culture, et de variétés.

nombre de nœuds %								
	Kondor				Spunta			
	2-3	4-5	6-7	8-9	2-3	4-5	6-7	8-9
MS	<u>50</u>	25	17	8	25	<u>34</u>	33	8
MS1	38	<u>37</u>	19	6	14	<u>36</u>	29	21
MS2	15	30	<u>30</u>	25	4	25	34	<u>37</u>

- Pour les vitroplants ayant 4 à 5 nœuds, les résultats obtenus sont similaires entre MS et MS1 chez Spunta. La même analogie est retrouvée chez Kondor pour 6 à 7 nœuds par vitroplants

1.2.3. Développement du feuillage

le développement foliaire dans les différents milieux de culture était identique chez les deux variétés :

- Un feuillage très peu développé a été enregistré chez 18 % de vitroplants des deux variétés en milieu MS (figure 10) ;
- Le milieu MS1 a permis l'apparition de feuilles chez 58 % de vitroplants de Kondor, dont 8 % seulement avaient de feuilles bien développées. L'évolution foliaire avait été

observée chez 56 % de vitroplants de Spunta, dont 12 % présentaient un bon développement ;

- Le milieu MS2 a favorisé un feuillage chez 85 % des vitroplants de Spunta et, chez 87 % de Kondor (figure 8), dont respectivement, 43 % de Spunta et 51 % de Kondor à un très bon feuillage. comme le montre la figure 10, les feuilles, étant plus nombreuses, sont mieux développées que celles des autres milieux, dotées d'une couleur vert foncée.

1.2.4. Développement racinaire

La rhizogenèse a été estimée par le nombre de vitroplants enraciné après 30 jours de croissance. Dans les trois milieux représentés en figure 11, et pour les deux variétés, la rhizogenèse s'est amorcée dès le troisième jour de la mise en culture.

- Dans le milieu MS, 48 % de Kondor et 65 % de Spunta n'avaient présenté qu'un faible enracinement ;
- Le milieu MS1 a favorisé un bon développement racinaire chez 50 % de vitroplant de Kondor et 48 % chez Spunta ;
- Le milieu MS2 a favorisé un enracinement plus développé que les autres milieux (figure 12), avec 40 % chez Kondor et 42 % chez Spunta.

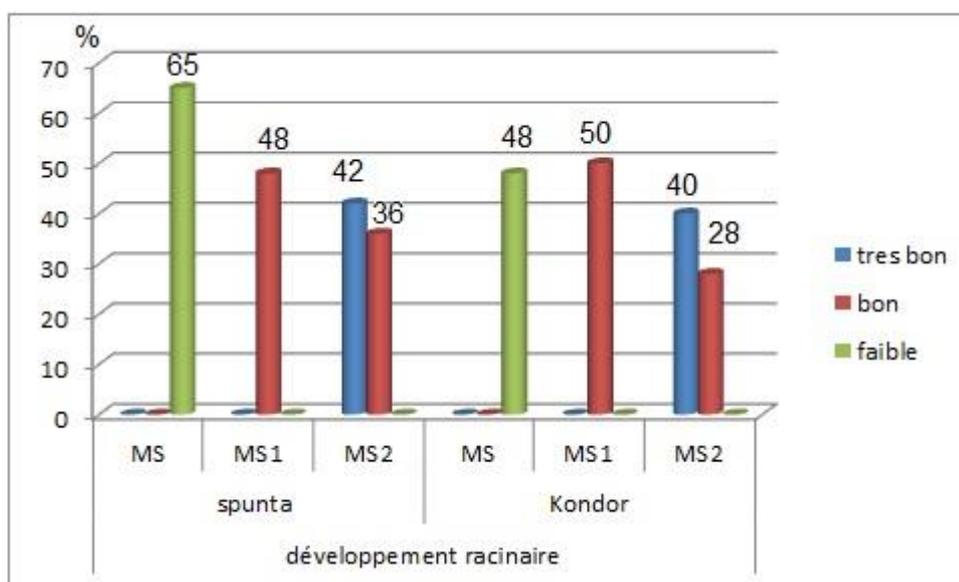


Figure 11 : Pourcentage d'enracinement des vitroplants en fonction des milieux de culture MS, MS1 et MS2.

Selon les résultats obtenus, le milieu de culture MS2 a été sélectionné pour micropropager le matériel végétal.

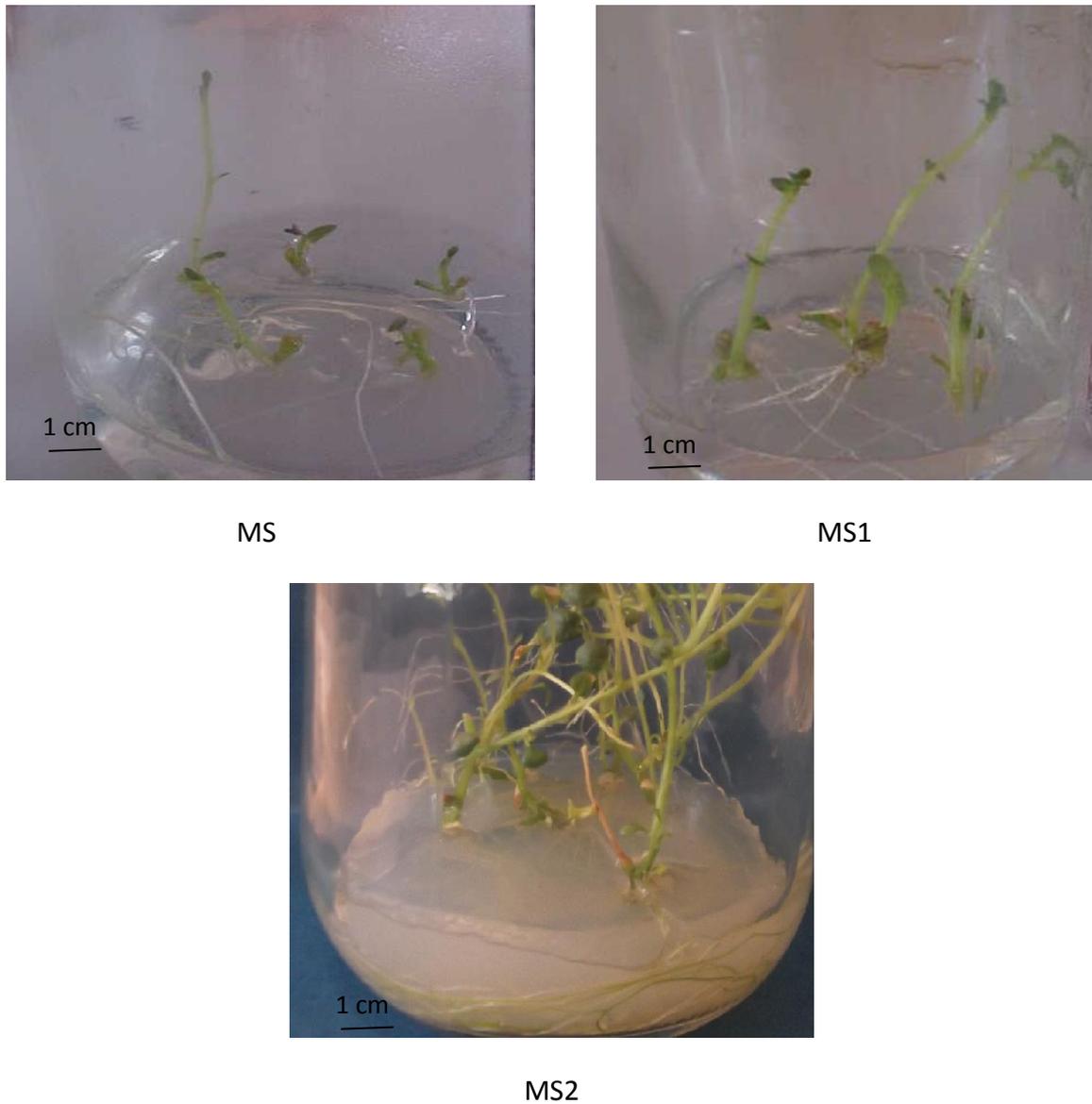


Figure 12 : Croissance de la Rhizogenèse de vitroplants de Spunta après 10 jours de culture.

2. CULTURE MERISTEMATIQUE

Dans cette partie de l'étude, le prélèvement méristématique a été effectué à partir des vitroplants obtenus précédemment. Les méristèmes prélevés ont été placés dans le milieu MA pendant 3 à 4 jours, afin de permettre une meilleure multiplication cellulaire des méristèmes, et d'éviter un brunissement des tissus.

2.1. Taux de reprise et évolution morphologique des méristèmes

Différents milieux de culture ont été testés pour identifier le milieu favorisant le développement optimal des explants, sans passer par la callogenèse. Le suivi de la croissance a été effectué tous les 8 jours, durant 40 jours.

Les explants repiqués avaient présenté un début d'évolution après 5 jours de croissance. Selon le tableau 8, le milieu de culture MB a favorisé une reprise caulinaire maximale des méristèmes, atteignant 70 % chez Kondor et 62,5 % chez Spunta (figure 13). Le milieu MC était peu favorable concernant l'évolution caulinaire pour les méristèmes de Kondor et nul pour Spunta. Néanmoins, les pertes étaient considérables dans ce milieu, et cela chez les deux variétés, enregistrant plus de 76 % chez Spunta et plus de 30 % chez Kondor. Ces pertes se manifestent soit par l'arrêt de croissance, soit par des nécroses.

Chez les deux variétés, le développement caulinaire a débuté par l'ébauche d'une première feuille, suivi d'une évolution lente de la tige (figure 13). Toutefois, cette croissance n'a pas enregistré de différence de taille entre variétés.

Tableau 8 : Estimation des différentes évolutions morphologiques des méristèmes de Spunta et Kondor après 20 jours de croissance en milieux MB et MC.

	Spunta				Kondor			
	Tige	Cal	Arrêt de croissance	Mort	Tige	Cal	Arrêt de croissance	Mort
MB	<u>62,5%</u>	00%	12,5%	25%	<u>70%</u>	00%	26,66%	3,33%
MC	<u>00%</u>	00%	23,8%	76,19%	<u>38%</u>	19,23%	11,5%	30,76%

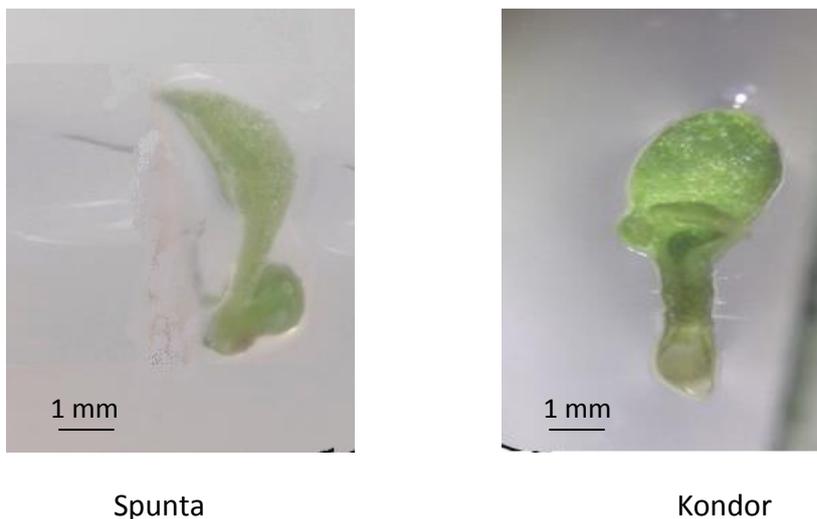


Figure 13 : Evolution des méristèmes des deux variétés, après 15 jours de culture en milieu MB.

Il est à signaler que la reprise organogène des explants était plus favorable chez Kondor que chez Spunta.

La callogenèse enregistrée en milieu MC était observable après 20 jours de croissance. Celle-ci était faiblement présente chez Kondor avec un taux de 19,23%, et quasiment absente chez Spunta. Ces cals néoformés ne présentaient aucune évolution organogène avec le temps. Ces cals étaient compacts, lisses et de couleur verdâtre (figure 14).

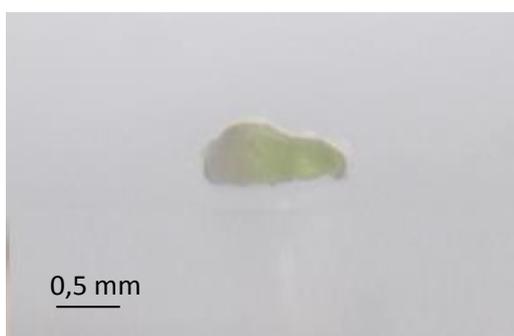


Figure 14 : Présentation d'un cal de Kondor de 25 jours de croissance dans le milieu MC .

2.2. Evolution de la croissance des vitroplants

2.2.1. Développement des tiges

A cette étape, l'évolution des vitroplants était suivie périodiquement sous loupe binoculaire durant 32 jours. Cette évolution caulinaire, était très variable entre variétés et selon les milieux (figure 15).

Selon les données obtenues, le milieu MB a favorisé la reprise maximale des méristèmes après 16 jours de culture. Toutefois, plus de 10 % de ces méristèmes ont péri 8 jours après, et cela chez les deux variétés. Ainsi, nous retrouvons 60 % de méristèmes de Kondor et 54 % de ceux de Spunta ayant présentés une croissance caulinaire favorable après 32 jours de culture.

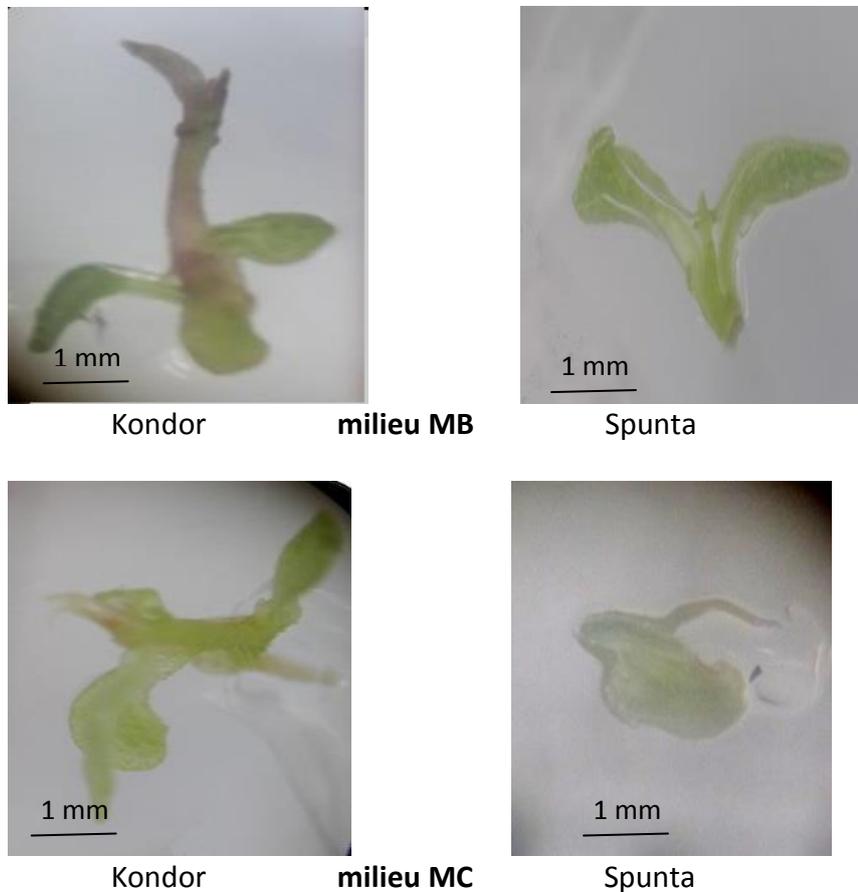


Figure 15 : Evolution caulinaire de Spunta et Kondor en milieu MB et MC, après 20 jours de croissance.

Le milieu MC, par contre, était peu favorable pour le développement méristématique des deux variétés. À 8 jours de la mise en culture, la caulogénèse était près de 8 % chez Spunta et de 4,5 % chez Kondor. 40 % des méristèmes Kondor ont évolués après 34 jours, dont 16 % ont péri après 32 jours de culture (figure 15). Chez Spunta, une perte totale des méristèmes a été enregistrée après 16 jours de culture.

2.2.2. Développement des racines

Les vitroplants obtenus n'ont stimulé aucune rhizogenèse. Cela nous a incité à tester d'autres milieux de culture tel que les milieux MD et ME. Les résultats se présentent comme suit :

Concernant les vitroplants issus du milieu MB :

- Leur repiquage en milieu MD a favorisé la néoformation rhizogène après 10 jours de culture. Les racines avaient présenté une augmentation de taille en fonction du temps, atteignant 28.57 % pour Spunta et de 14.28 % pour Kondor (figure 16). En conséquent, la partie aérienne a présenté une croissance positive durant la période de la rhizogenèse.
- L'utilisation du milieu ME a amorcé une rhizogenèse qui a bien évoluée à partir de 7^{ème} jour, plus longue et plus vigoureuse que celles du milieu MD. Cette évolution s'est exprimée chez 42.85 % pour Spunta et 25 % chez Kondor. De ce fait, les tiges et les feuilles se sont développées beaucoup mieux que celles du milieu MD (figure 17).
- Sur les deux milieux, la variété Spunta s'est mieux développée que la variété Kondor.

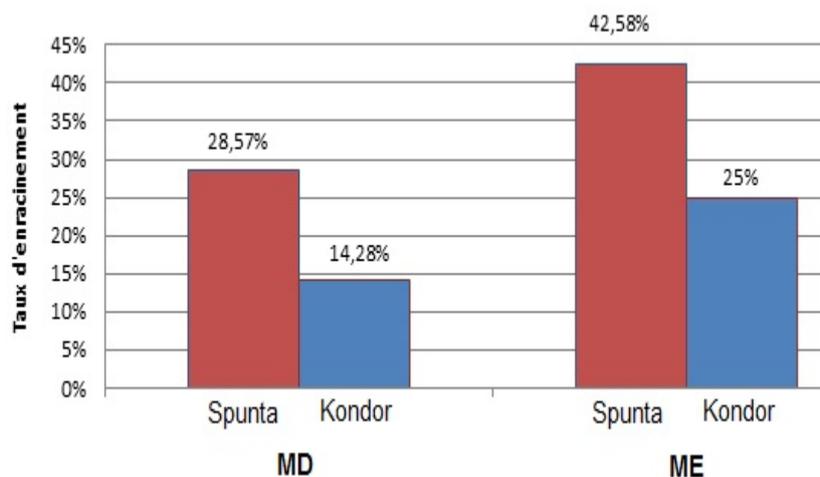
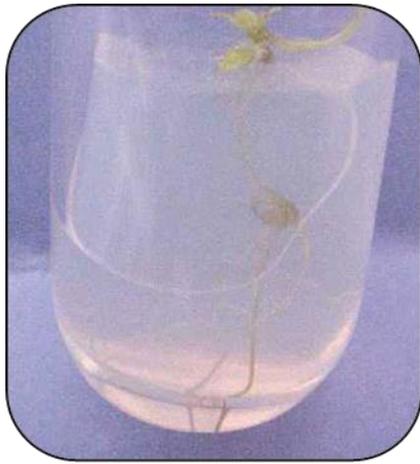


Figure 16 : Estimation du taux d'enracinement des vitroplants sur les 2 milieux MD et ME



MD



ME

Figure 17 : Présentation racinaire des vitroplants de Spunta en milieux MD et ME.

Concernant les vitroplants prélevés du milieu C :

- Leur repiquage dans les milieux MD et ME a entraîné la vitrification totale dès la première semaine.

De ce fait, la micropropagation a été établie en repiquant périodiquement, en milieu MS2, les vitroplants obtenus par culture méristématique ; ainsi, la disponibilité du matériel végétal est assurée de manière permanente.

3. MICROTUBERISATION

Dans cette étape, nous avons cherché le milieu de culture le plus favorable pour la production des microtubercules viables. A cet effet, deux milieux ont été testés sur 50 vitroplants, selon les conditions de culture décrites par les auteurs. Les résultats obtenus se résument comme suit :

3.1. Taux de tubérisation

En milieu MS3, l'induction de microtubercules a commencé après 20 jours de croissance ; c'est à dire 5 jours après la mise en obscurité. Les vitroplants Kondor avaient présentés une croissance maximale de 3 cm, avec de très petites feuilles (figure 19). Chez Spunta, les vitroplants étaient d'une croissance caulinaire maximale de 4 cm, mais généralement avec des feuilles plus petites ; les tubercules avaient présentés des stolons

atteignant 3 cm. Le temps nécessaire pour le développement des microtubercules est de 33 jours. 54 % de vitroplants de Kondor et 47 % de Spunta avaient tubérisé, à raison d'un microtubercule par vitroplant. Ces microtubercules étaient d'une couleur jaunâtre et de forme arrondie (figure 18).

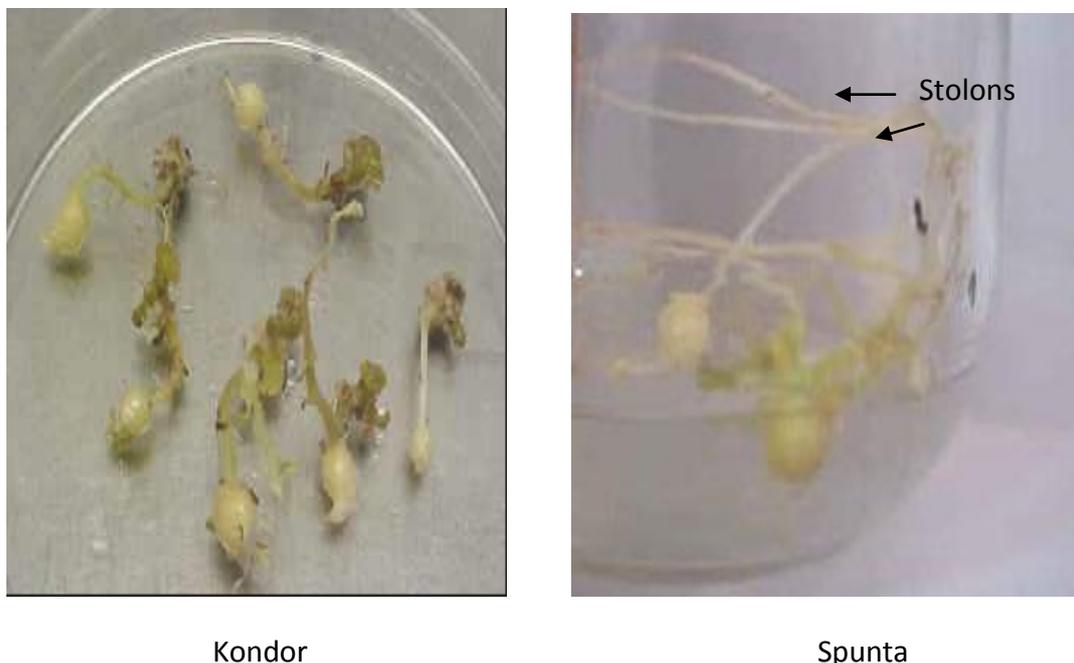


Figure 18 : Microtubercules issus de vitroplants, de Spunta et Kondor, cultivés en milieu MS3, après 30 jours de croissance.

Le milieu MS4 n'a incité la microtubérisation des vitroplants qu'après 60 Jours d'incubation. Chez les deux variétés, les microtubercules avaient une forme allongée, et une taille très importante. Pour la variété Kondor 85 % de vitroplants avaient présenté une microtubérisation, allant parfois jusqu'à deux microtubercules par vitroplant. Pour la variété Spunta, cette microtubérisation était plus importante atteignant les 92 % de vitroplants.

La récolte faite à la phase de sénescence (90 jours), met en évidence des microtubercules d'une couleur brun foncé (figure 19), avec des calibres variables.



Spunta



Kondor



Spunta



Kondor

Figure 19 : Microtubercules des 2 variétés Spunta et Kondor, obtenus après 90 j de croissance.

3.2. Poids et calibres

Les microtubercules récupérés ont été mesurés par leur diamètre et pesés, puis conservés à 4°C durant 30 jours. A cet effet, nous avons établi une échelle de mesure du calibre, représentée dans le tableau 9. Le milieu de culture MS3 a favorisé, beaucoup plus, le calibre C1. Ce développement a été de 89 % chez Kondor et de 87 % chez Spunta. Le milieu MS4 a plutôt favorisé le développement des quatre calibres, à raison de 105 microtubercules récoltés en Kondor et, de 124 en Spunta. Le taux maximal du C3 est de 36% chez Kondor et 40% chez Spunta. Ce milieu a également favorisé le développement du calibre supérieur de 8 mm, et cela en privilégiant la prédominance de Spunta sur Kondor.

De ce fait, le milieu MS4 est plus favorable à la production de microtubercules à calibre élevé.

Tableau 9 : Echelle des calibres des microtubercules obtenus dans le milieu MS3 et MS4.

Calibre (mm)	Kondor (%)		Spunta (%)	
	MS3	MS4	MS3	MS4
C 1 : De 1 à 2,5	<u>89</u>	10	<u>87</u>	28
C 2 : De 3 à 4	11	44	13	16
C 3 : De 5 à 7	00	<u>36</u>	00	<u>40</u>
C 4 : ≥ à 8	00	10	00	16

Pour le poids des microtubercules, il était très variable en fonction du calibre. Les mesures effectuées en milieu MS3 concordent avec ceux faites en milieu MS4. Afin de simplifier la lecture du poids et du calibre, le tableau 10 met en relation les différents calibres des microtubercules avec le poids correspondant chez les deux variétés.

Tableau 10 : Poids des microtubercules obtenus en fonction du calibre.

Calibre	Poids (g)
C 1	De 0,001 à 0,09
C 2	De 0,1 à 0,4
C 3	De 0,5 à 0,9
C 4	> 1

Nous avons remarqué que le milieu MS4 a marqué le poids des microtubercules le plus élevé, et le milieu MS3 a présenté les poids les plus légers. Cette modification en calibre et en poids a présenté un effet direct sur la conservation de ces microtubercules. Les tableaux 9 et 10 font ressortir qu'en MS4, le calibre C3 était prédominant chez Spunta

et moins chez Kondor. Pour le milieu MS3, l'intervalle du poids de 0,001 à 0,09 g était le plus fréquent pour l'ensemble des variétés.

3.3. Conservation et pré-germination

Cette étape nous permet d'évaluer l'aptitude à la conservation des microtubercules en fonction du calibrage. Le stockage au froid à 4°C a été effectué pour l'ensemble du matériel végétal produit durant 30 jours, pour avancer la levée de dormance. Les microtubercules ont été mis en pré-germination à la température ambiante (figure 20).

- Microtubercules induits dans le milieu MS3 : dessèchement total et sont éliminés de l'étude ;
- Ceux induits en MS4 :
 - ✓ Calibres C3 et C4 des deux variétés : parfaitement conservés pour les deux variétés ;
 - ✓ Calibre C1 : dessèchement ;
 - ✓ Calibre C2 : de 4 mm avait gardé son aptitude à la conservation, dont 9 % de Spunta et 21 % de Kondor ;
- Après 25 jours de pré-germination :
 - ✓ Sur 105 microtubercules récoltés de Kondor, 68 % ont donné des germes ;
 - ✓ Sur 124 microtubercules de Spunta, 64 % ont donné des germes.



Figure 20 : Microtubercules pré-germés.

4. CALLOGENESE

L'induction callogène a été effectuée sous contrainte de différentes température d'incubation, afin d'optimiser une callogenèse organogène. Les cals obtenus ont été, par la suite, mis dans différents milieux de culture, pour provoquer une néoformation organogène. Les résultats obtenus, sont résumés comme suit :

4.1. La température d'incubation

Après 4 semaines de culture, les cals caulinaires se sont développés sur l'ensemble des explants. La multiplication des cellules de cals foliaires sont initiés à partir de la blessure, qui s'étend sur les autres tissus de l'explant.

La variation de la température d'incubation a fortement influencé l'induction callogène et sa texture, critère indicateur de l'organogénèse somatique. Les résultats obtenus dévoilent que les températures d'incubation testées, pour les deux variétés, ont induit un pourcentage variable en cals organogènes. A T2 ($25\pm 1^\circ\text{C}$), la callogenèse était d'une texture ferme, globuleuse et chlorophyllienne (figure 21 a), cals typiquement organogènes. Cette induction était d'un optimum de 33 % pour la variété Spunta et de 66 à 76 % pour la variété Kondor. La température T1 ($22\pm 1^\circ\text{C}$) a stimulé une callogenèse d'une texture hypertrophique non organogène : lisse, friable et blanchâtre (figure 21 b). A cette température, la néoformation de cals organogènes était exclusivement expressive chez les cals foliaires avec un taux de 3 %. T3, est une température qui n'a favorisé que 10 % de cals organogènes chez Spunta et de 16 % chez Kondor.

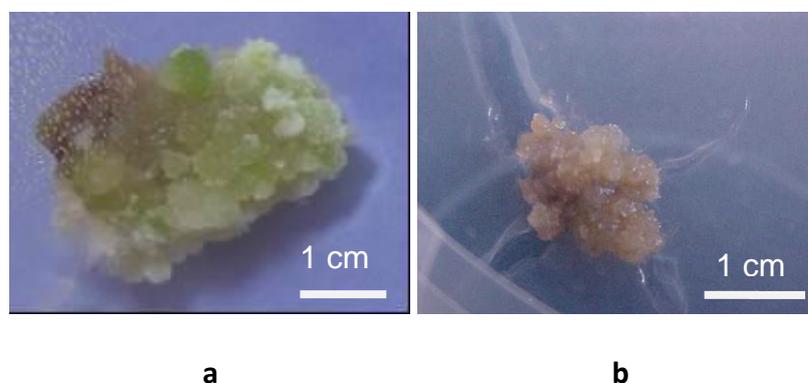


Figure 21 : Induction de cal sur les explants tiges (a) et de feuilles (b) de la variété Kondor.

L'étude statistique par ACP, présentée dans la figure 22, montre:

- L'axe 1 représentant 97,06 % de la variation totale de l'organogénèse des cals ;
- L'axe 2 représentant 2,94 % de la variation observée des températures d'incubation.

les deux variables (cals tiges et cals feuilles) sont positivement corrélés par rapport à l'axe 1, mais opposés par rapport à l'axe 2.

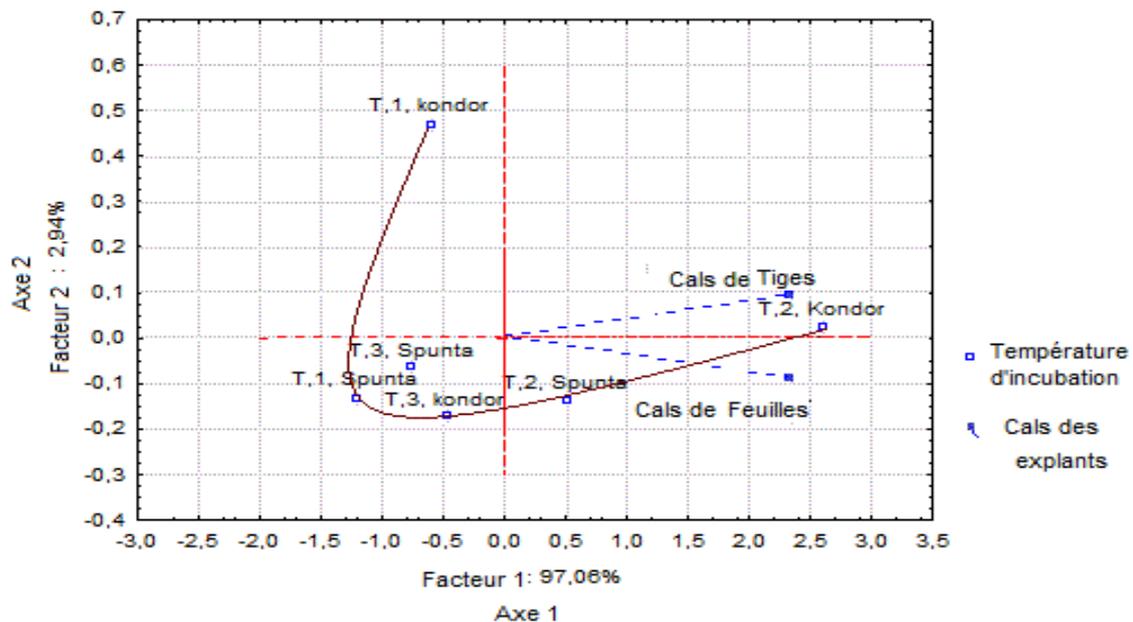


Figure 22 : Projection des températures d'incubation et des cals des explants tiges et feuilles sur l'axe factoriel de l'ACP.

La figure 22 montre la structuration majeure d'un nuage d'individus (T3 Spunta, T3 Kondor et T1 Spunta), qui se trouvent fortement corrélés par leur action ou par la similitude des cals induits. Les données présentées dans le plan factoriel formé par les deux axes, montre une organisation des températures d'incubation en forme d'arc parabolique. Cette forme, en "fer à cheval", que présentent les individus est typique d'un effet Guttman. Pour des raisons liées à la non linéarité des données, le deuxième axe isole les températures les plus caractéristiques aux extrémités de la parabole. Selon Bachacou (1973), les températures les moins caractéristiques, à amplitude large, sont projetées à l'intérieur de la parabole :

- T2 positivement organogène pour les deux variétés, avec un effet plus favorable sur Kondor ;
- T3 et T1 se situent du côté négatif des axes et à l'intérieur du nuage de la parabole. Ces températures induisent une évolution de cals peu ou non organogènes.

5. ORGANOGENESE SOMATIQUE DES CALS

Après 45 jours de croissance sur les milieux d'organogénèse, les embryons somatiques ont été observés à la loupe binoculaire sur cals des tiges et des feuilles pour la variété Spunta et uniquement sur les cals des tiges pour la variété Kondor (figure 23). Le temps nécessaire de cette induction dépend fortement du type d'explant. Chez la variété Spunta, les embryons se sont formés sur les milieux de culture ; MSC3 et MSC4. Chez la variété Kondor, les milieux de culture MSC1 et MSC2 se sont révélés les plus appropriés (tableau 11).

Tableau 11 : Résultats de l'induction d'embryons somatiques à partir d'explants de tiges et de feuilles des variétés Spunta et Kondor.

Milieux de culture	KONDOR		SPUNTA			
	Tige		Tige		Feuille	
	Temps d'induction (jours)	Pourcentage (%)	Temps d'induction (jours)	pourcentage (%)	Temps d'induction (jours)	pourcentage (%)
MSC	-	-	-	-	-	-
MSC1	40	67	-	-	-	-
MSC2	30	73	-	-	-	-
MSC3	-	-	50	70	35	17
MSC4	-	-	40	77	35	20

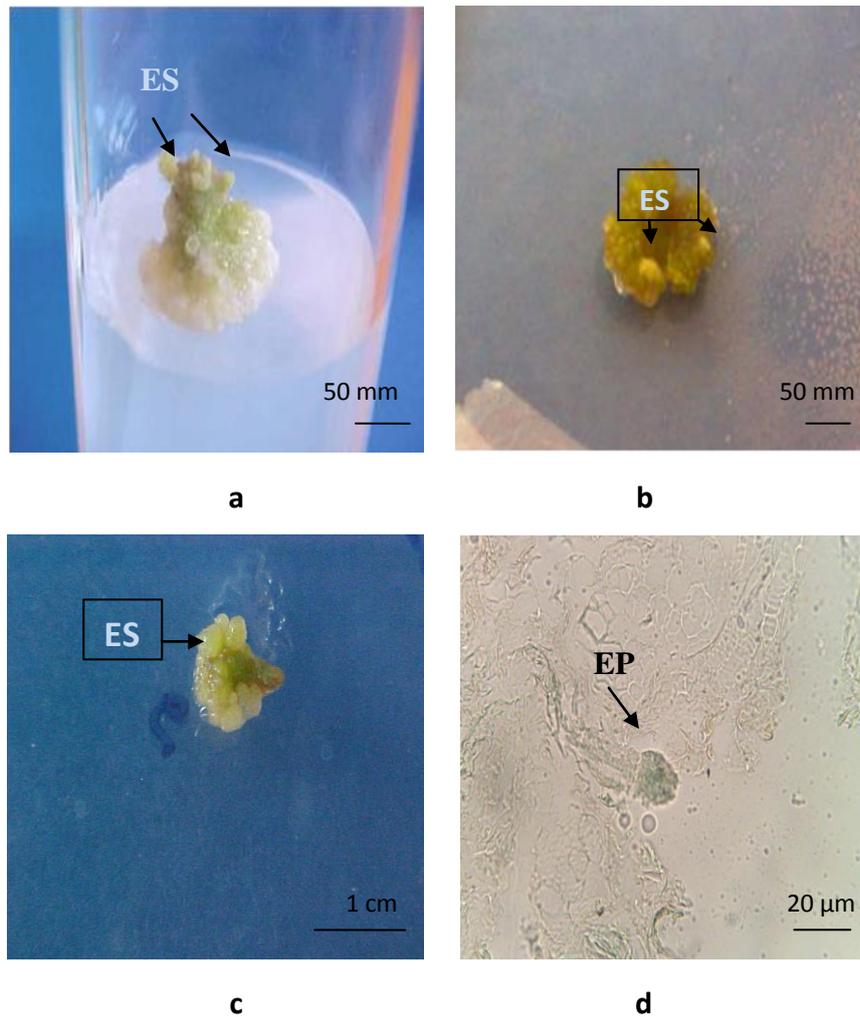


Figure 23 : Formation d'embryon somatique (ES) sur cals caulinaire et foliaire des 2 variétés.

a: ES sur cal caulinaire de Spunta en MSC4; b: ES de cal foliaire de Spunta en MS1; c : ES de cal caulinaire de Kondor en MSC1 ; d: coupe histologique d'un embryon primaire (EP) sur cal foliaire de Spunta en MSC5.

L'étude histologique a montré la présence d'embryons somatiques en phase primaire. Cette formation a été identifiée par l'apparition d'un amas cellulaire sous forme de nodule, relié au cal par un axe apico-basale, formant ainsi une extrémité filamenteuse (figure 24 d). Ces embryons se développent en formant, par la suite des embryons globulaires visibles à l'œil nue (figure 25 c).

Chez les cals embryogènes, une faible proportion de cellules se divise pour donner naissance à une organogénèse. De plus, la majorité de ces cellules se localisent à la

surface de l'explant ou en contact avec le milieu nutritif comme cela a été déjà observé par Evans *et al* (1981).

Pour les deux explants de Kondor, le milieu MSC a favorisé deux formes de régénérations organogènes :

- 1- prolifération organogène sur cal (figure 24 c) ;
- 2- Prolifération organogène directement sur l'explant avant callogenèse (figure 24 f).

Une bonne évolution d'amas cellulaires a été observée, formant ainsi les méristèmes chez la variété Kondor après 60 jours de mise en culture. Ces amas cellulaires se présentent en de petites cellules nettement différentes des cellules voisines, avec une coloration intense de l'ensemble de la cellule avec le bleu de toluène. Par la suite, il y a eu un développement de méristèmes secondaires. La figure 24 a mis en évidence la coloration bleuâtre de ces structures secondaires. Celles-ci se présentent par la formation de primordia (les premières feuilles), ainsi que le méristème apical.

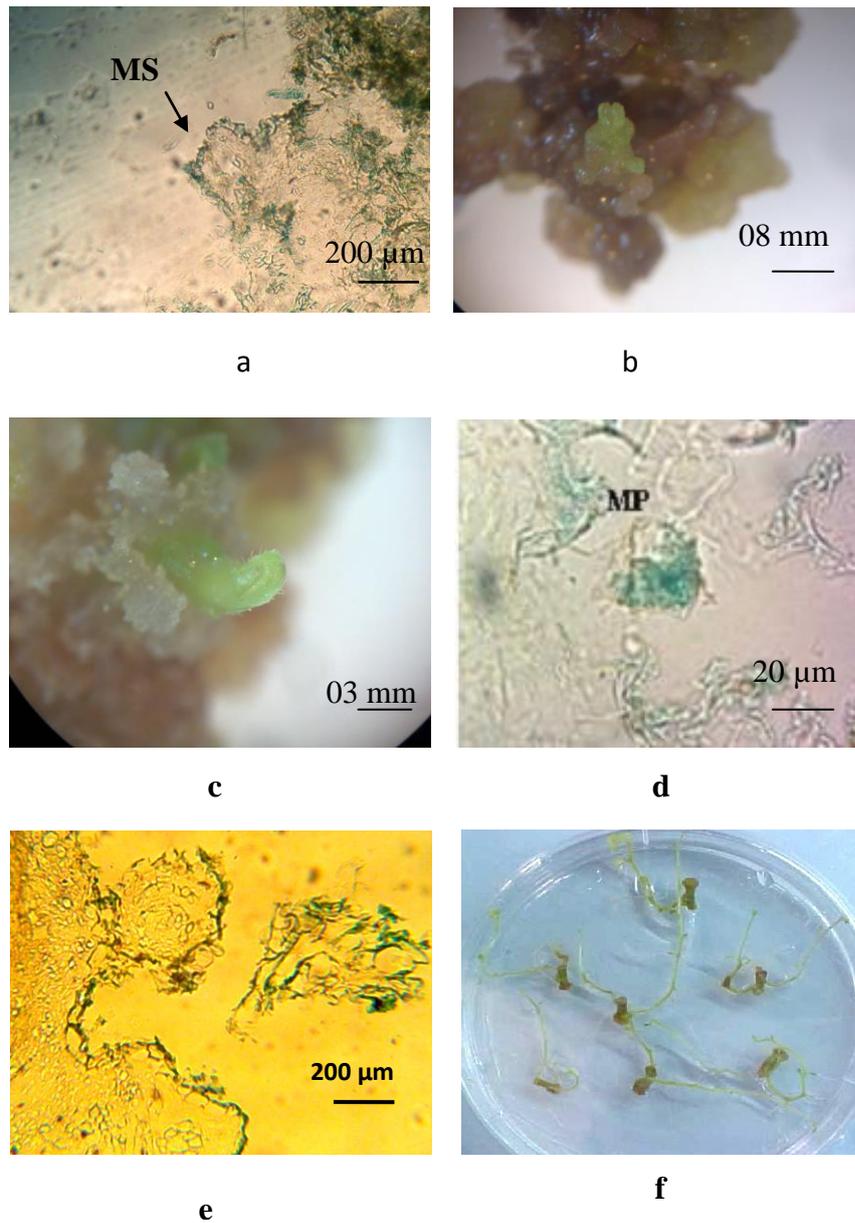


Figure 24 : Formation de méristèmes somatique (MS) sur cals caulinaires et foliaires de Spunta et Kondor.

a : coupe histologique de MS sur cal caulinaire de Kondor en MSC1; **b**: MS sur cal foliaire de Kondor en MSC1; **c**: MS sur cal caulinaire de Kondor en MSC2; **d**: méristème primaire (MP) sur cal foliaire de Kondor en MSC3; **e**: cal globulaire caulinaire de Spunta en MSC1; **f**: développement de MS sur tige Kondor en MSC.

Le tableau 12 résume les résultats obtenus dans l'initiation méristématique sur cal. Les milieux organogènes diffèrent selon la variété. La variété Kondor a pu se régénérer par la formation de méristème somatique dans les milieux MSC, MSC3 et MSC4 sur cal de la tige et tous les milieux testés sur cal de la feuille. Chez la variété Spunta, seul l'organe cal tige a induit des méristèmes sur milieu MSC1 après 65 jours de la mise en culture (figure 24 b), tout en respectant les facteurs de la mise en culture décrites ci-dessus.

Tableau 12 : Résultats d'induction de méristèmes somatiques chez Spunta et Kondor.

Milieu de culture	KONDOR				SPUNTA	
	Tige		Feuille		Tige	
	Temps d'induction (jours)	pourcentage (%)	Temps d'induction (jours)	pourcentage (%)	Temps d'induction (jours)	Pourcentage (%)
MSC	60	75	65	44	65	34
MSC1	-	-	75	10	-	-
MSC2	-	-	60	10	-	-
MSC3	35	17	60	17	-	-
MSC4	40	10	53	20	-	-

Les données obtenus ont été traités avec le logiciel STATISTICA ; l'analyse en composante principale présentée en figure 23 permet de mettre en corrélation le choix de l'explant pour chaque variété avec la concentration la plus propice en 2.4-D. Les axes factoriels de cette ACP présente l'axe 1, avec 52,89 % de la variation totale en organogenèse somatique des cals ; l'axe 2 représente 26,02 % de la variation observée chez les milieux de culture testés (MSC, MSC1, MSC2, MSC3 et MSC4).

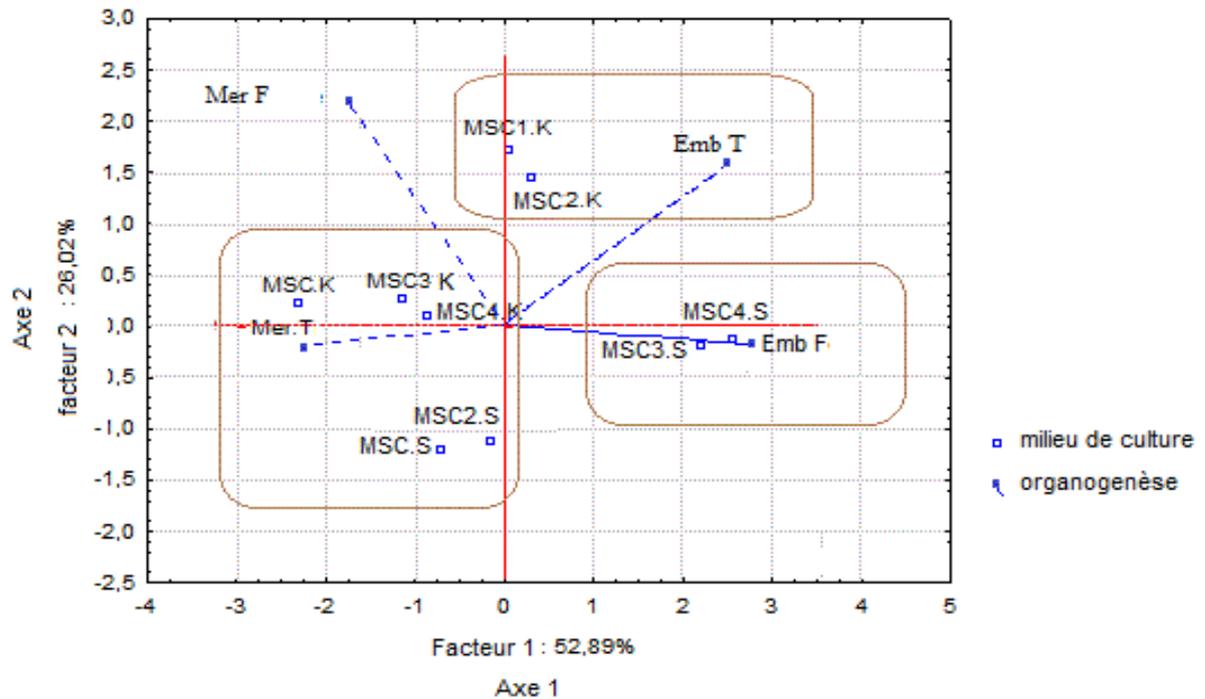


Figure 25 : Projection des milieux de culture et des néoformations organogènes des cals sur l'axe factoriel de l'ACP.

La projection des données sur le plan factoriel montre une organisation de trois groupes. Le premier groupe, se localisant sur la partie positive de l'axe 1, regroupe les milieux de culture MSC3 et MSC4 avec l'induction embryogène des cals foliaires de Spunta. Le deuxième groupe, se situant sur la partie positive de l'axe 2, démontre une grande corrélation entre la régénération par embryogenèse somatique des cals caulinaires de Kondor avec les milieux MSC1 et MSC2. Le troisième groupe, se localisant sur la partie négative de l'axe 1, favorise la corrélation entre la régénération par bourgeonnement somatique des cals caulinaires en présence de MSC, MSC3 et MSC4 pour Kondor, et de MSC et MSC2 pour Spunta.

Par conséquent, l'induction d'embryon somatique est très favorable sur cals des deux explants chez Spunta. Pour Kondor, seul les cals caulinaires ont été plus propices à ce mode de reproduction dans ces milieux. La régénération par bourgeonnement somatique était positive chez l'ensemble des milieux testés pour la variété Kondor. Le milieu MSC s'est révélé le milieu le plus favorable pour ce dernier mode de régénération chez les deux variétés.

B. DEUXIEME ETAPE

1. SELECTION DE CALS TOLERANTS AU STRESS SALIN

Les cals induits des deux variétés ont été exposés à différentes concentrations de NaCl ; permettant par la suite, d'identifier les cals tolérants. Les résultats de cette étude se résument comme suit :

1.1. Détermination du seuil de tolérance

L'utilisation du milieu de culture MSC avait favorisé une callogenèse des explants des deux variétés, présentant une texture compacte, globulaire et de couleur verdâtre (figure 26 A et B). Cette texture a subi des modifications, par l'accroissement du stress salin, aboutissant à un cal friable lisse et brunâtre (figure 26 C et D). Pour la première génération (G1), les taux de T1 à T5 avait présenté une texture semblable au témoin, avec une diminution de 6 % du poids moyen chez Spunta et de 10 % chez Kondor. T6 et T7 avaient accentué cette perte de poids jusqu'à 40 % chez Spunta et de 48 % chez Kondor. A partir de T8, la texture du cal a été modifiée avec une chute importante du poids atteignant 80 % chez les deux variétés.

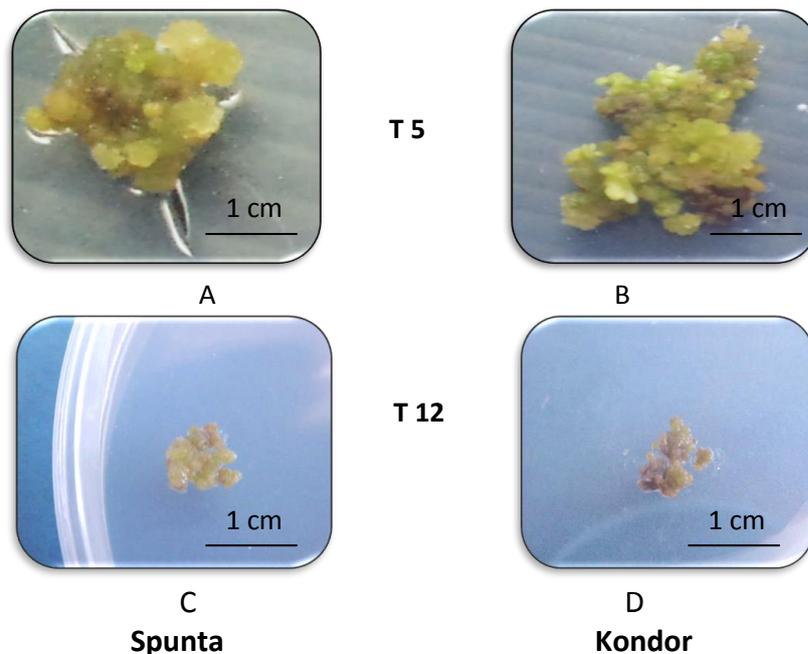


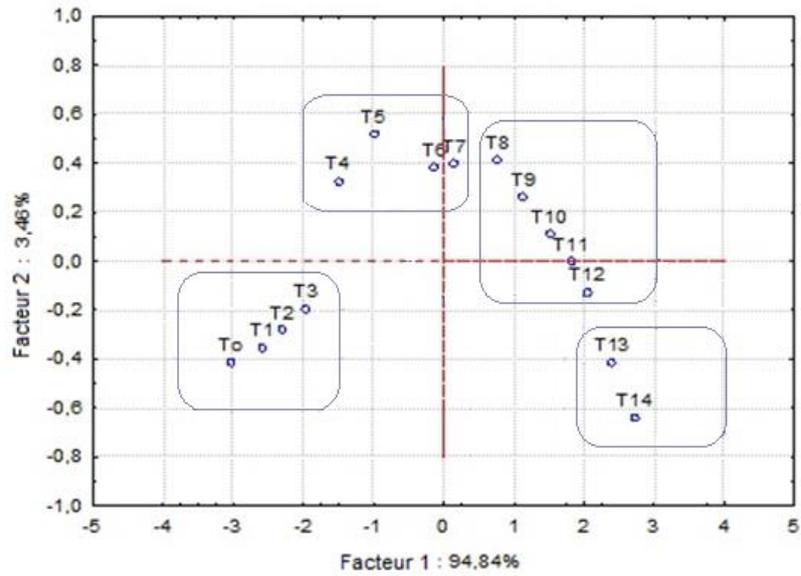
Figure 26 : Présentation de cals tolérants à 5 g.L⁻¹ de NaCl et de cals brunis à 12 g.L⁻¹ de NaCl.

Selon l'étude statistique résumée en figure 27, la croissance des deux générations de cals est représentée par le facteur 1, et le degré de sensibilité au stress salin par le facteur 2. L'ACP de la G1 (figure 27 A) indique la présence d'une importante corrélation donnant quatre groupes distincts :

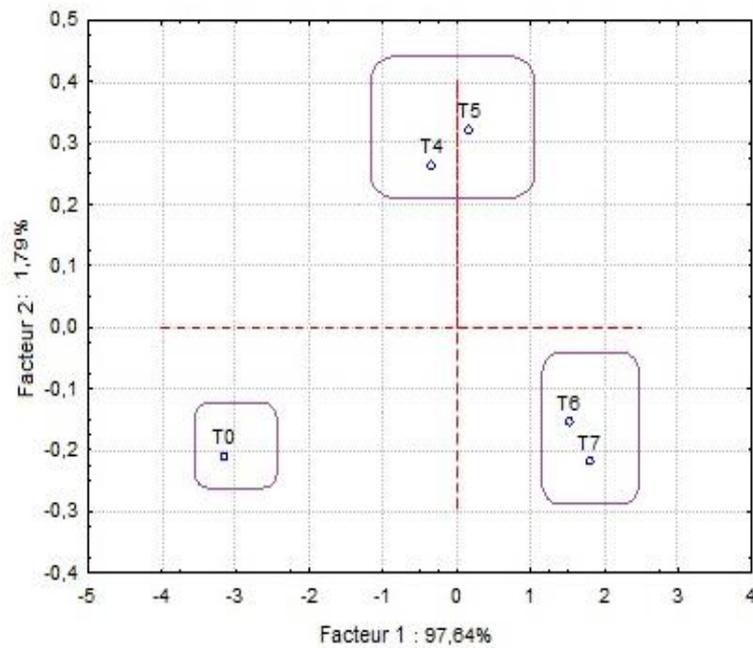
- Groupe 1 : (T0, T1, T2 et T3) cals caractérisés par une très faible sensibilité au stress salin, se situant dans la partie négative de l'axe 2. Les cals de T1, T2 et T3 étaient bien développés par rapport à T0 ;
- Groupe 2 : (T4, T5, T6 et T7) cals peu sensibles au stress, par leur position dans la partie positive de l'axe 2. Les individus de T6 et T7 sont fortement corrélés par leur rapprochement de l'axe 1 ;
- Groupe 3 : (T8 à T12) cals de sensibilité croissante à la salinité, présentant une forte corrélation entre eux. Les cals avaient présenté une faible croissance, avec un brunissement qui s'accroissait avec le temps ;
- Groupe 4 : (T13 et T14) cals de grande sensibilité au stress salin, caractérisés par un arrêt de la croissance, suivi d'un brunissement total du cal. Ce sont les concentrations létales.

Par conséquent, les cals tolérants du groupe 2 ont été retenus et repiqués en respectant les concentrations du NaCl. La texture des cals de cette deuxième génération (G2) n'avait présenté aucune modification. Toutefois, l'analyse par l'ACP (figure 27 B), montre la forte corrélation existant entre les individus, les classant en trois groupes :

- Le groupe des témoins (cals de T0) ;
- Le groupe 1 comportant les cals tolérants (cals de T4 et T5): représentant le seuil de tolérance au stress salin des deux variétés ;
- Le groupe 2 (cals de T6 et T7) : avec une sensibilité plus élevée au stress salin que le groupe 1.



A



B

Figure 27 : Projection de la sensibilité des cals de la G1(A) et de la G2 (B) au stress salin sur l'axe factoriel de l'ACP.

Le calcul de l'ITS des cals de la G2, évoque la grande tolérance au stress salin de Kondor par rapport à Spunta, résumé dans le tableau 13. Cet indice de tolérance reflète la

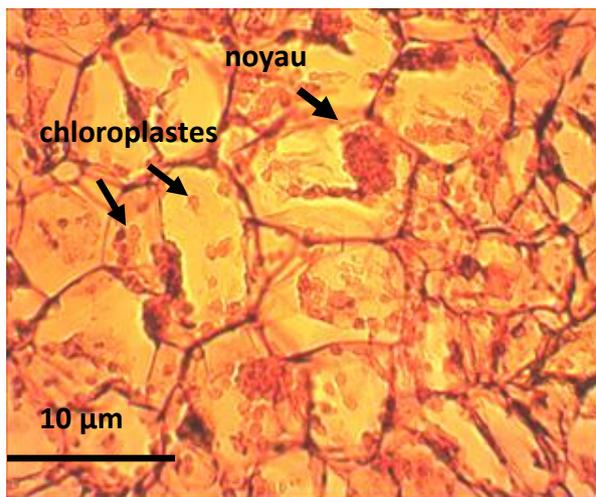
progression respective de la sensibilité à la salinité en passant de T4 à T7 chez les deux variétés, avec une différence concrète en tolérance des cals caulinaires et foliaires. De ce fait, nous pouvons dire que le seuil de tolérance des deux variétés se situe entre T4 et T5 (4 g.L⁻¹ et 5 g.L⁻¹).

Tableau 13 : Mesure de l'indice de tolérance du stress salin (ITS) sur les cals des deux variétés.

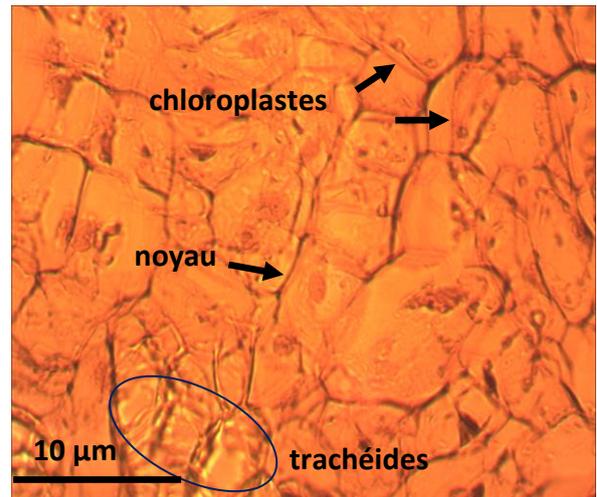
Variétés	Kondor		Spunta	
Explant Doses De NaCl	Tige	Feuille	Tige	Feuille
T4	2,32	1,94	1,77	1,78
T5	1,65	1,89	1,72	1,55
T6	1,14	1,15	0,99	1,11
T7	1,03	1,00	0,95	0,92

1.2. Etude histologique de cals en milieu salin

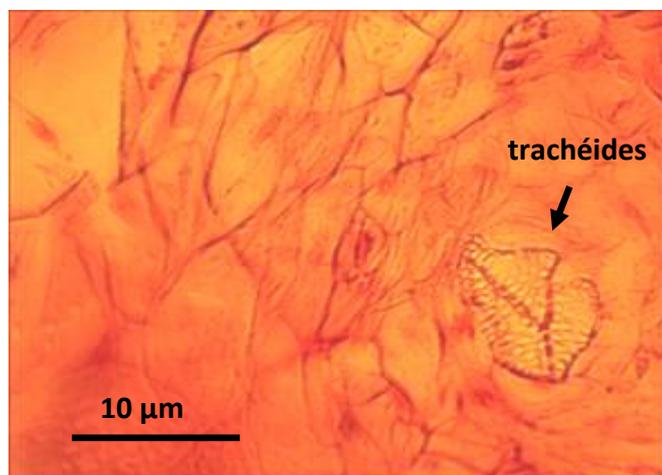
Les résultats obtenus révèlent que la taille cellulaire des cals ne diffère pas en fonction des explants et des variétés (figure 28). Toutefois, les cellules callogène foliaires se manifestent par une présence considérable en chloroplastes. Au cours de cette phase de croissance (25 jours), le cal commence à développer les cellules constituant le parenchyme, appelées trachéides. Ces cellules se retrouvent dans la partie centrale des cals foliaires et collinaires (figure 29).



Kondor feuille



Spunta feuille



Spunta tige

Figure 28 : Différenciation des cellules de cal témoins de 25 jours de croissance de Spunta et Kondor.

Selon la figure 29, les cellules du tissu néoformé sont de taille plus petite que celles de tissu préexistant (après repiquage du cal). Cela indique la croissance de ce cal en entraînant la différenciation des cellules méristématiques et de trachéides. Ces derniers sont des cellules formatrices du xylème primaire (protoxylème). Cette néoformation est le signe indicateur de la différenciation cellulaire, et de l'organogenèse somatique.

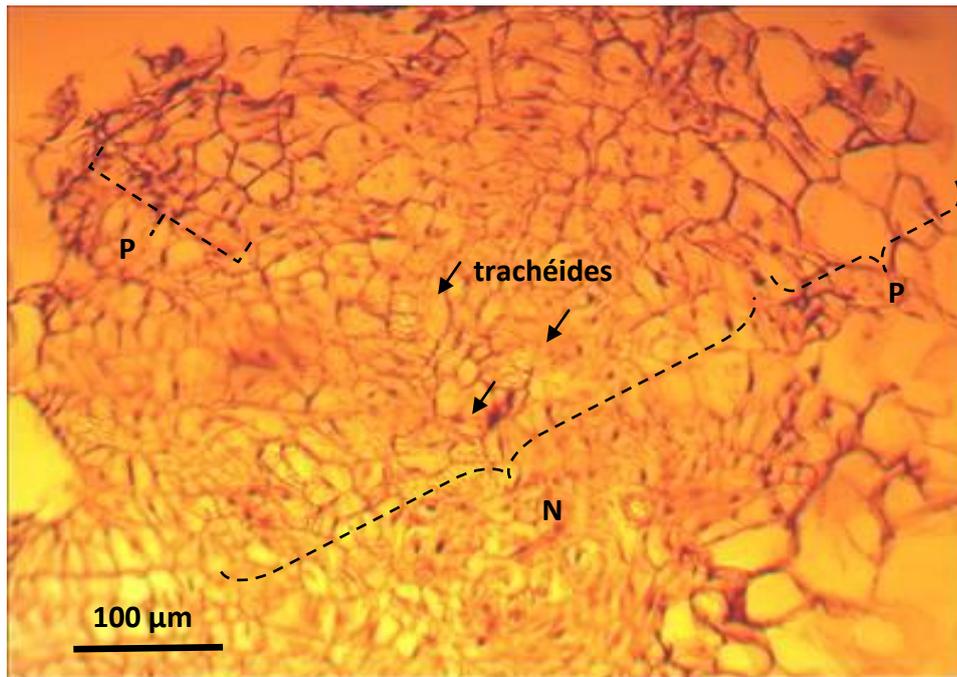


Figure 29 : Coupe longitudinale d'un globule d'un cal caulinaire de Kondor

P : tissu préexistant ; N : tissus néoformé.

L'exposition des cals à différentes concentrations de NaCl a favorisé le ralentissement de la croissance cellulaire. La réalisation de coupes histologiques témoigne de la réaction identique des cellules callogènes des deux variétés aux différentes concentrations de NaCl. De T0 à T5, les cellules ressemblent aux cellules du témoin, comme le montre la figure 30-d. A partir de T6, les cellules commencent à subir une plasmolyse, qui s'accroît avec l'augmentation de la concentration (figure 30- c, b et a). A T8, la plupart des cellules se plasmolysent de façon considérable ; mais à T12, le cytoplasme est complètement vidé de son eau.

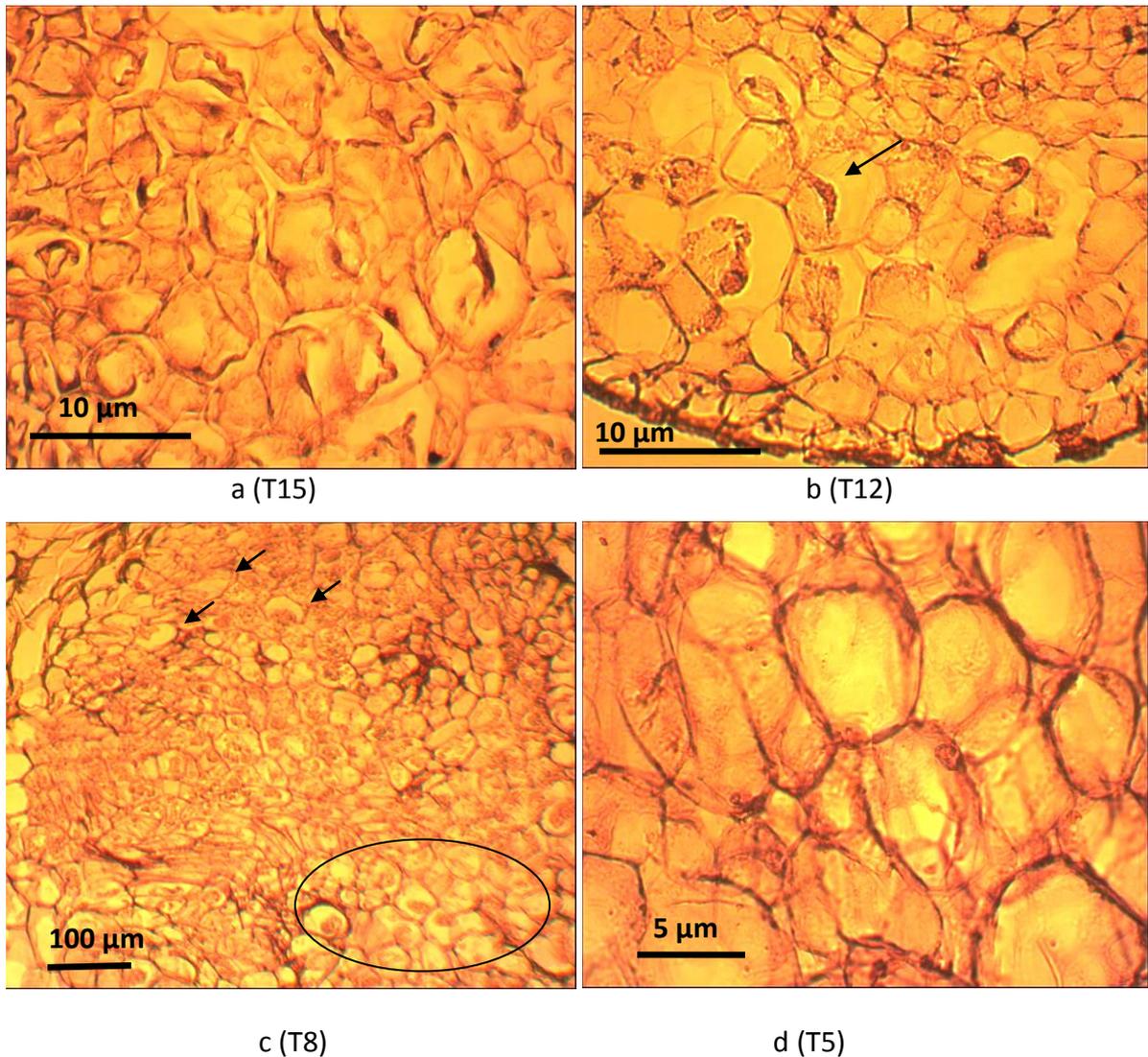
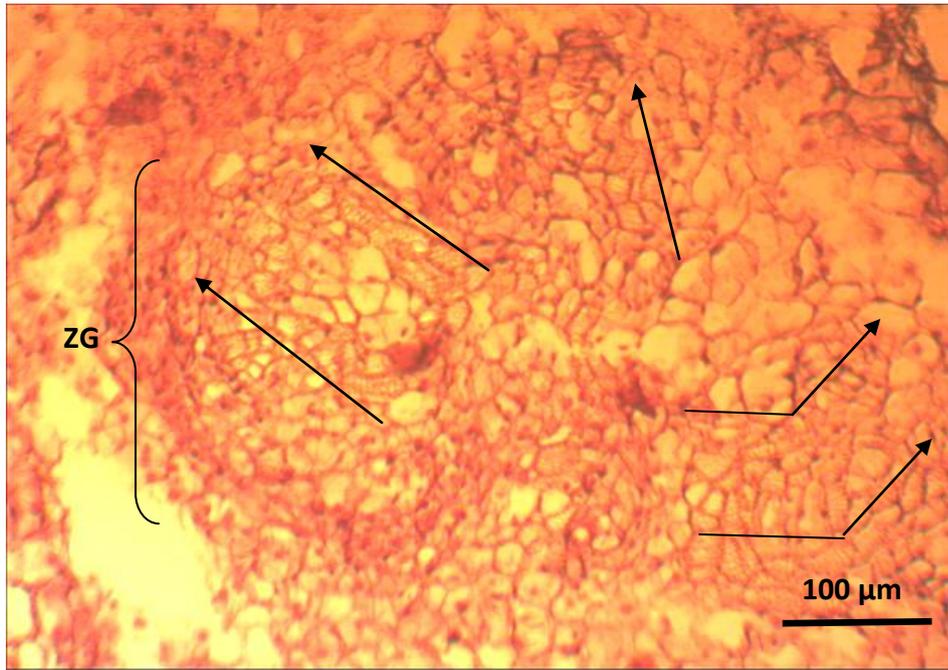
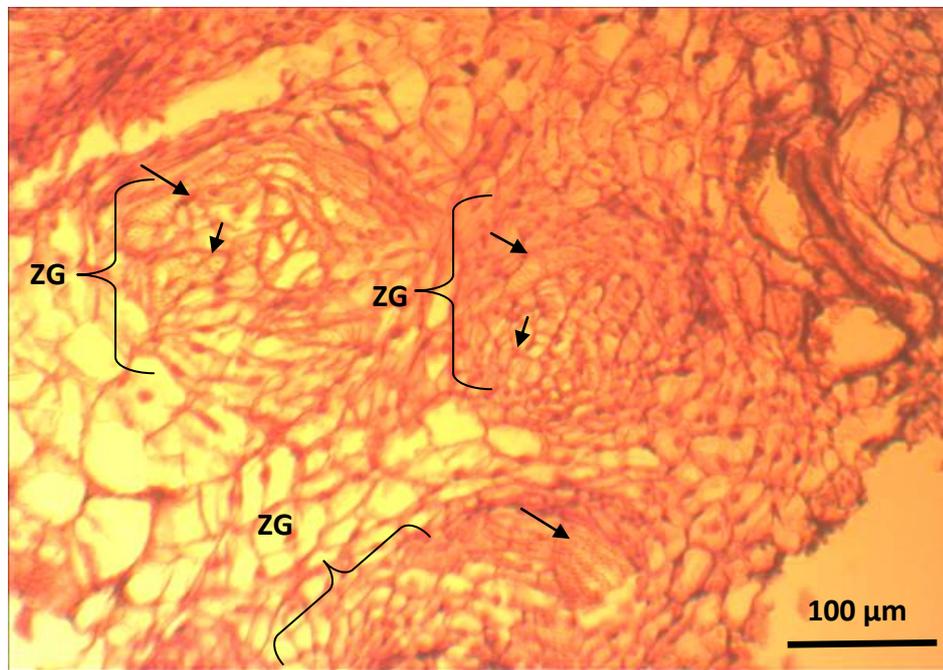


Figure 30 : Passage de cellules non plasmolysées à 5 g. l⁻¹ de NaCl de cals caulinaires vers des cellules plasmolysées à 8, 12 et 15 g.l⁻¹ de NaCl chez la variété Kondor.

L'examen des différents tissus callogènes, exposés au stress salin, montre que les zones génératrices se présentent sous forme de nodules englobant, généralement, des massifs de trachéides. Les observations des cals à T1 et T5 montrent que la fréquence des zones génératrices diminue avec l'augmentation des concentrations en NaCl. Par contre, les massifs de trachéides se développent d'avantage, parfois en sens aléatoire (figure 31-T1). A partir de T3, ces massifs de cellules lignifiées s'organisent en formant des canaux de manière centrifuge (figure 31- T5).



T5



T1

Figure 31 : Présentation de l'évolution des zones de générations (ZG) et formation des canaux de trachéides.

1.3. Induction des méristèmes tolérants

Les résultats représentés dans la figure 32 montrent que l'induction méristématique a été plus favorable chez les cals caulinaires que chez les cals foliaires pour les deux variétés. Cette organogenèse somatique a été induite chez les cals témoins dès la première génération, suivie d'une meilleure induction à la deuxième génération. Pour la variété Kondor, nous avons observé une organogenèse de 66 % à partir de cals foliaires, et de 76 % chez les cals caulinaires. Dans le même ordre d'enchaînement, les cals de la variété Spunta avaient présenté près de 14 % et 33 %.

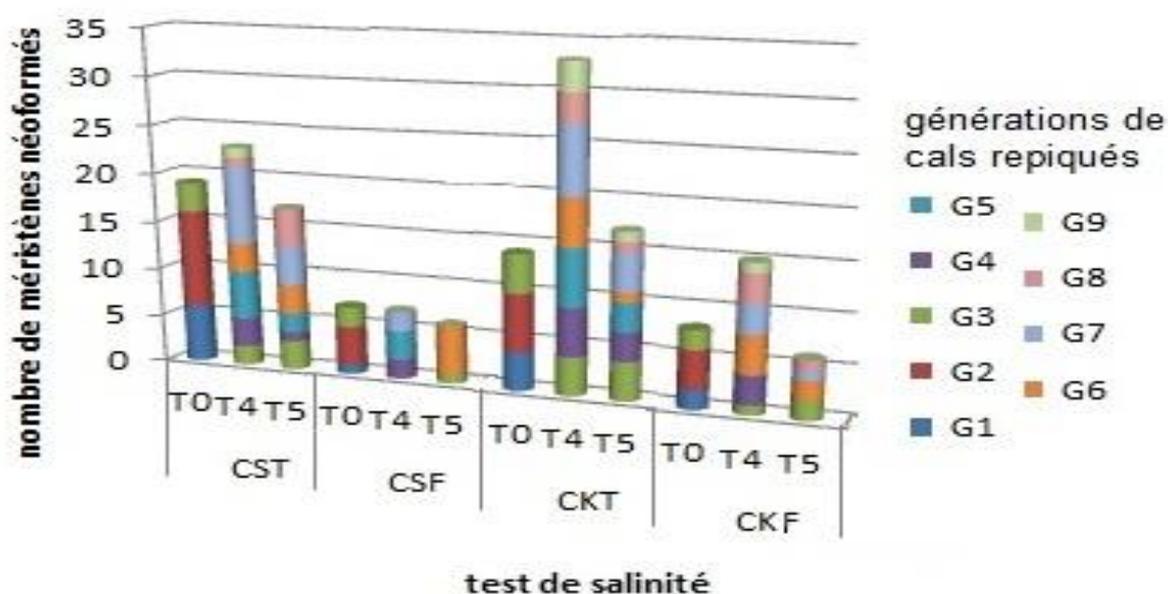


Figure 32 : Nombre de méristèmes induits sur cals tolérants selon les générations (de G1 à G9).

Les cals tolérants de la variété Kondor ont été plus organogènes que ceux de la variété Spunta. Les concentrations T4 et T5 avaient provoqué une inhibition de l'organogenèse somatique des cals des générations G1 et G2. Ce n'est qu'à partir de la G3 où la néoformation méristématique a été observée chez les deux variétés. Le nombre de méristèmes néoformés avaient diminué avec les générations, et en augmentant les concentrations en NaCl. Cette néoformation organogène a été inhibée à partir de la neuvième génération callogène pour les deux variétés.

1.4. Croissance et enracinement des vitroplants tolérants

Le repiquage des cals tolérants à T4 et T5 dans le milieu de culture MSE, avait donné une croissance caulinaire relativement faible par rapport aux témoins. Il a été remarqué, que les variants de T4 étaient plus développés que les variants de T5 (figure 33) : différences moyennes de près de 3 cm pour l'explant tige et de 4 cm pour l'explant feuille.

Pour les deux concentrations retenues, la variété Kondor a été plus expressive en croissance par rapport à la variété Spunta, et les explants feuilles ont été moins rentables par rapport aux explants tiges.



Figure 33 : Vitroplants tolérants à T4 et T5 induits à partir de cals caulinaire de Kondor, après vingt jours de croissance.

Chez les deux variétés, la mise en culture de ces variants dans MSE1 avait entraîné une rhizogenèse très favorable pour tous les vitroplants (figure 34). La modification de la concentration de l'ANA à 18 mg.L^{-1} avait accéléré le processus d'enracinement en moins de 6 jours.

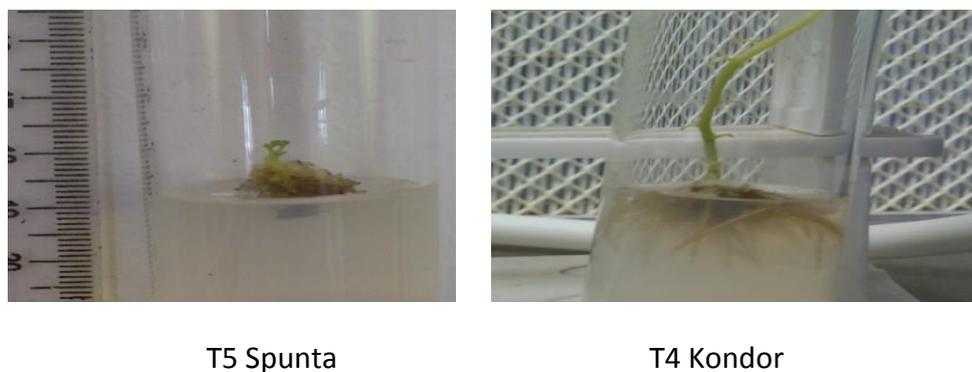


Figure 34 : Enracinement des variants de cals de feuilles, de dix jours de croissance, dans T4 pour Kondor et dans T5 pour Spunta.

Le facteur variété ne rentre pas en compte pour ce paramètre, il en est de même pour le choix des explants destinés à l'étude (tige ou feuille). Comme le montre la figure 34, la croissance racinaire s'est révélée très favorable pour le traitement T4 et moins développée pour T5.

2. SELECTION DES GENOTYPES TOLERANTS

L'exposition des vitroplants aux différentes concentrations de NaCl (de T0 à T10) a révélé des résultats très variables, et sont comme suit :

2.1. Première génération de vitroplants exposés au stress salin

2.1.1. Effet de la salinité sur la croissance des tiges

Suite aux stress salins appliqués sur 50 vitroplants par variété et par test, les résultats étaient très relatifs aux concentrations de NaCl. Le suivi mené tous les 8 jours, durant 32 jours a révélé que la tolérance est relativement dépendante des variétés et des concentrations de NaCl. L'émergence des vitroplants exposés de T1 à T4 a été effectuée dès le quatrième jour de culture. De T5 à T7, les vitroplants se sont développés dès le sixième jour. T8 et T9 n'avaient favorisé l'émergence des vitroplants qu'à partir du neuvième jour de la culture. Toutefois, le stress salin a été d'une grande influence sur la croissance des vitroplants (figure 35). Il a été noté que la concentration létale chez les deux variétés était 10 mg.L^{-1} de NaCl. Suivant la figure 34, en T1, la croissance des vitroplants a été réduite de 2,5 cm chez Kondor et de 1 cm chez Spunta. A ce niveau l'indice de tolérance chez Kondor est de 2,53 ; et de 2,76 chez Spunta (tableau 14).

La croissance caulinaire diminue en moyenne de manière progressive de 0,5 cm chez les deux variétés jusqu'à T5. Dans ce test, la longueur est réduite de moitié chez Kondor.

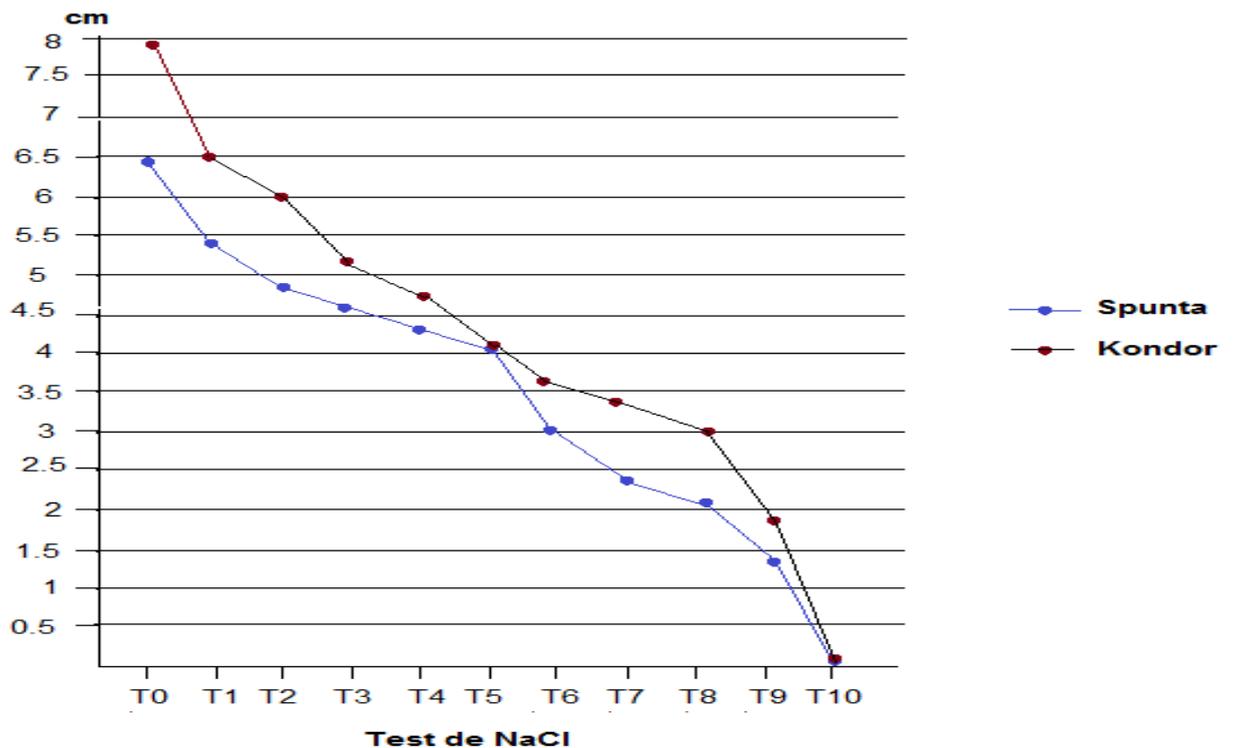


Figure 35 : Présentation de la longueur moyenne des tiges de vitroplants de 32 jours de croissance en milieux salins variables.

A T6, la longueur de tige chez Spunta se réduit de moitié, avec un indice de tolérance de 1,5. Selon le tableau 14, le seuil de tolérance est à T5 pour Spunta, et de T4 chez Kondor (figure 36). De ce fait, nous pouvons dire que les vitroplants de Spunta présentent une tolérance plus considérable en croissance caulinaire que les vitroplants de Kondor.

Tableau 14 : Indice de tolérance au stress salin causé par NaCl de la première génération de Spunta et Kondor.

Doses de NaCl	SUNTA	KONDOR
T1	2,76	2,53
T2	2,5	2,34
T3	2,4	2,02
T4	2,24	1,83
T5	2	1,59
T6	1,56	1,4
T7	1,2	1,3
T8	1,09	1,17
T9	0,73	0,54



Kondor 18 Jours

Spunta 30 jours

Figure 36 : Croissance des vitroplants en milieu T4.

La chlorose est un phénomène physiologique lié à la tolérance des vitroplants aux stress salins (figure 37). Les individus présentant ce phénomène sont pauvres en chlorophylle ; les feuilles et les tiges jaunissent, suivi d'un arrêt de croissance entraînant leur perte après un certain temps de développement. Au cours de cette expérience, ce phénomène s'est déclenché à tous les niveaux du test, mais à une proportion variable. Ces individus sont automatiquement éliminés de l'étude.

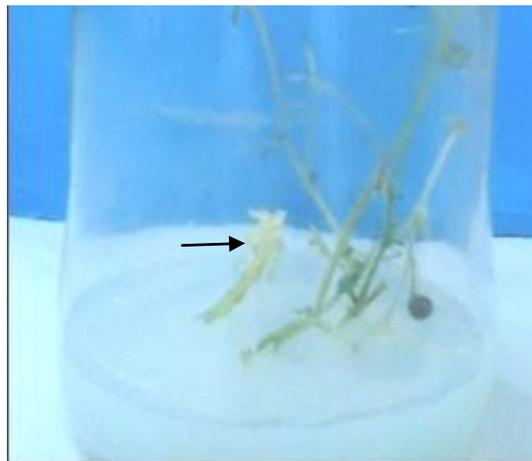


Figure 37 : Chlorose d'un vitroplant de Spunta exposé à 1g.L^{-1} de NaCl.

2.1.2. Effet de la salinité sur la rhizogenèse

La rhizogenèse est une phase déterminante, elle permet d'identifier les vitroplants les plus tolérants au stress salin. Le développement racinaire de T0 à T2 s'est développé dès le

troisième jour de la mise en culture. De T3 à T5, la rhizogenèse a été développée à partir du huitième jour. Le reste n'a présenté de racine qu'à partir du 15^{ème} jour de culture.

La figure 38 montre que Spunta présente une rhizogenèse plus développée que celle de Kondor. Ce processus s'inverse lors de l'application du stress salin de T1 à T4. Par contre, à T5 et T6, la réponse rhizogène des vitroplants est identique chez les deux variétés. Ce n'est qu'à partir de T7 que le ralentissement du développement racinaire se fait ressentir.

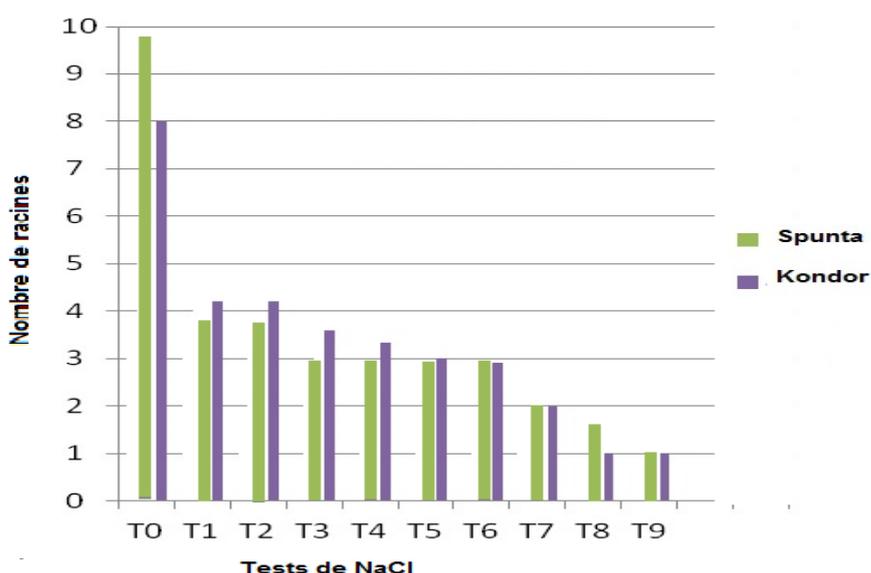


Figure 38 : Nombre de racines des vitroplants de 32 jours de croissance exposées à différentes doses de NaCl.

Après analyse des résultats, les taux T6, T7, T8 et T9 ont été éliminés de l'étude de la deuxième génération.

2.2. Deuxième génération de vitroplants exposés au stress salin

Les vitroplants de la première génération tolérants, ont été repiqués en deuxième génération dans les taux de NaCl retenus. Les observations faites lors du suivi ont révélé les résultats suivant :

2.2.1. Effet de la salinité sur la croissance des tiges

Les vitroplants tolérants repiqués ont présenté une croissance considérable telle que cela apparaît dans la figure 39. Des analyses de variance ont été effectuées par le logiciel STATITCF, sont présentées dans les tableaux qui suivent :



Kondor



Spunta

Figure 39 : Croissance de vitroplants de 32 jours tolérants à T2.

Tableau 15 : Résultats de l'analyse de la variance à trois facteurs : la concentration en NaCl, du temps d'exposition à ce stress et des deux variétés de *S.tuberosum*.

	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	ET	CV
TOTALE	95	3,65				
Temps de croissance (Facteur 1)	3	17,19	16,48	0,0000		
Variétés (Facteur 2)	1	40,26	38,60	0,0000		
Concentration en NaCl (Facteur 3)	5	31,85	30,54	0,0000		
INTER facteurs (Facteur 1* Facteur 2)	3	0,04	0,04	0,9894		
INTER facteurs (Facteur 1* Facteur 3)	15	0,92	0,88	0,5904		
INTER facteurs (Facteur 2* Facteur 3)	5	2,64	2,53	0,0412		
INTER facteurs (Facteur 1*Facteur 2*Facteur 3)	15	0,66	0,64	0,8295		
VAR.BLOCS	1	9,22	8,84	0,0047		
VAR.RESIDUELLE	47	1,04			0,12	6,8%

L'analyse montre que les trois facteurs présentent une interaction hautement significative face au stress salin. Toutefois, la croissance des tiges n'est pas significativement liée aux variétés. La concentration en NaCl a un effet significatif sur la croissance des vitroplants, en corrélation avec les variétés.

Test de Newman et Keuls à un seuil de 5 %

Les résultats ont été, par la suite, traités avec le test Newman et Keuls.

➤ Facteur 1 : Nombre de jours de croissance

Le tableau 16 permet de classer les périodes en deux groupes, selon la phase de croissance des vitroplants. Dans ce cas, la croissance en 24 jours ou en 32 jours des vitroplants des deux variétés est identique. Cela veut dire que la croissance maximale se limite généralement à 24 jours.

Tableau 16 : Résultat de la comparaison des moyennes de la hauteur des tiges en fonction du temps et des variétés Spunta et Kondor.

F1	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
4	32 J	4,70	A
3	24 J	4,37	A
2	16 J	3,18	B
1	8 J	3,00	B

➤ Facteur 2 : Variétés

Le tableau 17 révèle que le facteur variété est d'une importance considérable sur la croissance des vitroplants. La variété Spunta présente généralement, une croissance caulinaire plus importante que la variété Kondor (caractère génétique variétal).

Tableau 17 : Résultat de la comparaison des moyennes de la hauteur des tiges selon la variété.

F2	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
2	SPUNTA	4,46	A
1	KONDOR	3,17	B

➤ Facteur 3 : Concentration en NaCl

Dans le tableau 18, les résultats montrent 5 groupes de sensibilité distinctes de manière linéaire jusqu'au seuil limite représenté par T3. T4 et T5 se rejoignent dans le dernier groupe. La liaison de ces résultats statistiques avec celles des observations physiologiques met en évidence que T5 est une concentration létale, et T4 est une concentration sub-létale, vue la présence de certains individus à cette concentration.

Tableau 18 : Résultat de la comparaison des moyennes de hauteurs des tiges selon la concentration en NaCl pour les variétés Spunta, kondor.

F3	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENNES
1	T0	5,97	A
2	T1	5,08	B
3	T2	3,65	C
4	T3	3,01	CD
5	T4	2,75	D
6	T5	2,43	D

➤ Interaction F2*3 : Variétés-concentrations en NaCl :

Cette partie est particulièrement importante, compte tenu de l'interaction existante entre les deux facteurs. Elle permet également de délimiter le seuil de tolérance pour chaque variété. Selon le tableau 19, de T2 à T5, Spunta a été classée parmi les derniers groupes en comparaison avec Kondor. En faisant la lecture de ce tableau pour les deux variétés séparément, nous remarquons que les deux variétés présentent un seuil de tolérance situé à T 3.

Tableau 19 : Influence de la longueur des tiges en fonctions de la variété et la concentration (Test de Newman et Keuls).

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENNES
KON-T1	5,42	A
SP-T1	4,73	A
KON-T2	4,63	A
KON-T3	4,07	B
KON-T4	3,16	BC
SP-T2	2,67	C
KON-T5	2,54	C
SP-T3	2,33	CD
SP-T4	2,32	D
SP-T5	1,92	D

SP : Spunta ; Kon : Kondor ; T : concentration en NaCl

L'évaluation de l'indice de tolérance, résumée dans le tableau 20, permet d'identifier les individus potentiellement tolérants au stress. Les données obtenues en cette génération diffèrent de celles de la première génération. A T1 et T2, Spunta reste la plus significative face à la salinité. Ce n'est qu'à partir de T3 où Kondor se distingue, par son indice de tolérance étant supérieur à celui de Spunta. Cela dit, la fourchette de la concentration en sel chez Kondor est plus large, donc plus tolérante. Ce fait revient à la vigueur végétative, qui est un caractère variétal déterminant.

Tableau 20 : Evaluation de l'indice de tolérance au stress salin des vitroplants de la deuxième génération des deux variétés.

Doses en NaCl	SPUNTA	KONDOR
T1	2,63	1,83
T2	2,55	1,62
T3	1,27	1,59
T4	1,25	1,36
T5	0,60	0,81

Les vitroplants tolérants de T1 à T5 viables ont été repiqués afin de passer à la phase de tubérisation.

2.2.2. Effet de la salinité sur la rhizogenèse

L'étude de la phase d'enracinement des vitroplants en conditions saline, participe à l'évaluation du seuil de tolérance au stress salin induit par le NaCl. La figure 40 résume les moyennes des racines induites après 32 jours de croissance en milieux de culture de T0 à T5.

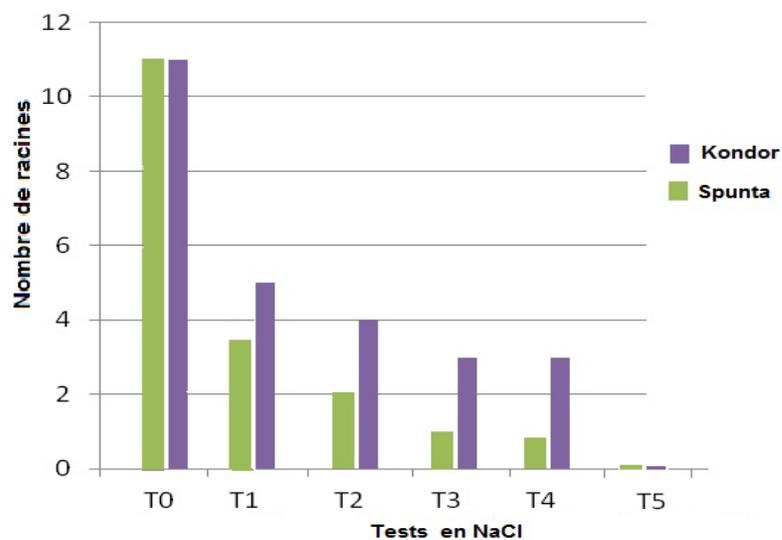


Figure 40 : Rhizogenèse des vitroplants de Spunta et Kondor en deuxième génération après 32 jours de croissance en milieu salin de T0 à T5.

Les vitroplants tolérants ont présenté une rhizogenèse moins importante que celle de la première génération. Toutefois, en cette phase, les deux variétés restent identiquement comparables en conditions non salines.

En cette phase d'étude, Kondor reste de loin la plus tolérante en condition saline. De T0 à T1, le taux d'enracinement a diminué de moitié, pour se réduire progressivement et s'annuler à T5. De ce fait, T5 est considéré comme concentration d'inhibition rhizogène. En T3 et T4, la rhizogenèse très réduite, reste invariable chez les deux variétés.

2.2.3. Effet de la salinité sur la chlorose des vitroplants

Pour ce facteur, les mêmes observations ont été effectuées pour les individus de la deuxième génération (figure 41).



Figure 41 : Chlorose de vitroplants de Kondor en milieu T2.

A T1, la chlorose touche 33 % de Spunta et 30 % de Kondor. Ce phénomène physiologique a atteint 50 % d'individus de Spunta à T3, et 60 % d'individus de Kondor à partir de T2 (figure 42). Les observations ont révélé que Kondor est révélée très sujette à la chlorose par rapport à Spunta. A T4, le taux de chlorose a atteint 53 % chez Spunta et 80 % chez Kondor. Cependant, T5 a favorisé la chlorose à 96 % chez Spunta et 85 % chez Kondor.

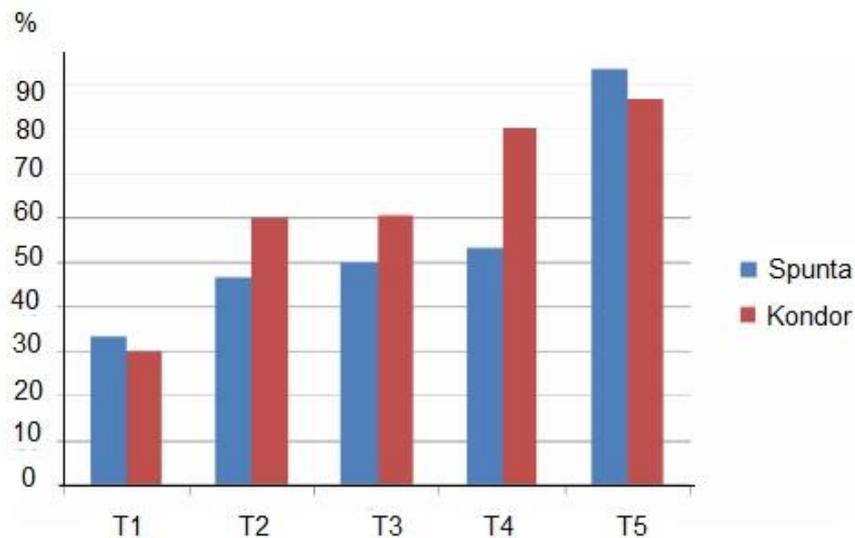


Figure 42 : Evaluation de la chlorose de vitroplants en milieu salin.

Les vitroplants non porteurs de chlorose ont été sélectionnés pour la phase de tubérisation.

3. MICROTUBERISATION DES GENOTYPES TOLERANTS

3.1. Taux de tubérisation

3.1.1 Utilisation du milieu MS2S

Dans ce milieu, la microtubérisation a été peu importante, et à raison d'un tubercule par vitroplant au maximum. L'initiation de la tubérisation s'est établie après 60 jours de la mise en culture. La phase de sénescence a été observée après 120 jours de croissance, soit 30 jours de plus que les témoins.

Sachant que le nombre de tubercule est équivalant au nombre de vitroplants tubérisés, le taux de la microtubérisation, résumé dans le tableau 21, présente le pourcentage de vitroplants tubérisés par rapport au nombre total de vitroplants mis en étude. Dans ce milieu de culture, la tubérisation la plus élevée a été de : 20 % à T1 chez Spunta, et de 48 % à T2 chez Kondor (figure 43). Les variétés se rejoignent à T3 en un taux identique de 12 %. Néanmoins, nous retrouvons Spunta en T4 avec un taux de 12 %, alors que Kondor ne tubérise pas.

Tableau 21 : Taux de microtubérisation chez les vitroplants tolérants de Spunta et Kondor.

Doses en NaCl	Spunta	Kondor
T1	20 %	24 %
T2	15 %	48 %
T3	<u>12 %</u>	<u>12 %</u>
T4	12 %	00 %



Figure 43 : Microtubercules de Kondor à T2.

3.1.2. Utilisation du milieu MS4'

Ce milieu a été destiné uniquement pour tester la concentration T4, concentration limite de la croissance de vitroplants. L'objectif était d'inciter la microtubérisation en conditions de croissance minimale. Contre toute attente, la microtubérisation a été initiée 20 jours après la mise en culture, chez les deux variétés. Les résultats étaient similaires, avec 32 % de microtubérisation de Spunta et de 36 % de Kondor (figure 44).



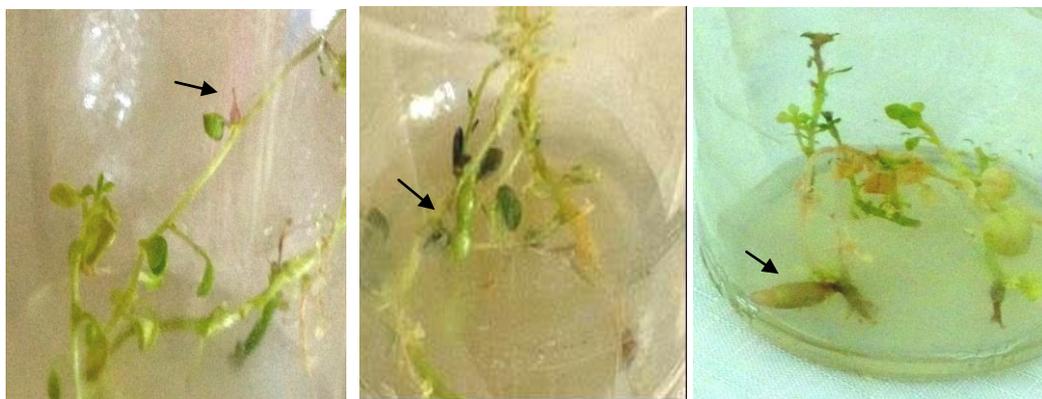
Kondor

Spunta

Figure 44 : Microtubérisation des vitroplants à T4 en milieu MS4'.

3.2. Calibre des microtubercules tolérants

La forme des microtubercules était identique pour les deux milieux testés. Généralement, la tubérisation débute par la formation d'une petite vésicule, qui en s'allongeant, va se déformer pour grandir d'avantage et former un microtubercule de forme oblongue ou ronde (figure 45).



Vésicule à 65jours

déformation à 74 jours

microtubercules à 82 jours

Figure 45 : Déroulement progressif de la microtubérisation, cas de Kondor à T3 en milieu MS2S.

En MS2S, les calibres des microtubercules obtenus étaient très variables. Là encore, Kondor s'est démarquée, en formant 70 % de microtubercules de calibre C3 en milieu T3 (tableau 22). C'est également la seule variété qui a présenté le calibre C4 en T2. Spunta était plus productive en T4 au calibre C1, et en T3 avec 66 % en C2.

Tableau 22 : Calibrage des microtubercules de Spunta et Kondor en milieu salin.

Doses Calibre	Kondor (%)				Spunta (%)			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
C 1	0	16	0	0	20	0	0	100
C 2	34	34	30	0	40	0	66	0
C 3	66	41	<u>70</u>	0	40	0	<u>34</u>	0
C 4	0	9	0	0	0	0	0	0

Le milieu MS4 a favorisé une microtubérisation en T4 chez les deux variétés, à raison d'un tubercule par plant. La variété Kondor a permis la formation de 50 % de microtubercules en calibre C3 et, de 10 % du calibre C4 (tableau 23). Spunta reste encore la moins productive, avec 12 % pour C3 et 0 % pour C4. Néanmoins, chez cette même variété, le calibre C1 domine à 50 %.

Tableau 23 : Microtubercules récoltés selon le calibre en milieu MS4'.

Calibrage	Kondor (%)	Spunta (%)
C 1	20	50
C 2	20	38
C 3	50	12
C 4	10	0

• DISCUSSION

Le stress salin est un des facteurs limitants à la production de plants de pommes de terre. Les terres fertiles ont tendance à se saliniser, suite aux apports répétés d'engrais, conjugués à la déficience des irrigations, permettant le lessivage des sels. L'irrigation des cultures par les eaux saumâtres accentue la salinisation des terres. L'induction de variants

somaclonaux tolérants au stress salin permet de surmonter cet inconvénient. C'est le principal objectif de notre étude, dans laquelle nous avons traité différents points.

A. PREMIERE ETAPE

Une bonne micropropagation réussie se manifeste par un bon développement caulinaire et racinaire des vitroplants. Dans la première partie de cette étude, la culture *in vitro* a été optimisée en testant trois milieux de culture (MS, MS1 et MS2). Le milieu nutritif doit répondre aux demandes nutritives de la plante soumise à l'étude. Généralement, le milieu MS est utilisé comme milieu de base de différentes études ; tel que cela a été le cas pour

- mesurer l'effet de Thidiazuron (TDZ) sur la micropropagation *in vitro* des variétés Désirée et Cardinal par Sajid et Aftab (2009) ; l'ajout de cet hormone de croissance au milieu MS n'a amélioré la croissance caulinaire que d'une moyenne de 0,1 cm.

- La Régénération *in vitro* et la caractérisation physiologique de variants somaclonaux de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) tolérants aux basses températures par Bettaieb *et al.* (2008) ; où il y a addition de 2.4-D pour initier la callogenèse et de la BAP, pour induire l'organogenèse.

La modification de la composition de ces milieux a fait que, la reprise des explants et leur croissance était relativement considérable. C'est le cas des vitamines de Morel et Wetmore en milieu MS1, ayant incité une croissance caulinaire plus importante par rapport au milieu MS. MS1 a été proposé par Haïcour (2002) comme milieu de micropropagation pour les herbacées. Cela a été appliqué également pour la micropropagation de *Sorbus torminalis* L. par Battut *et al.* (1993). Les chercheurs Zrýd *et al.* (1988) expliquent que l'addition en milieu de culture de vitamines tels que la biotine, la choline, l'acide folique, l'acide pantoténique et la riboflavine est peu bénéfique à la croissance de la plante. Dans notre étude, cet apport en biotine, Thiamine (B1), Pyridoxine HCL (B6), Acide nicotinique, Glycine et Myo-inositol est très bénéfique pour la croissance des vitroplants de pomme de terre. Cela s'est exprimé par une précocité en émergence des boutures de deux jours, de 25 % d'augmentation chez Spunta et de 17 % chez Kondor. Les sucres remplissent deux fonctions principales dans les milieux de culture : une source d'énergie et du maintien du

potentiel osmotique. Si les besoins en sucre sont généralement satisfaits par l'apport de saccharose à 2-3 %, une partie de ce saccharose peut être remplacé par du mannitol (Zrýd *et al.*, 1988) ; ou par du fructose pour le milieu MS2. Cette jonction en milieu MS2 a favorisé une croissance de tiges plus vigoureuses chez les deux variétés, avec un feuillage assez développé, un enracinement plus considérable et une croissance caulinaire plus importante. Le sucre additionné dans le milieu est d'un rôle important, car il fournit à la plante du glucose et du fructose qui entrent dans la constitution des parois cellulaires mais qui sont également les composés initiaux de la glycolyse (Peters, 1986). Toutefois, la variété Spunta reste la plus déterminante en croissance caulinaire et racinaire en milieu MS. Mais, pour les milieux MS1 et MS2, des différences non négligeables ont été enregistrées entre Spunta et Kondor, dont nous citons :

- Une hausse de 5% de vitroplants chez Spunta par rapport à Kondor en nombre de nœud de 6 à 7 et de 8 à 9 ;
- Pour le taux de feuillage, Kondor a dépassé Spunta de 2% de vitroplants ;
- En milieu MS2, le taux d'enracinement chez Spunta s'est mieux exprimé, dépassant Kondor de 8 %.

Cette différence a été, également, enregistrée par Kechid (2005), en signalant que Spunta tolère mieux les variations de la photopériode par rapport à Kondor. L'application de la micropropagation à grande échelle, nécessite l'utilisation d'un milieu de culture peu coûteux, d'où la nécessité d'utiliser un milieu sans hormones de croissance. Ces derniers, présentent la capacité de stimuler le vitroplant, et de faire un gain de temps de croissance. Néanmoins, économiquement, les milieux dotés de ces substances sont assez onéreux. Par exemple, si nous calculons le prix de revient des milieux testés par vitroplant, nous obtenons environ : 25 DA pour le milieu MS ; 26,5 DA pour le milieu MS1 et 26,51 DA pour le milieu MS2. A priori, le milieu le plus efficace, qui est le MS2, est le plus coûteux, mais en parallèle, une hausse en production de vitroplants de 33 % pour Spunta et de 19 % pour Kondor.

Ces vitroplants obtenus ont servi à la culture méristématique des deux variétés. Les méristèmes qui sont des tissus de formation, en expansion continue, confèrent à la plante une organogenèse permanente chez les végétaux supérieurs. Ils représentent des petits

massifs de cellules indifférenciées (0,1 mm) et conservent la capacité de se diviser activement. Ces zones méristématiques gardent jusqu'à leur mort le caractère juvénile. Elles jouent un rôle capital dans le développement végétal puisqu'elles édifient tous les organes (Margara, 1989).

Suite à des tests préliminaires, le développement caulinaire s'est basé sur le test de deux milieux de culture, tout en utilisant les régulateurs de croissance GA3 et ANA. Le milieu MS est très concentré, ce qui explique qu'il soit souvent utilisé dilué (Zrýd *et al.*, 1988). De ce fait, les méristèmes prélevés ont été placés en milieu MA, milieu MS semi concentré pendant 4 jours au maximum. Cela a été établi afin de permettre aux blessures des méristèmes de se cicatrifier et de limiter les nécroses. L'absence des régulateurs de croissance en milieux de culture, induit une absence totale de la régénération des méristèmes (Gallard, 2008).

En outre, l'utilisation de la GA3 à 0,1 mg.L⁻¹ a favorisé une caulogénèse assez importante chez les deux variétés, avec une inclinaison plus déterminée chez la variété Kondor. Ce milieu n'a favorisé aucune formation callogène, contrairement au milieu MC auquel plus de 19 % du matériel végétal s'est transformé en cal. Cette observation met en évidence l'existence d'interactions entre les régulateurs de croissance sur la multiplication et la dédifférenciation cellulaire. C'est surtout l'interaction entre la GA3 et l'ANA qui influence la production de cal et le taux de nécroses enregistré. D'autres combinaisons hormonales ont été utilisées pour entamer la croissance caulinaire des méristèmes de pomme de terre, telle que la combinaison de l'ANA (0,1 mg.L⁻¹) avec la Kinétine (de 0,01 mg.L⁻¹ à 1 mg.L⁻¹) testées par Badoni et Chauhan (2009). Les résultats obtenus sont peu encourageant, puisqu'après 45 jours de culture, les vitroplants n'ont présenté que 02 nœuds.

L'induction et la croissance rhizogène a été influencée en repiquant les vitroplants en milieux riches en GA3. Cette substance de croissance a la particularité de stimuler la croissance par élongation cellulaire (Vidalis *et al.*, 1989). L'augmentation de sa concentration à 0,5 mg.L⁻¹ a favorisé un meilleur développement racinaire que celle observée à la concentration de 0,2 mg.L⁻¹. Il est à remarquer que le facteur variétal a un impact direct sur la croissance organogène des vitroplants. Les chercheurs Bommineni et

Jauhar (2003) révèlent que l'établissement du phénotype morphologique du végétal dépend à la fois du génotype et de l'environnement. Les facteurs internes, notamment les diverses hormones végétales, auxine, cytokinines, gibbérellines, etc, résultent de l'expression du génotype. Cela explique la différence de croissance enregistrée entre Kondor et Spunta durant l'étude.

Les vitroplants obtenus et micropropagés ont fait l'objet de l'étude de la microtubérisation. Les microtubercules de pommes de terre (*S. tuberosum* L.) produits *in vitro* sont actuellement utilisés dans de nombreux secteurs de l'agriculture comme matériel pour la recherche (Coleman *et al.* 2001). En pratique, les gros calibres sont préférés parce qu'ils sont faciles à manipuler et qu'ils produisent des plantes vigoureuses. Ils sont en outre moins sujets au dessèchement en conservation, et ont une période de dormance courte et un taux de survie élevé lors d'un transfert direct dans le sol (Leclerc *et al.*, 1994). A ce niveau d'étude, l'objectif était d'examiner l'action du milieu de culture sur la microtubérisation : autrement dit, l'amélioration de leur qualité en termes de poids et de taille, pour optimiser leur utilisation en conditions de culture de plein champ. Différentes procédures de production des microtubercules ont été pratiquées par différents chercheurs. Nous citons en exemple :

- Lê et Thomas (2010) pour la variété Bintje, avec la modification de la composition du milieu de culture à chaque phase d'application (croissance des vitroplants, initiation des microtubercules, augmentation du volume de ces microtubercules), tous en réduisant de moitié la dose des macroéléments ;
- Mani *et al.* (2012) pour la variété Spunta, où le milieu de base a été le MS semi concentré, additionné à $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ d'AIB.

L'objectif de cette étape est de déterminer le milieu de culture induisant des microtubercules viables, conservables et peu coûteux lors de son application à grande échelle.

L'utilisation des hormones de croissance, telle que la BAP favorise une tubérisation rapide des vitroplants, avec des calibres allant de 1 à 5 mm de diamètre. Cela concorde avec les résultats de Sidikou *et al.* (2003). Mais ce type de milieu n'incite pas son application, vue leur dessèchement total lors de la conservation. De ce fait, pour une

production de microtubercules viables, il est à éviter d'utiliser les hormones de croissance telle que la BAP en milieu de culture.

L'utilisation du milieu MS4 sans hormone de croissance, et à 80 g.l⁻¹ de saccharose a favorisé la formation de microtubercules chez Spunta et Kondor à de tailles variables, dont le cycle de production a été à 90 jours. Cette concentration en saccharose a été également approuvée par Lê et Thomas (2010) et Mani *et al.* (2012). Contrairement à ces auteurs, un seul milieu de culture a été gardé pour toutes les phases de production, sans modification de la photopériode. Le temps de la récolte était beaucoup plus court par rapport à 176 jours pour Lê et Thomas (2010).

La bonne conservation de ces microtubercules est en liaison directe avec le calibre. Plus ce dernier est petit, plus la conservation prolongée entraîne la déshydratation du tubercule. Suivant les résultats enregistrés, le tubercule doit avoir au minimum un diamètre de 4 mm pour une bonne conservation à la température de 4°C, et une germination favorable. Economiquement, le milieu MS4 est peu coûteux du moment qu'un vitroplant nous revient à 26,76 DA.

La variation somaclonale est l'une des techniques appliquée pour l'amélioration variétale chez la pomme de terre. C'est l'un des moyens qui permet l'obtention de plants tolérant à un stress abiotique en passant par la callogénèse des cellules. Celle-ci constitue, en effet, des sources de variabilités originales qui se sont avérées efficaces pour la sélection de nouveaux caractères (Sibi, 1995). L'induction organogène des cals permet d'obtenir un nombre élevé de variants, parfois plus tolérants aux stress, en un temps restreint. Selon Özgen *et al.* (1996), ce type de régénération permet également une augmentation de la variabilité génétique de l'espèce. Toutefois, la réponse organogène des cals dépend du milieu de culture, de l'explant (génotype) et des conditions de culture comme la température d'incubation.

L'induction de cals organogènes chez *S.tuberosum* est souvent reproduite par l'utilisation de la phytohormone 2.4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) sous des températures d'incubations variables. A cet effet, différentes inductions callogènes ont été réalisées sur *S.tuberosum*, tels que par De Garcia *et al.* (1995) sur les tiges, avec des concentrations variables de 2.4-D (0,5 ; 2 et 4 mg.L⁻¹) à 23 ±1°C ; Ochatt *et al.* (1999) sur les

feuilles à une température de $24 \pm 1^\circ\text{C}$; Seabrook *et al.* (2001) sur les tissus foliaires et caulinaires à $19 \pm 1^\circ\text{C}$; et finalement, Vargas *et al.* (2005) sur les tiges avec 4 mg.L^{-1} de 2.4-D à $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Chez d'autres espèces nous retrouvons Koutoua *et al.* (2012), qui ont travaillé sur les embryons de blé en utilisant $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2.4-D sous une incubation de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durant quatre semaines ; et Messaï *et al.* (2006) qui ont utilisé les tissus foliaires et caulinaires de la tomate à la température de 24°C . Dans cette recherche, l'action de la température d'incubation a été prise en considération pour déterminer les caractéristiques callogènes des explants (tiges et feuilles) chez les deux variétés Spunta et Kondor. L'organogenèse somatique de ces cals a été induite en modification la concentration du 2.4-D. Les critères discriminatoires obtenus doivent permettre une hiérarchisation des applications en callogenèse chez la pomme de terre.

Les résultats obtenus dans ce contexte indiquent que l'organogenèse somatique des cals de *S.tuberosum* dépendent fortement de l'interaction entre les hormones de croissances (endogènes et exogènes) et, des facteurs d'incubation des cals. Cela est en concordance avec les résultats des chercheurs : Seabrook et Douglass (2001), Sharma et Millam S (2004), et Vargas *et al.* (2005). En callogenèse, l'influence de la température d'incubation se répercute sur la texture du cal, donc sur la nature du cal.

L'analyse statistique de l'induction organogène des cals, associée à la texture de ces cals montrent que la température d'incubation T2 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) est la plus adaptée. Elle permet d'induire un cal dit organogène selon Messaï *et al.* (2006) : compact, globulaire et chlorophyllien. Cette température a été utilisée par Vargas *et al.* (2005), pour la variété Désirée. L'explant tige a été étudié par De Garcia et Martinez (1995), ainsi que Seabrook et Douglass (2001) en utilisant une température de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, mais avec une incubation plus longue.

Le test ACP a révélé que la température T3 ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) comme étant la moins propice à l'incubation chez les deux variétés. Par contre, la température T1 ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) incite la prolifération d'un cal lisse, blanchâtre et d'une texture friable. Ces résultats concordent avec les travaux de Saidi *et al.* (2009) effectués sur l'espèce *Aristolochia longa* L.

Litz et Gray (1995) expliquent que les Solanacées, présentent généralement un potentiel récalcitrant pour l'embryogenèse somatique. Les résultats obtenus dans notre

étude, suite à la compatibilité avec les travaux de Tican *et al.* (2008), la néoformation embryonnaire des cals était fortement liée au génotype de l'espèce, à la concentration hormonale en 2.4-D et à la température d'incubation.

La capacité organogène et embryogène sur les cals varie en fonction de la nature et/ou de la concentration des phytohormones utilisées. La réussite d'une application expérimentale dépend en grande partie sur le respect total des facteurs de la culture, notamment : la photopériode, la température et l'intensité lumineuse utilisée (Ghomari *et al.*, 2013). L'utilisation de l'hormone 2.4-D, par Sharma *et al.* (2008), à une concentration de 5 mg.L⁻¹ a favorisé l'induction des embryons somatiques à partir d'entre-nœuds pour la variété Désirée en quinze jours. Cette concentration de 2.4-D utilisée est assez élevée par rapport à la concentration choisie dans notre étude. L'addition de l'auxine BAP a incité la néoformation embryonnaire en un temps plus long. Cette association fait penser à un effet synergique ou complémentaire des auxines et des cytokinines sur la callogenèse, l'organogenèse et l'embryogenèse, en particulier chez ces deux variétés. Les cals foliaire de la variété Spunta ont nécessité une concentration élevée en 2.4-D (sur milieux MSC3 et MSC4) pour une néoformation embryonnaire. Les milieux MSC1 et MSC2 se sont révélés les plus appropriés à cette néoformation sur cals foliaires pour le cas de la variété Kondor.

L'étude des résultats en milieux de culture par ACP montre que la néoformation méristématique est similaire en milieu MSC chez les deux variétés. Toutefois, les cals caulinaires de la variété Kondor ont présenté tous une induction méristématique sur tous les milieux testés. Le choix de l'explant dans l'induction de cals organogène est déterminant (Ghomari *et al.*, 2013). La tige est l'organe le plus utilisé dans les recherches *in vitro*. Sa capacité de régénérer les méristèmes caulinaire lui donne la capacité d'induire des cals plus organogènes mieux que la feuille.

De ce fait, la variété Kondor s'est révélée plus organogène que la variété Spunta, et l'explant tige est plus expressif que l'explant feuille.

B. DEUXIEME ETAPE

Dans cette seconde phase, les résultats obtenus chez les deux variétés, avaient montré une très faible sensibilité au stress salin pour les tests T1, T2 et T3. Toutefois, l'application de l'ACP des poids des cals avait indiqué une large tolérance pour les concentrations de

NaCl allant de 4 g.l^{-1} à 7 g.l^{-1} . Au-delà de ces concentrations, une forte sensibilité au stress a été manifestée par :

- La régression de la croissance des cals ;
- La friabilité de ces cals ;
- Le virement de la couleur en blanc ou brunissement total.

Ces interactions ont été confirmées par Levigneron *et al.* (1995), expliquant que chez plusieurs espèces végétales, les dégâts produits par le stress salin se manifestent communément par une séquence de changements morphologiques et physiologiques. Les fortes concentrations salines entraînent un déséquilibre ionique cellulaire et, une toxicité chez les végétaux ; ce qui peut affecter certains processus métaboliques vitaux (Benmahioul *et al.*, 2009), tel que de la réduction de la croissance, et la nécrose des cals sensibles.

Il est connu que, *in vivo*, la variété Spunta présente une tolérance au stress salin assez élevé par rapport à la variété Kondor. Le calcul de l'indice de tolérance au stress de ces deux variétés *in vitro*, avait révélé que les cals de Kondor, bien que moins développés, était plus tolérante. Egalement, les cals d'origine caulinaire des deux variétés étaient plus tolérantes que les cals foliaires. Messaï *et al.* (2006) décrit qu'à l'état normal, ces cals foliaires sont plus riches que des cals caulinaires en K^+ et que, la présence de NaCl dans le milieu de culture, fait baisser les teneurs en K^+ des deux types de cals, surtout à la concentration 6 g.L^{-1} . Ils expliquent également que les teneurs en Ca^{2+} des cals foliaires sont plus élevées que celles des cals caulinaires. De ce fait, nous pouvons dire que les cals foliaires devraient présenter des difficultés pour régulariser la pression osmotique cellulaire, ce qui favorise une sensibilité plus importante.

A ce niveau, la détermination du seuil de tolérance des cals chez les deux variétés a été assez laborieuse. Un repiquage des cals tolérants dans les milieux présentant les concentrations de 4 g.L^{-1} à 7 mg.L^{-1} avait permis de délimiter le seuil de tolérance entre T4 et T5.

L'étude histologiques des tissus de cals montre qu'au niveau de la taille cellulaire, aucune différence n'a été observée entre cals témoins caulinaires et foliaires. Seule la

présence de chloroplastes en un nombre important a été enregistrée dans les cellules callogènes foliaires. L'application du stress salin à des concentrations au-dessus de 5 g.L⁻¹ s'est exprimée par la plasmolyse du cytoplasme de la cellule. Cela veut dire qu'à ce niveau, la cellule n'arrive plus à contrôler sa pression osmotique. L'étude minérale des cals de tomates exposés au stress salin, établie par Messaï *et al.* (2006), démontre que les cals caulinaires et foliaires sont riches en K⁺ et en Ca²⁺. Mais leur exposition à 6 g.L⁻¹ de NaCl a entraîné une substitution considérable de ces éléments par les ions Na⁺ et Cl⁻. Ce qui a entamé un déséquilibre ionique du cytoplasme et par conséquent, un abaissement du potentiel osmotique. L'ajustement osmotique joue un rôle primordial dans la résistance ou la tolérance de la plante à la contrainte (Munns, 2002). En effet, la tolérance, dans le cas d'un abaissement du potentiel hydrique, s'exprime par un maintien de la turgescence (Garg *et al.*, 2002; Moinuddin *et al.*, 2005) grâce au phénomène d'ajustement osmotique (Hassani *et al.*, 2008).

Les observations microscopiques, après 25 jours de la mise en culture, ont révélé la présence chez les témoins de nombreux amas méristématiques, de forme globulaire avec au centre une présence timide des trachéides. Chez les angiospermes, ces trachéides sont appelés éléments de vaisseaux et sont perforés à chaque extrémité pour former une colonne creuse continue formant le xylème primaire. Leur rôle principal en milieu favorable est de conduire la sève brute (Ye, 2002). Dans notre étude, ces trachéides étaient de plus en plus fréquentes en augmentant la concentration du NaCl. La présence de fortes concentrations de sels dans le milieu crée une pression osmotique élevée dans l'environnement, réduisant la disponibilité de l'eau. A ce déficit hydrique s'associe un stress ionique dont l'ampleur dépend de la perméabilité des membranes végétales vis-à-vis des ions, et du niveau de toxicité de ces ions pour l'espèce végétale considérée (Hamza, 1980). Le maintien des processus vitaux dans ces conditions de forte salinité passe donc par une résistance de la plante à la déshydratation, par une adaptation de son potentiel osmotique afin d'assurer une alimentation en eau convenable.

Certaines espèces peuvent développer plusieurs mécanismes pour assurer leur cycle de croissance et de développement. Elles utilisent le mécanisme d'exclusion des sels en excès (Zid et Grignon, 1991; Alem et Amri, 2005) ou les compartimentent dans la vacuole

(Niu *et al.*, 1995). Selon Wakamiya *et al.* (1996), les caractéristiques adaptatives des plantes et en particulier à leur habitat (précipitation, température et salinité) se traduisent à l'échelle cellulaire par la formation des trachéides pour atténuer l'effet de toxicité dans les milieux hautement concentrés.

Selon les observations effectuées, la formation de trachéides au niveau des cals exposés à de fortes concentrations, ne présente aucun lien avec l'organogenèse ; mais un moyen de combattre le stress salin. Ces trachéides permettent au tissu callogène d'exclure les sels toxiques en excès, vers le milieu externe. Cela explique la forme centrifuge des canaux de trachéides, orienté du centre du cal vers le milieu externe.

Les cals tolérants sélectionnés ont été repiqués en milieu de culture inducteur d'organogenèse somatique. Cette induction organogène de ces cals tolérants avait été plus favorable chez les cals caulinaires que chez les cals foliaires. Hannachi (1997) affirme que chez la pomme de terre, les segments d'entre-nœuds présentent une meilleure capacité de régénération sur milieu salin que les fragments de feuilles. L'augmentation des concentrations en NaCl avait exercé un effet réducteur, voire même inhibiteur de la régénération ; en effet, à 5 g.L^{-1} , l'organogenèse a été fortement affectée par l'avortement des bourgeons, ainsi que la formation de pousses dont la croissance est réduite.

Le nombre de repiquage des cals tolérants avait fortement influencé l'induction méristématique. Ce n'est qu'à partir de la troisième génération où la régénération avait débuté, pour être plus favorable à la quatrième génération. Cela pourrait être expliqué par la capacité d'adaptation des cellules au milieu salin, permettant par la suite, leur organogenèse. El Yacoubi et Rochdi (2011) expliquent que la tolérance des cals est liée à la capacité de régulation et de séparation ionique, puisque la captivité vacuolaire des ions salins est contrebalancée dans leur étude par une synthèse et l'accumulation de solutés organiques (proline et sucres solubles). Cela a permis par la suite, l'ajustement osmotique entre le compartiment vacuolaire et le cytosol des cellules des cals tolérants.

L'utilisation du milieu de culture MSE a été très favorable pour la croissance caulinaire des méristèmes tolérants. A ce niveau, la présence du NaCl influence considérablement l'émergence et la prolifération racinaire. La variété Kondor avait présenté plus d'aptitude à l'adaptation au stress salin que la variété Spunta. Le repiquage des vitroplants tolérants à

T4 dans le milieu d'enracinement avait favorisé une émergence racinaire remarquable chez les deux variétés par rapport à T5.

Pour évaluer l'optimum de tolérance au stress salin *in vitro*, il ne suffit pas d'aboutir à une bonne callogenèse, ou à une induction méristématique en un milieu salin ; mais atteindre une bonne productivité de variants tolérants bien développés. De ce fait, la concentration T4 a été considérée comme l'optimum de tolérance obtenu *in vitro* chez les variants de *S.tuberosum*. C'est une valeur supérieure au résultat obtenu par Hannachi *et al.* (2004) pour la variété Claustar.

En agriculture, la diversité génétique est exploitée pour créer des variétés adaptées à différents environnements et conditions de croissance. L'aptitude de telle ou telle variété à résister au stress abiotique, à se développer et à fournir des produits de meilleures qualités gustatives, est un caractère transmis par les gènes (Lazrek-ben friha, 2008). Ces ressources génétiques sont la matière première qu'emploient les sélectionneurs de plantes et les spécialistes de la biotechnologie pour produire de nouvelles variétés. Sans cette diversité, il ne peut y avoir une évolution constante des cultures adaptées aux besoins et aux changements écologiques et culturelles.

Dans la nature, l'évolution résulte des pressions de sélection qui s'exercent sur des populations polymorphes. De même, la création variétale suppose l'existence d'une diversité parmi les plantes cultivées et l'application de pressions sélectives par l'homme (Bouharmont, 2002). En ce contexte, une autre méthode a été explorée pour obtenir des individus tolérants à la présence du NaCl. Cette méthode consiste à exposer les vitroplants aux concentrations de NaCl et, d'effectuer la sélection de génotypes présentant un seuil de tolérance élevé ; suivi d'une descendance des plants sélectionnés, afin de s'assurer stabilité du caractère retenu et de l'absence de variations épigénétiques non transmissibles par voie sexuée. Les mutations épigénétiques spontanées manifestées par les variétés, pour la résistance à la salinité, permet d'envisager la sélection *in vitro* de génotypes à des seuils de tolérance élevés face au stress salin (Ignasse, 2011).

Le suivi de la croissance de vitroplants des deux variétés Spunta et Kondor en milieu salin a révélé des différences relativement importantes en croissance caulinaire et racinaire. Les résultats obtenus dévoilent que la croissance caulinaire moyenne des

variétés est estimée à de 24 jours en présence de sel. La présence du sel a un effet considérable sur l'émergence des boutures. A partir de T5, le temps nécessaire pour l'émergence s'accroît de 2 jours en moyenne. Il est à signaler que T10 est une concentration létale à ce niveau.

L'étude de la première génération de vitroplants a révélé que la variété Spunta était d'une meilleure tolérance par rapport à Kondor, confirmant les résultats de Jarret *et al.* (1980) et de Lê *et al.* (1997); avec un seuil de tolérance délimité entre T5 et T6. Toutefois, la rhizogenèse de la variété Kondor en milieu salin était plus favorable que celle de Spunta. Cela incite à dire que la sensibilité des variétés au milieu salin *in vitro* peut se traduire par une faible croissance caulogène, mais pas forcément en rhizogenèse. Dans ce cas, le facteur variété est déterminant pour l'estimation de la tolérance, en concordance avec Khenifi *et al.* (2011). Les chercheurs Ghomari *et al.* (2013) expliquent que l'organogenèse est fortement liée au génotype.

L'analyse des données obtenus en deuxième génération des vitroplants tolérants montre que la concentration de 5 g.L^{-1} de NaCl est une dose létale pour les deux variétés, entraînant les vitroplants à une chlorose totale. Egalement, les vitroplants tolérants de Kondor repiqués avaient présenté une meilleure croissance que celle de Spunta. De ce fait, il est évident que Spunta ne supporte pas la présence permanente du milieu salin à travers les générations. En dépit du facteur variété, à l'échelle *in vitro* le seuil de tolérance de *S.tuberosum* est de 3 g.L^{-1} de NaCl. Ce seuil est évalué *in vivo* à $2 \text{ milli-siemens.cm}^{-1}$ par la FAO (2010), soit l'équivalent de 1,28 g de sel dissous par litre d'eau.

La microtubérisation des vitroplants tolérants se présente comme un autre facteur déterminant de la tolérance. Afin d'initier cette étape, deux milieux de culture ont été testés : MS2S et le MS4'. En milieu MS2S, la période de récolte des microtubercules étaient retardée de 30 jours par rapport au témoin. A la concentration T3, la tubérisation était maximale chez Kondor et Spunta. Toutefois, Kondor considéré la plus tolérante c'est révélée peu favorable à la tubérisation en concentration sub-létale (T4).

La sélection des individus présentant une bonne croissance en T4, et leur repiquage en milieu MS4' plus riche en sucre et en ANA, a induit une tubérisation très rapprochée à celle des témoins. Kondor reste encore la plus dominante en cette phase. Toutefois, la

différence s'est révélée lors de la formation des microtubercules. En milieu salin ces microtubercules subissent en totalité une déformation physiologique, qui disparaît en évoluant en volume. A la sénescence, aucune différence visuelle n'a été détectée au niveau des microtubercules tolérants avec ceux des témoins.

Afin de mieux cerner tous ces résultats de la présente étude, nous pouvons dire que l'induction de variants par callogenèse reste une méthode longue et peu rentable. La probabilité d'aboutissement à un résultat positif est très infime. Il est préférable d'induire une mutagenèse en exposant de façon régulière des génotypes à des concentrations élevées de NaCl *in vitro*, et de sélectionner les génotypes présentant un seuil de tolérance éminent.

Conclusion

Conclusion générale

L'objectif de cette thèse est de fournir des solutions afin de mieux cerner l'amélioration variétale de la pomme de terre soumise aux conditions salines. Les résultats obtenus sont le fruit d'une démarche d'un programme de recherche fondamentale et appliquée, qui s'est intégré dans un projet PNR. Notre première attente dans ce travail était, de maîtriser les différentes étapes de micropropagation et la microtubérisation pour les variétés Spunta et Kondor. Par la suite, nous avons entamé l'induction de variants somaclonaux en milieu non salin, qui été soumis au stress salin. Par la suite, une autre méthode a été testée pour le même objectif, il s'agit de la sélection de génotypes *in vitro*, présentant une importante tolérance au stress salinité.

Les résultats obtenus peuvent être résumés comme suit :

- 1 - La culture méristématique, permettant d'assainir le matériel végétal, est lancée à partir de méristèmes de vitroplants sur milieu MB, qui est le milieu MS avec l'hormone de croissance GA3. La rhizogenèse est acceptée en repiquant les explants en milieu ME, milieu MS avec une concentration plus élevée en GA3 ;
- 2 - La micropropagation de *Solanum tuberosum* L., qui a fait l'objet de multiples études, a été à son optimum en utilisant le milieu MS2, milieu de Murashige et Skoog enrichi par les vitamines de Morel et Wetmore, et des apports variés en sucre. La production de microtubercules a été optimisée par l'utilisation de milieu de culture enrichi d'avantage en saccharose. Dans ce milieu, les tubercules produits ont des bonnes aptitudes de conservation et sont dotés d'un pouvoir germinatif précoce ;

3 - L'induction de variants somaclonaux par callogenèse étant une étape importante et nécessaire, pour cela nous avons respecté certaines applications de manière précises :

- ✓ L'étude de cette phase a permis de mettre en évidence l'effet de la température d'incubation et de l'hormone de croissance 2.4-D sur l'induction organogène des cals de *S.tuberosum*. La température d'incubation est un paramètre déterminant en callogenèse, elle influe sur la texture du cal résultant. Nous avons trouvé que la température optimale, qui est de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, favorise une meilleure expression organogène des cals (une texture compacte globulaire et chlorophyllienne). La variation de cette température entraîne soit l'allongement du temps de cette néoformation, soit la modification de la texture en devenant lisse, friable et blanchâtre ;
- ✓ Action synergique des deux hormones de croissance BAP et 2.4-D et, l'origine de l'explant (tige et feuille) déterminent le mode de néoformation organogène des cals. Les résultats obtenus après modification des différentes concentrations de 2.4-D, nous ont permis de constater que l'induction de méristèmes somatiques est plus expressive chez la variété Kondor que chez la variété Spunta. Donc la néoformation d'embryons somatiques est entièrement dépendante de la concentration hormonale 2.4-D et du génotype variétal ;
- ✓ Nous pouvons dire donc, que l'explant tige est plus favorable à l'organogénèse des cals. L'induction méristématique reste pour la pomme

de terre le mode de reproduction le plus active, avec un taux supérieur à 60 % pour Kondor et de 34 % pour Spunta ;

4 - L'induction de variants somaclonaux tolérants au stress salin est induite en exposant les cals induits au stress salin par NaCl, à des concentrations allant de 1 à 14 g.L⁻¹. Nous avons abouti aux résultats suivants :

- ✓ La présence du NaCl à partir de 8 g.L⁻¹ avait entraîné la friabilité et brunissement de ces cals. Les cals caulinaires avaient présenté un indice de tolérance plus important que les cals foliaires ;
- ✓ Le stress salin avait entravé la néoformation organogène des cals tolérants durant les deux premières générations, et a favorisé la présence de trachéides pour mieux éliminer les toxines. L'étude histologique des tissus en présence du sel, a permis de mettre en évidence la plasmolyse des cellules à partir de 6 g.L⁻¹ de NaCl, entraînant par la suite une réduction de la taille des cellules. Toutefois, il y a une adaptation au milieu salin à une concentration supérieure à 2 g.L⁻¹ ;
- ✓ Les bourgeons obtenus en troisième génération n'ont pas été d'une croissance favorable que par l'additionnement de m'urée et des hormones de croissance comme la GA3 et l'AN A dans le milieu de culture. Cette dernière hormone, intégrée à 18 g.L⁻¹, avait déclenché une rhizogenèse intense des variants de *S.tuberosum* tolérants à 4 g.L⁻¹ et 5 g.L⁻¹ de NaCl ;
- ✓ Les cals foliaires ont été moins tolérants et peu organogènes comparativement aux cals caulinaires. A l'échelle *in vitro*, la variété Kondor

possède des capacités d'adaptation au stress salin meilleure que celle de la variété Spunta. Les variants somaclonaux tolérants à 4 et à 5 g.L⁻¹ n'avaient présenté aucune tubérisation par la suite.

5 - La méthode de l'amélioration variétale par sélection de génotype est testée *in vitro* pour les deux variétés, sous la contrainte du stress salin (de 1 à 10 g.L⁻¹ de NaCl). L'exposition répétée à ce stress a incité quelques génotypes à mieux tolérer les fortes concentrations. Selon les données obtenues, les génotypes sont dit tolérants à condition de présenter une croissance végétative favorable au cours des générations. Les vitroplants en cours de stress permanent permet l'expression d'une adaptation, résultant d'une mutation génétique transmise aux générations futures. Les résultats ainsi obtenus dans ce cadre sont présentés comme suit :

- ✓ Le facteur variété est déterminant dans l'expression de la tolérance. La variété Kondor s'est révélée comme la plus tolérante *in vitro* par rapport à Spunta ;
- ✓ Les tests répétés confirment que le seuil de tolérance de *S.tuberosum* L. *in vitro* est de 3 g.L⁻¹ de NaCl. La concentration létale est estimée à 5 g.L⁻¹ ;
- ✓ L'objectif de cette présente étude est de pousser les génotypes à tubériser en conditions extrêmes de salinité. De ce fait, les génotypes ayants présentés une croissance favorables à 4 g.L⁻¹ ont été micropropagés et repiqués à nouveau dans des milieux de microtubérisation. Les résultats montrent que le milieu doit être riche en saccharose et en hormone de croissance ANA.

Un variants somaclonale est dit tolérants que s'il présente une croissance caulinaire et racinaire favorable, et qui est capable de tubériser en conditions de stress. Les deux méthodes testées pour induire les variants sont différentes l'une par rapport à l'autre. La méthode qui induit des variants en passant par des cals est complexe et très longue ; et l'objectif attendu à la fin de l'application est improbable. L'utilisation de la méthode de sélection de génotypes tolérants *in vitro* s'affiche en première position. C'est une technique peu couteuse et reste la plus économique en résultats. C'est une technique qui nécessite deux fois moins de temps que celle de la sélection de lignées cellulaires tolérantes, et qui peut rapporter un intérêt économique important.

Actuellement cette étude continue son parcours au niveau de l'INRAA de Sidi Bel Abbés. Elle rentre dans un programme de recherche destiné à la production de semences, notamment la semence de pomme de terre. Les objectifs visés englobent la micropropagation des variants tolérants à la concentration sub-létale et d'inciter leurs microtubérisation en milieu hydroponique.

Références bibliographiques

- Abbas A H. 2011, Production de semences de pomme de terre : L'Algérie produit 65% de ses besoins. Journal Horizons.
- AFBV-1. 2013. Association Française des Biotechnologie Végétales. La première ébauche de séquence du génome de la pomme de terre. <http://www.biotechnologies-vegetales.com/>.
- AFBV-2. 2013. Association Française des biotechnologie végétales. Bientôt une pomme de terre résistante au mildiou. <http://www.biotechnologies-vegetales.com/node/277>.
- Agnès B., Hélène R. et F. Louise. 2013. La culture *in vitro* en TPE. <http://culture-in-vitro-tpe.e-monsite.com/>.
- Akesbi N., Benatya D. et N. El Aoufi. 2007. Implications structurelles de la libéralisation sur l'agriculture et le développement rural ; *Conseil Général du Développement Agricole*, Banque Mondiale Institut Agronomique Coopération Française et Vétérinaire Hassan II Programme rural structure. Première phase : Synthèse nationale Maroc. *In* : Bessaoud O. 2011. Les politiques agricoles et rurales maghrébines face aux enjeux du futur. <http://www.maghrebemergent.com>
- Alem C. et A. Amri. 2005. Importance de la stabilité des membranes cellulaires dans la tolérance à la salinité chez l'orge. *Reviews in Biology and Biotechnology*, Vol. 4, No. 1 : 20- 31.
- Alvarez I., Tomaro L.M. et P.M. Bernavides. 2003. Changes in polyamines, proline and ethylene in sunflower calluses treated with NaCl. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 74, 51-59. *In* : Koutoua A., Hmouni D., Elyacoubi H., Hassikou R., Zidane L. et A. Rochdi. 2012. Sélection et évaluation *in vitro* de lignées de cals tolérants à la salinité chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). Science Lib Editions Mersenne : Volume 4, N ° 120708.
- Amroise A. 2002. Microtubérisation modèle : pomme de terre *Solanum tuberosum* L.. Biotechnologies végétales, techniques de laboratoire. Ed : TEC&DOC. Londres, Paris, New York. Pp : 66- 78.
- APG III. 2009. Classification of Flowering Plant Families. The table gives the classification of Plant Families according to APG III. <http://theseedsite.co.uk/class4.html>.
- Aquastat. 2005. Algérie : Rapport sur l'eau. www.fao.org/agl/aglw/docs/
- Asakavičiūtė R., Clement C. et A. Ražukas. 2007. Genetic aspect in anther culture of Lithuanian potato (*Solanum Tuberosum* L.) cultivars. *BIOLOGIJA*. 2007. Nr. 1. P. 19–22.

- Atef M. et K. Nassar. 2009. Use of Somatic Embryogenesis in Potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Russet Burbank Improvement. These de doctorat. Department of Plant Science, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.
- Aubert G. 1983 : Observation sur les caractéristiques, la dénomination et la classification des sols salés ou sals sodiques. Cash. ORSTOM.ser. ped. Vol xxx n°1, pp = 73-78.
- Bachacou J. 1973. L'effet Guttman dans l'analyse de données phytosociologiques. INRA (France). *In* : Morneau F. 2007. Effets d'un gradient d'engorgement sur la structure et la dynamique d'une forêt tropicale humide (paracou, guyane française). Thèse de doctorat. Guyane Française
- Badoni A. et J.S. Chauhan. 2009. Effect of Growth Regulators on Meristem-tip Development and *in vitro* Multiplication of Potato Cultivar 'Kufri Himalini' Nature and Science. 7(9):31-34.
- Battut A., Grenier E., G. De March. 1993. Micropropagation de *Sorbus torminalis* L. Rev. For. Fr. XLV – 3.
- Benavides P.M., Marconi L.P., Gallego M.S., Comba E.M. et L.M. Tomaro. 2000. Relationship between antioxidant defence systems and salt-tolerance in *Solanum tuberosum*. Aust. J. Plant Physiol., 27, 273-278. *In* : Koutoua A., Hmouni D., Elyacoubi H., Hassikou R., Zidane L. et A. Rochdi. 2012. Sélection et évaluation *in vitro* de lignées de cals tolérants à la salinité chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). Science Lib Editions Mersenne : Volume 4, N ° 120708.
- Benkhelifa M., Gorine M. et L. Kouri. 2012. Contribution au diagnostic de l'état de salinisation et sodisation des sols du périmètre irrigué de la Mina, Nord-Ouest de l'Algérie. Le sol face aux changements globaux 11èmes Journées d'Etude des Sols, 19-23 mars 2012, Versailles. pp : 42- 43.
- Benmahioul B., Daguin F., et M. Kaid-Harche. 2009. Effet du stress salin sur la germination et la croissance *in vitro* du pistachier (*Pistacia vera* L.). C. R. Biologies 332 : 752–758.
- Bensalem M. 1998, Techniques histologiques, théorie et pratique. Office des publications universitaires, Algérie, 17- 19.
- Bernhardes U. 1998. La pomme de terre *Solanum tuberosum* L., monographie institut national agronomique. Paris- Grignon.
- Bettaieb T., Denden M. et M. Mhamd. 2008. Régénération *in vitro* et caractérisation physiologique de variants somaclonaux de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) tolérants aux basses températures. TROPICULTURA. 26, 1, 10-16
- Bommineni U.R. et P.P. Jauhar. 2003. Regeneration of plant through isolated scirtelum

culture of durum. Wheat. Plant sci. p 116; 197.

- Bouchenafa N. et A. Dellal. 2012. Dégradation des sols de la région de l'ouest Algérien (Oranie). 11èmes Journées d'Etude des Sols, 19-23 mars 2012, Versailles. Actes du colloque : Le sol face aux changements globaux du 23 mars Versailles.
- Bouharmont J. 1991. Utilisation de la variation somaclonale et de la sélection *in vitro* à l'amélioration du riz. L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris, pp. 1-8.
- Bouharmont J. 2002. Partie IV : Bases agronomiques de la production végétale ; Chapitre 13 : Création variétale et amélioration des plantes. Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgique. 311- 338.
- Bouharmont J., 1986. Création variétale et amélioration des plantes ; partie iv : bases agronomiques de la production végétale. 312- 518.
- Boxus P. 1995 : multiplication végétative: micropropagation et embryogenèse somatique dans les biotechnologies Végétales. BV 93, Ed CNED.AUPELF-UREF 191p.
- Bretaudeau A. 2006. Les techniques de culture *in vitro* et la micropropagation des espèces végétales, IPR/Kolibougou Koulikoro B P 06.
- Calvet R. 2003 : Le sol, propriété et fonction, phénomènes physiques et chimiques. Tome 2. Ed. France. Agricole, 511 p.
- Caraglio Y. 2012. L'organogénèse. UMR Cirad/Inra de Modélisation des plantes (AMAP). Programme modélisation des plantes du Cirad-amis <http://amap.cirad.fr/architecture/organo/organo.html#introduction>
- Cedevit. 2013. La culture *in vitro*. <http://www2.ulg.ac.be/cedevit/french/Index-invito-fr.htm>
- CEVIE. 1997. Review on the many applications of plant tissue culture research centre d'étude des végétaux d'intérêt économique et écologique plant science : institut Belgique P : 17.
- Chapman *et al.*. 2007. J. Soil Sed. 7, 406–410. In : Bérard A., Dollinger J., Ben Sassi M., Tlili A. et P. Renault. 2012. La méthode « FungiResp », une application de la méthode MicroResp™ comme bioindicateur de la biomasse et de la diversité catabolique fongiques au sein des communautés microbiennes édaphiques. Le sol face aux changements globaux 11èmes Journées d'Etude des Sols, 19-23 mars 2012, Versailles. Pp : 38- 41. PP : 210-211.
- CIPT LIMA. 1987. Centre International de la Pomme de terre Lima. La pomme de terre. Bulletin d'information Technique. Pérou Edition.
- CNCC. 1995. Recueil des textes relatifs aux semences et plants. Publication du CNCC,

Ministère de l'Agriculture.

- CNCC. 2013. Centre National de Contrôle et de Certification des Semences. Bilan de la réunion de coordination. Algérie.
- CNIFPT. 2013. Conseil National Interprofessionnel de la Filière Pomme de Terre. http://www.minagri.dz/pdf/Divers/2013/Avril/CNIFPT_Fr_01_04_2013.pdf.
- Coleman W.K., Donnelly D.J. et S.E. Coleman. 2001. Potato microtubers as a research tools : A review. *Am. J. Potato Res.* 78, 47 – 55. *In*: Côm-Linh Lê et Daniel Thomas. 2010. Production de microtubercules de pomme de terre *in vitro*: effet de la durée de culture. *Recherche Agronomique Suisse* 1 (11–12): 404–409.
- Copyright. 2012. Risque de Salinité. <http://www.lenntech.fr/francais/irrigation/salinite-risque-irrigation.htm>
- Corringan G. et Trillion P. 2005. Catalogue des variétés de pomme de terre produites en France. Ed : Carousel, Paris (France). 312P.
- Dalvesco L.L et P.M. Guerra. 2001. The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic *embryogenesis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 64:19 – 25.
- Davoust P. 2009. Pierre Davoust, Éco socio systèmes. *In* : Wikipédia, 2013. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Salinisation#>
- De Garcia E. et S. Martinez. 1995. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* Ll. cv. Desiree from stem nodal sections. *J Plant Physiol* 145: 526–530.
- Dellaa A. 2013. La culture *in vitro*. <http://fr.slideshare.net/AhmedDellaa/culture-in-vitro-des-plantes>.
- Demol J., Baudoin J.P. et B.P. Louant. 2008. Amélioration des plantes : application aux principales espèces cultivées en régions tropicales, Ed presse agronomique de Gembloux, la Belgique, p 581.
- Denden M., Bettaieb T., Salhi A. et M. Mathlouthi. 2005. Effect of Chloride Sodium on Chlorophyll Fluorescence, Plant Proline Content and flowers production of three ornamental species. *Tropicultura*, 23 (4) : 220-225. *In*: Lepengue A.N., Mouaragadja I., AKE S. et B. M'batchi. 2012. Quelques aspects biochimiques de la réaction de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. Sabdariffa) au stress salin. *Journal of Applied Biosciences*, 49 : 3452– 3458.
- Doctrinal M. 2013. Plantes *in vitro* : les techniques de culture *in vitro*. <http://technivit.pagesperso-orange.fr/techniques.htm>
- Dodeman V.L., Ducreux G. et M. Kreis. 1997. Zygotic embrogenesis *versus* somatic embryogenesis . *Journal of Experimental Botany* 48N 313 : 1493 -1509.
- Douaoui A., Hartani T. et M. Lakehal. 2006. La salinisation dans la plaine du Bas-Cheliff

: acquis et perspectives. Economies d'eau en Systèmes IRigués au Maghreb. Deuxième atelier régional du projet Sirma, Marrakech, Maroc, 29-31.

- Doudech N., Mhamdi M., Bettaieb T. et M. Denden. 2008. Tolérance à la salinité d'une graminée à gazon : *Paspalum notatum* Flüggé. *Tropicultura*. 26, 3, 182-185.
- Dutuit P. et R. Gorenflot. 2008. Glossaire pour le développement durable : des mots pour les maux de la planète, Ed des archives contemporaines, p 182.
- Elzebroek T. et K. Wind. 2008. Guide to Cultivated Plants. CAB International, Oxfordshire, UK. pp 368 - 371. *In* : Atef M. et K. Nassar. 2009. Use of Somatic Embryogenesis in Potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Russet Burbank Improvement. These de doctorat. Department of Plant Science, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.
- Evans D.A., Sharp W.R. et C.E. Flick. 1981. Plant tissue culture thorpe : Methods and applications in agriculture., Eds : *Academic Press.*, New York, 45P.
- FAO. 2002. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. Sommet national de l'alimentation, cinq ans après : Le sel de la terre : un danger pour la production vivrière. <http://www.fao.org/worldfoodsummit/french/newsroom/focus/focus1.htm>.
- FAO. 2008. Année internationale de la pomme de terre. http://www.fao.org/corp/google_result/fr/?cx=018170620143701104933%3A1nrxaehdysq&q=Pomme+de+terre+en+Alg%C3%A9rie&x=-136&y=-270&cof=FORID%3A9.
- FAO. 2010. *In*: Départements Productions raisonnées. 2010. Flash spécial "Tempête Xynthia", viticulture et productions légumières. Chambre d'Agriculture. <http://www.fao.org/worldfoodsummit/french/newsroom/>.
- FAO. 2013. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), Rome, base de données FAOSTAT; Fonds monétaire international (FMI), Washington, D.C, base de données, Statistiques financières internationales, base de données; Division de Statistiques de Nations Unies, base de données du Bulletin mensuel de statistiques. http://www.fao.org/corp/google_result/fr/?cx=018170620143701104933%3A1nrxaehdysq&q=Pomme+de+terre+en+Alg%C3%A9rie&x.
- Fortes A.M. et M.S. Pais. 2000. Organogenèse de entrenœud - nodules derived de *Humulus lupulus* Var. Nugget (Cannabaceae): études histologiques et les changements dans la teneur en amidon. *American Journal of Botany* 87 (7): 971-979.
- Gallard A. 2008. Etude de la cryoconservation d'apex en vue d'une conservation a long terme de collections de ressources génétiques végétales : compréhension des phénomènes mis en jeu et évaluation de la qualité du matériel régénère sur le

modèle *pelargonium*. Thèse de doctorat spécialité : biologie cellulaire école doctorale d'Angers.

- Garg A.K., Kim J., Owens T., Ranwala A., Choi Y., Kochian V. et R.J. Wu. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 15898-15903. *In* : Hassani A ; Dellal A ; Belkhouja M et Kaid- Harche M. 2008. Effet de la Salinite Sur L'eau et Certains Osmolytes Chez L'orge (*Hordeum Vulgare*). European Journal of Scientific Research. ISSN 1450-216X Vol.23 No.1, pp.61-69.
- Ghomari S., Lotmani B., Labdi M., Haddad M. et M.B Khaled. 2013. Effect of phytohormone on neoformation of somaclonal variants in *Solanum tuberosum* L.. Advances in Environmental Biology, 7(14) Decembre 2013. 4697-4702.
- GNIS et FNPPT. 2006. Groupement National Interprofessionnel des Semences et Plants ; Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre. Fiche descriptive des maladies et ravageurs de la pomme de terre. 88p.
- Greenfacts. 2013. Plantes Génétiquement Modifiées : Comment les biotechnologies peuvent-elles s'appliquer à l'agriculture ? <http://www.greenfacts.org/fr/ogm/3-organismes-genetiquement-modifies/3-selection-classique-plantes.htm#0p0>.
- Greenway H. et R. Munns. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes, Annu. Rev. Plant Physiol. 31, 149–190. *In* : Hernandez S., Deleua C. et F. Larher. 2000. Accumulation de proline dans les tissus foliaires de tomate en réponse à la salinité. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences 323. 551–557.
- Guyot M.J., Segulier-Guis M. et D. Duris. 2003. Terre des cafés, Ed CIRAD, p 141.
- Haïcour R. 2002. Multiplication de plantes herbacées *in vitro* ; Modèle pomme de terre *Solanum tuberosum* L.. Biotechnologies végétales, techniques de laboratoire. 01-16P.
- Hamza M. 1980. Réponse des végétaux à la salinité. *Physiol., Vég.* 18 (1): 69-81.
- 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. *In* : Messaï Abir, C. El Yacoubi H., Rochdi A., 2011. Improvement of cellular salt tolerance of 'troyer' citrange *in vitro*. *Acta Hort.*, 911, 337-348.
- Hannachi C., Debergh P., Zid E., Messaï A. et T. Mehouchi. 2004. Tubérisation sous stress salin de vitroplants de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* ; (1), 9–13.
- Hans M., Peeten G., Folkertsma S., Schipper J.K., Baarveld H.R. et S.V. Der Kleijn. 2011. Catalogue néerlandais des variétés de pommes de terre 2011. NIVAP.

http://www.potato.nl/fr/Sur_les_pommes_de_terre/Catalogue/ras?frm_variety=

- Hassani A., Dellal A., Belkhodja M. et M. Kaid- Harche. 2008. Effet de la Salinite Sur L'eau et Certains Osmolytes Chez L'orge (Hordeum Vulgare). European Journal of Scientific Research. ISSN 1450-216X Vol.23 No.1, pp.61-69.
- Hernandez S., Deleua C. et F. Larher. 2000. Accumulation de proline dans les tissus foliaires de tomate en réponse à la salinité. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences 323. 551–557.
- IBV. 2013. Initiatives Biotechnologies Végétales. OGM : La tolérance à la sécheresse et aux basses températures. <http://www.ogm.org/OGM%20et.../OGM%20et%20agronomie/la-tolerance-a-la-secheresse-et-aux-basses-temperatures.html>
- Ignasse J. 2011. Epigénétique . [http : www.Sciences et avenir.fr](http://www.Sciences et avenir.fr).
- INRAA. 2006. Institut National de la Recherche Agronomique Algérienne, rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture : Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques.
- INRAA. 2013. Institut National de la Recherche Agronomique Algérienne : Centre de production de la semence de pomme de terre *in vitro* à Tiaret.
- IPTRID. 2006. Programme International pour la Technologie et la Recherche en Irrigation et Drainage : Conférence électronique sur la salinisation : Extension de la salinisation et Stratégies de prévention et réhabilitation.
- IRD. 2008. Les dossiers thématiques de l'Institut de recherche pour le développement. Les sols sont fragiles : 1er partie Salinisation et sodisation des sols. 2ème partie La dégradation des sols par salinisation ou alcalisation. <http://www.mpl.IRD2008.fr/suds-enligne/sols/fragile/salinisation1>. In : Boualla N., Benziane A. et Z. Derrich. 2012. Origine de la salinisation des sols de la plaine de M'léta (bordure sud du bassin sebkha Oran). Journal of Applied Biosciences 53: 3787 – 3796.
- Isac V., Popescu A.N. et M. Coman. 1994. Studies on plant regeneration from tissue-derived callus in *Fragaria X ananassa* Duch. In : Schmidts H. et M Kellerhals. Progress in temperate fruit breeding. Kluwer Academic Publishers, , p 395-398.
- Jarret R.L, Hasegawa P.M. et H.T. Erickson. 1980. Factors affecting shoot initiation from tuber discs of potato *Solanum tuberosum* .Physiol.plants .p 49, 177-184.
- Jayasree T., Pavan U., Ramesh M., Rao A.V., Reddy J .M.K. et A. Sadanandam. 2001. Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato
- Kechid M. 2005. Physiologie et Biotechnologie de la Microtubérisation de la Pomme de

Terre *Solanum tuberosum* L.. Mémoire En vue de l'obtention du Diplôme de Magister en Biotechnologie Végétale. Université Mentouri de Constantine. 154p.

- Khadraoui. A. 2010. Gestion des ressources en eau souterraines au sahara Algérien. www.abhs.dz.
- Khenifi M.L., Boudjeniba M. et A. Kameli. 2011. Effects of salt stress on micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). African Journal of Biotechnology Vol. 10(40), pp. 7840-7845.
- Kone T., Kone M., Kone D., Kouakou T.H., Traore S. et Y.J. Kouadio. 2010. Effet de la photopériode et des vitamines sur la micropropagation du bananier plantain (*Musa AAB*) à partir de rejets écaillés de rang. Journal of Applied Biosciences 26: 1675 – 1686.
- Koutoua A., Hmouni D., El Yacoubi H.A., Hassikou R., Zidane L. et A. Rochdi. 2012. Sélection et évaluation *in vitro* de lignées de cals tolérantes à la salinité chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). *Science Lib Editions Mersenne* 4: 120708.
- Koutoua A., Hmouni D., Elyacoubi H., Hassikou R., Zidane L. et A. Rochdi. 2012. Sélection et évaluation *in vitro* de lignées de cals tolérants à la salinité chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). *Science Lib Editions Mersenne* : Volume 4, N ° 120708.
- Langeron M. 1949. Précis de microscopie. Eds : *Masson*, Paris., 598p.
- Lazrek-Ben Friha F. 2008. Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse. 204P.
- Lê C.L. 1994. Apport de l'électrophorèse dans l'identification des variétés de pomme de terre saines en suisse .*Revue suisse Agric* .26(6),373-379.
- Lê C.L. et D.Thomas. 2010. Production de microtubercules de pomme de terre *in vitro* : effet de la durée de culture. *Recherche Agronomique Suisse* 1 (11–12): 404–409.
- Leclerc Y., Donnelly D.J. et J.E.A. Seabrook. 1994. Microtuberization of layered shoots and nodal cuttings of potato: the influence of growth regulators and incubation periods. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 37, 113 – 120. *In* : Côm-Linh Lê et Daniel Thomas. 2010. Production de microtubercules de pomme de terre *in vitro*: effet de la durée de culture. *Recherche Agronomique Suisse* 1 (11–12): 404–409.
- Lepengue A. N., Mouaragadja I., Ake A. N. et B. M'batchi. 2012. Quelques aspects biochimiques de la réaction de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) au stress salin. *Journal of Applied Biosciences* 49: 3452– 3458.

- Lepoivre P. 2003. Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte, Ed De Boeck, p 432
- Levigneron A., Lopez F., Vansuyt G., Berthomieu P. et P. Fourcroy. 1995. Casse-Delbart, Les plantes face au stress salin, Cah. Agri. 4. 263–273. *In* : Benmahioul B., Daguin F. et M. Kaid-Harche. 2009. Effet du stress salin sur la germination et la croissance *in vitro* du pistachier (*Pistacia vera* L.). C. R. Biologies 332 : 752–758.
- Litz R.E. et D.J. Gray. 1995. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. World J Microb Biot., 11: 416-425.
- Lutts S., Bouharmont J. et J.M. Kinet. 1999. Physiological characterization of saltresistant. *In* : Koutoua A., Hmouni D., Elyacoubi H., Hassikou R., Zidane L. et A. Rochdi. 2012. Sélection et évaluation *in vitro* de lignées de cals tolérants à la salinité chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). Science Lib Editions Mersenne : Volume 4, N ° 120708.
- Maas E.V. 1986. Salt tolerance of plants. Appl. Agric. Res.1, p. 12–26
- Mani F., Mhamdi M., Bettaieb T. et C. Hannachi. 2012. Effet du saccharose sur la tubérisation *in vitro* de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). Revue « Nature & Technologie ». 38 - 4.
- Margara F. 1989 Bases de la multiplication végétative: les méristèmes et l'organogenèse. Ed INRA Paris 262p.
- Margara F. 1989. Bases de multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse . Ed INRA Paris 262p.
- Mellah N. 2008. Production de la pomme de terre : L'Algérie dans le dernier rang en Afrique du Nord. Liberté.
- Messaï A., Hannachi C., E. Zid. 2006. Régénération *in vitro* de plantes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), adaptées au NaCl. *Tropicultura* 4 (24):221-228.
- Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. 2005. Le Drainage en Algérie
- Moghaddam A. et M.H. Hadizadeh. 2002. Response of corn hybrids and their parental lines to drought using different stress tolerant indices. Iranian J. Seed and Seedling. 18: 255-272. *In* : A. Jafari, F. Paknejad, M. Jami AL-Ahmadi. 2009. Evaluation of selection indices for drought tolerance of corn (*Zea mays* L.) hybrids. International Journal of Plant Production 3(4): 33-38.
- Moinuddin A., Fischer R., Sayre K. et M.P. Reynolds. 2005. Osmotic Adjustment+ Wheat in Relation to Grain Yield under Water Deficit Environments. *Agro.J.*97:1062-1071. *In*: Hassani A ; Dellal A ; Belkhodja M et Kaid- Harche M. 2008. Effet de la Salinite Sur L'eau et Certains Osmolytes Chez L'orge (*Hordeum Vulgare*). European Journal of Scientific Research. ISSN 1450-216X Vol.23 No.1, pp.61-69.

- Morel G. et R.H. Wetmor. 1951. Ferncallus tissue culture. *Ann.J. Bot.*, 38, 141-143.
In: Haïcour R., 2002. Multiplication de plantes herbacées *in vitro* modèle *Solanum tuberosum* L, Biotechnologie végétale, techniques de laboratoire. Londres, Paris, New york: TEC & DOC., 1-16.
- Munns R. 2002.Comparative physiology of salt and water stress; *Plant, Cell and Environment.* 25, 239–250. *In* : Hassani A ; Dellal A ; Belkhodja M et Kaid- Harche M. 2008. Effet de la Salinité Sur L'eau et Certains Osmolytes Chez L'orge (*Hordeum Vulgare*). *European Journal of Scientific Research.* ISSN 1450-216X Vol.23 No.1, pp.61-69.
- Murashige T. et F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15, 473–497.
- Nezli I.E., Achour S. et L. Djabri. 2007. approche géochimique des processus d'acquisition de la salinité des eaux de la nappe phréatique de la basse vallée de Oued M'ya (Ouargla). *Larhyss Journal*, n°6, pp. 121-134.
- Niu X., Rsessan R.A., Hasegawa P.M. et J.M. Pardo. 1995: Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology.* 109 (3): 735- 742.
- Ochatt S.J., Marconi P.L., Radice S. et P.A. Arnozis. 1999. *In vitro* recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 1–8.
- Ochette C. 2005. Growth, quality and biothecnology, WFP publisher.finland.
- Özgen M., Türet M., Özcan S. et C. Sancak. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. *Plant Breed* 6 (115) : 455-458. *In*: Ayolié K, El yacoubi V, Rochdi A. 2007. Influence du 2.4-D et de l'explant embryonnaire sur la callogenèse du blé dur. *Bull.Soc.Pharm* 146: 97-112.
- Patridge T. et J.B. Wilson. 1987. Germination in relation to salinity in some plants of salt marshes in Otago, New Zeland. *J. Bot.* 25. 255–261. *In* : Benmahioul B., Daguin F. et M. Kaid-Harche. 2009. Effet du stress salin sur la germination et la croissance *in vitro* du pistachier (*Pistacia vera* L.). *C. R. Biologies* 332 : 752–758.
- Peters. A. 1986. Quelques aspects de la morphogenèse des ignames cultivées *in vitro*. Rapport de stage ORSTOM. Montpellier. PP 18.
- Rousselle P., Yvon R. et J. Crosnier. 1996. La pomme de terre : production, ammélioration, ennemis et maladies. Ed INRA, 640p.
- Saadi A. 1991. Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L par embryogenèse somatique . Thèse de doctorat . Paris Grignon 162p.

- SAADI A. et F. HAMDANI. 2007. Régénération *in vitro* du *Scorpiurus muricatus* ssp. *subvillosus* via la caulogénèse. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, Volume 11 (2007) -- numéro 3. <http://popups.ulg.ac.be/Base/document.php?id=815>
- Saidi F., Cherif H.S., Metidji H., Chaouia C., Rouibi A., Mohamed Said R., *et al.* 2009. Essais de multiplication *in vitro* par organogénèse indirecte d'une plante medicinale *Aristolochia longa* L. Agricultura Știință și practică nr 4 (3): 71-72.
- Sajid Z.A. et F. Aftab. 2009. Effect of thidiazuron (tdz) on *in vitro* micropropagation of *solanum tuberosum* l. cvs. desiree and cardinal. *Pak. J. Bot.*, 41(4): 1811-1815.
- Sama A.E., Simon Z., Nyochembeng L., Tambong T.A., Nezana X. et J.G Wutah. 1998 : Culture *in-vitro* et multiplication rapide de plante à tubercules et racines au Caméroune. Cahier Agriculture. 7 : 63-66. *In* : Hamdani F.Z. 2001. Régénération via l'organogénèse Ou L'embryogénèse somatique chez le *Scorpiurus*. Univeristé Hassiba Ben Bouali de Chlef - Magister.
- Schäfer-Menuhr A., Mix-Wagner G. et K. Vorlop. 2003. Regeneration of plants from cell suspension cultures and encapsulated cell suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. cv. Clarrissa. *Landbauforschung Völkenrode* 53, 1. PP 53-59.
- Schmid J. et E. Keller. 1981. Nouvelles possibilités pour l'amélioration et la multiplication des plantes : les cultures de tissus et de cellules. *Revue Suisse Agriculture*. 13(6): 265-272. *In* : Hamdani F.Z. 2001. Régénération via l'organogénèse Ou L'embryogénèse somatique chez le *Scorpiurus*. Univeristé Hassiba Ben Bouali de Chlef - Magister.
- Seabrook J. et L.K. Douglass. 2001. Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. *Plant Cell Rep* 20: 175–182. *In*: Sharma Sk, Millam S, Hedley PE, Mcnicol J, Bryan GJ. 2008. Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato, An auxin led perspective. *Plant Mol Biol* 68 : 185–201.
- Sharma S.K. et S. Millam. 2004. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. A histological examination of key developmental stages. *Plant Cell Rep* 23 : 115–119. *In*: Sharma Sk, Millam S, Hedley PE, Mcnicol J, Bryan GJ. 2008. Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato, An auxin led perspective. *Plant Mol Biol* 68 : 185–201.
- Sidikou R.D.S., Sihachkr D., Lavergne D., Nato A., Ellissèche D., Jouan B. et G. Ducreux. 2003. Etude de la microtubérisation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) au Sahel. *Cahiers Agricultures*. Volume 12, Numéro 1, 7-14. http://www.jle.com/fr/revues/agro_biotech/agr/sommaire.phtml?cle_parution=743&type=text.html
- Sihachkr D. 2002. Protoplastes, isolement, culture, régénération et fusion au

polyéthylène glycol. Biotechnologies végétales, techniques de laboratoire. Ed : TEC&DOC. Londres, Paris, New York. Pp : 177-199.

- Smillie R.M. et R. Nott. 1982. Salt tolerance in crop plants monitored by chlorophyll fluorescence *in vitro*. Plant physiol. 72, 1043-1050. *In* : Doudech N., Mhamdi M., Bettaieb T. et M. Denden. 2008. Tolérance à la salinité d'une graminée à gazon : *Paspalum notatum* Flüggé. Tropicultura. 26, 3, 182-185.
- Soltener D. 2005. Les grandes productions végétales. Collection Scientifique des technologies agricoles 20^{ème} édition, p 472.
- Staritsky G. et G.A.M. Vanhassel. 1980. The synchronized mass propagation of *Coffea canephora in vitro*. Proc. 9. Int. Science Colloquium on Coffea, Paris, 597–602
- Stewart C.R. et F. Larher. 1980. Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress, The Biochemistry of Plants. 5, 609–630. *In* : Hernandez S., Deleua C. et F. Larher. 2000. Accumulation de proline dans les tissus foliaires de tomate en réponse à la salinité. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences 323. 551–557.
- Svobodova H., Albrechtova J., Kumstyrova L., Lipavska H., Vagner M. et Z. Vondrakava. 1999. Somatic embryogenesis in Norway spruce.
- Tchetché Y., Bouo-Bella D.F.X., Sallanon H., Coudret A. et H. Isaka. 2008. Modélisation des conditions d'environnement des bocalux de culture *in vitro* : bocalux avec agar et vitroplants. Afrique SCIENCE 04(1) (2008) 154 – 166.
- Thamir S.A., Campbell W.F. et M.D. Rumbaugh. 1992. Response of Alfalfa cultivar to salinity during germination and post germination, Growth Crop Sci. 32. 976–980.
- Tican A., Campeanu G., Chiru N. and D. Ivanovici., 2008. Using of unconventional methods for obtaining somaclonal variations, having as goal making of new potato varieties with resistance at diseases and pests. Romanian Biotechnological Letters., 13(4): 3791-3798.
- Unnikrisham S.K., Mehta A.R. et P.N. Bhatt. 1990. Abscisic acid induced high frequency embryogenesis from *Sapindus trifoliatus* leaves :89-94. Acta Horticulturae 280. *In-vitro* culture and Horticultural breeding.
- UNPT. 2009. Union Nationale de Production de la Pomme de Terre : production mondiale.
http://www.producteursdepommesdeterre.org/static/production_mondiale
- Vargas T.E., De Garcia E. et M. Oropeza. 2005. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures : histological analysis and extracellular protein patterns. Journal of plants physiology., 162, P 449-456.
- Vargas T.E., Xena N., Vidal M.d.C., Oropeza M. et E. De García. 2008. Genetic stability

of *Solanum tuberosum* L. Cv. Désirée plantlets obtained from embryogenic cell suspension cultures. *Interciencia*, INCI vol.33 no.3 Caracas Mar.

- Vidalis H., Augé R., Beauchesne G., *et al.* 1989. La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Lavoisier, Tec et Doc (ed). 7- 24.
- Wakamiya I., James Price H., Messina M.G. et R.J. Newton. 1996. Pine genome size diversity and water relations. *Physiologia Plantarum* Volume 96, Issue 1, pages 13–20.
- Webb K.J., Osifo O.E. et G.G. Henshaw. 1983, Shoot regeneration from leaf and discs of six cultivars of potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*). *Plant Sci. Lett.* 30, 33-47. 26.
- Wheeler V.A, Evans N.E., Foulger D., Webb K.J., Karp A., Franklin J. et S.W.J. Bright. 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.
- Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowler R.D. et G.N. Somero. 1982. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*, 217, 1214-22.
- Ye Z.H. 2002. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 183-202
- Zid E. et C. Grignon. 1991: Les tests de sélection précoce pour la résistance des plantes aux stress. Cas des stress salin et hydrique. L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides, AUPELF-UREF. Jon Libbey Eurotext, Paris: 91- 108.
- Zryd J.P., Brettel R., Derreudre J., *et al.* 1988. Culture de cellules, tissus et organogenèse végétaux : fondement théorique et utilisations pratiques. Press polytechniques Romandes.

Annexes

Annexe 1 : Milieu de culture Murashige et Skoog (MS) (1962).

Macro-élément	Quantité (mg/l)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂	332,3
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micro-élément	Quantité (mg/l)
MnSO ₄ , 4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,60
H ₃ BO ₃ (Ac borique)	6,20
KI	0,83
Na ₂ MO ₄ , 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025
CaCl ₂ , 6H ₂ O	0,025
Vitamines	Quantité (mg/l)
Glycine	2.00
Myo-inositol	100
Acide nicotinique	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10
FeEDTA	Quantité (mg/l)
Na ₂ FeEDTA	37,3
FeSO ₄ , 7H ₂ O	27,8
Gélifiant	Quantité (g/l)
Agar-agar	8

Annexe 2 : Les vitamines de de Morel et Wetmore (1951).

Vitamines de Morel et Wetmore	Quantité (mg/l)
Thiamine	1
Pyridoxine HCL	1
Acide nicotinique	1
Panhotenate de calcium	1
Myo inositol	100
Biotine	0,01

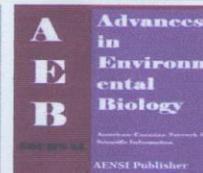
Annexe 3 : L'article de Ghomari *et al.* (2013).



AENSI Journals

Advances in Environmental Biology

Journal home page: <http://www.aensiweb.com/aeb.html>



Effect of 2,4-D Phytohormone on Neof ormation of Somaclonal Variants in *Solanum tuberosum* L.

¹S. Ghomari, ²B. Lotmani, ³M. Labdi, ¹M. Haddad and ¹M.B. Khaled

¹Djillali Liabès University, Sidi Bel Abbes, Algeria.

²Vegetables Protection Laboratory's, Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem, Algeria.

³National Institute of Agronomic Research in Algeria- Unity of West Research (INRAA-URO), Sidi Bel Abbes, Algeria.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 October 2013

Received in revised form 14

January 2014

Accepted 20 January 2014

Available online 25 February 2014

Key words:

Somaclonal Variants, *Solanum tuberosum*, Callus, Neof ormation, Stem, Leaf.

ABSTRACT

Induction of somaclonal variants *in vitro* needs a careful selection of explant and a definite hormonal interaction. This study contributed to show the effect of using explant and phytohormones on the new formation of somatic embryos and meristems in *Solanum tuberosum* L.. Organogenic callus neof ormation was obtained from the stem and leaf explants of two varieties (Spunta and Kondor). Stem and leaves explants were cultivated on MS medium with 0.5 mg.l⁻¹ BAP (6-benzyl aminopurine) and 0.2; 0.5; 1.5 and 2 mg.l⁻¹ of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). After seventy days of growth, the histological assessment of the callus showed that embryos were formed in 0.2 and 0.5 mg.l⁻¹ of 2,4-D for Kondor stems calluses; and of 1.5 and 2 mg.l⁻¹ for Spunta stem and leaf calluses, whereas meristematic buds induction, only the concentration of 1.5 and 2 mg.l⁻¹ of 2,4-D from Kondor and alone the medium of 0.5 mg.l⁻¹ of 2,4-D for Spunta stem. Concerning the meristematic induction, only concentrations of 1.5 and 2 mg.l⁻¹ 2,4-D favoured the meristematic neof ormation of Kondor variety. However, in the variety Spunta, the medium 0.5 mg.l⁻¹ of 2,4 D, induced a meristematic organogenesis of stems calluses.

© 2013 AENSI Publisher All rights reserved.

To Cite This Article: S. Ghomari, B. Lotmani, M. Labdi, M. Haddad and M.B. Khaled., Effect of 2,4-D Phytohormone on Neof ormation of Somaclonal Variants in *Solanum tuberosum* L.. *Adv. Environ. Biol.*, 7(14), 4697-4702, 2013

INTRODUCTION

Currently, the production of seed potato in Africa and particularly in Algeria is constantly altered by biotic and abiotic stress. The salinity of soil constitutes a permanent constraint, and nowadays, it affects most of land irrigated by brackish waters. The varietal improvement by the traditional methods remains long, expensive, delicate, and even impossible for some characters [12,1]. For this purpose, it will be interesting to improve using somaclonal variation *in vitro*, mainly somatic budding or embryogenesis of the callus.

The regeneration of plants *in vitro* is getting more and more used in agricultural research. Somatic embryogenesis is a biological process that allows the production of an unlimited number of embryos from a cell or group of somatic cells [4]. The transition to the regeneration through the production of callus allows an increase of the variability, and can be followed by a rapid regeneration and high rates of multiplication [12]. However, it will be useful to know the morphology of tissue in order to distinguish between embryogenic and the meristematic cells. Embryonic tissues have a bipolar structure (axis stem and root). They have not a vascular connection with the underlying tissue and can be easily separated from it. The first leaves have the typical aspect of cotyledons [21]. Regarding the regeneration via budding, the meristem is directly formed with the callus.

Jiménez [6] showed that hormones present a varied effect on the organogene expression, generally related to the type of explant chosen in the same species. The current study was aimed to study two varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.): Spunta and Kondor, using explants of stems and leaves obtained *in vitro* culture. The purpose was to determine the concentration of hormone 2,4-D (2,4 dichlorophenoxyacetic acid) in order, to induce the somaclonal variants by somatic embryos or organogenesis on callus, obtained from stems and leafs of both varieties.

Corresponding Author: S. Ghomari, Djillali Liabès University, Sidi Bel Abbes, Algeria

Tel: 213 553 796 648, E-mail: Samia_biotech@yahoo.fr or samiabiotech73@yahoo.fr.

MATERIALS AND METHODS

Induction of Callus:

The initial calluses were induced from internodes and leaves of two varieties, taken from vitroplants of four to five weeks of growth. The culture medium selected was codified MSC, based on MS [10] with vitamins of Morel and Wetmore [11] and, with 0.5 mg.l⁻¹ BAP (6-benzyl aminopurine) and, 0.5 mg.l⁻¹ of 2,4-D. Explants were cultivated during 12 hours, at 25 ± 1°C with light intensity of 15000 Lux.

Somatic Organogenesis of Callus:

The induced calluses (aged four weeks) were subcultured in the media named MC1, MSC2, MSC3 and MSC4, thirty explants per medium. These media consisted of MSC added to 1 mg.l⁻¹ of BAP and respectively to 0.2; 0.5; 1.5 and 2 mg.l⁻¹ of 2,4-D. After twenty days of culture, the calluses were put in the darkness. The formation of primary somatic embryos and somatic buds was confirmed by histological assessment.

Histological Assessment:

The histological sections were obtained using the traditional method, but with some modifications. The samples were put at room temperature for 24 hours, in the fixer Dubosq of Brazil [8]. Ten volumes of the condition solution (1g of picric acid and 150 ml of ethanol at 80°), were added to four volumes of formol at 35° and one volume of glacial acetic acid. Hence, the samples were deshydrated in ethanol at increasing concentrations (80°, 96° and 99.8°) for 40 mn. The long-term exposure of 24 hours to absolute ethanol is avoided to prevent hardening of the tissues which may cause difficulties in cutting. After that, each sample has undergone three successive baths in toluene during 20 mn. The passage in the paraffining was made without using the vacuum pump. This led to perform many tests in order to estimate the immersion time required for the paraffining. The purpose was to immerse the plant material into two successive baths of paraffin at 65°C; paraffin 1 for 24 hours, paraffin 2 for 48 hours. After cutting, the samples, sections of 7 microns thick were made using a microtome. The dewaxing was done though three successive baths in toluene during 10 mn for each sample, followed by rehydration with ethanol in decreasing degrees; 99.8° during 5 mn respectively, 90° during 5 mn, and 75° during 10 mn. Afterward, a mordanting is made later, with iron alum for 3% for 10 mn. The sections were coloured with the blue of toluidine. A technique was performed aiming the preservation of the sections. It consisted of mounting using Canada balsam, after rapid dehydration of the tissues coloured, by ethanol of 99.8°.

Results:

Somatic embryos of stems and leaves callus of Spunta variety and only stem callus of Kondor variety were observed under a binocular (Figure.1 and Table 1). This induction time depended mainly on the type of explant used. For Spunta varieties, embryos were formed on the culture media: MSC3 and MSC4. So, for Kondor varieties, MSC1 and MSC2 media cultures were most appropriate (Table 1).

The histological study showed the formation of new somatic embryos from the different stages of primary development. These observations have been noticed by Jürgens [7]; Weijers and Jürgens [19]: by the formation of globular embryos or primary somatic embryos begins with the formation of a single cell forming the apical-basal axis, then the proembryos, leading to the globular embryo.

In our study, the formation of somatic embryos begins with the neoformation of clusters cells. These were linked to callus by filamentous extremity typical to globular embryo (Figure 1d and 1e).

In embryogenic callus, a small proportion of cells divided to give rise to an organogenesis (figure 1a, 1b and 1c). Furthermore, the majority of these cells are located on the surface of the explant or in contact with the nutrient medium, as was already observed by Evans *et al* [3]. It should be noticed that MSC media allows the induction of two forms of organogenic regeneration for both types of explants of Kondor:

1 - Induction of adventitious organs on callus (Figure.2c);

2 - Proliferation of adventitious organs directly on the explant in the development phase of the callus [17] (Figure.2f).

Table 2 summarizes the results in the initiation of meristematic callus. The organogenic mediums differ and depend on the variety. The variety Kondor was able to regenerate through the formation of somatic meristem in MSC, MSC3 and MSC4 medias on stem callus, and in all media tested on leaf callus. For Spunta variety, only stem calluses were able to induce meristem on MSC medias after 65 days of the cultivation (figure.2b), while respecting the cultivation factors described above. Figures 1 and 2 present the macroscopic and the histological assessments of callus.

This study showed the good evolution of cell clusters forming the meristem for the variety Kondor after 60 days of cultivation. These clusters cells appeared in small cells sharply different from nearby cells, with an intense tint of the whole cell with the blue of toluidine. Subsequently, there has been a development of secondary meristems. Figure 2a shows the bluish coloration of these secondary structures. They look like a formation of primordia (the first leaves), as well as the apical meristem.

Table 1: Results of induction of somatic embryos in Spunta and Kondor varieties, for stem and leaf explants.

Culture mediums	KONDOR		SPUNTA			
	stem		Stem		Leaf	
	Induction time (days)	Percentage (%)	Induction time (days)	Percentage (%)	Induction time (days)	Percentage (%)
MSC	-	-	-	-	-	-
MSC1	40	67	-	-	-	-
MSC2	30	73	-	-	-	-
MSC3	-	-	50	70	35	17
MSC4	-	-	40	77	35	20

Table 2: Results of induction of somatic meristems in Spunta and Kondor varieties.

Culture mediums	KONDOR				SPUNTA	
	stem		Leaf		Stem	
	Induction time (days)	Percentage (%)	Induction time (days)	Percentage (%)	Induction time (days)	Percentage (%)
MSC	60	75	65	44	65	34
MSC1	-	-	75	10	-	-
MSC2	-	-	60	10	-	-
MSC3	35	17	60	17	-	-
MSC4	40	10	53	20	-	-

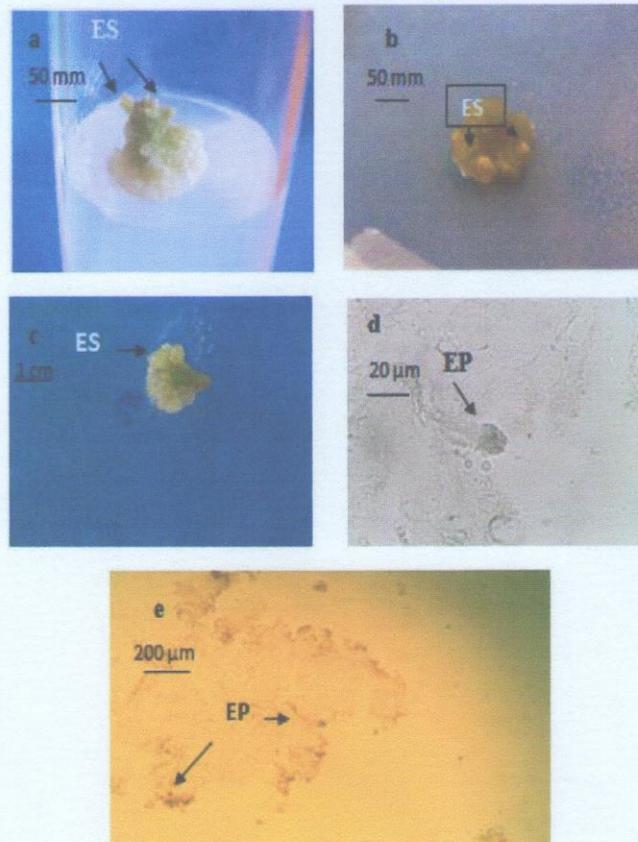


Fig. 1: Somatic embryo formation (ES) on callus stem and leaf of Spunta and Kondor (*Solanum tuberosum*). a: ES stem callus Spunta in MSC4; b: ES leaf callus Spunta in MSC1; c: ES stem callus in MSC1; d: Histological section of primary embryo (E)

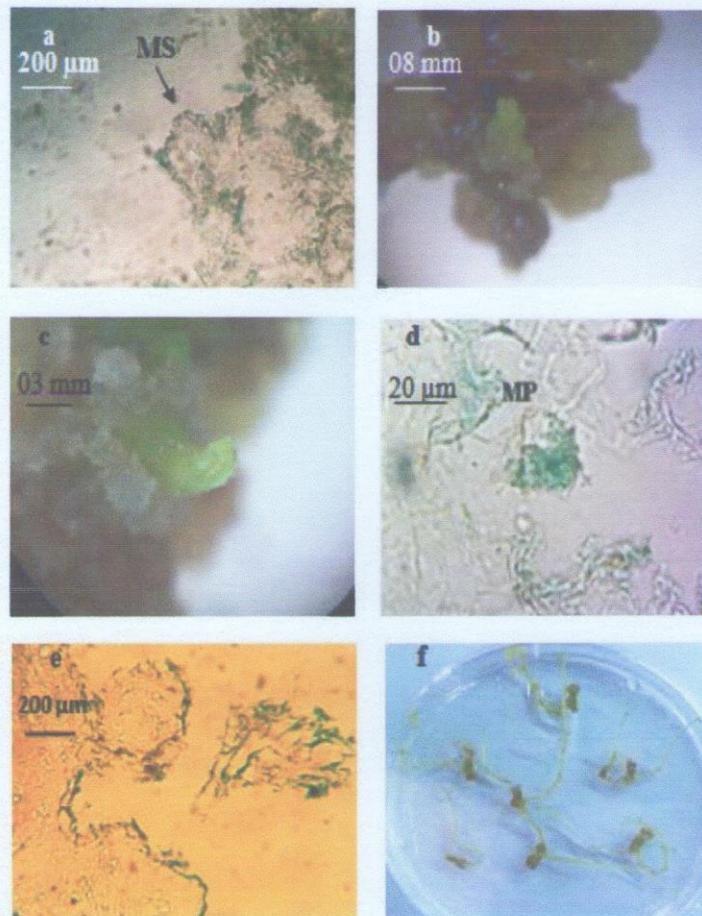


Fig. 2: Formation of somatic meristem (MS) on stem and leaves callus of Spunta and Kondor varieties (*S. tuberosum*). a: histological section of MS on Kondor rod callus in MSC1; b: MS on Kondor leaf callus in MSC1; c: MS on Kondor stem callus in MSC2; d: primary meristem (MP) on Kondor leaf callus on MSC3; e: globular callus of Spunta stems in MSC1; f: development of MS in Kondor stems on MSC.

Discussion:

The potato (*Solanum tuberosum* L.) is regularly reproduced asexually, which ensures the stability of varietal characteristics through the generations. The tubers however, are infected by viruses leading to significant losses in yields. The multiplication *in vitro* allows purifying and performing cloning with a high vegetative multiplication.

Several studies have underlined the cultural techniques and the hormones needed to induce organogenesis or embryogenesis. Unfortunately, no data are available about comparative studies between the two techniques using the same hormones. It should be noticed that few studies have shown the impact of varietal character on the choice of the explant with the mode of regeneration *in vitro* using the same hormones.

The results showed the influence of varietal factor on the concentration of 2,4-D hormone; either a somatic embryogenesis or a somatic organogenesis at *Solanum tuberosum* L. Comparison of the ability of organogenic of different type of explants growth showed that the stems are able to regenerate itself compared to leaf explants.

However, the organogenic and embryogenic abilities on callus vary according to the nature and/or the concentration of phytohormones used. It should be mentioned that the success of experimental applications depends significantly on respect of cultivation factors, particularly the photoperiod, the temperature and the luminous intensity used.

Litz and Gray [9] explained that the Solanaceae presents a recalcitrant potential for somatic embryogenesis. Current studies, however, showed controversial results, using the appropriate hormone concentrations as it was reported by De Garcia and Martinez [2], Seabrook and Douglass [13], Jayasree

et al., Vargas *et al.* and finally Sharma and Millam [14]. That's perfectly concurs with the results obtained in our study.

Sharma and Millam [14] and Sharma *et al.* [15] used the hormone 2.4-D at a concentration of 5 mg.l⁻¹ for somatic embryos induction from the internodes for Desirée variety, during two weeks. The concentration used of this hormone is exceeding that used in our study: 2.5 mg.l⁻¹. This can be explained by the addition of auxin (BAP) which allowed the formation of somatic embryo with a longer time estimated at forty days. This association is reminiscent of a synergistic effect and/or complementary to auxins and cytokinins on: callogenesis in general, organogenesis and embryogenesis, particularly in the two studied varieties.

The research's carried out on *S.tuberosum* led to a direct organogenesis on the explant. For Yaya-Lancheros and Chaparro-Giraldo [20] they induced somatic buds directly on stem explants of the variety Diacol Capiro.

In our work, it has been shown that the explant stem was more favourable to the regeneration *in vitro* than the leaf. In *S.tuberosum*, the varietal factor (genotype) influences significantly the callus organogenesis expression (2008). The variety Spunta has more ability to the formation of somatic embryos. Using the tested culture media, the variety Kondor makes growing faster the somatic meristems. It is evident that variety is the determining factor for not to say limiting to obtaining the desired results. This allows us to say that for the same species of *S.tuberosum*, it is not sufficient to respect the concentration of hormones used, but, we should consider the choice of variety (broad genotypic variability).

Conclusion:

This study allowed the application of some methods used in regeneration of potato through somatic embryogenesis and bud meristem. Although micropropagation is well controlled, the regeneration in this species still has difficulties affecting the somatic embryogenesis or organogenesis on callus.

The callogenesis was not affected by the nature of the phytohormones used, but rather by their concentration in the culture media. On the other hand, the induction and proliferation of somatic embryos and somatic buds on callus were strongly influenced by the nature and the concentration of phytohormones used, and also by the cultivation factors.

The expression shown by the hormonal combination BAP/2.4-D was also influenced by the genotype factor. However the concentration variability of 2.4-D for both varieties was not important related to the frequency of somatic embryogenesis or organogenesis.

Hence, we can state that the somatic embryogenesis seems to be the more reproducible and efficient regeneration of somaclonal variants in potato, since it ensures continuously a high level of multiplication for healthy, juvenile and homogeneous.

This morphological potential should facilitate access to new technologies, including somaclonal variation tolerant to some stress.

REFERENCES

- [1] Beaujean, A., R.S. Sangwan and B.S. Sangwan-Norreel, 1997. Régénération efficace et rapide de plantes transgéniques après transformation d'entre-nœuds de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*. Scientifiques du réseau biotechnologies végétales. Orsay, pp : 1-23.
- [2] De Garcia, E and S. Martinez, 1995. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree from stem nodal sections. J Plant Physiol., 145: 526-530. In: S.k. Sharma, S. Millam, P.E. Hedley, J. Mcnicol and G.J. Bryan, 2008. Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: An Auxin led perspective. Plant Mol Biol., 68: 185-201.
- [3] Evans, D.A., W.R. Sharp and C.E. Flick., 1981. Plant tissue culture thorpe: Methods and applications in agriculture Academic Press, Eds., New York, p: 45.
- [4] Jain, S.M and P.K. Gupta, 2005. Protocols of somatic embryogenesis- Woody Plants, Kluwer Academic publishers. In: Iraqi D., Lamhamedi M.S and Tremblay F.M, 2005. Rôle et métabolisme du saccharose lors de l'embryogenèse somatique : cas de l'épinette. AL Awami., 2(1): 113.
- [5] Jaya Sree, T., U. Pavan, M. Ramesh., A.V. Rao., K.J.M. Reddy and A. Sadanandam, 2001. Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. Plant Cell Tissue Organ Cult., 64: 13-17.
- [6] Jiménez, V.M., 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. Plant Growth Regulation., 47: 91-110. In: Jürgens, G, 1995. Axis formation in plant embryogenesis: cues and clues. Cell., 81: 467-470.
- [7] Jürgens, G., 1995. Axis formation in plant embryogenesis: cues and clues. Cell., 81: 467-470.
- [8] Langeron, M., 1949. Précis de microscopie. Masson, Eds. Paris, p: 598.

- [9] Litz, R.E and D.J. Gray, 1995. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World J Microb Biot.*, 11: 416-425.
- [10] Murashige, T and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15: 473-497.
- [11] Morel, G and R.H. Wetmor, 1951. Fern callus tissue culture. *Ann.J. Bot.* 38: 141-143. In: R. Haicour., 2002. Multiplication de plantes herbacées *in vitro* modèle *Solanum tuberosum* L.. Biotechnologie végétale, techniques de laboratoire. Tec & Doc., Eds. Londres, Paris, New York, pp: 1-16.
- [12] Özgen, M., M. Türet, S. Özcan and C. Sancak, 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. *Plant Breed.*, 115(6): 455-458. In: Ayolié. K., V. El yacoubi and A. Rochdi, 2007. Influence du 2,4-D et de l'explant embryonnaire sur la callogenèse du blé dur. *Bull.Soc.Pharm. Bordeaux.*, 146: 97-112.
- [13] Seabrook, J and L.K. Douglass, 2001. Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. *Plant Cell Rep.*, 20: 175-182. In: Sharma. S.K., S. Millam., P.E. Hedley., J. Mcnicol and G. J. Bryan, 2008. Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: An auxin led perspective. *Plant Mol Biol.*, 68: 185-201.
- [14] Sharma, S.K., and S. Millam, 2004. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: A histological examination of key developmental stages. *Plant Cell Rep.*, 23: 115-119. In: Sharma. S.k., S. Millam., P.E. Hedley., J. Mcnicol and G.J. Bryan, 2008. Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: An auxin led perspective. *Plant Mol Biol.*, 68: 185-201.
- [15] Sharma, S.K., V. Millam., P.E. Hedley., J. Mcnicol and G.J. Bryan, 2008. Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: an Auxin led perspective. *Plant Mol Biol.*, 68: 185-201.
- [16] Tican, A., G. Campeanu, N. Chiru and D. Ivanovici, 2008. Using of unconventional methods for obtaining somaclonal variations, having as goal making of new potato varieties with resistance at diseases and pests. *Romanian Biotechnological Letters.*, 13(4): 3791-3798.
- [17] Tisserat, B., 1987. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. *Plant culture a pratical approach*. Eds., R A. Dixon.
- [18] Vargas, T.E., E. De Garcia and M. Oropeza, 2005. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. from cell suspension cultures, histological analysis and extracellular protein patterns. *Plant Physiology.*, p: 162.
- [19] Weijers, D and G. Jürgens, 2005. Auxin and embryo axis formation: the ends in sight? *Curr Opin Plant Biol.*, 8(1): 32-7. In: C. Ben., 2005. Analyse du transcriptome lors de l'embryogenèse précoce chez le tournesol. Thèse doctorat: université de Toulouse, école doctorale, Biologie, Sante, Biotechnologies., France., pp: 167.
- [20] Yaya-Lancheros, M.L and A. Chaparro-Giraldo, 2009. Regeneration and mannose sensibility in potato internodal explants (*Solanum tuberosum* spp. andigena var. diacol capiro). *Acta Biologica Colombiana.*, 14(1): 143-154.
- [21] Zryd, J.P., 1988. Cultures de cellules, tissus et organes végétaux: fondements théoriques et utilisation pratiques. Presses Polytechniques Romandes, Eds., Lausanne, Suisse, pp: 1-305.