

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abdelhamid Iben Badis de Mostaganem  
Faculté des Sciences et Sciences de l'Ingénierie  
Département d'Agronomie

**Mémoire**

Pour l'obtention du diplôme de Magister en Agronomie

Option : Biotechnologie végétale

Sélection de cals de pomme de terre  
(*Solanum tuberosum L.* var. Kondor et  
Spunta) tolérants à la salinité

Présenté par :

M<sup>elle</sup> BELABBAS Meryem

Soutenu le :

**Devant le jury :**

Président : M<sup>r</sup> Berkani A.

Professeur. Université de Mostaganem.

Promoteur : M<sup>r</sup> Lotmani B.

Maître de Conférences. Université de Mostaganem.

Co promoteur: M<sup>r</sup> Labdi M.

Maître de Recherches. INRAA de Sidi Belabbès.

Examineur: M<sup>r</sup> Baba Ahmed M.B.

Maître de Conférences. Université d'Oran.

Examineur: M<sup>r</sup> Youcef Benkada M.

Maître de Conférences. Université de Mostaganem

À la mémoire de mon père qui aurait tant aimé me voir en ce jour,  
que Dieu lui accorde sa clémence et sa miséricorde.

À ma chère mère, et à toute ma famille, qui m'ont fait part de leur  
encouragement et leur aide morale et matérielle.

## Remerciements

À mon Promoteur le Docteur LOTMANI B. Maitre de conférence à l'université de Mostaganem, je lui suis très reconnaissante d'avoir accepté de m'encadrer, de la confiance qui m'a témoigné, de son soutien, ses orientations avisées, et sa disponibilité tout le long de la réalisation de ce travail.

À mon Co promoteur le Docteur LABDI M. Maitre de recherche et Directeur de l'INRAA de Sidi Belabbès, je lui exprime ma profonde gratitude et je le remercie d'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir accueilli au laboratoire de l'unité de recherche où j'ai réalisé ce travail dans les meilleures conditions. Je lui adresse toute ma reconnaissance pour les précieux conseils qu'il m'a prodigués et la grande disponibilité qu'il m'a manifestée. Il m'a apporté, sans réserve, tout l'aide scientifique, morale et matérielle qui m'a été nécessaire pour mener à terme ce travail.

C'était un honneur pour moi de travailler avec eux. Qu'ils trouvent ici, l'expression de mon profond respect.

Au Professeur BERKANI A. Doyen de la faculté des sciences et de l'ingénierie, université de Mostaganem. Je le remercie de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire. Qu'il me soit permis de lui témoigner de ma profonde considération et mon respect.

Au Docteur BABA AHMED M.B., Maitre de conférences à l'université d'Oran. Je le remercie d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Au Docteur YOUCEF BENKADA M., Maitre de conférences à l'université de Mostaganem. Je le remercie d'avoir accepté aimablement de juger ce travail.

Qu'ils trouvent ici, l'expression de mes vifs remerciements et mon profond respect.

Je remercie Mme GHOMARI S. Maitre assistante à l'université de Sidi Bel Abbés, pour son aide, et son soutien morale le long de la réalisation de ce travail.

Je remercie aussi Melle BELAHCÈNE N. attaché de recherche à l'INRAA de Sidi Bel Abbés, et Mr MOULFARAA M., chimiste à l'INRAA, pour leur soutien, leur aide précieuse qui m'a fait beaucoup avancé dans la réalisation de ce travail.

Je remercie tout le personnel de l'unité de recherche de l'INRAA de Sidi belabbès, Mr HAMMOU M., Melle LABDI N., Mme HAMDI S., Mr TEGGAR A. je les remercie encore une fois pour leur disponibilité, leur professionnalisme et leur soutien à chaque moment où j'en avais besoin.

Je remercie mon mari, pour son aide, son soutien moral et sa grande disponibilité tout le long de ce travail.

Enfin, je remercie mes amies (Souhila, Amina, Nacera, Aarbia, Hassiba, meriem, Nawel, Fanina et Sara); mes collègues et tous ceux qui ont participé de près ou de loin dans la réussite de ce travail.

Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance et gratitude.

# Table des matières

---

Résumé .....	i
Abstract.....	ii
Liste des figures.....	iii
Liste des courbes .....	v
Liste des tableaux .....	vi
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre1 : Synthèse bibliographique</b> .....	<b>4</b>
1. ....	P
présentation de la plante .....	4
1.1.....	G
généralités .....	4
1.2.....	I
importance de la pomme de terre en Algérie comme culture stratégique.....	5
1.3.....	C
classification taxonomique, origine et description botanique .....	8
1.4.....	R
reproduction de la pomme de terre.....	10
1.4.1Cycle végétatif de la pomme de terre .....	10
1.4.2Tubérisation .....	12
1.5.....	R
ressources et variabilité génétique de la pomme de terre.....	13
1.6.....	S
sélection de la pomme de terre.....	14
2.....	S
stress salin, tolérance et amélioration des plantes à la salinité .....	16
2.1 Introduction.....	16

2.2	Présentation du stress salin .....	16
2.3	La tolérance au sel .....	18
2.4	Réponses des plantes face à la salinité du sol et de l'eau .....	20
2.5	Stratégies pour l'amélioration des cultures contre la salinité.....	22
2.6	Tolérance de la pomme de terre à la salinité .....	25
2.6.1	Selon des recherches effectuées in vivo .....	25
2.6.2	Selon des recherches effectuées in vitro .....	27
3.	Multiplication végétative et Sélection in vitro .....	30
3.1	Présentation de la multiplication végétative in vitro .....	30
3.2	Les régulateurs de croissance .....	31
3.3	Sélections de variants par la culture in vitro afin d'acquérir une tolérance aux stress .....	34
3.3.1	Variation somaclonale.....	34
3.4	Méthodes de culture in vitro utilisées dans un programme de sélection de variants .....	36
3.4.1	Micropropagation.....	36
3.4.2	Callogénèse.....	39
3.4.3	Régénération par organogénèse et embryogénèse somatique.....	40
3.4.4	Facteurs de la régénération .....	44
3.5	La recherche de la tolérance à la salinité in vitro par la culture de cals et de cellules .....	47
	<b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes</b> .....	49
1.	.....	É
	tapes et objectifs de l'expérimentation .....	49
2.	.....	M
	matériel végétal .....	52
2.1	.....	
	Préparation du matériel végétal .....	52

3.....	.....	.....
Méthodes .....	.....	52
3.1 .....	.....	.....
Partie 1 .....	.....	52
3.1.1 .....	.....M	.....
micropropagation.....	.....	52
3.1.2 .....	.....C	.....
allogénèse et embryogénèse somatique.....	.....	55
3.2 .....	.....	.....
Partie 2 .....	.....	57
3.2.1 .....	.....E	.....
essai sous serre .....	.....	57
3.2.2 .....	.....T	.....
tolérance des cals à la salinité.....	.....	58
3.3 .....	.....	.....
Partie 3 : sélection de cals tolérants .....	.....	59

**Chapitre3 : Résultats et interprétations..... 61**

1. ....	.....P	.....
partie 1 : Callogénèse et régénération.....	.....	61
1.1.....	.....R	.....
racines .....	.....	61
1.2.....	.....T	.....
tiges .....	.....	66
1.3.....	.....F	.....
feuilles.....	.....	74
1.4.....	.....R	.....
récapitulatif des résultats de la partie1 .....	.....	80
2. ....	.....P	.....
partie 2 .....	.....	81
2.1.....	.....E	.....
essai sous serre .....	.....	81

2.1.1.....	E
ffet du stress salin sur l'émergence des plantules.....	81
2.1.2.....	E
ffet de la salinité sur le début du développement végétatif .....	84
2.2.....	
Tolérance des cals à la salinité .....	90
2.2.1.....	E
ffet de la salinité sur la croissance des cals de tiges .....	90
2.2.2.....	E
ffet de la salinité sur la croissance des cals de feuilles .....	98
3. ....	P
partie 3 : sélection des cals tolérants.....	110
3.1.....	V
variété kondor .....	110
3.1.1.....	C
cals des tiges.....	110
3.1.2.....	C
cals des feuilles.....	112
3.1.3.....	M
ultiplication et suivi des cals tolérants .....	112
3.2.....	V
variété spunta .....	118
3.2.1.....	C
cals des tiges.....	118
3.2.2.....	C
cals des feuilles .....	119
3.2.3.....	M
ultiplication et suivi des cals tolérants .....	120
3.3.....	R
écapitulatif des résultats de sélection .....	122
<b>Discussion</b> .....	123
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	127

<b>Références bibliographiques</b> .....	129
<b>Annexes</b> .....	150

### **Résumé :**

Une sélection *in vitro* de cals tolérants au stress salin, chez *Solanum tuberosum* L. var. Kondor et Spunta, a été entreprise. Pour cela, trois types d'explants issus de vitroplants des deux variétés (feuilles, tiges, racines) ont été utilisés. Le milieu de Murashige et Skoog, a été utilisé comme milieu de base. La 6-benzylaminopurine (BAP) ( $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) ( $0,5$  à  $4 \text{ mg.l}^{-1}$ ) ont été ajoutés à ce milieu de base pour étudier la callogénèse et la régénération sur les cals.

Chez les deux variétés, les combinaisons BAP/2,4-D ont significativement affectés la callogénèse. En se basant sur ces premiers résultats, c'est la combinaison  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP/ $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D qui a été la plus réactive, et c'est les cals de tiges et de feuilles qui ont donné les meilleurs résultats concernant la régénération de plantules. La sélection de variants s'est effectuée sur les cals issus de fragments de tiges et de feuilles des deux variétés sur le milieu MS additionné de la combinaison  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP/ $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D, et de différentes concentrations de NaCl ( $0$  à  $18 \text{ g.l}^{-1}$ ). Des cals de tiges tolérants ont été obtenus sur le milieu contenant  $7 \text{ g.l}^{-1}$  de NaCl pour la variété Kondor, et sur le milieu avec  $9 \text{ g.l}^{-1}$  de NaCl pour la variété Spunta. La tolérance des cals sélectionnés s'est maintenue après plusieurs repiquages.

**Mots clés :** *Solanum tuberosum L.*, callogénèse, régénération, sélection *in vitro*, stress salin, variants, tolérance.

**Abstract:**

An *in vitro* selection of tolerant cal to the saline stress, at *Solanum tuberosum L.* cv. Kondor and cv. Spunta, were undertaken. For that, three types of explants resulting from vitroplants of the two varieties (sheets, stems, roots) were used. The medium of Murashige and Skoog, was appointed like basic medium. The 6-benzylaminopurine (BAP) ( $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) and acid,-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) ( $0,5$  to  $4 \text{ mg.l}^{-1}$ ) were added to this basic medium to study the callogénèse and regeneration on the cal.

At the two varieties, the Bap/2,4-D combinations significantly affected the callogénèse. While being based on these first results, it is the combination  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP/ $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D which was most reactive, and they is the cal of stems and sheets which gave the best results concerning the regeneration of seedling. The selection the variable ones was carried out on the cal resulting from fragments of stems and sheets of the two varieties on medium ms added with the combination  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP/ $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D, and of different NaCl concentrations ( $0$  to  $18 \text{ g.l}^{-1}$ ). Tolerant cal of stems was obtained on the medium containing  $7 \text{ g.l}^{-1}$  of NaCl for the Kondor variety, and on the medium with  $9 \text{ g.l}^{-1}$  of NaCl for the Spunta variety. The tolerance of the selected cal was maintained after several subcultures.

**Key words:** *Solanum tuberosum L.*, callus, regeneration, *in vitro* selection, saline stress, variable, tolerance.

## Liste des figures

<b>Figure N°1:</b> Origine des espèces cultivées de pomme de terre ( <i>Solanum</i> sp.) (d'après Hawkes, 1981 <i>In</i> Ross, 1986)	9
<b>Figure N°2:</b> Stade de développement de la pomme de terre (Kotchi, 2004)	11
<b>Figure N°3:</b> paramètres de tolérance à la salinité se rapportant au rendement relatif à l'augmentation de la salinité en zone racinaire (Shannon et Grieve, 1999)	19
<b>Figure N°4:</b> catégories pour la classification de la tolérance des cultures à la salinité (Shannon et Grieve, 1999)	22
<b>Figure N°5:</b> induction d'embryogénèse somatique chez ( <i>Solanum tuberosum</i> L. var. Désirée) sur un milieu contenant 5µM 2,4D (Sharma et al., 2008)	42
<b>Figure N°6:</b> Schéma représentant les étapes du protocole expérimental	51
<b>Figure N°7 :</b> les vitroplants obtenus par micropropagation des deux variétés	54
<b>Figure N°8 :</b> dispositif expérimental des essais en pot sous serre pour les deux variétés Kondor et Spunta	57
<b>Figure N°9 :</b> Présentations des cals de racines de la variété kondor formés sur les différents milieux de culture testés	62
<b>Figure N°10 :</b> Présentations des cals de racines de la variété spunta formés sur les différents milieux de culture testés	63
<b>Figure N°11:</b> bourgeonnement sur cal de racine induit sur la combinaison 0.5mg BAP/3mg 2,4D	65

<b>Figure N°12:</b> Réactions des fragments de cals après le transfère sur milieu de développement des embryons .....	66
<b>Figure N°13 :</b> Présentations des cals de tiges de la variété kondor formés sur les différents milieux de culture testés	68
<b>Figure N°14 :</b> Présentations des cals de tiges de la variété spunta formés sur les différents milieux de culture testés	69
<b>Figure N°15:</b> régénération sur des cals de tiges var. kondor induits sur le milieu 1 (0.5mg BAP/0.5mg 2,4-D) .....	71
<b>Figure N°16:</b> régénération sur cal de tige var. spunta formés sur la combinaison 0.5mg BAP/0.5mg 2,4D.....	72
<b>Figure N°17:</b> bourgeon sur un cal de tige var. kondor induit sur le milieu 5 (0.5mg BAP/4mg 2,4-D) .....	72
<b>Figure N°18 :</b> Développement de plantules régénérées sur cals des tiges var. kondor (milieu 5).....	73
<b>Figure N°19:</b> développement de plantules régénérées sur cals des tiges var. spunta (milieu 1).....	73
<b>Figure N°20 :</b> Présentations des cals de feuilles de la variété kondor formés sur les différents milieux de culture testés.....	75
<b>Figure N°21 :</b> Présentations des cals de feuilles de la variété spunta formés sur les différents milieux de culture testés.....	76
<b>Figure N°22:</b> lbourgeonnement induit sur les cals de feuilles var. kondor sur le milieu 1(0.5mg BAP/0.5mg 2,4-D)	78
<b>Figure N°23 :</b> bourgeon sur cal de feuilles var. spunta formés la combinaison 0,5mg BAP/0,5mg 2,4-D .....	79
<b>Figure N°24:</b> développement des bourgeons issus de cal des feuilles, var. kondor .....	79
<b>Figure N°25 :</b> développement des bourgeons issus de cal des feuilles, var. spunta .....	79
<b>Figure N°26:</b> effet des différents traitements sur les dates d'émergences chez la variété Kondor .....	83
<b>Figure N°27:</b> effet des différents traitements sur les dates d'émergences chez la variété Spunta .....	83
<b>Figure N°28 :</b> cal de tiges morts, à gauche var. kondor sur 15 g/l de NaCl, et à droite var. spunta sur 17 g/l .....	90
<b>Figure N°29 :</b> cal de tige, var. kondor, 20 jours de culture sur le traitement T7.....	111
<b>Figure N°30 :</b> cal 4.7, var. kondor, redevenu sensible au traitement T7 au deuxième repiquage.....	114
<b>Figure N°31 :</b> cals de tiges tolérants au traitement T7 sélectionnés, var. kondor.....	117
<b>Figure N°32 :</b> cals de tiges tolérants au traitement T9 sélectionnés, var. spunta.....	121

## Liste des courbes

<b>Courbe N°1</b> : évolution de la consommation de la pomme de terre de 1995 à 2005 (F.A.O.stat., 2006) .....	5
<b>Courbe N°2</b> : évolution de la production de pomme de terre de 1995à 2005 (F.A.O. stat., 2006) .....	7
<b>Courbe N°3</b> : évolution des rendements des cultures de pomme de terre de 1995 à 2005 (F.A.O. stat., 2006) .....	7
<b>Courbe N°4</b> : croissance des cals de racines var. kondor sur les différents milieux de cultures testés.....	64
<b>Courbe N°5</b> : croissance des cals de racines var. Spunta sur les différents milieux de cultures testés.....	64
<b>Courbe N°6</b> : croissance des cals de tiges var. kondor sur les différents milieux de cultures testés .....	70
<b>Courbe N°7</b> : croissance des cals de tiges var. Spunta sur les différents milieux de cultures testés .....	70
<b>Courbe N°8</b> : croissance des cals de feuilles var. kondor sur les différents milieux de cultures testés .....	77
<b>Courbe N°9</b> : croissance des cals de feuilles var. Spunta sur les différents milieux de cultures testés .....	77
<b>Courbe N°10</b> : Effet des différents traitements en NaCl sur la hauteur des tiges après 30 jours de la date plantation var. kondor .....	86
<b>Courbe N°11</b> : effet des différents traitements en NaCl sur la croissance des tiges chez la variété spunta .....	86
<b>Courbe N°12</b> : Effet des différents traitements en NaCl sur le taux de croissance des cals de tiges chez la var. kondor après 24 jours de culture .....	97
<b>Courbe N°13</b> : Effet des différents traitements en NaCl sur le taux de croissance des cals de tiges var. spunta après 24 jours de culture.....	98

**Courbe N°14:** Effet des différents traitements en NaCl sur le taux de croissance des cals de feuilles var. kondor après 24 jours de culture ..... 105

**Courbe N°15:** Effet des différents traitements en NaCl sur le taux de croissance des cals de feuilles var. spunta après 24 jours de culture..... 105

## Liste des tableaux

**Tableau N°1:** Présentation des protocoles les plus utilisés pour la micropropagation de plantules de pomme de terre..... 38

**Tableau N°2:** Présentation de quelques protocoles d'embryogénèse somatique à partir de cals chez la pomme de terre ..... 43

**Tableau N°3:** Présentation des deux variétés de pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*) utilisées (Doornbos et Ros, 1987 ; Corrignan et Trillion, 2005) ..... 53

**Tableau N°4-1:** Résultats des paramètres étudiés pour la callogénèse des racines de la variété Kondor..... 62

**Tableau N°4-2:** Résultats des paramètres étudiés pour la callogénèse des racines de la variété Spunta..... 63

**Tableau N°4-3:** Résultats des paramètres étudiés pour la callogénèse des tiges de la variété Kondor ..... 68

**Tableau N°4-4:** Résultats des paramètres étudiés pour la callogénèse des tiges de la variété spunta ..... 69

**Tableau N°4-5:** Résultats des paramètres étudiés pour la callogénèse des feuilles de la variété Kondor ..... 75

**Tableau N°4-6:** Résultats des paramètres étudiés pour la callogénèse des feuilles de la variété Spunta ..... 76

**Tableau N°5-1:** résultats de l'analyse de variances à un seul facteur, l'effet des traitements sur la date d'émergence var. kondor ..... 81

**Tableau N°5-2:** résultats de l'analyse de variances à un seul facteur, l'effet des traitements sur la date d'émergence var. spunta..... 82

<b>Tableau N°5-3:</b> moyennes de la durée en jours entre la plantation et l'émergence pour les différents traitements var. kondor .....	82
<b>Tableau 5-4:</b> moyennes de la durée en jours entre la plantation et l'émergence pour les différents traitements var. spunta .....	82
<b>Tableau N°5-5 :</b> Résultat de la comparaison des moyennes des dates d'émergences var. kondor .....	84
<b>Tableau N°5-6 :</b> Résultat de la comparaison de moyennes des dates d'émergence pour la variété spunta .....	84
<b>Tableau N°5-7:</b> résultats de l'analyse de variance à deux facteurs, l'effet des traitements et de la durée des traitements sur la hauteur des tiges var. kondor .....	85
<b>Tableau N°5-8:</b> résultats de l'analyse de variance à deux facteurs, l'effet des traitements et de la durée des traitements sur la hauteur des tiges var. spunta.....	85
<b>Tableau N°5-9:</b> Résultat de la comparaison des moyennes de hauteurs des tiges pour les différents traitements var. Kondor .....	87
<b>Tableau N°5-10:</b> Résultat de la comparaison des moyennes de hauteur de tiges pour chaque traitement var. spunta	88
<b>Tableau N°5-11:</b> Résultat de la comparaison des moyennes de hauteurs des tiges selon le temps. Variété Kondor .	88
<b>Tableau N°5-12 :</b> Résultat de la comparaison des moyennes de hauteur de tiges à différentes période de la culture.	88
<b>Tableau N°5-13 :</b> les valeurs des indices de tolérances basés sur la hauteur des tiges à 30 jours pour chaque traitement, variété kondor .....	89
<b>Tableau N°5-14 :</b> les valeurs des indices de tolérances basés sur la hauteur des tiges à 30 jours pour chaque traitement, variété spunta .....	89
<b>Tableau N°5-15 :</b> échelle de tolérance au sel pour la hauteur des tiges.....	89
<b>Tableau N°6-1 :</b> Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs, l'effet des traitements et de la durée des traitements sur la croissance des cals de tiges de la variété kondor .....	91
<b>Tableau N°6-2 :</b> Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs, l'effet des traitements et de la durée des traitements sur la croissance des cals de tiges de la variété spunta.....	91
<b>Tableau N°6-3:</b> résultat de la comparaison des moyennes des poids des cals des tiges selon les différents traitements var. kondor .....	92

<b>Tableau N°6-4:</b> Résultat de la comparaison des moyennes des poids des cals de tiges de la variété spunta pour les différents traitements .....	93
<b>Tableau N°6-5 :</b> Résultats du classement des moyennes des poids des cals de tiges à différentes périodes de la culture var. kondor .....	94
<b>Tableau N°6-6:</b> Résultat de la comparaison des moyennes des poids des cals de tiges de la variété spunta à différentes périodes de la culture .....	94
<b>Tableau N°6-7:</b> échelle de tolérance au sel pour le taux de croissance des cals .....	95
<b>Tableau N°6-8:</b> taux de croissance et indices de tolérance des cals de tiges de la variété kondor après 24 jours de culture .....	95
<b>Tableau N°6-9:</b> taux de croissance et indices de tolérance des cals de tiges de la variété spunta après 24 jours de culture .....	96
<b>Tableau N°7-1 :</b> Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs, l'effet des traitements et de la durée des traitements sur la croissance des cals de feuilles de la variété kondor.....	99
<b>Tableau N°7-2:</b> Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs, l'effet des traitements et de la durée des traitements sur la croissance des cals de feuilles de la variété spunta .....	99
<b>Tableau N°7-3:</b> classement des moyennes de poids des cals de feuilles de la variété kondor par rapport aux différents traitements .....	100
<b>Tableau N°7-4:</b> Résultat de la comparaison des moyennes des poids des cals de feuilles de la variété spunta pour les différents traitements .....	101
<b>Tableau N°7-5 :</b> Résultat de la comparaison des moyennes des poids des cals de tiges de la variété kondor à différents période de la culture .....	101
<b>Tableau N°7-6:</b> Résultat de la comparaison des moyennes des poids des cals de tiges de la variété spunta à différents période de la culture.....	102
<b>Tableau N°7-7:</b> Taux de croissance et indices de tolérance des cals de feuilles de la variété kondor.....	103
<b>Tableau N°7-8 :</b> taux de croissance et indices de tolérance des cals de feuilles de la variété spunta après 24 jours de culture .....	104
<b>Tableau N°8 :</b> comparaison des résultats obtenus sur la tolérance de la variété Kondor au stress salin, selon les expérimentations menées in vivo et in vitro .....	107

<b>Tableau N°9</b> : comparaison des résultats obtenus sur la tolérance de la variété Spunta au stress salin, selon les expérimentations menées in vivo et in vitro .....	108
<b>Tableau 10-1</b> : Résultats du repiquage des cals de tige var. kondor sur les milieux de culture contenant les concentrations de NaCl de sélection .....	110
<b>Tableau 10-2</b> : taux de croissance après 24 jours de culture des 8 cals multipliés sur T7 présentant un développement proche des témoins.....	111
<b>Tableau 10-3</b> : Résultats du repiquage des cals de feuilles var. kondor sur les milieux de culture contenant les concentrations de NaCl de sélection .....	112
<b>Tableau 10-4</b> : résultats du premier repiquage des cals de tiges var. kondor tolérants à 7g/l de NaCl .....	113
<b>Tableau 10-5</b> : résultats du deuxième repiquage des cals de tiges var. kondor tolérants à 7g/l de NaCl. ....	115
<b>Tableau 10-6</b> : résultats du troisième repiquage des cals de tiges var. kondor tolérants à 7g/l de NaCl. ....	116
<b>Tableau 11-1</b> : Résultats du repiquage des cals de tiges var. spunta sur les milieux de culture contenant les concentrations de NaCl de sélection .....	118
<b>Tableau 11-2</b> : Résultats du repiquage des cals de feuilles var. spunta sur les milieux de culture contenant les concentrations de NaCl de sélection .....	119
<b>Tableau 11-3</b> : résultats du premier repiquage des cals de tiges var. spunta tolérants à 9g/l de NaCl .....	120
<b>Tableau 11-4</b> : résultats du deuxième repiquage des cals de tiges var. spunta tolérants à 9g/l de NaCl .....	121
<b>Tableau 11-5</b> : résultats du troisième repiquage des cals de tiges var. spunta tolérants à 9g/l de NaCl .....	121

## **Introduction :**

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est l'une des cultures maraîchères les plus importantes en Algérie. Sa consommation a atteint une moyenne de 60 kg/habitant en 2006 (F.A.O.stat., 2006). Les surfaces de cultures ne cessent de croître, et sont estimées à 85 000ha en 2007 (M.A.D.R., 2007).

Au niveau mondial, la pomme de terre est la quatrième denrée alimentaire après le blé, le maïs et le riz, avec une production de 325,3 millions de tonnes en 2007; cette production augmente en moyenne à un rythme annuel de 4,5% depuis 10 ans (F.A.O., 2007). La pomme de terre est produite dans 150 pays, dont les principaux producteurs sont : la Chine, la Russie, l'Inde, les États-Unis, l'Allemagne et la Pologne (F.A.O. stat., 2006).

Compte tenu de la situation actuelle d'insécurité alimentaire, en particulier dans les pays en voie de développement, un certain nombre de facteurs provoquant une nouvelle diminution de la productivité des cultures ont surgis. Parmi eux, la disponibilité des terres agricoles, les ressources en eau douce, les stress biotiques et abiotiques, et les faibles activités économiques dans le secteur agricole sont les facteurs les plus importants (Athar et Ashraf, 2009).

Ce sont les stress abiotiques qui sont considérés comme les principaux sources de réductions du rendement (Boyer, 1982 ; Rehman et al., 2005 ; MUNNS et Tester, 2008 ; Reynolds et Tuberosa, 2008).

La salinité un des principaux stress abiotique, affecte plus de 6% des terres de la planète. Parmi les 230 millions d'hectares actuelles de terres irriguées, 45 millions (19,5%) d'hectares sont affectés par le sel ; et parmi les 1.500 millions d'hectares en vertu de l'agriculture des zones arides, 32 millions (2,1%) en sont affectés à des degrés divers (Athar et Ashraf, 2009).

L'Algérie est l'un des pays où la salinisation des sols concerne de très importantes surfaces, notamment dans les périmètres irrigués de l'Ouest Algérien et dans toutes les zones arides et semi arides. Des travaux effectués par différents auteurs démontrent que la majorité des sols agricoles en Algérie sont affectés par les sels (Durand ,1958). Selon Szabolcs (1994), une superficie de 3,2 millions d'hectares en Algérie est menacée par la salinisation (Belkhodja et Bidai, 2004).

La salinisation des sols et l'irrigation avec des eaux chargées en sels, constituent une contrainte majeure pour le développement de la pomme de terre, culture stratégique pour le pays en termes de surface emblavée et de rendement agronomique. En effet, la pomme de terre est une plante sensible à la salinité et son niveau de tolérance varie de 1,5 à 2 g/l de NaCl (Maas, 1986). A une concentration de 3,5 g/l, le sel diminue au minimum de 50% la croissance et le rendement de la plante (Maas et Hoffman, 1977 ; Maas, 1984).

La recherche sur la tolérance à la salinité devient impérative pour pouvoir stabiliser et améliorer les rendements d'une espèce telle que la pomme de terre. Diverses stratégies peuvent être adoptées pour faire face au stress salin. Néanmoins, il est très important de développer une approche d'évaluation efficace pour la sélection de génotypes tolérants à la salinité qui devrait être fiable, rapide, facile, pratique et économique.

L'amélioration génétique par la sélection classique en utilisant des croisements en vue d'obtenir des génotypes tolérants à la salinité chez la pomme de terre s'avère une approche relativement difficile à appliquer en raison du temps qu'elle requiert (Bajaj, 1987). Par contre, la sélection de variations induites par culture *in vitro*, résultante d'une modification du métabolisme due à une altération génétique ; peut être une voie prometteuse pour améliorer la tolérance de cette espèce au stress salin surtout que cette approche biotechnologique a été utilisée avec succès chez d'autres Solanacées, comme la tomate, l'aubergine et le tabac.

La variation somaclonale est une source de diversité complémentaire à l'efficacité de la régénération des plantes à partir des cultures cellulaires. Elle est 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 aux cultures cellulaires.

La régénération de plantules à partir de la culture cellulaire, se fait généralement par la néoformation d'organes ou d'embryons somatiques qui permet une multiplication conforme; chose intéressante pour la sélection de variants. Car les variations sélectionnées sont conformément reproduite.

Notre travail consiste à entreprendre une étude sur la sélection de cals de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L. var. Spunta et Kondor) tolérants à la salinité.

Pour atteindre cet objectif il est nécessaire de passer par trois grandes étapes qui sont :

- 1.** La détermination du milieu de culture et du type d'explant favorable à l'induction de cals et à la régénération de plantules pour chaque variété : cinq combinaisons hormonales et trois types d'explants sont testés pour chaque variété.

2. La détermination de la tolérance des deux variétés étudiées à différentes concentrations de NaCl et la délimitation des intervalles de concentrations à utiliser pour la sélection des cals: pour cela un essai est conduit en pot sous serre, et un autre en culture *in vitro*.
3. La multiplication répétée de cals sur les concentrations sélectionnées, et sélection des cals tolérants.

## *Chapitre 1 : Synthèse bibliographique*

# 1. Présentation de la plante :

## 1.1. Généralités:

La pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*) est originaire des Andes péruviennes. Elle est arrivée en Europe au 16<sup>ème</sup> siècle grâce aux espagnols, le tubercule est rapidement adapté aux conditions de végétation du nord et devient un aliment de base à une époque de grande croissance démographique. Introduite en Afrique à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle; on la rencontre aujourd'hui très fréquemment en zones arides (principalement au nord et au sud du continent Africain) (Bourgneuf, 2002). En Algérie la pomme de terre a été introduite en 1856 par les Français (Starsting, 1977).

Les avantages culturels de cette espèce ont largement contribué avec le temps à son extension rapide. Avec une production mondiale de presque 315 millions de tonnes en 2006 (F.A.O.stat., 2006); on peut dire que la pomme de terre est un légume prépondérant dans l'alimentation humaine et donc, un des produits les plus importants.

C'est une culture des climats tempérés et humides, mais grâce à son adaptation, on la trouve aussi bien dans les pays chauds que dans les pays froids (Gondé et al., 1968).

La pomme de terre est exigeante en lumière, ainsi qu'en humidité du sol et de l'atmosphère, surtout pendant le développement des parties aériennes et pendant la floraison. L'humidité optimale du sol doit être maintenue à 80% jusqu'à la pleine formation des tubercules. La partie aérienne de la plante est sensible aux gelées, elle périt à une température de -0,8°C à -1,5°C. Les tubercules sont plus résistants au froid.

Elle s'épanouit dans des sols silico- argileux ou argileux- siliceux, bien drainés, fertiles, frais et bien travaillés, elle s'y développe très bien et donne de très bons rendements. On peut produire d'excellents tubercules dans les sols silico- calcaires bien fumés (Kolev, 1979).

En Algérie, les périodes de plantation de la culture de pomme de terre se présentent succinctement comme suit :

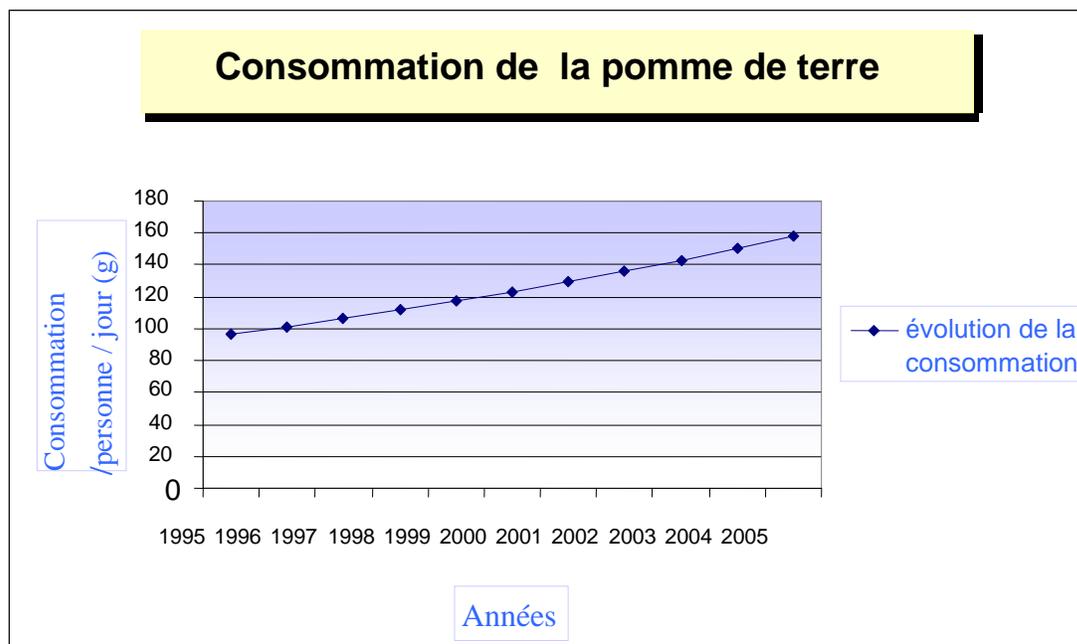
- De janvier à début avril pour la culture de saison;

- De juillet à septembre pour la culture d'arrière-saison;
- D'octobre à décembre pour la culture de primeur.

En termes d'importance, la culture de saison avec environ 53% de la sole pomme de terre occupe la première place suivie par la culture d'arrière- saison avec 34% et enfin par la culture de primeur avec 13% (AMRAR, 2005).

## 1.2. Importance de la pomme de terre en Algérie comme culture stratégique:

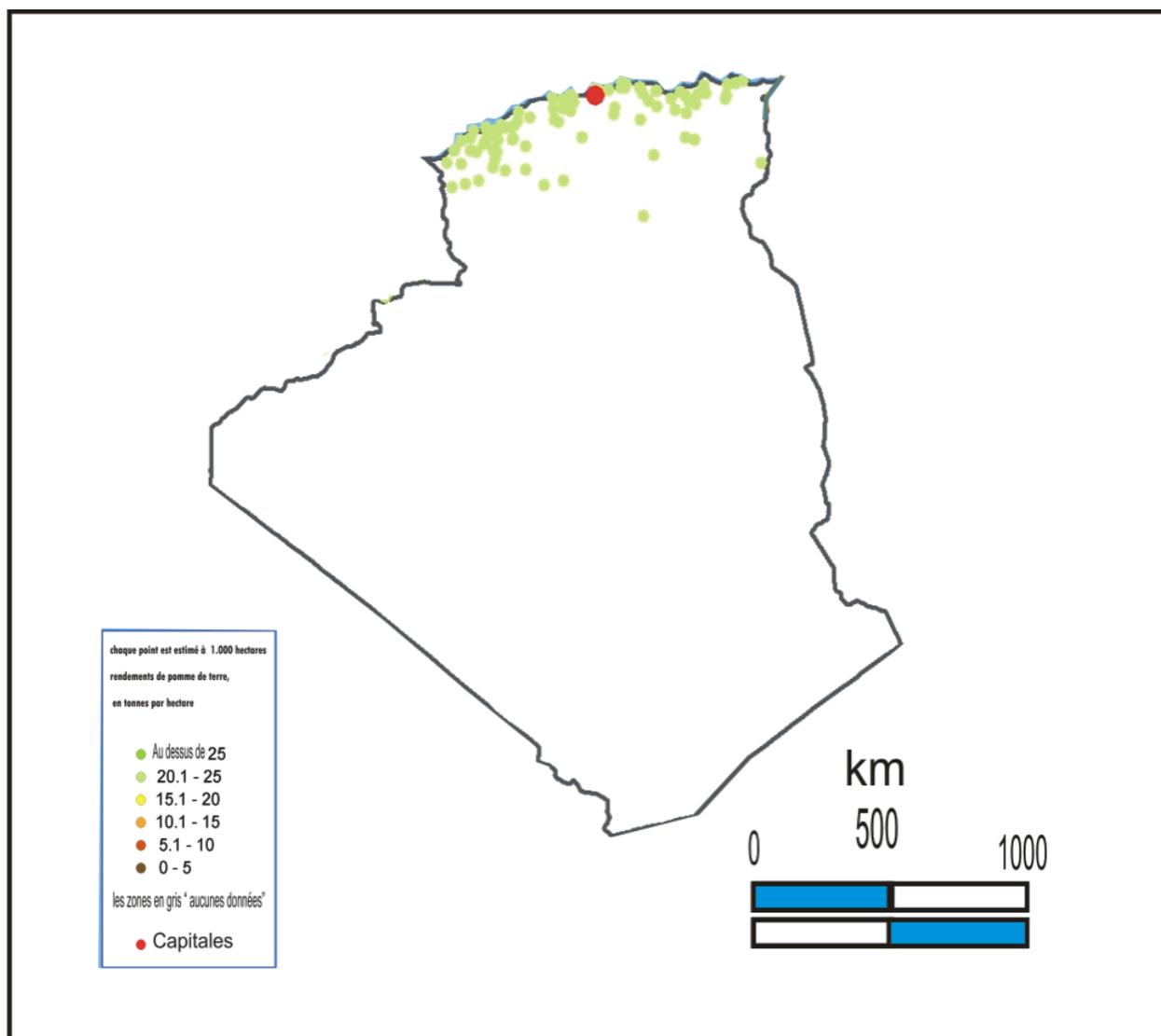
La pomme de terre est une culture stratégique pour le pays en termes de surface emblavée et de rendement agronomique. La pomme de terre n'a pris de l'importance dans l'alimentation des Algériens qu'après l'indépendance. Et sa consommation ne cesse d'augmenter au fil des années (courbe N°1) (F.A.O.stat. , 2006).



**Courbe N°1 :** évolution de la consommation de la pomme de terre de 1995 à 2005 (F.A.O.stat., 2006).

Face à cette grande consommation, les superficies de culture s'élargissent et augmentent chaque année de plusieurs milliers d'hectares tout type confondu (saison, arrière saison et primeur). Elles sont passées de 72 690 ha en 1999- 2000 à 83 000 ha en 2003- 2004 (DSA., 2004), soit une augmentation de 10 310 ha en 4 ans pour atteindre 85 000 ha en 2007 (MADR., 2007).

Comme le montre la carte N°1, l'aire de répartition des cultures de pomme de terre se localise principalement au nord. Quant aux rendements, ils ne dépassent pas les 25 tonnes par hectare.



**Carte**

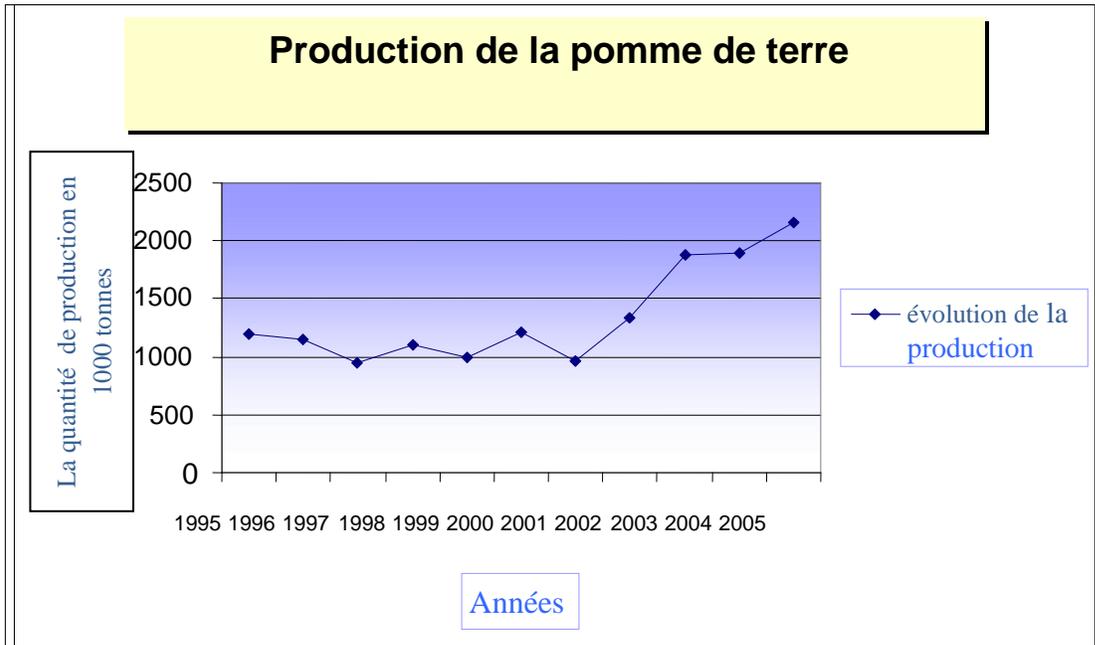
**N°1:** Rendements et aire de répartition des cultures de la pomme de terre en Algérie (C.I.P., 2007)

La production de la pomme de terre ne cesse de subir des variations d'une année à une autre (courbe N°2). La courbe présente une réelle augmentation depuis 2002, cette augmentation résulte de l'extension des surfaces cultivées pour la pomme de terre de consommation, et l'importation des semences. Cela est dû à la nouvelle politique tracée par le plan national de développement agricole (PNDA) lancé en l'an 2000.

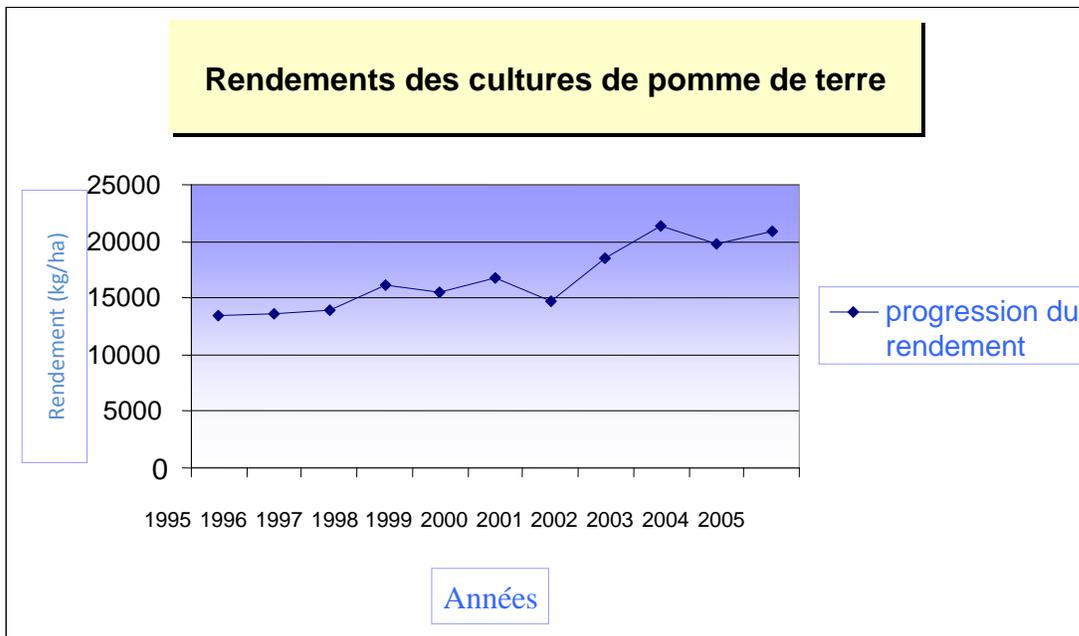
Elle résulte aussi d'une amélioration de rendement par hectare qui est tributaire de plusieurs facteurs (semences, façons culturales, apports en engrais...) (courbe N°3).

Dans les premières années de l'indépendance, l'Etat Algérien importait 8000t/an de semences non certifié et 60 000 t/an de semences certifiées. En outre 30.000 t/an de semences certifiées était produites localement (Booth, 1979). Pour des causes multiple toutes endogènes, qu'exogènes ; la production de semence pomme

de terre est en régression constante. 20% de la production annuelle de la pomme de terre, sont réservés comme semences.



**Courbe N°2:** évolution de la production de pomme de terre de 1995 à 2005 (F.A.O. stat., 2006).



**Courbe N°3:** évolution des rendements des cultures de pomme de terre de 1995 à 2005 (F.A.O. stat., 2006).

### 1.3. Classification taxonomique, origine et description botanique:

La pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*) appartient à la famille des solanacées (Gallais et Bannerot, 1992 ; Mazoyer, 2002). Le genre *Solanum* regroupe environ 2000 espèces dont plus de 200 sont tubéreuses (Hawkes, 1990). L'ensemble de ces espèces forme un groupe ayant un nombre chromosomique de base 12 et allant du niveau diploïde au niveau hexaploïde.

Les zones d'origine et de diversification s'étendent tout au long de la Cordillère des Andes du sud du Chili jusqu'au Venezuela et en Amérique centrale jusqu'au Nord du Mexique. Les zones les plus riches en espèces sont le Centre des Andes (Pérou, Bolivie, Equateur) et le Centre du Mexique. L'habitat s'étage de 0 à 4000 m. Les différentes espèces cultivées et leurs relations phylogéniques sont présentées dans la figure 1.

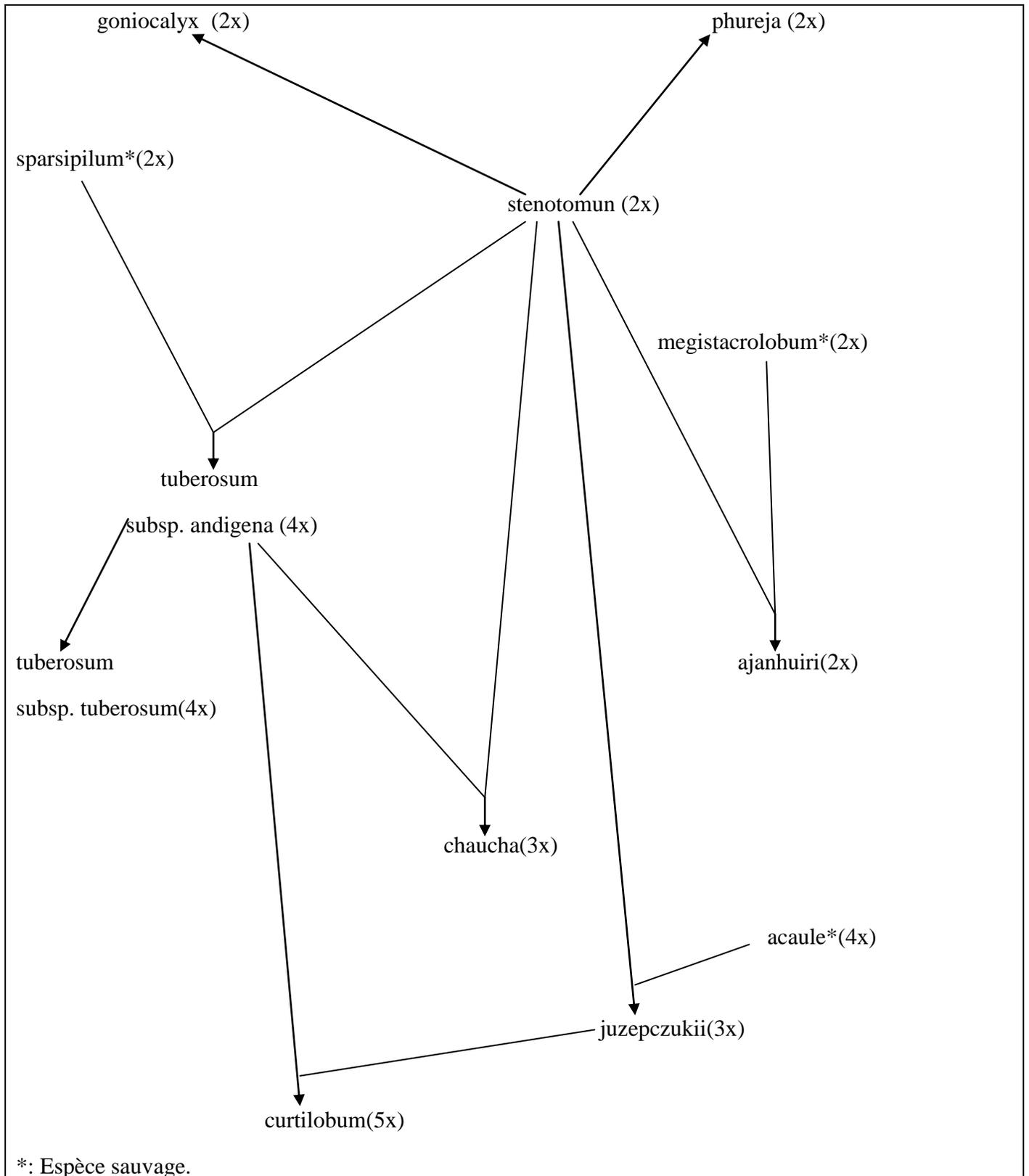
La pomme de terre est une plante annuelle tétraploïde ( $2n= 4x= 48$ ) (Mathurin., 1998). La classification taxonomique est la suivante:

Embranchement	: Spermaphytes;
Sous-embranchement	: Angiospermes;
Classe	: Dicotylédones;
Sous-classe	: Astéridées;
Ordre	: Solanales;
Famille	: Solanacées ;
Genre	: <i>Solanum</i> ;
Espèce	: <i>Solanum tuberosum L.</i>

Les caractères morphologiques de l'espèce changent d'une variété à une autre, et dans la même variété, car ils peuvent subir des variations importantes sous l'influence des conditions climatiques et des techniques culturales (Grisson, 1983).

Toutefois, les caractères morphologiques communs aux différentes variétés de pomme de terre se résument comme suit :

- Des tiges à section triangulaire présentant des appendices latéraux appelés "ailes" ;



**Figure 1:** Origine des espèces cultivées de pomme de terre (*Solanum* sp.) (d'après Hawkes, 1981 *In* Ross, 1986).

- Les feuilles sont du type imparipenné (Grison, 1983), disposées en alternance sur la tige suivant une phyllotaxie spiralée. De grandes folioles latérales primaires sont insérées par paires le long d'un pétiole terminé lui-même par une foliole unique (7 à 15 par pétiole) et à la base de chaque foliole se développe un ensemble de petites feuilles nommées foliolules. Celles-ci se disposent par paire (Roussele et al., 1996; Loon, 2000; Grison, 1983) ;
- Les fleurs peuvent être selon la variété blanche, rouge ou violacé (Doornbos et Ros, 1987).Elles sont disposées sur une inflorescence en cyme bipare. Les fleurs sont autogames et sont souvent male stérile (environ 1/3 des variétés). Elles ne produisent pas de nectar et sont rarement visitées par les insectes, ce qui fait que la fécondation croisée est presque inexistante dans la nature (Roussele et al., 1996).
- Les fruits sont des baies sphériques ;
- Les racines présentent la partie la plus intéressante de la plante, par la présence des tubercules qui confèrent à la plante sa valeur alimentaire.
- Le tubercule et le germe se sont les plus caractéristiques d'une variété donnée par leur couleur et leur forme.

#### **1.4. Reproduction de la pomme de terre:**

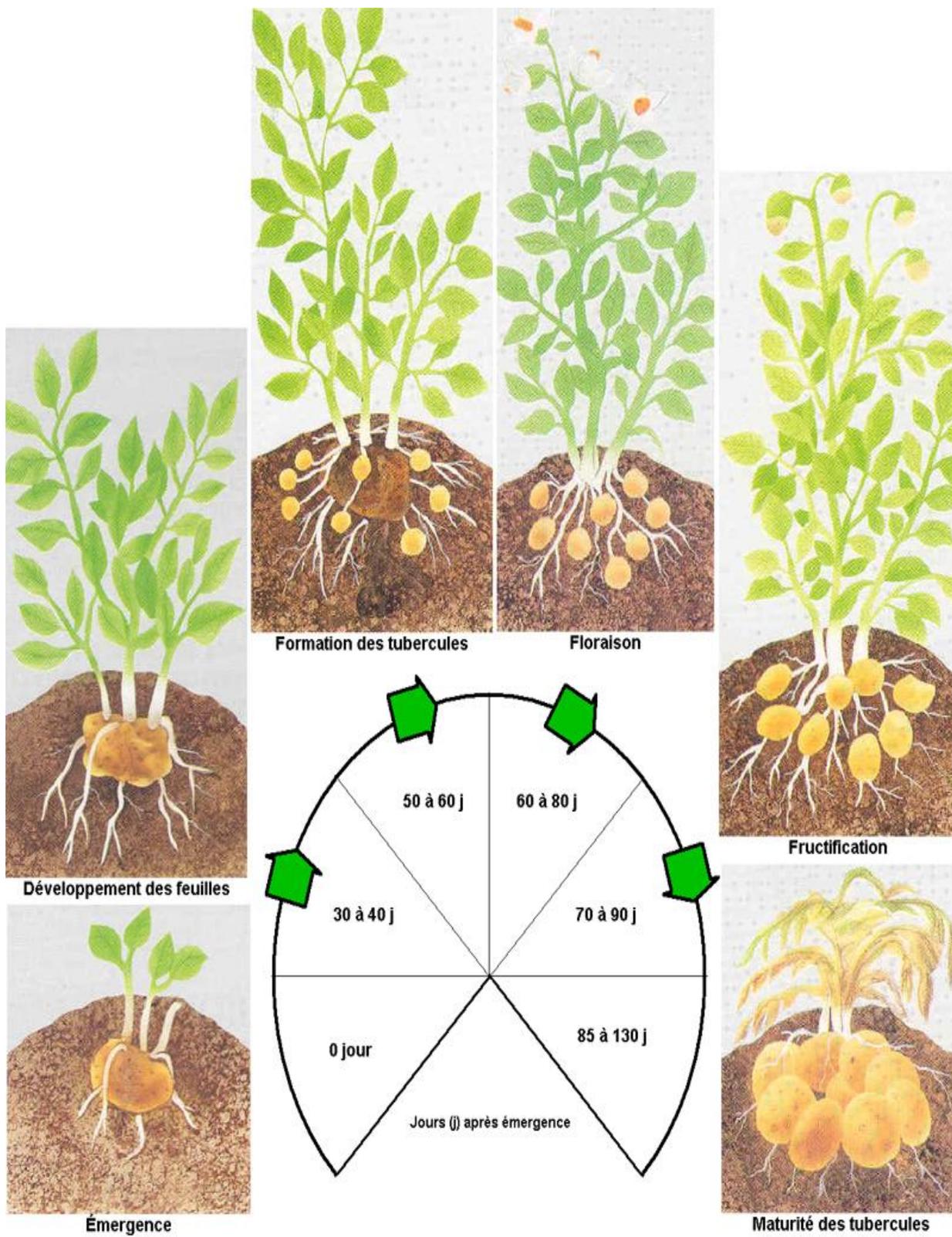
La pomme de terre est une plante herbacée qui peut être reproduite par graine (reproduction sexuée), outil essentiel pour la création variétale car elle aboutit à la formation d'individus génotypiquement différents des parents ; ou par multiplication végétative (reproduction asexuée) c'est-à-dire par plantation de tubercules.

Dans tout type de reproduction, la plante conduit à la formation de stolons, dont les extrémités gonflées par des réserves d'amidon, donnent les tubercules (Rousselle et al., 1996).

La reproduction asexuée, pratiquée dans le milieu agricole, se caractérise par la propagation d'individus génétiquement identiques à la plante- mère, aboutissant ainsi à la constitution de clones homogènes.

##### **1.4.1 Cycle végétatif de la pomme de terre:**

Le cycle végétatif est très court (trois à quatre mois), il comporte 6 principaux stades de développement présentés dans la **Figure n°2** :



**Figure N°2:** Stade de développement de la pomme de terre (Kotchi, 2004)

### 1.4.2 tubérisation :

La tubérisation est favorisée par les jours courts et les températures basses. Elle est initiée lorsque la plante a un volume de feuillage suffisant pour l'induire en vue d'assurer un rendement correct (Gallais et Bannerot, 1992).

À maturité complète, tous les tubercules de la même plante ont sensiblement le même âge physiologique quelque soit leur taille, car ils ont été initiés en un temps relativement court d'une à deux semaines (Madec et Perennec, 1960; Grisson, 1983).

#### ❖ **Physiologie du tubercule:**

Le tubercule une fois récolté passe par deux périodes :

##### ✚ **Période de dormance:**

À la récolte, les tubercules sont en général dormants (Roussele et al., 1996). On appelle aussi cette période de dormance le repos végétatif. La durée de la période dépend:

- De la variété;
- du degré de maturité à la récolte (la récolte avant maturité allonge quelque peu la période de repos);
- des températures au cours de la saison de croissance, les conditions chaudes pendant la végétation et les jours courts pendant la croissance abrègent la période de repos;
- de la température pendant la conservation ;
- de l'endommagement mécanique du tubercule (sectionnement ou blessure accidentelle) ou maladie (par exemple mildiou) (Van de zaag, 1985).

Au cours du stockage au froid, une évolution interne du tubercule conduit à la perte de la dormance, mais aussi à la production des germes à partir des yeux. Les conditions d'environnement favorables à cela sont: une température de 15 à 20°C, une hygrométrie supérieure à 90% (la germination sera presque nulle dans un air sec et à une température comprise entre 3 et 12°C)

##### ✚ **Période de croissance:**

En conditions favorables, le bourgeon terminal de l'extrémité apical du tubercule se développe en germe, et inhibe le développement des autres bourgeons c'est la dominance apicale qui progressivement

disparaît et un petit nombre de germes à croissance rapide se développent. L'augmentation du nombre de germes de plus en plus minces se poursuit, ils s'allongent ensuite se ramifient pour finir avec une tubérisation qui dure jusqu'à l'épuisement du tubercule.

### **1.5. Ressources et variabilité génétique de la pomme de terre :**

Les premiers croisements interspécifiques chez la pomme de terre ont permis d'introduire une résistance au mildiou provenant de *S. demissum*, dès 1850 (Perennec, 1982). La prise en considération de l'importance des espèces sauvages a encouragé la création de banques de gènes, l'étude génétique des espèces sauvages, ainsi que la prospection (Masson, 1990). Un grand nombre de variétés possèdent des gènes "sauvages". Ross (1986) recense parmi les variétés européennes, 97 variétés ayant dans leur ascendance *S. demissum*, 97 *S. tuberosum andigena*, 97 *S. phureja*, 41 *S. stoloniferum*, 41 *S. vernei* et 39 *S. acaule* (Gallais, Bannerot, 1992).

Les plus importantes collections se trouvent au Pérou (CIP : International Potato Center), aux Etats-Unis, en Allemagne, en Ecosse, et en URSS. Ainsi, à la Station de Génétique de Sturgeon Bay, dans le Wisconsin (Etats-Unis), quelques 6 000 types sont conservés sous forme de graines ou de tubercules. Les caractéristiques génétiques de chacun d'eux sont étudiées (Hanneman et Bamberg, 1986).

Les espèces sauvages, cultivées, ou non, ont été utilisées comme géniteurs dans des programmes d'introduction de résistances chez les cultivars. Par exemple, *S. demissum* (résistant aux virus PVY et PLRV, et au mildiou), *S. acaule* (résistant au froid, au PSTV, PLRV et aux nématodes). Des espèces sauvages, comme *S. chacoense*, ont également été choisies pour l'abondance de leurs fleurs et une bonne compatibilité avec le cytoplasme des clones de type *tuberosum*.

Un certain nombre de caractères sont à déterminisme mono ou oligogénique : les caractères de présentation du tubercule (Howard, 1970) et les résistances par hypersensibilité à certaines maladies (Ross, 1986). Pour la plus part des autres, le déterminisme est plus complexe et nécessite une approche relevant de la génétique quantitative.

L'évaluation des différents paramètres génétiques chez la pomme de terre est difficile du fait de la nature tétraploïde et hétérozygote de la totalité du matériel, de la taille importante des expérimentations, de la stérilité mâle assez fréquente et de la physiologie du plant. Ainsi, même en ne prenant pas en compte les variances d'épistasie comme cela est couramment pratiqué chez les espèces diploïdes, les dispositifs ne permettent pas d'évaluer les variances d'effet d'interaction trigénique et tétragénique.

En ce qui concerne le rendement brut, Plaisted et al. (1962), Tai (1976) et Killick (1977) trouvent une prédominance de l'ASC par rapport à l'AGC dans les croisements entre tétraploïdes.

L'AGC et l'ASC sont significatives pour le nombre et le poids moyen des tubercules dans la population tétraploïde étudiée par Killick (1977), alors que seule l'ASC pour le nombre et l'AGC pour le poids moyen sont significatives pour Tai (1976). Pour le nombre, Thompson et Mendoza (1984) trouvent une AGC largement prédominante. Ces divergences sont dues à la différence des fonds génétiques et des plans de croisements utilisés (Rousselle et al., 1988).

L'AGC pour la teneur en matière sèche est élevée chez les tétraploïdes (Johansen et al., 1967) et moyenne chez les diploïdes (Ruttencutter et al., 1979).

## **1.6 Sélection de la pomme de terre :**

La sélection amélioratrice de la pomme de terre en vue d'obtenir des génotypes performants présentant une supériorité portant à la fois ; sur les caractères cultureux (productivité, précocité, résistance aux parasites, tolérance aux stress abiotiques), et sur les caractères commerciaux (forme, tenu à la cuisson, richesse en fécule), peut être réalisée selon différentes méthodes.

La sélection au niveau tétraploïde de la pomme de terre dont le schéma adopté à la Station INRA de Ploudaniel et utilisé par la quasi-totalité des créateurs de variétés en France et à l'étranger. Ce schéma repose sur le principe suivant : croisement sexué entre géniteurs choisis sur leur valeur propre, suivi de l'élimination progressive de clones par accumulation de données. Beaucoup de caractéristiques sont à combiner dans le même génotype, sans qu'il y ait compensation, il s'agit donc d'une sélection à niveaux indépendants. En outre, ce n'est que 9 ans après le croisement que les clones conservés sont présentés à l'inscription au Catalogue. C'est donc une sélection très longue et compliquée.

La sélection au niveau diploïde proposé par Chase (1963), présente comme intérêts principaux, une simplification des ségrégations génétiques et l'utilisation des espèces apparentées diploïdes en passant par trois étapes :

L'obtention de dihaploïdes par croisement entre une variété tétraploïde et une espèce diploïde particulière (*Solanum phureja*) (Moule, 1982 ; Ducreux et al., 1986 ; Rajnchapel-Messai, 1987 ; Hougas et Peloquin, 1958) ; suivit par la création de populations diploïdes en croisant la variété ramenée à l'état dihaploïde, avec une espèce sauvage diploïde. Les meilleurs hybrides de première génération sont sélectionnés puis recroisés entre eux ou avec d'autre dihaploïdes, ainsi peut être constituée une population améliorée qui

présente une autre variabilité par rapport au groupe *tuberosum* de départ (Ducreux et al., 1986). La dernière étape est le retour au niveau tétraploïde, l'état pour lequel la pomme de terre paraît être le mieux adaptée.

La sélection de la pomme de terre en associant plusieurs techniques biotechnologiques peut être regroupée en trois grandes catégories :

- a. Reproduction avec changement au niveau de ploïdie par l'androgenèse ou la fusion des protoplastes. Le schéma le plus représentant de ce type de sélection est celui de Wenzel et al. (1979), qui ont proposé un schéma associant plusieurs étapes de culture *in vitro* et de sélection à
- b. différents niveau de ploïdie. Mais ce schéma ne fonctionne correctement que pour les gènes dominants, il faut noter aussi que l'androgenèse ne donne pas de très bons résultats chez la pomme de terre, et que la régénération et la fusion de protoplastes ne peuvent s'appliquer à tous les génotypes.
- c. Reproduction non conforme qui a été objet de nombreux travaux porté sur la variation somaclonale et son éventuel intérêt pour la création variétale. Cette méthode est intéressante pour des caractères tels que les résistances aux parasites et aux stress environnementaux.
- d. Transformation génétique. Les recherches dans ce domaine ont souvent pris la pomme de terre comme plante modèle. Des plantes transformées ont été obtenues qui présentent la résistance à des antibiotiques, des herbicides, aux virus X et Y ou aux insectes (Gallais, Bannerot, 1992).

## **2. stress salin, tolérance et amélioration des plantes à la salinité:**

### **2.1 Introduction :**

Compte tenu de la situation actuelle d'insécurité alimentaire, en particulier dans les pays en voie de développement, un certain nombre de facteurs provoquant une nouvelle diminution de la productivité des cultures ont surgis. Parmi eux, la disponibilité des terres agricoles, les ressources en eau douce, les stress biotiques et abiotiques, et les faibles activités économiques dans le secteur agricole sont les facteurs les plus importants. (Athar et Ashraf, 2009)

Toutefois, on croit généralement que c'est les stress abiotiques qui sont considérés comme les principaux sources de réductions du rendement (Boyer, 1982 ; Rehman et al., 2005 ; Munns et Tester, 2008 ; Reynolds et Tuberosa 2008).

L'estimation du potentiel des pertes de rendement est de 17% en raison de la sécheresse, 20% en raison de la salinité, 40% due aux fortes températures, 15% pour les faibles températures et 8% par d'autres facteurs (Rehmane et al., 2005 ; Ashraf et al., 2008).

#### **✚ Définition du stress et du stress abiotique:**

Le stress subi par une plante peut être défini comme toute condition (ou combinaison de conditions) qui empêche la plante de réaliser pleinement l'expression de son potentiel génétique pour la croissance, le développement et la production (Levitt, 1980).

Le stress peut être induit par une nuisance chimique ou une contrainte physique, de manière réversible ou permanente, selon que les altérations provoquées dans ces conditions disparaissent ou pas, après retour à des conditions de croissance normale (Chretien, 1992).

Un facteur environnemental qui limite la productivité des cultures ou détruit la biomasse est considérée comme un stress abiotique (Grime, 1979).

### **2.2 Présentation du stress salin :**

Le stress salin est un stress abiotique causé par l'excessivité des minéraux dans un sol. Les sols salins existent dans tous les continents sur la terre et la qualité des sols agricoles affectés par la salinité augmente à l'échelle mondiale.

La salinité affecte plus de 6% des terres de la planète. Parmi les 230 millions d'hectares actuelles de terres irriguées, 45 millions (19,5%) d'hectares sont affectés par le sel ; et parmi les 1.500 millions d'hectares en vertu de l'agriculture des zones arides, 32 millions (2,1%) sont affectés par le sel à des degrés divers (Munns, 2009).

La salinisation des sols est induite lorsque la surface du sol accumule les ions toxiques par évaporation de l'eau d'irrigation de surface ou lorsqu'elle est envahie par l'eau salée souterraine. Les sols salinisés réduisent la croissance des plantes et le rendement (Epstein, 1976). Les minéraux excessifs qui provoquent le stress salin sont essentiellement les sels solubles présents dans le sol tels que KCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, et Na<sub>4</sub>S<sub>0</sub><sub>4</sub> (Lewis, 1984).

Le NaCl qui est l'élément minéral dominant dans les sols salins, occupe 70% des minéraux des zones terrestres touchées (Epstein, 1976). Cela justifie le fait qu'il a été au centre de la plupart des études sur le stress salin à la fois *in vivo* et *in vitro*.

Le niveau de salinité des sols est exprimé en CE (conductivité électrique) et l'unité généralement utilisé est le dSm<sup>-1</sup>, tandis que dans les expériences *in vitro* sont exprimés en mM, %, mg/l ou ppm.

Une CE de 1 dSm<sup>-1</sup> est d'environ 11 mM ou 640 mg/l de NaCl (Lewis, 1984).

La salinité est devenue un problème très grave pour la production de cultures (Munns et Tester, 2008), en particulier dans les zones arides et semi- arides. En règle générale, la salinité des terres arides a été classée en trois types différents :

- zones à faible salinité (CE<sub>e</sub> 2-4 dS/m) ;
- zones à salinité modérée (CE<sub>e</sub> 4-8 dS/m) ;
- zones à salinité élevée (CE<sub>e</sub> > 8 dS/m) (Rogers et al., 2005).

Selon le type de source de salinisation, la salinité du sol peut être classée comme une salinisation primaire ou secondaire. La salinisation primaire ou naturelle résulte de l'altération des minéraux dérivés des roches mère salines ; la salinisation secondaire est causée par l'intervention humaine, tel que l'irrigation, la déforestation, le surpâturage, ou la culture intensive (Ashraf, 1994).

En se basant sur la relation du sol avec l'eau provoquant la salinisation, Rengasamy (2006) a catégorisé la salinité en 3 groupes :

- la salinité associée aux eaux souterraines ;
- la salinité non associée aux eaux souterraines ;
- la salinité associée à l'irrigation.

Il a suggéré que les connaissances au sujet de la salinité et des processus des facteurs de salinisation dominants peuvent être mis à jour avec l'aide des plus récentes techniques géophysiques. Cela sera propice pour évaluer le matériel tolérant au sel ou à déterminer jusqu'à quel niveau de tolérance de sel, les cultures doivent être munies et exigée pour une production de culture économiquement viable dans un environnement salin (Athar et Ashraf, 2009).

### **2.3 La tolérance au sel :**

La tolérance des plantes au sel est généralement raisonnée en termes qualificatifs de la capacité de la plante à résister aux effets de sels sans effets négatifs significatifs dans les zones racinaire ou sur le feuillage. Lunin et al, 1963 ; ont proposé deux règles de base pour les études sur la salinité :

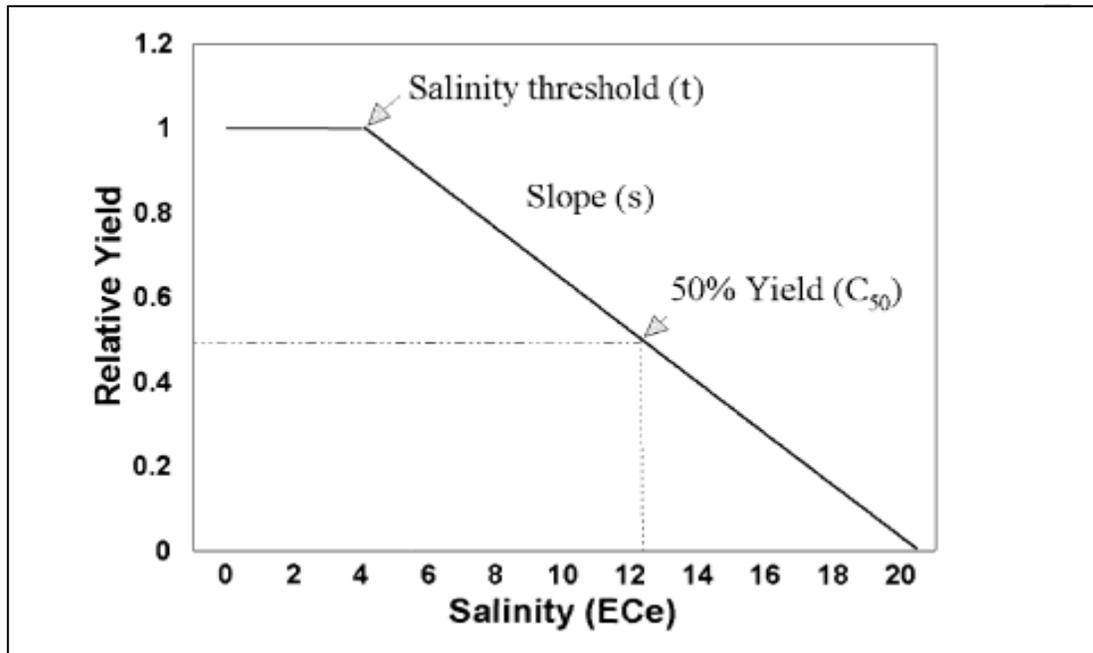
1. la tolérance réelle d'une culture donnée à la salinité varie en fonction des stades de croissance ;
2. les valeurs de tolérance à la salinité devront également prendre en considération la partie de la plante à commercialiser.

Leur étude a démontré que la salinité cause une grande réduction dans les racines que dans la partie supérieure, chez la betterave. Tandis que, la réduction du rendement pour les bulbes est inférieur à celle observée dans les parties aériennes. En outre, les gènes de tolérance au sel fonctionnent en accord avec d'autres gènes ce qui influence à la fois les caractères quantitatifs et les interactions environnementaux. Par conséquent, il n'est pas surprenant que la tolérance au sel est une entreprise complexe contrôlée par de nombreux gènes (Shannon et Noble, 1990 ; Shannon, 1996).

#### **✚ Paramètres de la tolérance à la salinité :**

En termes de sa mesure, la tolérance au sel est décrite comme une fonction complexe de rendement selon toute une gamme de concentration de sel (Maas et Hoffman, 1977 ; VAN Genuchten et Hoffman, 1984). La tolérance au sel peut être mesurée de façon adéquate sur la base de deux paramètres : le seuil (CE<sub>s</sub>), la conductivité électrique qui est la cause de la première réduction significative du rendement

maximal attendu ( $Y_{max}$ ) et la pente ( $s$ ) (figure 3). La pente est tout simplement le pourcentage du rendement attendu pour chaque unité de salinité ajouté au dessus de la valeur du seuil de salinité (CE)



**Figure N°3:** paramètres de tolérance à la salinité se rapportant au rendement relatif à l'augmentation de la salinité en zone racinaire (Shannon et Grieve, 1999).

Le rendement ( $Y$ ) peut être calculé selon la formule :

$$Y = 100 - s (CE_e - CE_t)$$

Où  $CE_e > CE_t$

Le seuil de tolérance d'une culture à la salinité c.à.d. la concentration de sel où commence la première réduction du rendement est très sensible aux interactions environnementales. Elle dépend à la fois de la précision et la méthode de mesure de la salinité.

Les données fiables des fonctions de la salinité aident les agriculteurs à faire le choix des espèces plus tolérantes dans les rotations, lorsque les données mises à leur disposition indiquent des baisses de rendement économiquement désastreuses. Ces données considérées comme fiables, peuvent ne pas l'être sous l'influence d'importants facteurs environnementaux qui présentent d'importantes interactions avec la salinité et qui sont la température, vent, humidité, lumière et la pollution de l'air.

En raison des difficultés à mesurer avec exactitude la tolérance au sel, d'autres indices de rendement ont été proposés. Il s'agit notamment de la tolérance au cours de la germination, de poids sec des tiges, des

racines, du nombre de tiges, des dommages observés sur les feuilles, l'entretien de la floraison, la taille des feuilles, le volume du couvert végétale, ou sa qualité, et la survie des plantes.

## **2.4 Réponses des plantes face à la salinité du sol et de l'eau :**

La plupart des espèces d'intérêt agronomique sont rangées dans le groupe des glycophytes, plantes dites sensibles au sel parce que leur croissance est diminuée en présence de sel dans le sol. A l'inverse, un certain nombre de plantes dites halophytes sont naturellement tolérantes au sel (Flowers, 1977).

Les halophytes peuvent vivre dans des sols dont le niveau de salinité est au-delà de 300 mM de NaCl (Flowers et al., 1977). Inversement, la productivité des glycophytes est réduite dans les sols dont la CE est de 2,0 à 3,0 dSm<sup>-1</sup> (env. 22 - 33 mM de NaCl) (Maas et Hoffman, 1977). L'effet du stress salin sur les plantes se traduit par, les effets osmotiques et les effets spécifiques des ions (Munns, 1993; Munns et al., 1995) ainsi que des contraintes nutritionnelles en diminuant l'absorption de plusieurs éléments (K, P, Ca). Le stress osmotique qui survient en premier, induit une réduction de la croissance égale dans les plantes sensibles et tolérantes. Puis le stress spécifiques des ions conduit à l'accumulation d'un niveau d'ions toxiques dans les plantes sensibles au sel, mais pas dans les plantes tolérantes parce que les plantes sensibles sont moins capables d'exclure ou de cloisonner les sels dans les cellules végétales. Les halophytes peut survivre sur des sols salés en:

- a) excluant les sels de leurs racines et / ou leur sécrétion par les glandes spécialisées sur la surface des feuilles;
- b) cloisonnant les sels dans des vacuoles de cellules (Ashraf, 1994; Shannon et coll, 1994).

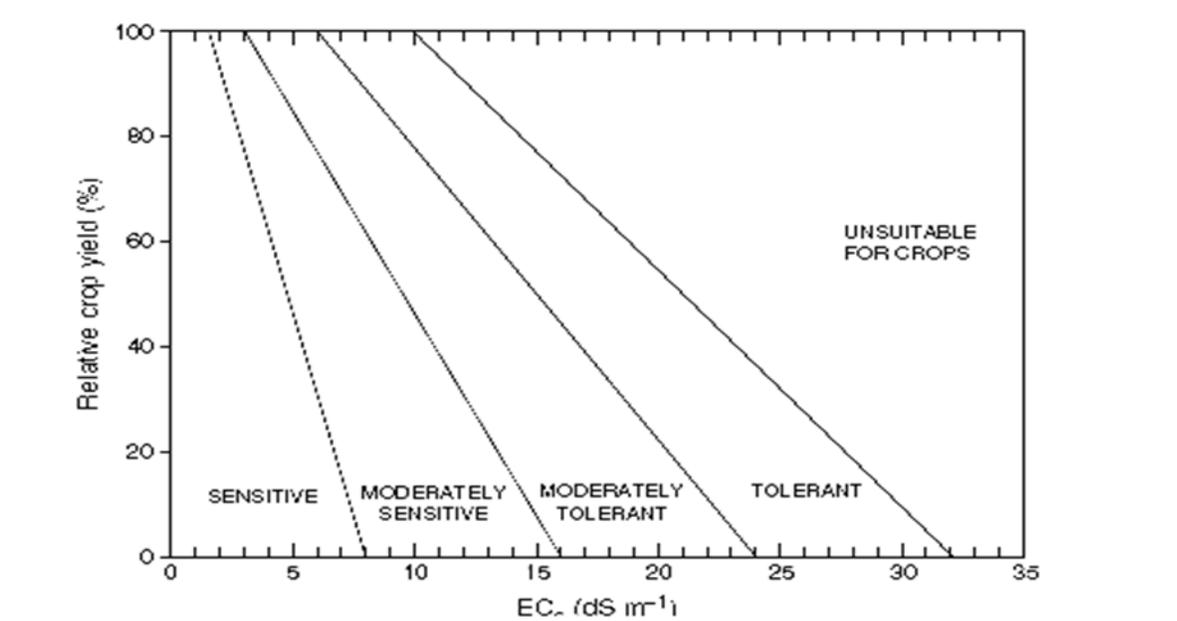
Ces deux mécanismes permettent aux halophytes d'éviter la toxicité cellulaire d'ions afin qu'ils puissent tolérer le stress de la salinité (Ashraf, 1994). Dans les conditions salines ces plantes développent habituellement des cuticules épaisses sur les feuilles. La plupart des glycophytes ne peut survivre sur des sols salins ; en vertu du faible potentiel osmotique du sol, il se produit une déshydratation et la perte de turgescence des cellules. Ensuite, soit ils prélèvent essentiellement Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> dans le sol, ou ils produisent des osmolytes différents tels que le glycérol, saccharose, ou de la proline dans le cytoplasme. Les cellules végétales accumulent de grandes quantités d'ions toxiques dans leurs vacuoles pour résister à la pression osmotique externe (Serrano et Gaxiola, 1994). Ces accumulations d'ions toxiques réduisent les activités enzymatiques et inhibent l'absorption d'autres ions, par exemple, K<sup>+</sup> et Ca<sup>+2</sup> (Serrano et Gaxiola, 1994).

Les glycophytes plus tolérants à la salinité peuvent soit exclure le sel ( $\text{Na}^+$  et / ou  $\text{Cl}^-$ ) à partir de leurs cellules par des pompes ioniques, ou de produire différents osmolytes pour compenser le stress osmotique externe (Shannon et Grieve, 1999; Tal, 1984). Les glycophytes touchés par le stress salin semblent rabougris et vert foncé avec peu de nœuds et des entre-nœuds courts (Shannon et Grieve, 1999).

Les effets osmotiques de la salinité contribuent à la réduction des taux de croissance, les changements de couleur des feuilles et du taux de maturité. Les effets ioniques se manifestent généralement par les dommages sur les feuilles et les méristèmes où se manifestent les symptômes typiques de carence nutritionnelle (Shannon et Grieve, 1999).

La figure 4 représente une classification des plantes cultivées selon leur tolérance à la salinité.

De nombreux auteurs ont évalué les effets du stress de la salinité sur la croissance végétale et la productivité. Ces expériences ont été réalisées soit *in vivo* (Ahmad et Abdallah, 1979; Bilski et al., 1988; Levy, 1992, Levy et al., 1988; Paliwal et Yadav, 1980), ou *in vitro* (Arslan et al., 1987; Morpurgo, 1991; Morpurgo et Rodriguez, 1987; Naik et Widholm, 1993) dans la pomme de terre, et dans d'autres cultures comme la luzerne (*Medicago sativa*) (Shah et al., 1993), porte-greffes d'agrumes (*Poncirus trifoliata*) (Beloualy et Bouharmont, 1993), le tabac (Nabors et al., 1980), ou le blé (Maddock et al., 1983), etc.



**Figure 4:** catégories pour la classification de la tolérance des cultures à la salinité (Shannon et Grieve, 1999).

## 2.5 Stratégies pour l'amélioration des cultures contre la salinité :

La salinité du sol ou de l'eau est l'une des principales contraintes pour les cultures ; en conséquent, il existe une demande croissante pour de nouveaux cultivars de plante qui ont un potentiel de rendement plus élevé sous l'effet des stress abiotiques. Avec les progrès actuels considérables dans le domaine de la physiologie des plantes et la biologie moléculaire, les espérances sont grandes des sélectionneurs pour obtenir des cultures tolérantes au sel avec un rendement plus élevé (Athar et Ashraf, 2009).

Diverses stratégies peuvent être adoptées pour faire face au stress salin. Toutefois, les agriculteurs et les biologistes sont parfaitement familiarisés avec deux stratégies majeures pour l'utilisation des terres touchées par la salinité, qui sont, l'approche technologique et l'approche biotique (Epstein et al., 1980 ; Ashraf, 1994).

Dans l'approche technologique, on peut modifier les sols salés par le biais de mesures expressives et pratiques de gestion qui permettent aux plantes de croître et de produire un rendement raisonnable. Cependant, ces méthodes sont coûteuses et ne sont pas toujours une solution pratique au problème de la salinité des sols.

Epstein a proposé que nous devons adopter l'approche biotique et ne pas dépendre uniquement sur l'approche technologique afin de contrecarrer le problème de la salinité (Epstein et al., 1980). Cela a été proposé principalement pour deux raisons principales :

- l'absorption et l'assimilation des éléments minéraux dont  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  sont génétiquement contrôlés et peuvent être manipulés (Ashraf, 1994; 2004; Apse et al., 1999; Tester et Davenport, 2003; Flowers, 2004; Munns, 2005; Munns et al., 2006);
- certaines plantes ont la capacité de croître sous haute conditions salines (Greenway and Munns, 1980; Ashraf, 1994; 2004; Flowers, 2004).

L'approche biotique est une approche prometteuse pour atténuer le problème de la salinité des sols du monde entier. Toutefois, récemment certaines stratégies du potentiels biologiques ont été revues pour augmenter au maximum le potentiel de tolérance des cultures à la salinité (Ashraf et al., 2008).

Au cours des dernières années, l'amélioration génétique de la tolérance à la salinité dans les génotypes cultivés a été proposée comme la stratégie la plus efficace pour résoudre les problèmes de salinité. Comme il est évident dans la littérature, il existe une variabilité génétique inter- intra spécifique de la tolérance à la salinité, elle pourrait être exploitée judicieusement pour la sélection d'une plus grande tolérance au sel. Par exemple, Moreno et al., (2000) a trouvé une grande ampleur de variabilité génotypique dans des cultivars d'haricot (*Phaseolus vulgaris L.*) pour la tolérance au sel au stade semis. Ils ont identifié certains cultivars tolérants à la salinité au stade croissance avec une grande croissance racinaire et accumulation d'éléments minéraux. Dans une autre étude, Mano et Takeda (2001) ont constaté que certains cultivars de blé tolérant à la salinité au stade semis, maintiennent cette tolérance au stade de croissance qui suit.

L'amélioration de la tolérance au sel des génotypes est souvent inhibée par le manque d'efficacité d'évaluation du stade de croissance pour identifier les génotypes tolérants (Munns, 2002; 2005). Par exemple, dans un certain nombre de cultures, la tolérance au sel est un phénomène spécifique d'un stade de développement. Ainsi, la tolérance au sel doit être évaluée à la germination des semis et aux stades adultes (Ashraf, 2004).

En revanche, en évaluant la tolérance au sel de la tomate au stade semis et au stade maturité, Dasgan et al.,(2002) suggère que la détermination au stade semis et non seulement moins laborieux, prend moins de temps et coute moins cher, mais à également un haut niveau de fiabilité.

En condition de champs, la sélection et l'amélioration des plante à la tolérance au sel sont basées et classées selon le degré d'inhibition de la croissance végétative de la plante ou le rendement (Levy, 1992; Morpurgo, 1991; Ponnampereuma, 1977 et 1984; Zurayk et al., 1993). Les études sur le stress salin sur terrain ont rencontré plusieurs problèmes communs qui influencent les résultats de classement. La salinité

du sol varie sensiblement avec le temps, l'emplacement et la profondeur du sol (Shannon, 1984). Les géotypes des végétaux ont de grandes interactions avec l'environnement (Ekanayake et Dodds, 1993). Les réactions des plantes sous stress salin varient aussi avec l'ontogenèse (Levy, 1992). Tous ces facteurs conduisent à la diminution des répétitions, ainsi que des investissements importants dans les dispositifs de suivi dans les essais en plein champ (Saxena et al., 1994; Shannon, 1984). Évidemment l'essai sur le terrain ne remplit pas les critères idéaux pour évaluer la tolérance à la salinité des cultures pour une sélection économique et efficace (Acevedo et Fereres, 1990).

L'amélioration et la sélection de la tolérance à la salinité a été accompli dans des conditions plus contrôlées :

A) les serres ou les chambres de culture sont utilisées pour les essais de cultures au stade de germination des graines ou de levée et des différents stades de croissance (Jones, 1986; Nieman et Shannon, 1976; Saxena et al., 1994). Les conditions contrôlées sous la serre éliminent les variations dues à l'environnement qui existent dans les essais sur le terrain, y compris le type de sol, le climat, et l'emplacement sur le terrain (Zeroni, 1988). La culture sur sable, la culture hydroponique, dans les chambres de culture contrôlées ; ont été utilisés pour évaluer la tolérance au sel des cultures. Il est commode de contrôler à la fois la salinité et la situation nutritionnelle dans la culture (Nieman et Shannon, 1976).

B) les systèmes de culture de tissus végétaux ont été utilisées pour la culture des plantes soit par culture de cellule ou d'organe (nœud, tige ou racine) (Tal, 1993). Par rapport aux essais sur le terrain ou en serre, la culture in vitro de cellule ou d'organes permet de tester de grandes populations dans un espace relativement petit (Wenzel et Foroughi-Wehr, 1990) et de fournir une unité expérimentale relativement homogène (Tal, 1984).

Tout en établissant la technique de sélection appropriée, il est aussi important de comprendre que les processus physiologiques et biochimiques sont les plus sensibles au stress salin et peuvent être utilisé comme un critère efficace de sélection (Ashraf 2004, Ashraf et Harris, 2004).

Par conséquent, il est très important de développer une approche d'évaluation efficace pour la sélection de géotypes tolérants à la salinité qui devrait être fiable, rapide, facile, pratique et économique.

## **2.6 Tolérance de la pomme de terre à la salinité :**

### **2.6.1 Selon des recherches effectuées in vivo :**

La pomme de terre a été classée comme sensible à la salinité par rapport à d'autres espèces (Maas et Hoffman, 1977). La croissance des plantes et le rendement en tubercules sont négativement affectés par une CE de sol de 2- 3 dS m<sup>-1</sup>(Zhang, 1998).

La pomme de terre est très sensible à la sécheresse et la carence en calcium (Abdullah et Ahmad, 1982; Bilski et al., 1988; Van Hoorn et al., 1993) deux facteurs qui ajoutent les risques de la conduite d'expériences de tolérance au sel.

Des essais en pot sur la tolérance à la salinité de 7 cultivars de pomme de terre ont révélés que le rendement de certains cultivars a augmenté à de faibles niveaux de salinité du sol (0,2- 0,4% de sels mixtes, approximativement 34 - 60mM NaCl). Les concentrations au-delà de 1% pendant l'irrigation inhibent la tubérisation de 4 cultivars parmi les sept testés (Ahmed et Abdullah, 1979).

La salinité diminue la proportion de gros tubercules en faveur de petits tubercules, moins acceptés commercialement. Autant la durée de la salinité et / ou la concentration augmente, la sensibilité de la pomme de terre augmente, en raison d'une diminution de la taille des tubercules à la moyenne (Shannon et Grieve, 1999).

Dans une étude sur terrain effectuée en U.S. au Laboratoire de salinité en 1951(Bernstein, 1959), il a été prouvé que la salinité réduit la taille des tubercules et pas le nombre et hâte la maturité de la variété «White Rose». Une réduction de 50% de rendement s'est produite à 6,2 dS m<sup>-1</sup> dans cette étude. Il a été noté que la salinité n'a pas affecté de manière significative la qualité mesurée par le pourcentage de saccharose et amidon dans les tubercules. Les concentrations de Ca<sup>2+</sup> et Cl<sup>-</sup> dans les feuilles et les tiges et celles de Na<sup>+</sup> dans les tiges ont augmenté de 3 à 4 fois sur la gamme des traitements étudiés, mais les concentrations de Na<sup>+</sup> dans les feuilles sont restées faible. K<sup>+</sup> et Mg<sup>2+</sup> dans les feuilles et les tiges n'ont pas été significativement affectés par les traitements (Maas, 1986).

Paliwal et yadav (1980) ont étudiés la tolérance du cultivar Kufri Chandramukhi au stress salin (4,20, 40 et 80 meq/l ) (approximativement 4,20,40 et 80 mM NaCl) ; ils ont constatés que ce cultivars peut croitre normalement quand le sol est irrigué avec une eau salée de 40meq/l (40mM de NaCl), le rendement diminue de 20% à une CE de 6 dS m<sup>-1</sup>. L'augmentation du taux de salinité pour ce cultivar aussi, avait un effet plus défavorable sur la taille que sur le nombre des tubercules de pomme de terre.

Dans une autre étude menée dans le Néguev par Nadler et Heuer (1995), il a été noté que la taille des tubercules, mais pas le nombre de tubercules a diminué avec l'augmentation salinité, ce qui confirme encore une fois l'observation initialement formulée par Bernstein et ses collègues.

Levy (1992) a examiné la tolérance au sel de 14 cultivars de pomme de terre en conditions de champs dans le désert du Néguev. Les irrigations ont été appliquées par goutteurs et la CE de la solution saline variée entre 1,0- 1,4 ; 3,8- 4,3 et 6,1- 6,9 dSm<sup>-1</sup> avec un rapport de 2 :1 (en poids) de Na<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup>. La salinité a retardé l'émergence de la plante, et a augmenté la sénescence, elle a réduit la croissance des tiges et des racines et tubercules, et a hâté la maturité. Les traitements de salinité aux différents stades de croissance ont des effets différents sur le rendement des tubercules. Le rendement en tubercule a été diminué de 22 à 31% lorsque le stress salin est appliqué après que les plants étaient bien établis. Les rendements ont diminués de 21- 54% lorsque le stress salin a été appliqué après la levée des tubercules. 21- 79% de diminution de rendement a été enregistrée lorsque l'irrigation est appliquée dès la plantation.

Levy (1992) a constaté que les cultivars à maturité précoce, Atica et Désirée et le clone LT4 ont été les moins sensibles à une salinité modérée. Mais parmi les 14 cultivars, on avait constaté que la relation entre le temps de maturation et de la tolérance au sel n'était pas compatible. Malgré le scepticisme de ce chercheur, l'ensemble des éléments évidents dans la pomme de terre et d'autres espèces indiquent qu'une portion de tolérance au sel peut être attribuable à une maturité plus hâtive aussi longtemps que la précocité n'est pas associée au déclin des rendements. Cette spéculation est également compatible avec l'observation que la hausse des taux de croissance permet à la plante de diluer les effets des ions qui s'accumulent dans les tissus à la suite de forte salinité (Zhang, 1998).

La tolérance à la salinité de la pomme de terre a été testée dans des expériences sous serres (Bilski et al., 1988; Levy et al., 1988). Parmi les cultivars Norchip, Norgold Russet, Red Pontiac, et Russet Burbank ; le cultivar Norgold Russet a été plus tolérant que les autres cultivars en se basant sur le critère du poids sec des feuilles et des tiges.

L'espèce sauvage de pommes de terre *S.kurzianum* s'est montrée plus tolérante au sel, par de faibles diminutions en croissance avec l'augmentation de la salinité par rapport aux cultivars Alpha et Russet Burbank (Sabbah et Tal, 1995). Il a été constaté que l'espèce sauvage a accumulé plus de Na<sup>+</sup> que les espèces cultivées, mais que l'accumulation de Cl<sup>-</sup> et la présence de Ca<sup>2+</sup> peuvent avoir des effets très significatifs sur la tolérance au sel.

Les tolérances de 6 espèces sauvages *Solanum* (*S. bulbocastanum*, *S. chacoense*, *S. gourlayi*, *S. microdontum*, *S. papita*, et *S. sparsipitum*) ; ont été testé en fonction de paramètres tels que : le pourcentage de germination des semences, le pourcentage de survie des semences, le poids sec de la végétation (Bilski et al., 1988). La croissance chez les survivants des semis a été réduite par le NaCl (40, 80, et 120 mM). L'espèce *S. chacoense* était la plus tolérante en se basant sur la survie des semences.

La germination des graines, la croissance végétative de la plante ou le rendement des tubercules étaient communément utilisés pour évaluer la tolérance de la pomme de terre à la salinité que se soit des espèces sauvage ou des cultivars.

Le nombre de génotypes ou cultivars testés dans ces expériences sont limités, allant de 1 (Paliwal et Yadav., 1980) à 14 (Levy, 1992) sur le terrain et de 4 (Levy et al., 1988) à 11 (Bilski et al., 1988) dans les expériences sous serre. Cela reflète le fait que ces tests *in vivo* présentent beaucoup de contraintes (espace, temps, coût, interactions avec différents facteurs).

### **2.6.2 Selon des recherches effectuées *in vitro* :**

Afin de surmonter certains des problèmes inhérents aux essais sur terrains, les méthodes de culture *in vitro* ont été utilisées pour évaluer la tolérance à la salinité de la pomme de terre. La culture de nœuds (Arslan et al., 1987), culture d'explant de tige (Kim et al., 1995; Morpurgo, 1991; Morpurgo et Rodriguez, 1987; Naik et Widholm, 1993), bourgeon axillaire (Potluri et Prasad, 1993); segment d'extrémité de racine (Naik et Widholm, 1993) et microtuberisation (Kim et al., 1995). Ces cultures ont été utilisées pour tester la tolérance au sel de la pomme de terre. L'évaluation de la tolérance à la salinité au niveau cellulaire se rapporte aussi à la culture de cals (Burgutin et al., 1996) et des cultures de cellules en suspension (Naik et Widholm, 1993).

Deux cultivars de pomme de terre Fruhbote et Hansa et trois espèces sauvages *S. chacoense*, *S. phureja*, et *S. sparsipilum* étaient micropropagés par culture de nœuds dans un stress de 0, 4, 8, 12 et 16 mmhos cm<sup>-1</sup> NaCl (environ 0,44, 88, 132 et 176 mM NaCl) (Arslan et al., 1987). En se basant sur la croissance des plantules après 6 semaines de culture, le cultivar Fruhbote était plus tolérant à la salinité que Hansa. Parmi les espèces sauvages *S. sparsipilum* était plus tolérant que *S. phureja*, tandis que *S. chacoense* n'a montré aucune tendance distincte.

La même expérimentation a été utilisée pour tester 20 variétés de pomme de terre vis-à-vis du stress salin à différentes concentrations de NaCl (0,50, 100, 150, 200 et 250mM) (Kim et al., 1995). En se basant sur la réduction de la croissance en poids frais total, longueurs des racines et des tiges des vitroplants, et le rendement en microtubercules. 10 des 20 cultivars ont été jugés relativement résistants à la salinité.

Six cultivars de pomme de terre ont été évalués avec la culture des bourgeons axillaires exposés aux sels de mer (Potluri et Prasad, 1993), un stress salin de 0,4 - 0,8%; environ 68- 136mM de NaCl, a inhibé la croissance des bourgeons axillaires chez tous les cultivars. Une concentration de sel (0,2%) (env. 34 mM de NaCl) a été bénéficiaire et augmente le poids sec dans la plupart des cultivars. Le ratio K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> de feuilles des plantules a été positif en corrélation avec le rendement en poids sec des plantules. La tolérance à la salinité de six autres cultivars de pomme de terre, Kennebec, Norship, Red Pontiac, Russet Burbank,

Russet Norkotah, et Superior ont été testés en utilisant le NaCl (0,0 – 250mM) avec plusieurs méthodes de cultures de tissus et avec une expérimentation sous serre (Naik et Widholm, 1993). Les facteurs d'études ont été l'enracinement des plantules issues de cultures des nœuds, de la croissance des extrémités de racines, du poids frais des cellules en cultures, et le poids de la plante entière cultivée sous serre.

Seule la croissance des extrémités de racines était en corrélation positive avec le poids frais, mais pas les autres paramètres de croissance. Sur cela, la culture des extrémités de racines pourrait être utilisée comme méthode de sélection préliminaire.

Dans une autre expérimentation Morpurgo et Rodriguez (1987) ont testé la tolérance à la salinité de 8 clones de pomme de terre micropropagés sur le milieu MS (1962) avec 120 mM de NaCl, pendant 1 mois. Parmi tous les paramètres d'études, celui du poids frais des racines a été le plus touchés par le stress du NaCl pour tous les clones.

Avec la même méthodologie, Morpurgo (1991) a testé la tolérance au sel de 10 cultivars de pomme de terre, sous un stress de 4mM NaCl. Il a aussi mené un essai sur le terrain. Les niveaux de salinité du sol varient beaucoup entre les CE de 4,0 à 7,0 dS m<sup>-1</sup> (env. 44 -77mM NaCl). Pendant la saison de croissance, le poids frais des racines était pour ces clones aussi le seul paramètre in vitro en corrélation positive avec le rendement des tubercules de l'essai sur terrain.

C'est la seule corrélation in vitro et in vivo rapportée pour l'évaluation de la tolérance de la pomme de terre à la salinité; malgré les traitements limités en NaCl in vitro et la grande gamme appliquée dans les variations du champ.

Les lignées cellulaires tolérantes à la salinité dérivées de la culture de cals d'un hybride de pomme de terre (*S. tuberosum* L. x *S. chacoense* Bitt.) sont maintenus dans 1,0 ou 1,5% de NaCl (environ 171 ou 257 mM NaCl) (Burgutin et al., 1996). Les microboutures de plantes régénérées sont cultivées dans le milieu MS contenant 0,7% NaCl (approx. 120mM). 5 des 38 lignées cellulaires dépassent nettement les hybrides en croissance végétative. La tolérance a été présente même après plus de 60 repiquages. Les plantules n'ont pas été testées en conditions de terrain. La plupart des études in vitro sur la tolérance à salinité de la pomme de terre ont utilisé qu'une seule méthode de culture, certains auteurs ont utilisé deux méthodes de culture, par exemple, culture d'entre nœuds et microtuberisation (Kim et al., 1995) mais ne les ont pas comparé.



### **3. Multiplication végétative et Sélection in vitro:**

#### **3.1 Présentation de la multiplication végétative in vitro :**

À côté des techniques traditionnelles qui font appel aux potentialités de l'organogénèse de fragments de végétaux comportant le plus souvent un ou plusieurs bourgeons (Robert et al., 1998), 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 type de plante, conditions optimales de température, de lumière, d'humidité,...).

Ces méthodes s'appliquent autant à des fragments de plante (tissus ou organes), qu'à des cellules isolées ou à des protoplastes (Robert et al., 1998; Zryd, 1988).

La culture in vitro doit toute son extension à la totipotence cellulaire des végétaux.

En principe, toute cellule diploïde possède dans son noyau la totalité de l'information caractéristique du génotype. La reconstitution d'un individu par voie asexuée à partir d'une cellule ou d'un petit nombre de cellules est l'expression de la totipotence cellulaire.

Mais dans le contexte de la vie intégrée au sein d'un individu pluricellulaire, les cellules n'expriment généralement qu'une petite partie de cette information.

Cette totipotence repose sur l'aptitude à la dédifférenciation : les cellules peuvent redevenir des cellules simple, non spécialisées et se différencier ensuite pour donner à nouveau les différents types de cellules spécialisées. (Beauchesne, 1989; Margara, 1984).

La multiplication végétative in vitro offre des avantages incontestables pour la pratique de la multiplication végétative dont:

- l'extension de la propagation végétative à un grand nombre d'espèces souvent difficile à multiplier par les méthodes classiques;
- elle est souvent associée à la lutte phytosanitaire. Les plantules obtenues débarrassées des virus, bactéries et champignons (Margara, 1984);
- reproduction intensive d'individus sur une surface restreinte avec un taux plus élevé que par les méthodes de culture traditionnelles, et le maintien de la conformité variétale du matériel;
- la possibilité de conservation au froid, ce qui facilite la constitution de « banque de gènes »;
- 
- le rajeunissement d'un végétal.

- Création de variabilité génétique, outil indispensable pour des programmes de sélections et d'amélioration des plantes

Les cultures in vitro procèdent de la même démarche : contrôler le mieux possible les facteurs de l'environnement, du fragment de la plante mis en culture pour essayer d'analyser son fonctionnement physiologique (recherche) ou de l'orienter vers un programme déterminé; néoformation de bourgeons, par exemple. Ces techniques doivent permettre de résoudre un certain nombre de difficultés :

- maintenir l'explant en vie mais aussi en activité;
- si cet explant représente une structure organisée (méristème, apex, bourgeon), lui permettre d'entrée normalement en croissance;
- si l'explant est constitué de cellules différenciées (fragment de tige, de feuille, de racine,...), induire chez ces dernières ou chez ces quelques unes d'entre elles un processus de dédifférenciation auquel devra succéder une nouvelle organisation;
- dans tout les cas, induire les divisions cellulaires.

Ces problèmes ont été partiellement résolus grâce à l'identification des régulateurs de croissance de végétaux ou phytohormones, ce sont ces substances qui paraissent déterminantes dans l'orientation que prendront les cellules mises en culture. Ces phytohormones se répartissent en 5 groupes : auxines, gibbérellines, cytokinines, acide abscissique, éthylène (Margara, 1984).

### **3.2 Les régulateurs de croissances :**

Ces diverses substances sont de nature «endogène », synthétisées par le végétal; il en existe d'autres synthétisées par l'homme dont les formules chimiques sont voisines ou différentes des substances naturelles mais qui présentent une activité physiologique similaire.

Tous ces composés ont quelques caractères communs :

- Ils agissent à très faible dose; à dose forte ils sont toxiques;
- Ils n'agissent qu'en interaction avec les autres régulateurs ;
- Ils interviennent dans de nombreux phénomènes physiologiques, ce qui implique au moins de modalités d'action;
- On note aussi la différence très importante entre régulateurs endogènes et régulateurs de synthèse : les premiers sont contrôlables par la machinerie métabolique des cellules, ils seront donc assez rapidement contrôlés ou éliminés; par contre, les seconds persistent beaucoup plus longtemps (Augé, 1989).

Les phytohormones se répartissent en 5 groupes :

### **3.2.1 L'auxine:**

Elle doit son nom à son action sur l'élongation cellulaire (auxèse)

L'auxine intervient dans de nombreux phénomènes physiologiques, son action dépend de sa concentration et de ses interactions avec les autres régulateurs. Ses plus importants effets sont :

- Une action nette sur l'élongation cellulaire, et sur la stimulation de la division cellulaire;
- Une action générale sur le métabolisme et plus particulièrement sur la synthèse d'ARN ribosomiques;
- Une action rhizogène nette.

L'auxine naturelle (AIA : acide indole  $\beta$  acétique ou acide  $\beta$  indolylacétique) est synthétisée chez toutes les plantes, cette synthèse est modulée en fonction du stade de développement. Parmi les composés auxiniques de synthèse les plus utilisées, l'acide 2,4dichlorophénoxyacétique (2,4D), qui est à basse concentration, un des facteurs important dans l'induction de la formation de cals embryogènes, cette auxine est ajoutée habituellement aux milieux de culture pour remplir cette fonction (Blake et Hornung, 1995 ;Buffard- Morel et al., 1995). L'efficacité du 2,4-D dépend de sa concentration dans le milieu de culture, et de sa disponibilité pour la plante. Après la formation complète du cal, il est nécessaire de réduire sensiblement la concentration de 2,4-D qui, autrement, peut agir comme un agent mutagène et interfère d'avantage dans l'ontogénèse (Blake, 1995 ; Loschiavo et al., 1989).

### **3.2.2 Les gibbérellines :**

La première gibbérelline identifiée et la plus utilisée, est la GA<sub>3</sub>. Les principales propriétés physiologiques des gibbérellines sont :

- Une action nette sur l'élongation des entre-nœuds; elle est active aussi pour de nombreux méristèmes qui, en son absence, présentent un aspect globuleux fait d'empilement de nœuds;
- Un effet stimulant sur le métabolisme car elles favorisent la synthèse d'enzyme hydrolysantes, elle agit également sur la teneur en auxine qui est souvent augmentée soit par stimulation des synthèses soit par inhibition des auxines- oxydases;
- S'opposent au phénomène de dédifférenciation.

### **3.2.3 Les cytokinines :**

Ce sont des adénines substituées dont on connaît deux composés endogènes (cytokinine naturel) : la zéatine et l'isopentényladénine (IPA); et des composés de synthèse dont les plus employées sont : la kinétine (6 furfuryl- aminopurine) et la benzyladénine (BAP) (6 benzyl-aminopurine).

Les cytokinines sont très actives et, à l'image des deux groupes précédents, elles sont utilisées pour maintenir l'explant en vie et l'orientation des cellules dans la voie de la dédifférenciation. Elles présentent de nombreuses actions dont les principales sont :

- Un effet très nette sur la division cellulaire, mais avec la présence de l'auxine : elles se complètent ;
- Un rôle important dans l'organogenèse où elles stimulent fortement la formation de bourgeons ; par contre, elles sont antagonistes de la rhizogenèse ;
- Une action très stimulante sur le métabolisme, d'une part en favorisant les synthèses protéiques, et d'autre part en protégeant les métabolites. Cet effet provoque un retard de la sénescence ;
- Un effet antagoniste de la dominance apicale : des bourgeons axillaires traités entrent en croissance et en compétition avec l'axe terminal. (Augé et al., 1989 ; Margara, 1984)

#### **3.2.4 L'éthylène :**

C'est un composé gazeux dont, toutes les parties de la plante, sont capables de produire. Les principales propriétés de ce régulateur, dont certaines sont voisines de celle de l'auxine, sont :

- Le déclenchement du processus de maturation des fruits ;
- La modification des corrélations de croissance sans doute par une action sur la polarité de transport de l'auxine ;
- L'action favorisante de la tubérisation (Augé et al., 1989).

#### **3.2.5 L'acide abscissique :**

Cet inhibiteur de croissance semble être synthétisé chaque fois que le végétal est en conditions difficiles (blessures, manque d'eau,..). En culture in vitro ce composé est quelque fois libéré dans le milieu et s'oxyde, ce qui provoque un brunissement et conduit souvent à la mort de l'explant, c'est pourquoi dans certaines cultures on utilise dans les milieux des substances anti- oxydantes ou encore des absorbants pour détoxifier le milieu. Il a aussi une action sur la perméabilité cellulaire aux ions potassium ; par cette action il influencerait sur la fermeture des stomates.

Il est peu utilisé en culture in vitro, selon les espèces d'une part, et les conditions de culture d'autre part, il provoque des réactions très différentes et difficilement interprétables (Augé et al., 1989).

### **3.3 Sélection de variants par la culture in vitro afin d'acquérir une tolérance aux stress:**

La multiplication *in vitro* offre à la fois des possibilités de reproduction végétative conforme ou non conforme, en fonction des méthodes et de l'explant utilisé. Ces deux types de résultats présentent des intérêts distincts.

La stratégie sur laquelle se base la sélection de variations induites par la culture *in vitro*, est de repérer un phénotype cellulaire résultant d'une modification du métabolisme due à une altération génétique.

La possibilité d'améliorer la résistance de plantes vis-à-vis de l'action des facteurs du milieu revêt une importance essentielle pour le sélectionneur. Si l'expression de la résistance au stress met en jeu très certainement différents niveaux d'organisation de la plante et implique l'interaction de divers facteurs biochimiques et physiologiques, les composantes cellulaires peuvent cependant être exploitées pour exercer une pression de sélection pour une plus grande tolérance vis-à-vis de conditions extrêmes. Des sélections *in vitro* ont donc été proposées, pour tenter d'isoler des résistants au sel, au froid, à la sécheresse, etc.

Les grandes étapes suivantes doivent être satisfaites lors de la sélection *in vitro* en vue d'obtenir de nouveaux génotypes de végétaux tolérants vis-à-vis d'un stress :

1. création de la variabilité génétique par variation somaclonale, par exemple;
2. mise au point d'un protocole de sélection;
3. suivi de la descendance des plantes sélectionnées, afin de s'assurer de la stabilité du caractère retenu (Piri et al., 1994).

L'emploi des techniques de culture *in vitro* s'est avéré efficace pour isoler des lignées cellulaires tolérantes à la salinité. Des plantes entières ont été régénérées à partir de ces cellules et la transmission à leur descendance du caractère de tolérance a été confirmée (Collin et al., 1990; Kochba et al., 1982; Zenk, 1974).

### **3.3.1 Variation somaclonale :**

L'origine des variations générées par une multiplication végétative *in vitro* a été très étudiée. Il semble qu'on regroupe sous le même terme de variation somaclonale plusieurs phénomènes. En effet, ces écarts à la conformité résulteraient de mutations de l'ADN nucléaire (Evans et Sharp, 1986) ou cytoplasmique (Wise et al, 1987 ; Hartman et al., 1987), de réarrangement chromosomique comme des translocations , des inversions, des délétions (Lee et Philips, 1988 ), de crossing over mitotiques et de réactivation d'éléments transposables (Larkin, 1987). Enfin, des amplifications de séquences répétées ont été observées chez certaines espèces dont le lin (Cullis et Cleary, 1986).

La variabilité somaclonale constitue donc l'ensemble des variations héréditaires obtenus après passage *in vitro* d'un matériel cellulaire ou tissulaire régénéré en plantes cytologiquement stabilisées avec ou sans

pression de sélection (Dubois, 1989). Les techniques de culture in vitro qui peuvent être inductrices de variations génétiques sont nombreuses (la culture de cals, de cellules et de protoplastes).

Si l'apparition de ces plantes est un handicap lorsque la multiplication conforme est l'objectif de l'expérience, elle représente une importante source de variabilité potentielle (Téoulé, 1999). En effet, les vitrovariations sont utilisées comme source pour la sélection des variétés à valeur ajoutée. En exerçant une pression de sélection sur le milieu et/ou les conditions de culture, il est possible d'orienter les vitrovariations vers l'acquisition d'un caractère intéressant par la plante. C'est le cas pour la pomme de terre, lors de l'obtention de somaclones résistants au mildiou par Behnke (1980) ; les étapes de la culture et de la sélection ont été les suivantes :

- Une population de 4000 cals issus de feuille est créée par une série de repiquages ;
- Ils sont ensuite transférés sur un milieu toxique= MS+ filtrat stérile de *Phytophthora infestans* ;
- 153 cals survivants sont repiqués sur le même milieu toxique ;
- 10 plantes régénérées à partir de ces cals sont sélectionnées ;
- Des tests pour la résistance au mildiou sont effectués sur les 10 clones cultivés en serre : le diamètre des taches de mildiou sur les feuilles est plus faible par rapport aux plantes témoins. Les clones ainsi obtenus se révèlent être plus "résistants" au mildiou.

Chez le riz une tolérance au froid et à la salinité du sol ont été obtenues ou encore chez le blé où des variétés particulièrement tolérantes à la sécheresse ont été développées par cette technique (Bouharmont, 1991).

Toutefois, l'exploitation de cette variabilité génétique, est freinée par le caractère aléatoire de l'apparition de ces variants : l'influence du type d'explant, et de la durée de la phase in vitro est observée mais non maîtrisée.

Des travaux déjà anciens (King et al., 1978 ; Thomas et al., 1979) font mention du phénomène ; Sibi dès 1974, puis Barbier et Dulieu (1980) ont suivi et étendu les investigations, respectivement, sur la laitue et sur le tabac ; en 1981, Sibi a réussi à intégrer l'utilisation des variants en amélioration des plantes. Toujours en 1981 parut un article de mise au point par Larkin et Scowcroft (1981) ; la même équipe, en 1987, a appliqué ces données à l'amélioration du blé pour des caractères tels que la capacité de tallage, la hauteur

des pailles, et divers autres caractères morphologiques et physiologiques. Beaucoup d'autres espèces ont été travaillées et étudiés par rapport à ce phénomène.

### **3.4 Méthodes de culture *in vitro* utilisées dans un programme de sélection de variants:**

Dans un programme de sélection *in vitro*, il est nécessaire comme cela à déjà été mentionné, d'induire en premier lieu une variabilité. Cette variabilité peut être acquise par une culture de cals de cellules ou de protoplastes ; avec ou sans agents mutagènes. Ensuite, orienter les variations par une pression de sélection vers le caractère recherché (selon le protocole de sélection déterminé). Enfin, les variants sélectionnés sont régénérés soit par embryogénèse somatique ou par organogénèse (bourgeonnement).

Selon le protocole utilisé dans de nombreux travaux, comme celui sur le riz (Bouharmont, 1991), citrus (Beloualy et Bouharmont, 1993) ; la variabilité génétique est obtenue par la culture de cals. Les cals, ces amas cellulaires dédifférenciés sont induits à partir de différents explants (anthère, embryon, tige, racine, feuille, etc.). Dans ce mémoire les explants utilisés en callogénèse sont issus de plants de pomme de terre propagés *in vitro*.

#### **3.4.1 Micropropagation :**

La micropropagation est une technique en plein essor, elle consiste à une rapide propagation d'individus identique à la plante mère. L'objectif majeur de cette technique est l'obtention d'un grand nombre de plantes clones dans un temps court en préservant leur état sanitaire de départ.

Le processus de multiplication est généralement divisé en phase suivante :

- **Phase 1** : établissement de la culture aseptique.

L'objectif de cette phase est d'obtenir une culture aseptique réussie de l'espèce à multiplier. Cela se traduit par l'obtention d'un pourcentage d'explants vivants en culture aseptique ainsi qu'une vitesse de croissance suffisamment rapide (Augé et al., 1989).

Chez la pomme de terre on part d'un germe, prélevé sur un tubercule à un stade physiologique adéquat (période de croissance active), déclaré sain. Après stérilisation, le germe est sectionné en fragment comportant un nœud. Ces nœuds sont implantés en tube sur un milieu gélosé et les tubes sont placés dans des conditions favorables à la croissance de la pomme de terre. Le bourgeon du nœud donne alors naissance à une tige vigoureuse à feuille relativement grandes (Rossignol- Bancilhon et al., 1980; Rossignol, 1988).

- **Phase 2** : la multiplication.

Le but est d'obtenir rapidement un grand nombre d'unités de multiplication qui pourront donner en fin de processus des plantes entières (Augé et al., 1989). Les tiges formées précédemment sont fragmentées à leur tour en boutures à un nœud et repiqués dans un milieu neuf de même composition et ainsi de suite. Le système de production est de 5 à 7 nœuds par mois (Nozeran et al., 1977).

Au bout de quelques repiquages, les plantes obtenues deviennent progressivement, comparables à celles issues de la germination d'une graine, c'est-à-dire, présentent une tige grêle, portant uniquement des feuilles simples, de tailles variables mais toujours petites et n'émettent des racines adventives que vers la base (Nozeran et Bancilhon, 1972; Nozeran et al., 1977; Rossignol, 1988) c'est ce qu'on appelle le stade juvénile.

Plusieurs repiquages, le plus souvent sont nécessaires pour obtenir une structure morphologique en phase juvénile. Le nombre de ceux-ci est fonction de la variété utilisée, de l'état d'incubation du tubercule mère et aussi des conditions écologiques tout à fait particulières dans lesquelles sont placées les explants (Nozeran et al., 1977).

Le milieu de culture de base, le plus souvent utilisé en micropropagation de la pomme de terre est celui de Murashige et Skoog (1962) (Miller et al., 1985) additionné de 20-30 g/l de saccharose (Wang et Hu, 1980); il n'est pas nécessaire d'utiliser des régulateurs de croissance (Hussey et Stacey, 1981; Levy, 1985; Haberlach et al., 1985), mais Hu et Wang (1983) recommande l'addition de 0,001 mg/l NAA et Estrada et al. (1986) recommande l'addition de 0,25 mg/l GA<sub>3</sub>.

Le tableau 1 présente les plus importants protocoles de micropropagation de la pomme de terre utilisés dans de nombreux travaux.

**Tableau 1:** Présentation des protocoles les plus utilisés pour la micropropagation de plantules de pomme de terre.

Références	Variété étudiée	Nature de l'explant	Milieu de culture	Conditions de culture			Durée de la culture
				Intensité lumineuse	photopériode	température	
Seabrook et Douglass, 2001.	18 variétés	Entre nœuds	MS avec: - 30 g/l saccharose - 6,5g/l Agar	100 $\mu$ mol/m <sup>2</sup> s	16/8 h	19 $\pm$ 1°C	4 semaines
Nouri-Ellouz et al., 2006	4 clones dihaploïdes	Entre nœuds	MS avec: -Vitamines de Morel et Wetmore (1951) - 30 g/l saccharose - 8 g/l Agar	62 $\mu$ E/ m <sup>2</sup> s	12/12 h	20°C	4 semaines
Silva et al., 2001.	Baronesa Kaisalla ugro	Entre nœuds	MS avec: -1 mg/l thiamine - 2mg/l pantothenate de calcium - 1 mg/l GA <sub>3</sub> - 30 g/l saccharose - 7 g/l Agar - pH 5,8	36 $\mu$ mol/m <sup>2</sup> s	16/8 h	26 $\pm$ 2°C	/
Levy , 1985.	Idit Orit Clone 8	Entre noeuds	MS avec: - 30 g/l saccharose - 12g/l Agar	316 $\mu$ W (cm <sup>2</sup> ) <sup>-1</sup>	16/8h	20-26°C	3-4 semaines
De Garcia et Martínez , 1995.	Désirée	Entre nœuds	MS avec: - 0,8mg/l thiamine - 0,1 mg/l GA <sub>3</sub> - 25 g/l saccharose - pH 5,6	/	/	/	4 semaines
Zhang , 1998.	11 variétés	Entre nœuds (1 cm)	MS avec : - 2 mg/l panthotenate de calcium - 0,4mg/l thiamine - 0,5 mg/l niacin - 30 g/l saccharose	40 $\mu$ mol/m <sup>2</sup> s	16/8 h	23 $\pm$ 2°C	3-4 semaines

### 3.4.2 Callogénèse :

Elle part de la mise en culture *in vitro* de divers fragments de plantes dépourvues de bourgeons (portions de feuilles, de tige ou de racine) (Ducreux et al., 1986 ; Rossignol, 1988) ou de protoplastes isolés (Shepard, 1982) sur un milieu de culture enrichi en substances de croissance, qui provoque une désorganisation importante des tissus végétaux, conduisant à une prolifération anarchique et à la formation de masses inorganisées (dédiérenciées) nommées cals (Ducreux et al., 1986) ou micro cals lorsqu'ils sont issus de protoplastes (Shepard, 1982).

Le rapport des régulateurs de croissance de plantes utilisées dans un milieu de culture semble souvent déterminer si la croissance et le développement procède d'une façon inorganisé ou pas. Skoog et Miller (1957) dans leur étude sur l'organogénèse *in vitro* ont démontré que la callogénèse est induite quand le rapport auxine/cytokinine est équilibré. Murashige et Skoog (1962) suggèrent un rapport auxine/cytokinine de 10 :1 à 25 :1 (AIA/Kin exprimé en poids) pour maintenir la croissance sous forme de cals. Winton (1972) a maintenu la croissance de cals du sapin avec un rapport auxine/ cytokinine de 1 :1 à 50 :1 (exprimé en poids). Brown et Lawrence (1968) rapportent que le 2,4-D favorise une meilleure croissance de cals que l'AIA à la même concentration dans les recherches effectuées sur le sapin.

En plus du milieu de culture et des conditions environnementales de la culture, la culture de cals est influencée par la taille et la nature de l'explant, car plus il est grand, plus l'équilibre endogène est déterminant ; ainsi, le milieu n'aura qu'une influence limitée. Par contre, un explant de petite taille sera plus facilement orienté par les substances contenues dans le milieu. Les tissus épidermiques sont les plus réactifs, les tissus corticaux ou cambiaux présentent également de bonnes réactions; les parenchymes médullaires sont les moins réactifs : ils demandent un ensemble assez complet de régulateurs (Augé et al., 1989).

Selon la composition du milieu de culture, les équilibres hormonaux, et l'état physiologique de l'explant, on observe des différences dans la structure et le comportement des cals obtenus :

- Certains sont friables à croissance rapide et incapables de donner naissance à de nouvelles plantes.
- D'autres sont compacts, à croissance lente susceptibles de produire des tiges néoformées (Ducreux et al., 1986 ; Rossignol, 1988).

Le cal est un tissu à croissance rapide, facile à cultiver, à partir duquel deux voies d'évolution sont possibles:

- Soit l'entretien par fractionnement en éléments plus petits, repiqués sur un nouveau milieu solide. Les conditions d'accroissement du cal sont identiques à celles de l'initiation; seules les concentrations en auxine et cytokinine sont plus faibles, et une application de pressions sélectives si on cherche à isoler un caractère donné.
- Soit la multiplication végétative par néoformation d'organes ou d'embryons. L'organogénèse peut en effet s'établir secondairement à partir du cal, par suite de la mise en place d'un programme de morphogénèse dans les cellules qui se sont activement divisées. Des méristèmes sont alors initiés sur un milieu solide approprié et se développent en une plantule. Enfin dans certaines conditions, on peut obtenir par culture de fragments de cal des amas pluricellulaires au sein desquels les divisions orientées provoquent l'apparition d'une polarité comparable à celle, typique, des embryons zygotiques, amas qui se développent par la suite en plantule : ce sont des embryons somatiques car ils se forment en dehors de tout phénomène sexué (Robert et al., 1998).

Pendant les phases de formation puis de croissance d'un cal, des changements au niveau du nombre et de la structure des chromosomes se produisent fréquemment. Les cals pourront être soumis à un traitement mutagène pour augmenter les chances de mutation, puis être transférés sur un « milieu sélectif » contenant par exemple des concentrations sublétales de NaCl, ou un filtrat toxique, ou un herbicide, ou tout autre substance toxique. Les cals survivants au milieu toxique sont supposés résistants.

Ce système (culture de cal) de variation génétique est intéressant car il ne perturbe pas trop fortement le génome, les fréquences de variations observées sont souvent plus faibles par comparaison avec la culture cellulaire. On pourra obtenir des mutations ponctuelles sans "modifications parasites" d'autres caractères agronomiques.

### **1.4.3 Régénération par organogénèse et embryogénèse somatique :**

La régénération in vitro de plantule se fait généralement par organogénèse (bourgeonnement) ou par embryogénèse somatique.

#### **a. Embryogénèse somatique :**

Les embryons provenant d'un tissu non constitué de cellules zygotiques mais à partir de cellules somatiques sont appelés embryons somatiques, c'est donc une embryogénèse asexuée (Zryd, 1988). Un embryon somatique peut être obtenu à partir de cals ou de suspension cellulaire.

Cependant, ils ne doivent pas être confondus avec des bourgeons. Ils possèdent une structure bipolaire (axe tige-racine), sont sans connexion vasculaire avec le tissu sous-jacent, et peuvent donc être facilement séparés de celui-ci. Les premières feuilles ont l'aspect typique de cotylédons (Zryd, 1988).

C'est Radhavan (1976) qui, le premier, observe le phénomène; peu après, Tissert et al. (1979) publièrent une étude approfondie de l'embryogénèse somatique chez les angiospermes. Nabors (1983), Smith et Murashige (1984) développent une étude quantitative du phénomène; le groupe de Vasil (1984) étudie l'embryogénèse chez le millet. Des travaux ont été menés sur le blé, le maïs, le seigle, l'orge, le riz; la génétique de la régénération a été étudiée sur le maïs (Dubois, 1989).

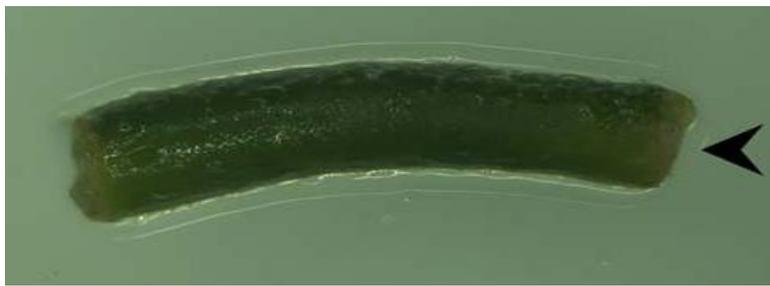
L'induction de l'embryogénèse somatique, se fait en premier temps, par le placement de l'explant dans un milieu primaire contenant de l'auxine où les cellules subissent un processus de différenciation. Durant cette période, les cellules se multiplient pour former des amas globulaires ou amas proembryogènes. Les cellules constituées de ces amas sont caractérisées par un cytoplasme dense et une taille réduite. Après cette période d'initiation embryonnaire, le transfert dans un milieu secondaire sans auxine permettra le développement des embryons.

Exceptionnellement, chez quelques espèces, il n'est pas toujours nécessaire de transférer le cal, l'initiation et la maturation embryonnaire peut se produire sur le même milieu; cependant, le repiquage dans un milieu secondaire est indispensable pour assurer la croissance normale des plantes.

Les embryons somatiques se développent lorsque le cal a été transféré dans un milieu sans auxine ou contenant une faible dose de celle-ci, on peut donc comprendre pourquoi dans certains cas les anti-auxines (ac. 2,4,6- trichlorophénoxyacétique, ac. p-chlorophénoxybutyrique) peuvent avoir une action efficace sur cette expression embryogène (Hanower et Hanower, 1984).

Il paraît nécessaire que l'embryon somatique, à l'exemple de l'embryon zygotique, trouve son origine dans une seule cellule jouant un rôle analogue à celui du zygote. Or, comme Reinert l'a remarqué dès 1959, beaucoup d'embryons somatiques se forment au sein de masses parenchymateuses où il est très difficile de suivre les étapes de l'évolution des cellules.

Plusieurs travaux sur l'induction de cals embryogènes chez la pomme de terre ont été effectués, trois d'entre eux sont présentés dans le tableau 2.



(a)



(b)



(c)

---

**Figure 5:** induction d'embryogénèse somatique chez (*Solanum tuberosum* L. var. Désirée) sur un milieu contenant 5 $\mu$ M 2,4D. (a) explant de tige fraîchement coupé; (b) après 14 jours explant gonflé et induction de cal sur les extrémités; (c) après 35 jours transfère sur un milieu sans 2,4D et apparition des embryons somatiques (Sharma et al., 2008).

**Tableau 2:** Présentation de quelques protocoles d'embryogénèse somatique à partir de cals chez la pomme de terre.

Références	Variété étudiée	Nature de l'explant	Milieu de callogénèse	Milieu d'embryogénèse	Conditions de culture			Durée de la culture	
					Intensité lumineuse	Photopériode	T°C		
Vargas et al., 2005.	Désirée	tige (1-1,5 cm)	MS avec: - 25 g/l de saccharose - 4mg/l 2,4D - 2g/l gerlite - pH 5,6	MS avec: - 25 g/l saccharose - 50 mg/l acide citrique - 50 mg/l acide ascorbique - 0,5mg/l zéatine - 100 ml/l lait de coco 2g/l gerlite pH 5,6	obscurité	0/24 h	25 ± 1°C	2 mois	30 jours
Seabrook et Douglass , 2001.	18 variétés	Tige, feuille (1-1,5 cm)	MS avec: - 30 g/l de saccharose - 19 µM AIA - 0,15 µM BAP ou TDZ - 6,5g/l Agar	MS avec: - 30 g/l saccharose - 12 µM zéatine - 50 µM AIA - 550 nM GA <sub>3</sub> - 6,5g/l Agar	100µmol/m <sup>2</sup> s	16/8 h	19 ± 1°C	7-14 jours	2 à 7 semaines selon la variété
De Garcia et Martinez, 1995.	Désirée	tige (4-8mm)	MS avec : -(0,5;1;2 et 4mg/l) 2,4D avec et sans 1% d'extrait de levure. - 2g/l de gerlite - pH 5,6	MS avec : -2mg/l 2,4D avec et sans 1% d'extrait de levure.	50µmol/m <sup>2</sup> s	16/8 h	23 ± 1°C	1 mois	3 mois (repiquage tous les 4 semaines)

## **b. Organogénèse :**

L'organogénèse 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, elle aboutit à la formation d'un nouvel individu par l'élaboration de bourgeons (caulogénèse) et de racine (rhizogénèse).

La caulogénèse désigne à la fois l'initiation et le développement des bourgeons terminaux, axillaires, adventifs ou néoformés sur un cal. 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 n'importe quel type d'organe ou de tissu y compris sur ceux qui ne les produisent pas dans les conditions naturelles (Camefort, 1977; Zryd, 1988; Margara, 1989).

La rhizogénèse désigne la néoformation et la croissance de racine. Les racines néoformées, au sein d'un cal, peuvent être considérées comme un cas particulier de méristèmes adventifs (rhizogénèse indirecte) ou l'émission de racines sur un explant dans des endroits inhabituelles (rhizogénèse directe).

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 caulogénèse se manifeste à partir de certaines catégories de tissus telle que: le cambium, le parenchyme vasculaire ou libérien (Belanger, 1998; Fortes et Pais, 2000). L'intensité de cette néoformation est nettement dépendante de la nature des tissus contenus 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).

Quant à la rhizogénèse, c'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).

### **3.4.4 Facteurs de la régénération :**

Les facteurs influant la régénération *in-vitro* peuvent être répartis en 2 groupes. Le premier représente les facteurs internes (ceux liés à la plante) et concerne d'une part le génotype, la nature et l'âge de l'explant et d'autre part l'état physiologique de la plante mère sur laquelle l'explant a été prélevé. Le second réunit les

différents facteurs externes qui sont les milieux (notamment leur composition en régulateurs de croissance et les sucres) et les conditions de cultures.

a. Effet de l'explant :

Généralement dans les cultures *in-vitro*, les explants les plus jeunes sont privilégiés (embryons immatures, jeunes feuilles, méristèmes etc.) car c'est l'état juvénile qui semble offrir le plus de possibilités de régénération (Davis, 1986., Saadi, 1991). La taille de l'explant est aussi à prendre en considération car plus elle est importante et plus les équilibres endogènes sont déterminants. La taille choisie varie selon la nature de l'explant, si le tissu végétal est de nature organisée, un ensemble assez complet sera nécessaire (soit un noeud , un apex , ou un bourgeon entier ) mais dans le cas d'une structure différenciée ( éléments de feuilles , de tige, de racines ,inflorescence..) des fragments de 5à 10 mm suffiront ( Zryd, 1988., Auge et *al.*, 1989; Hannweg et *al.* , 1996).

b. 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 (Auge et *al.* , 1989) . Cependant, plusieurs auteurs mentionnent que seulement certains génotypes paraissent posséder la capacité d'induire une embryogenèse somatique. Cette capacité, chez beaucoup d'espèce semble être génotypiquement contrôlé (George et Sherrington , 1984 ., Brown, 1988 ; Dodeman et *al.* , 1997 ) .

c. Effet du milieu de culture :

Les milieux de culture sélectionnés doivent être le plus parfaitement adaptés aux besoins nutritifs de la plante soumise à l'étude afin de lui laisser la possibilité d'exprimer pleinement son potentiel génétique. Les principaux constituants d'un milieu de culture sont généralement représentés par les macroéléments et les micro-éléments, une source carbonée et azotée, des vitamines et des régulateurs de croissance.

Le milieu de culture de base MURASHIGE et SKOOG (MS) a été employé d'une manière générale pour tous les types de cultures *in-vitro*. Mais c'est essentiellement pour le déclenchement de l'organogenèse, en particulier pour la néoformation de bourgeons qui s'est révélé nettement supérieur à d'autres milieux (MARGARA, 1989). Il existe deux composantes majeures du milieu qui peuvent

intervenir dans l'orientation du phénomène de morphogenèse et qui sont représentées par les régulateurs de croissances et la source de carbone.

-Effet des régulateurs de croissance :

Aucun régulateur de croissance ne provoque une initiation directe du phénomène d'organogenèse ou d'embryogenèse somatique, mais il interfère dans de nombreux métabolismes internes de la cellule végétale. Les deux hormones, les plus souvent utilisés, d'une manière conjointe ou séquentielle, sont les auxines et les cytokinines. Nitsh et Nougarede (1967) ont montré que des explants de parenchyme médullaire de tabac cultivés *in-vitro* dans un milieu ne contenant ni auxine, ni cytokinine ne prolifèrent pas. Il en était de même lorsque seulement une auxine ou une cytokinine était incorporée au milieu. Par contre, la prolifération cellulaire se déclenchait lorsque ces deux substances sont présentes dans le même milieu de culture.

Le rapport hormonal (auxine/ cytokinine) conditionne, en grande partie, le type de néoformation obtenu. Ce rapport a conduit, dans le cas de la culture *in-vitro* du parenchyme médullaire de tabac, par exemple, à l'orientation des tissus, soit vers la caulogenèse, soit vers la rhizogenèse (Skoog et Miller, 1957 in Zryd ,1988). Ainsi la néoformation de bourgeons est souvent favorisée par des teneurs élevées en cytokinine (Margara , 1989) alors que les fortes doses en auxines stimulent la formation de racines et améliorent leurs qualités (Druart, 1992, Hobbie, 1998; Abrie et Stadn , 2001; Compton et *al.*, 2001).

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, d'ajouter au milieu de culture l'un ou l'autre des deux régulateurs précités pour parvenir à une réponse morphogénétique (Seon et *al.* , 1998). Dans ce cas précis, nous pouvons citer deux exemples : le premier, concerne le Triticale où l'organogenèse a été obtenue en se servant uniquement d'auxine (milieu dépourvu de cytokinine) (Vikrant et Rashid , 2001) ; le second, touche l'espèce *Piper barberi gamble* où l'équipe d'Anand et Rao,(2000) a obtenu des bourgeons néoformés en utilisant des cytokinines seules dans le milieu d'induction.

Donc, l'efficacité des différentes auxines et cytokinines sur l'organogénèse varie essentiellement avec le matériel végétal employé. Tout comme l'organogenèse, Les régulateurs de croissance de type auxine et cytokinine sont aussi indispensables à l'embryogenèse somatique.

La production d'embryons somatique est généralement obtenue en deux phases de culture, sur des milieux qui diffèrent essentiellement par leurs concentrations en régulateurs de croissance (Auge et *al.*, 1989). Par exemple, chez la carotte ou la luzerne, les embryons sont obtenus en deux phases: Une phase dite d'*induction* réalisée sur un milieu souvent riche en régulateurs de croissance en particulier en auxines permet la formation et / ou la prolifération des cellules embryogènes. Ces cellules n'évolueront en embryons qu'au cours d'une deuxième phase dite de *développement* qui se réalise au moyen d'un transfert de tissus induits, sur un nouveau milieu moins riche, voire dépourvu de régulateurs de croissance essentiellement en auxines (Saadi, 1991 ; Giorgetti et *al.*, 1995) . Le transfert des tissus d'un milieu riche en auxine vers un milieu pauvre n'est pas toujours indispensable pour le déroulement des différentes phases annoncées précédemment.

-Effet de la source de carbone :

Les tissus en cultures *in-vitro* sont largement hétérotrophes vis à vis du carbone en raison de l'absence ou de l'insuffisance de l'assimilation chlorophyllienne. Il est donc indispensable d'ajouter une source carbonée (des glucides) au milieu de culture. Les glucides remplissent deux fonctions principales dans les milieux de culture ; ils fournissent de l'énergie nécessaire pour la croissance des tissus et maintiennent une pression osmotique donnée du milieu de culture (Zryd, 1988). Cette pression osmotique, peut avoir diverses actions sur les tissus. Elle agit, dans certains cas, sur l'orientation ou l'expression morphogénétique des tissus (Belaizi et Boxus, 1995; Charniere et *al.*, 1999), dans d'autres, sur la maturation des embryons somatiques produits (Walker et Parrott, 2001) .

L'organogenèse ou l'embryogenèse somatique ne semblent pas être influencées uniquement par la nature des sucres mais aussi, et pour un même sucre, par sa concentration dans le milieu de culture. Dans ce cas, l'exemple du tournesol est très significatif, l'usage d'une concentration de 12% en saccharose peut orienter le processus vers la voie de l'embryogenèse somatique, alors qu'une concentration de 3 % conduirait vers la néoformation de bourgeons (Charniere, 1999).

### **3.5 La recherche de la tolérance à la salinité in vitro par la culture de callosités et de cellules:**

La tolérance à la salinité de lignées a pu être obtenue dans de nombreuses espèces végétales par la sélection in vitro (Tal, 1993). Parmi les lignées cellulaires sélectionnées pour la tolérance à la salinité, à partir de 24 genres de 12 familles, 90% d'entre eux sont stables pour la tolérance au sel, 40% des plantes

régénérées ont été vérifiées et prouvées tolérantes au sel. La tolérance dans 20% des plants régénérés a été héritée par les générations R1, R2 ou R3 (Ram et Nabors 1985 ; Tal, 1990).

Les méthodes de sélection par la culture in vitro peuvent être divisées en générale en deux catégories :

- a. en une étape ou à court terme ;
- b. étape par étape ou à long terme.

La sélection en une étape consistera à exposer avec vigueur croissante des cals à des concentrations sublétales de sel, généralement de 80 à 200 mM de NaCl. Les cals qui sont capables de croître normalement (similaire au témoin) dans ce milieu sont transférés dans un milieu de régénération sans sel. En utilisant cette méthode, la tolérance à la salinité a été obtenue à partir de cultures de cals de luzerne (*Medicago sativa* L.) (Winicov, 1991) de porte-greffes de citrus (Bouharmont et Beloualy, 1993), de la moutarde indienne (*Brassica juncea*) (Kirki et al., 1991), lin (*Linum unum* L.) (Rowland et al., 1989), et de la betterave à sucre (*Beta vulgaris* L.) (Freytag et al., 1990).

La méthode de sélection par étapes consiste à soumettre les cellules à des niveaux relativement élevés de sel ; habituellement, de 150- 300 mM NaCl. En utilisant cette méthode, 50- 95 % des cellules meurent, et les plantes régénérées seront sélectionnées à partir des cellules survivantes par des repiquages successifs (Bressan et al., 1985).

Des plantules régénérées à partir de cultures de cals d'un hybride de pomme de terre (*S. tuberosum* L. X *S. chacoense* Bitt.) exposé à un stress de 200 mM de NaCl (Burgutin et al., 1996). Les explants d'hybrides et les plantules régénérées sont cultivés pendant 60 générations dans un milieu contenant 7% de NaCl (env. 120 mM). La croissance végétative des plants régénérés est significativement meilleure que celle de l'hybride. Les auteurs n'ont pas testés et confirmés la tolérance au sel des plantules régénérées dans les conditions de terrain.

# Chapitre 2 : Matériels et méthodes

## **1. Etapes et objectifs de l'expérimentation :**

L'objectif général de ce travail est d'obtenir des cals de *Solanum tuberosum* L. var. Kondor et Spunta, tolérants à la salinité. Pour atteindre cet objectif il est nécessaire de passer par trois grandes parties qui sont :

### **Partie 1 :**

L'objectif de cette partie est d'obtenir des cals permettant la régénération de plantules. Cette partie comporte:

Une première phase de micropropagation pour :

- l'obtention de vitroplants conformes à la plante mère ;
- assurer le maximum de matériel végétal de départ pour les étapes suivantes ;

Une deuxième phase de callogénèse et de régénération afin :

- d'étudier la callogénèse pour trois types d'explants (tiges, feuilles et racines) ;
- de rechercher un milieu qui permet :
  - L'induction de cals;
  - L'obtention de cals avec une bonne croissance, consistance et texture ;
  - L'obtention de cals permettant la régénération soit par la formation d'amas proembryogènes, soit par la formation de bourgeons.
- de sélectionner un milieu de callogénèse adéquat pour chaque type d'explant;
- de déterminer le ou les types d'explants qui ont permis le développement du type de cal recherché ;
- de développer des embryons somatiques ou des bourgeons dans un milieu adéquat;
- de régénérer des plantules à partir des cals ;
- de multiplier des cals sur le milieu choisi afin d'avoir un grand nombre pour la phase de sélection;

### **Partie 2 :**

L'objectif de cette partie, est de déterminer la tolérance à différentes concentrations de NaCl pour les deux variétés étudiées. Pour cela deux expérimentations ont été menées :

Expérimentation 1 :

Dans cette phase en conditions *in vivo*, un essai en pot est conduit sous serre, sur la tolérance à la salinité au stade émergence et début de développement des feuilles, des deux variétés étudiées. Cet essai va

permettre de déterminer la tolérance et les concentrations létales de NaCl pour chaque variété et de les comparer avec ceux obtenus dans la deuxième expérimentation, car la détermination à ce stade de développement prend moins de temps, et peut avoir un haut niveau de fiabilité; cela a été constaté chez d'autres espèces de la même famille notamment la tomate.

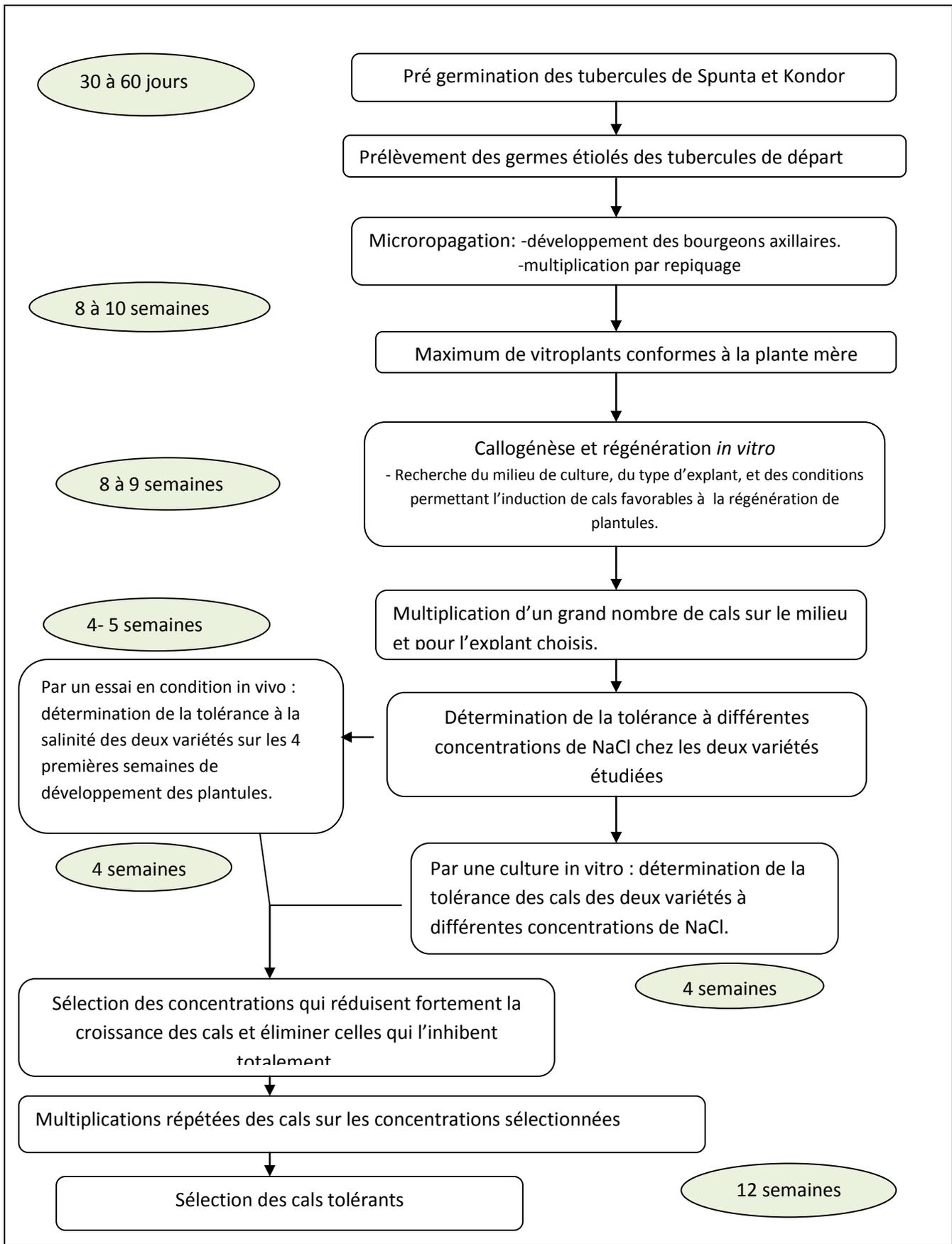
Expérimentation 2 :

Détermination de la tolérance des cals des deux variétés à différentes concentrations de NaCl. La sélection des concentrations qui réduisent fortement la croissance des cals et éliminer celles qui inhibent totalement la croissance des cals et provoque leur mort, en comparant les résultats avec ceux de la première expérimentation;

### **Partie 3 :**

L'objectif de cette partie est d'obtenir des cals variants qui tolèrent la salinité ; les étapes sont :

- Multiplication répétée des cals sur les concentrations sélectionnées dans la deuxième partie;
- Sélection des cals tolérants aux concentrations étudiées ;



**Figure 6:** Schéma représentant les étapes du protocole expérimental.

## **2. Matériel végétal :**

Cette expérimentation a concerné deux variétés de l'espèce *Solanum tuberosum L.*, la variété Kondor et la variété Spunta. Les variétés sont présentées dans le tableau 3.

Les semences utilisées sont de classe E en provenance de la Hollande conservées avant utilisation à une température de 6°C.

### **2.1 Préparation du matériel végétal :**

Pour la partie *in vitro*, les tubercules sont désinfectés en surface avec un passage à l'hypochlorite de sodium à faible concentration (10 %), ensuite rincés plusieurs fois. Ils sont mis à prégermer à l'obscurité à une température de 17°C à 23°C, pour une durée de 30 à 60 jours.

Les germes allongés de plus de 4 cm, sont prélevés des tubercules et stérilisés sous la hotte de la façon suivante :

- Passage dans un mouillant à 2% pendant 5 minutes ;
- Passage dans le mercryl laurylé à 30% pendant 3 minutes ;
- Rinçage avec l'eau distillée stérile ;
- Un dernier passage dans l'hypochlorite de sodium à 3° pendant 5 minutes ;
- 3 Rinçages avec l'eau distillée stérile.

Par contre, les tubercules destinés à l'essai sous serre sont choisis de façon à avoir des tubercules relativement de la même taille et avec le même nombre de germes (yeux). Ils sont mis ensuite pendant 20 jours à température ambiante afin de prégermer.

## **3. Méthodes :**

### **3.1. Partie 1 :**

#### **3.1.1 Micropropagation :**

Globalement, les stades de la micropropagation effectués dans ce travail sont :

- établissement d'une culture aseptique ;
- multiplication des vitroplants par repiquage.

Les germes stérilisés préalablement sont fragmentés en autant de fragments, qu'il y'a de nœuds, en évitant la base du germe, les boutures mesurent de 8-10 mm.

Les boutures ainsi réalisées sont mis en culture dans des tubes contenant 30 ml de milieu de culture.

Les tubes sont placés sous une luminosité de 50 watt/m<sup>2</sup>, et une photopériode de 12h. La température est maintenue à 25 ± 2°C.

**Tableau 3:** Présentation des deux variétés de pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*) utilisées (Doornbos et Ros, 1987 ; Corrigan et Trillion, 2005).

critères		variété Kondor	variété Spunta
origine génétique		61 333 X Wilja	Béa X U.S.D.A. x 96-56
obtenteurs		J.P.G Kołnst-Agrico (Pays Bas)	J. Oldemburger –Pays-Bas
inscription au catalogue		1987	1967
catégorie		consommation	Consommation
maturité		demi-précoce	Demi-précoce
caractères descriptifs	tubercule	forme oblong allongée, yeux demi-enfoncés, peau rouge, chair jaune pale.	forme allongée, yeux très superficiels, peau jaune, chair jaune pale
	germe	rouge violacé foncé, pilosité assez faible	Violet, conique, pilosité moyenne
	plante	taille moyenne à basse, port mi-dressé à dressé	Taille haute, port dressé
	feuille	vert foncé, ouverte à mi-ouverte, ovale à nervures assez enfoncées, folioles grandes.	Vert franc, mi- ouvertes, ovale arrondi, peu divisée, foliole moyenne.
	floraison	abondante	Assez abondante
	fleur	rouge violacé assez foncé.	Blanche
	fructification	modérée à abondante	Très rare
caractères culturels et d'utilisation	rendement	très élevé	Très élevé
	calibrage	tubercule très gros	Tubercule très gros

### ✚ Milieu de culture :

Le milieu de culture employé pour la micropropagation est le milieu de Murashige et Skoog (MS) (1962) (Annexe 1) avec les vitamines de Morel et Wetmore (1951) (Annexe 2) et 30 g/l de saccharose, le pH est ajusté à 5,7 (Nouri- ellouz et al., 2006)

### ✚ Repiquage :

Après 3 à 4 semaines de croissance, les vitroplants de plus de 4 nœuds, sont repiqués sur le même milieu pour les multipliés et avoir le maximum de matériel végétal.

Les vitroplants sont retirés des tubes et fragmentés en explants de 5 à 10 mm, pourvu chacun d'un bourgeon axillaire. Les conditions de culture restent les mêmes (photopériode et température).



(a)



(b)



(c)



(d)

**Figure 7** : les vitroplants obtenus par micropropagation des deux variétés. (a) vitroplant G1 de la variété Kondor ; (b) vitroplant G1 de la variété Spunta ; (c) vitroplant G2 de Kondor ; (d) vitroplant G2 de Spunta.

### 3.1.2 Callogénèse et régénération:

#### ▪ Callogénèse :

Les cals ont été initiés pour les deux variétés, sur trois types d'explants à partir des vitroplants (G2 : deuxième génération) multipliés précédemment.

- fragments de tige ;
- fragments de feuille,
- fragments de racine.

Les explants sont réalisés en conditions d'asepsie sous la hotte à flux laminaire comme suit :

- Le vitroplant est retiré du tube, en gardant les racines enveloppées du milieu de culture pour éviter qu'elles ne se dessèchent.

-Les feuilles sont séparées une à une du reste du vitroplant, les deux extrémités de la feuille sont sectionnées et la nervure centrale enlevée, la feuille est fragmentée ensuite de façon à avoir des petits carrés de 5mm.

- les fragments de tiges et de racines doivent être dépourvus de zones méristématiques, les fragments de tige mesurent de 5-7mm, ceux de racine 8-10mm.

Ces manipulations doivent être réalisées en peu de temps pour éviter le dessèchement des explants.

#### **Milieux de culture :**

Les milieux de culture testés, contiennent une cytokinine la BAP, et différentes concentrations d'une auxine, le 2,4D. Les milieux sont à base de :

- milieu Murashige et Skoog (MS) (1962) ;
- les vitamines de Morel et Wetmore (1951) (Vargas et al., 2005);
- 30 g/l de saccharose;
- 0,5 mg/l de BAP (Seabrook et Douglass, 2001).
- différentes concentrations de 2,4D ont été testées:
  - 0,5 mg/l;
  - 1 mg/l;
  - 2 mg/l;
  - 3 mg/l;
  - 4 mg/l. (Vargas et al., 2005 ; De Garcia et Martinez, 1995).
- pH 5,7

Les 5 milieux sont testés pour chaque type d'explant des deux variétés.

#### **Déroulement des cultures :**

50 explants de chaque type (feuille, tige et racine) sont mis en culture dans chacun des milieux testés pour une durée de 4 - 5 semaines, dans des boîtes de Pétri de 9cm de diamètre contenant 30 ml de milieu de culture, à raison de 10 explants par boîtes.

Les conditions environnementales de la culture sont les mêmes que ceux utilisées en phase de micropropagation jusqu'à la phase de régénération.

▪ **Régénération *in vitro* :**

Les embryons somatiques ou les bourgeons développés sur les cals sont transférés dans un nouveau milieu qui permettra leur développement.

Les conditions environnementales de la culture sont les mêmes que ceux utilisées en phase de micropropagation.

✚ **Milieu de culture :**

Le milieu de culture est le suivant :

- milieu MS (1962) ;
- les vitamines de Morel et Wetmore (1951) ;
- 20 g/l de saccharose;
- 0,05 mg/l de GA<sub>3</sub>.

✚ **Facteurs d'étude:**

✓ **Callogénèse :**

Le suivi des cultures a été effectué toutes les semaines sur les facteurs suivants :

- Temps nécessaire à l'induction de la callogénèse ;
- pourcentage d'induction des cals après deux semaines;
- Localisation de la formation du cal sur l'explant;
- Pourcentage de cals présentant un enracinement ;
- Poids frais des cals chaque semaine;
- Coloration, consistance et texture des cals;
- Temps nécessaire à l'initiation de la régénération (observation au binoculaire) ;

- Pourcentage de cals présentant une régénération.

✓ **Régénération et développement de plantules :**

- Temps nécessaire à l'initiation du développement des plantules.

- pourcentage de survie et de reprise sur le nouveau milieu.

✚ **Analyse des résultats :**

L'analyse des résultats est faite par comparaison entre les 5 milieux de culture et entre les trois types d'explants pour chaque variété. Pour cela :

- Les moyennes des paramètres quantitatifs sont calculées à l'aide du logiciel, Microsoft Excel 2007 ;
- Comparaison de la croissance des cals d'un explant donné sur les différents milieux testés ;
- Mettre en évidence l'effet des différentes combinaisons BAP/2,4-D sur la callogénèse et la régénération des différents explants ;
- Déterminer le type de cals bénéfique à la régénération.

### **3.2. Partie 2 :**

#### **3.2.1 Essai sous serre :**

Cet essai va permettre de déterminer l'impact de la salinité sur le premier stade de développement des deux variétés, et de déterminer leur tolérance au stress salin.

Les tubercules pré germés sont plantés dans des pots (capacité de volume : 5l) en plastique, à raison d'un tubercule par pot.

Les pots sont irrigués un jour sur deux, avec une eau contenant différentes concentrations de NaCl (0, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18 g/l) sur une durée de 4 semaines. Le dispositif comprend trois répétitions pour chaque concentration.



**Figure 8 :** dispositif expérimental des essais en pot sous serre pour les deux variétés Kondor et Spunta.

#### **✚ Facteurs d'étude:**

Le premier suivi de l'essai est effectué 10 jours après la date de plantation, ensuite toutes les semaines. Le suivi comprend : le taux de mortalité, la date d'émergence (levée) pour les plants vivants, la mesure de la hauteur des tiges.

#### **✚ Analyse des résultats :**

Les résultats sont traités statistiquement par les logiciels STATITCF et Microsoft Excel 2007 ; comme suit :

- Calculer la moyenne de la durée en jours entre la plantation et l'émergence, ainsi que la moyenne de croissance des tiges pour chaque traitement ;
- Analyse de variances;
- Comparaison multiple des moyennes selon la méthode de Newman et Keuls ;
- Calculer les indices de tolérance à partir des moyennes de hauteur des tiges. Les indices de tolérance sont déterminés par le rapport de la longueur moyenne de la plantule en présence de stress sur celle notée en absence de stress.

Cette analyse de résultat va permettre de :

- Déterminer si la salinité affecte la date d'émergence des plants ;
- Déterminer les concentrations létales qui inhibent totalement l'émergence;
- Déterminer l'effet de la salinité sur la croissance des tiges pour le stade développement étudié ;

### **3.2.2 Tolérance des cals à la salinité :**

Ce test va nous permettre de déterminer la tolérance des cals à la salinité et la sélection des concentrations qui réduisent fortement leur croissance.

Des cals initiés sur le type ou les types d'explants sélectionnés, et sur le milieu de calogénèse sélectionné en première partie ; sont multipliés dans différentes concentrations de NaCl allant de 1 à 18 g/l avec un écart de 1g.

30 cals sont alors multipliés, pendant 24 jours, dans chaque concentration pour les deux variétés et pour chaque type d'explant.

#### **Facteur d'étude:**

Le suivi est effectué chaque 8 jour et comprend :

- La croissance des cals par la mesure du poids frais chaque 8 jours ;
- Le taux de mortalité et de reprise par traitement;

#### **Analyse des résultats :**

Les résultats sont traités statistiquement par le logiciel STATITCF et Microsoft Excel 2007, de la façon suivante :

- Calculer les moyennes des poids de cals pour chaque traitement ;
- Analyse des variances ;
- Calculer le pourcentage de reprise pour chaque traitement ;
- Comparaison multiple des moyennes par le test de Newman et Keuls ;
- Calculer les taux de croissance en poids, qui sont déterminés par le rapport du poids moyen des cals pour un traitement donné à 24 jours de croissance sur le poids moyen initial des cals.
- Calculer les indices de tolérance par le rapport du taux de croissance des cals en présence de stress sur celui en absence de stress.

Les résultats ainsi traités vont permettre de :

- Déterminer l'effet de la salinité sur la croissance des cals ;
- Déterminer les concentrations létales et celles qui réduisent fortement la croissance ;
- Comparaison des résultats obtenus dans les deux expérimentations de cette partie, sur la tolérance de chaque variété aux différents traitements ;

- Déterminer les intervalles de concentration à utiliser pour la sélection de cals tolérants pour le ou les types d'explants choisis à l'issu de la partie 1.

### **3.3 Partie 3 : sélection de cals tolérants.**

Après avoir déterminé les intervalles de concentrations, les cals multipliés sur les concentrations de ces intervalles dans la partie 2 pour chaque type d'explant, sont repiqués une seconde fois sur ces même concentrations à raison de 50 cals par traitement.

Le suivi est effectué par cals sur les facteurs suivants :

- Poids moyen du cal ;
- Présence de brunissement ;
- Consistance du cal.

Pour une meilleur analyse, des calcules sont réalisés par le logiciel Microsoft Excel 2007 :

- Pourcentage de reprise pour chaque traitement ;
- Taux de croissance de chaque cal et la moyenne du taux de croissance pour chaque traitement ;
- Indice de tolérance pour chaque cal et pour chaque traitement.

Le but de ce premier repiquage est de déceler des cals qui présentent un développement supérieur au développement moyen de l'ensemble de cals multipliés sur un traitement donné.

Après la sélection de ces cals, trois repiquages successifs vont être effectués afin de vérifier la tolérance de ces cals. Un suivi sera effectué sur le poids des cals et la présence de brunissement cela va permettre de calculer le taux de croissance et l'indice de tolérance de chaque cal.

On estimera la stabilité du caractère de tolérance à ce stade d'étude par la comparaison du degré de tolérance au cours de ces trois repiquages ; si un cal garde le même degré de tolérance au cours de cette phase il est considéré comme tolérant à la concentrations dont il est soumis.

*Chapitre 3 : Résultats et  
interprétations*

## **1. Partie 1 : Callogénèse et régénération.**

Les résultats sont présentés par type d'explant. Pour chaque type d'explant les résultats des deux variétés étudiées sont exposés :

### **1.1 Racine :**

#### **➤ Effet des différentes combinaisons BAP/2,4-D sur la callogénèse et la régénération:**

Les résultats de l'effet des différentes combinaisons BAP/2,4-D sur la callogénèse des racines, sont présentés dans le tableau 4-1 pour la variété kondor et dans le tableau 4-2 pour la variété spunta.

Chez les deux variétés, la callogénèse des explants de racines est initiée après une semaine à 10 jours de culture sur les milieux contenant les combinaisons 0,5 mg BAP/2 mg 2,4-D; 0,5 mg BAP/3mg 2,4-D et 0,5 mg BAP/4mg 2,4-D. sur le reste des milieux l'initiation des cals est un peu plus tardive.

Les différentes combinaisons BAP/2,4-D ont affectées le pourcentage d'induction de callogénèse chez les deux variétés, le pourcentage le plus élevé est de 96% et a été enregistré chez la variété kondor sur le milieu 4. Quant à la variété spunta les milieux 3, 4 et 5 ont donnés le même pourcentage d'induction de cals qui est de 94%. Le pourcentage le plus faible a été enregistré sur le milieu 2 pour les deux variétés.

La formation du cal sur l'explant chez les deux variétés commence des extrémités ensuite s'étend soit partiellement sur le reste de l'explant (milieu 1 et le milieu 2), soit sur la totalité de l'explant (milieu 3). Sur le milieu 4 et le milieu 5, les cals se sont initiés et formés sur toute la surface de l'explant.

L'enracinement des cals a été observé sur les 5 milieux de cultures à des pourcentages différents pour les deux variétés (tableau 4-1; tableau 4-2); sur le milieu 2 , la totalité des cals (100%) présentent un enracinement pour les deux variétés.

L'effet des combinaisons BAP/2,4-D sur la couleur, la consistance et la texture des cals était différents pour et entre les deux variétés étudiées (tableau 4-1; tableau 4-2).

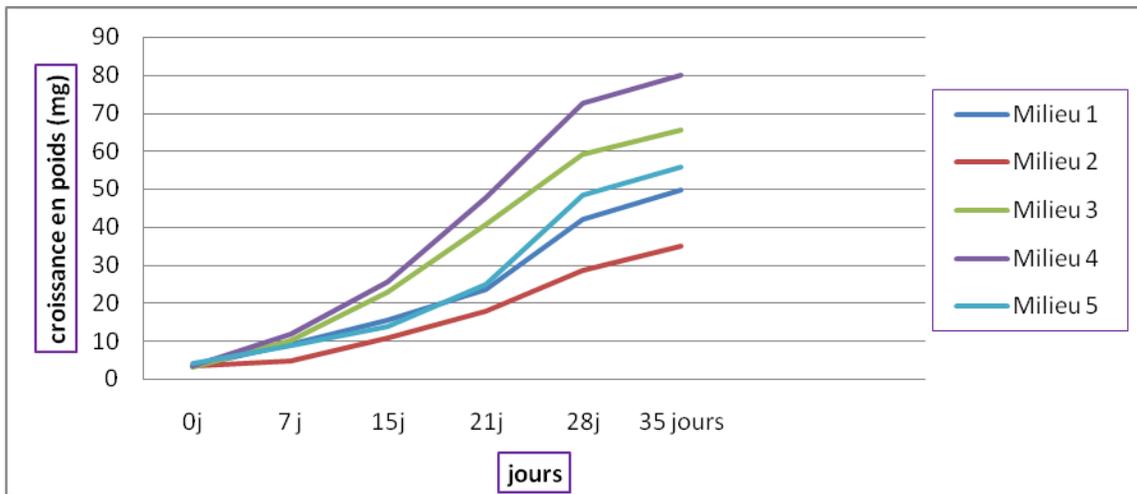
**Tableau 4-1:** Résultats des paramètres étudiés pour la callogénèse des racines de la variété Kondor.

Milieu	Pourcentage d'induction de cals	initiation des cals	formation du cal	Pourcentage d'enracinement	Consistance des cals	Couleur des cals
<b>Milieu1</b> (0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D)	78 %	Gonflement des explants après 5 jours, initiation : - 44 % après une semaine; - 34% après 15 jours.	aux extrémités ensuite sur quelques points de l'explant	70 %	friable peu granulé	72 % blanchâtre 6 % blanchâtre translucide
<b>Milieu 2</b> (0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D)	70%	Gonflement des explants après une semaine, initiation : - 12 % après une semaine - 58 % après 15 jours	aux extrémités ensuite sur quelques points de l'explant	100%	friable et lisse	51,42% blanchâtre 18,58% blanchâtre translucide
<b>Milieu 3</b> (0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D)	88%	Gonflement des explants après 5 jours, initiation : - 68 % après une semaine; - 20% après 10 jours.	aux extrémités ensuite sur tout l'explant	44 %	Peu compact, granuleux	80 % vert claire avec des zones blanchâtres 8% vert claire
<b>Milieu 4</b> (0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D)	96%	Gonflement des explants après 5 jours, initiation : - 74% après une semaine; - 22% après 10 jours.	sur tout l'explant	34%	Peu compact, peu globuleux	40 % vert claire avec des zones blanchâtres 56% vert claire
<b>Milieu 5</b> (0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D)	94%	Gonflement des explants après 5 jours, initiation : - 68 % après une semaine; - 26 % après 10 jours.	sur tout l'explant	48%	friable granulé	14 % blanchâtre 44 % vert claire. 36 % vert claire avec des zones blanchâtres

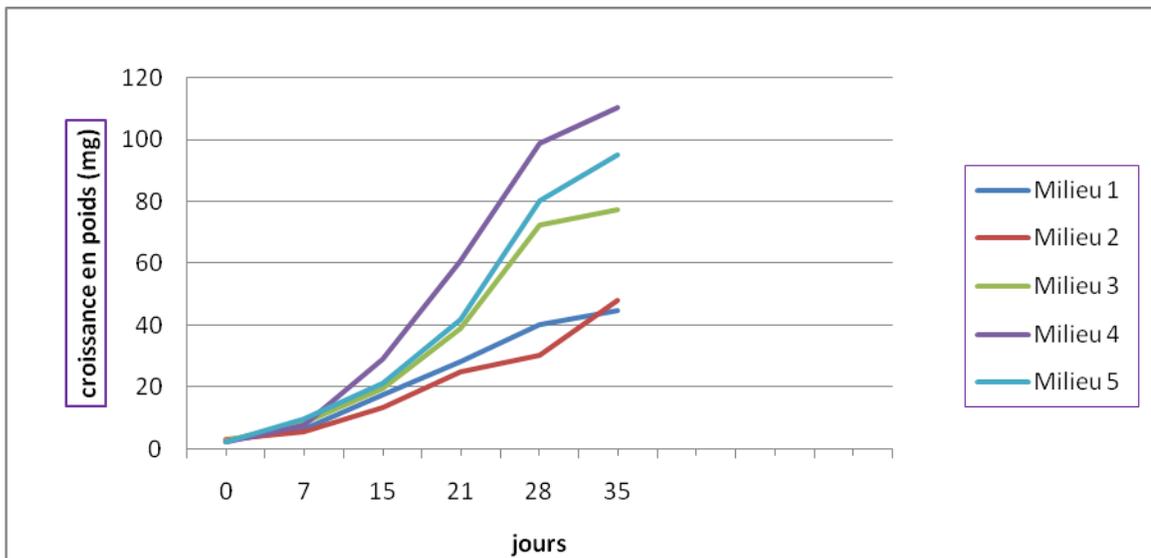
**Tableau 4-2:** Résultats des paramètres étudiés pour la callogénèse des racines de la variété Spunta.

Milieux	Induction de cals	initiation des cals	formation du cal	enracinement	consistance	couleur
<b>Milieu 1</b> (0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D)	78%	Gonflement des explants après 5 jours, initiation : - 30% après 10 jours; - 48 % après 15 jours.	aux extrémités ensuite sur quelques points de l'explant	72%	friable peu granulé	54% blanchâtre 24% blanchâtre translucide
<b>Milieu 2</b> (0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D)	68 %	Gonflement des explants après une semaine, initiation : - 33% après 10 jours; - 35% après 15 jours	aux extrémités ensuite sur quelques points de l'explant	100%	friable et lisse	26 % blanchâtre 42% blanchâtre translucide
<b>Milieu 3</b> (0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D)	94 %	Gonflement des explants après 5 jours, initiation : - 52% après une semaine; - 42% après 10 jours.	aux extrémités ensuite sur tout l'explant	60%	friable granuleux	vert très claire blanchâtre
<b>Milieu 4</b> (0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D)	94 %	Gonflement des explants après 5 jours, initiation : - 68% après une semaine; - 25% après 10 jours.	sur tout l'explant	48 %	peu compact granuleux	vert claire
<b>Milieu 5</b> (0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D)	94 %	Gonflement des explants après 5 jours, initiation : - 72% après une semaine; - 22% après 10 jours.	sur tout l'explant	60%	peu compact granuleux	50 % vert claire 44 % vert très claire blanchâtre

La croissance des cals de racines sur le milieu 4 est la plus élevée et la plus rapide au bout de 35 jours de culture pour kondor comme pour spunta, suivi du milieu 3 ensuite le milieu 5 chez la variété kondor et du milieu 5 ensuite le milieu 3 chez la variété spunta. Les cals multipliés sur le milieu 1 et le milieu 2 ont eu une croissance inférieure aux autres milieux (courbe 4; courbe 5).



**Courbe N°4** : croissance des cals de racines var. kondor sur les différents milieux de cultures testés.



**Courbe N°5** : croissance des cals de racines var. Spunta sur les différents milieux de cultures testés.

**Milieu 1** :0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D;

**Milieu 2** :0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D;

**Milieu 3** :0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D;

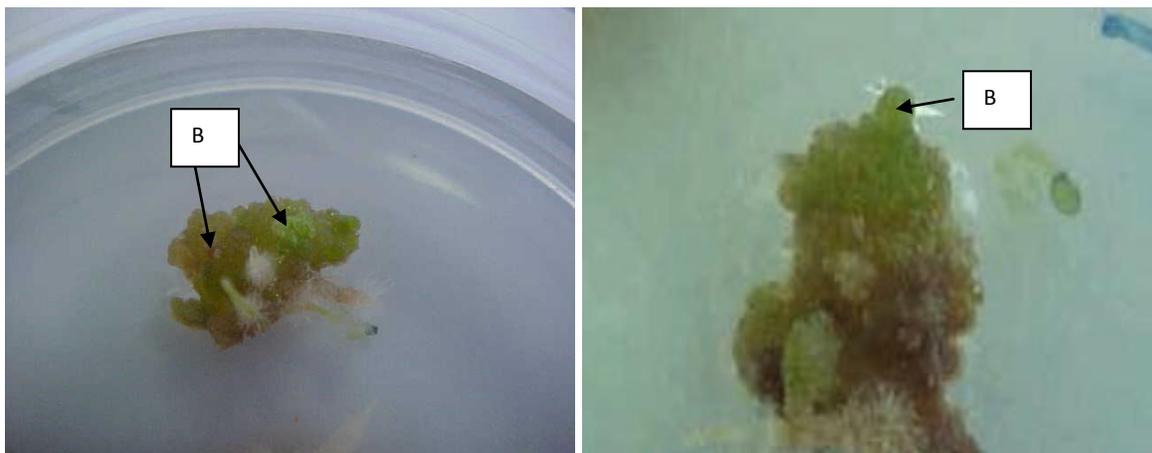
**Milieu 4** :0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D;

**Milieu 5** :0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D.

La régénération sur les cals de racines est nulle chez la variété spunta. Chez la variété kondor, 18% des cals multipliés sur le milieu 4 contenant la combinaison hormonale 0,5 mg BAP/ 3mg 2,4-D, ont développés des bourgeons au bout de 35 jours de culture (figure 11). Les cals formés sur le reste des combinaisons ne présentent pas de régénération. On observe que les bourgeons se sont développés que sur des cals peu compacts et peu globulaires obtenus sur le milieu 4 seulement pour la variété kondor; pour la variété spunta ce milieu n'a pas permis de développés des cals globulaires. Aucune autre combinaison hormonale utilisés n'a permis le développement de ce type de cals chez les deux variétés, mais plutôt des cals avec des consistances friables lisses ou granulaires.

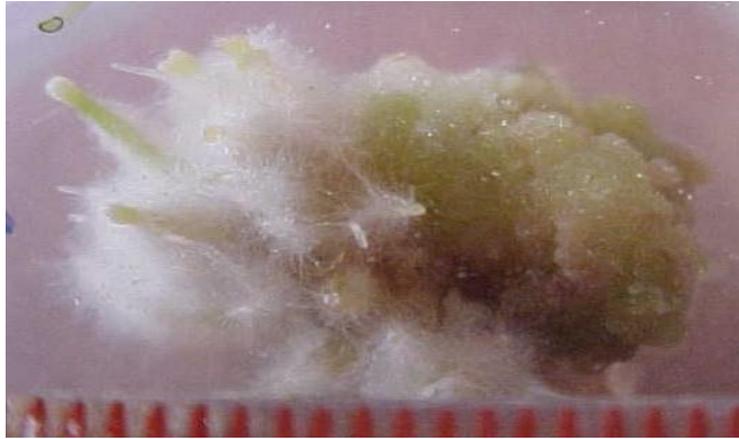
➤ . **Effet du milieu MGA<sub>3</sub> sur le développement des embryons somatiques :**

Après 35 jours les fragments de cals contenant les bourgeons de la variété kondor ont été transférés sur le milieu MGA<sub>3</sub> contenant 0,05mg/l de GA3 et 20g/l de saccharose. Les bourgeons ne se sont pas développés, il y'a eu formation de racines (figure 12) sur les fragments de cals après 2 semaines du transfère, les cals sont devenu blanchâtres et friables. Au bout de 4 semaines un arrêt de croissance a été observé sur les fragments de cals.



**Figure 11:** bourgeonnement sur cal de racine induit sur la combinaison 0.5mg BAP/3mg 2,4D.

B : bourgeon.



**Figure 12:** Réactions des fragments de cals après le transfère sur milieu de développement des bourgeons.

## 1.2 Tiges :

### ➤ Effet des différentes combinaisons BAP/2,4D sur la callogénèse et la régénération:

Les résultats de l'effet des différentes combinaisons BAP/2,4-D sur la callogénèse des tiges, sont présentés dans le tableau 4-3 pour la variété kondor et dans le tableau 4-4 pour la variété spunta.

Chez les deux variétés, la callogénèse est initiée après une semaine sur tous les milieux sauf le milieu 2 où elle s'initie après 10 jours.

Les différentes combinaisons BAP/2,4-D ont affectées le pourcentage de la callogénèse chez les deux variétés. La combinaison 0,5 mg BAP/0,5 mg 2,4-D est la plus réactive chez la variété kondor avec un pourcentage de 88%. Pour la variété spunta, un pourcentage de 86% est enregistré sur les deux milieux contenant respectivement les deux combinaisons 0,5 mg BAP/0,5 mg 2,4-D et 0,5 mg BAP/4mg 2,4-D. 76% d'explants ont induits une callogénèse sur la combinaison 0,5 mg BAP/ 3mg 2,4-D; les pourcentages enregistrés sur le milieu 2 et sur le milieu 3 ont été les plus inférieurs pour les deux variétés étudiées.

En ce concerne la localisation de la formation des cals sur les explants, il n'y avait pas de différences entre les deux variétés et se limitait aux extrémités c.à.d. aux zones blessées sur le milieu 1. Sur le milieu 2, elle commence des extrémités et s'étend sur toute la surface de l'explant; par contre, chez le reste des milieux la formation du cal se localise sur toute la surface de l'explant.

L'enracinement des cals de tiges chez les deux variétés est en général inférieur que celui observé sur les cals de racines sauf sur milieu 2 où 100% des cals présentent un développement de racines comme sur les cals de racines. Sur le milieu 3 l'enracinement est moyen avec 58% chez kondor et 48% chez spunta; sur les autres milieux, le pourcentage d'enracinement des cals est inférieur à 22% (tableau 4-3; tableau 4-4).

Chez les deux variétés, des cals friables, lisses ou peu granuleux d'un vert claire à blanchâtre sont obtenus sur les combinaisons 0,5 mg BAP/1 mg 2,4-D et 0,5 mg BAP/2 mg 2,4-D. Sur les deux combinaisons 0,5 mg BAP/3 mg 2,4-D et 0,5 mg BAP/4 mg 2,4-D, les cals sont respectivement granuleux et peu globuleux. Seul la combinaison 0,5 mg BAP/0,5 mg 2,4-D a permis le développement de cals verts compacts et globuleux (tableau 4-3; tableau 4-4).

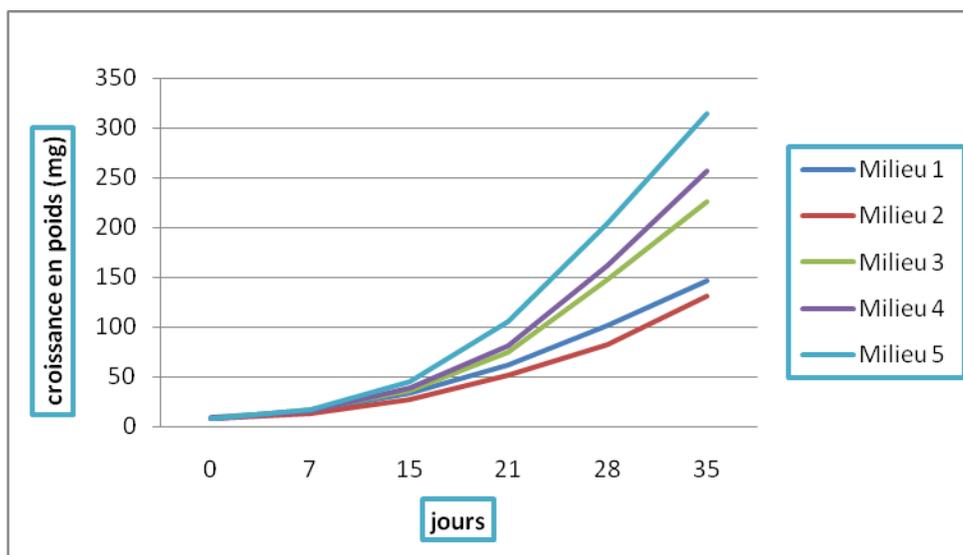
**Tableau 4-3:** Résultats des paramètres étudiés pour la callogénèse des tiges de la variété Kondor.

Milieu	Induction de cals	initiation des cals	formation du cal	enracinement	consistance	couleur
<b>Milieu1</b> (0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D)	88 %	gonflement et initiation après une semaine	aux extrémités de l'explant	20%	compact, globulaire	vert
<b>Milieu 2</b> (0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D)	70 %	gonflement après une semaine, initiation au 10ème jour	aux extrémités ensuite sur toute la surface de l'explant	100%	Friable et lisse	42 % vert claire 28 % vert claire avec des zones blanchâtres
<b>Milieu 3</b> (0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D)	74%	gonflement et initiation après une semaine	sur toute la surface de l'explant	58 %	friable peu granulé	10 % vert 50 % vert claire 14 % vert claire avec des zones blanchâtres
<b>Milieu 4</b> (0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D)	76%	gonflement et initiation après une semaine	sur tout l'explant	18 %	compact granulaire	40 % vert 34 % vert claire
<b>Milieu 5</b> (0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D)	86%	gonflement et initiation après une semaine	sur tout l'explant	12 %	compact, peu globulaire	vert

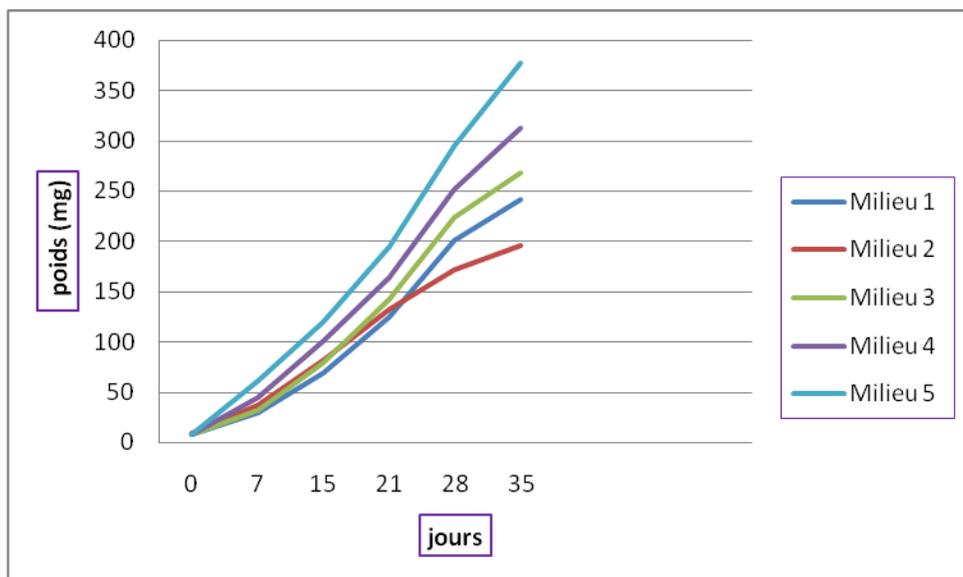
**Tableau 4-4:** Résultats des paramètres étudiés pour la callogénèse des tiges de la variété spunta.

Milieux	Induction de cals	initiation des cals	formation du cal	enracinement	consistance	couleur
<b>Milieu 1</b> (0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D)	86 %	gonflement après une semaine et initiation après 10 jours	aux extrémités de l'explant	20%	compact, globuleux	vert
<b>Milieu 2</b> (0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D)	74 %	gonflement après une semaine, initiation au 10 <sup>ème</sup> jour	aux extrémités ensuite sur toute la surface de l'explant	100%	friable lisse	vert claire avec des zones blanchâtres
<b>Milieu 3</b> (0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D)	74 %	gonflement et initiation après une semaine	sur toute la surface de l'explant	48%	friable peu granulé	vert claire
<b>Milieu 4</b> (0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D)	76 %	gonflement et initiation après une semaine	sur toute la surface de l'explant	14 %	Peu compact granulé	vert claire
<b>Milieu 5</b> (0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D)	86 %	gonflement et initiation après une semaine	sur tout l'explant	22 %	compact, peu globulaire	vert

Le milieu 5 avec 4 mg de 2,4-D a permis chez les deux variétés une croissance rapide est élevée par rapport aux autres milieux; suivi du milieu 4, ensuite du milieu 3. La croissance des cals sur le milieu 2 est la plus inférieure. Les cals multipliés sur le milieu 1 chez les deux variétés, ont enregistré une croissance plus élevée que le milieu 2 mais est aussi inférieur aux autres milieux; cela peut être expliqué du fait que les cals sont limités aux extrémités des explants (courbe 6; courbe7).



**Courbe N°6** : croissance des cals de tiges var. kondor sur les différents milieux de cultures testés



**Courbe N°7** : croissance des cals de tiges var. Spunta sur les différents milieux de cultures testés.

**Milieu 1** :0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D;

**Milieu 2** :0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D;

**Milieu 3** :0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D;

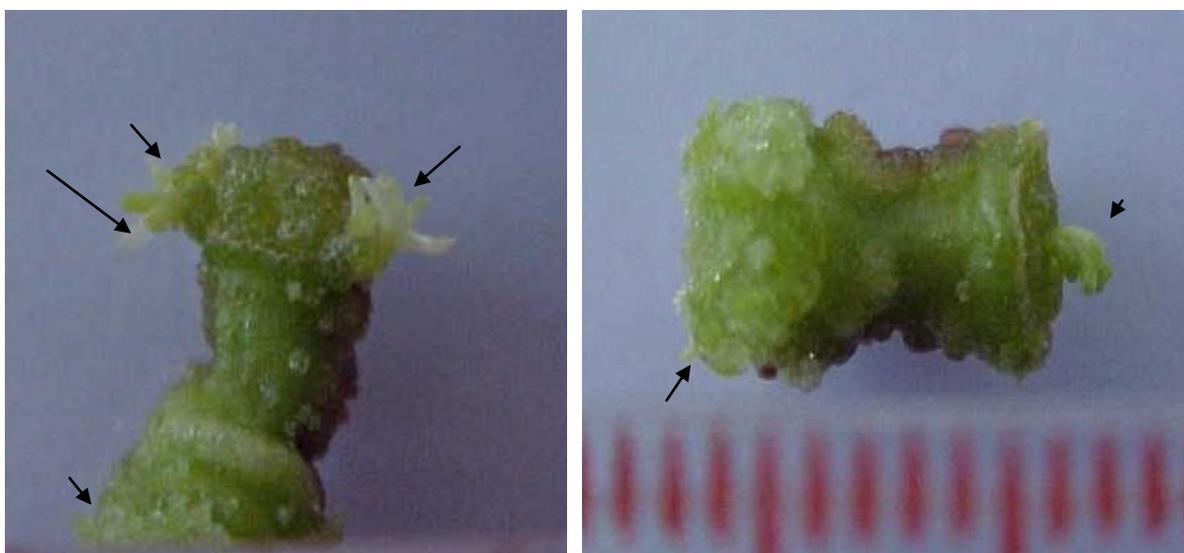
**Milieu 4** :0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D;

**Milieu 5** :0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D.

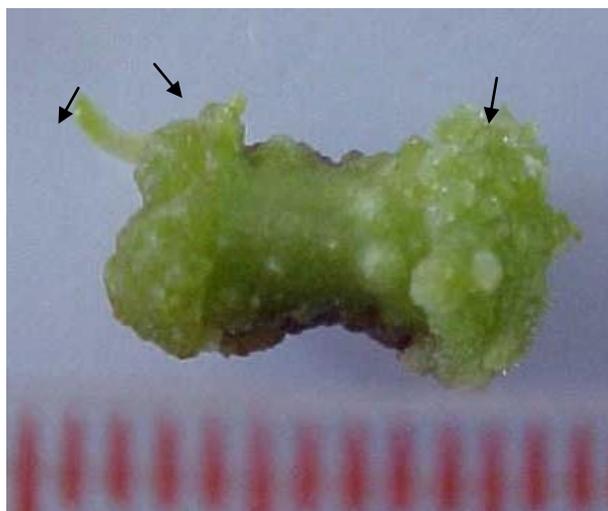
Sur la combinaison 0,5 mg BAP /0,5 mg 2,4-D, la régénération a été élevée sur les cals de tiges de la variété kondor, elle s'est initiée après 28 jours de culture, avec un pourcentage de 80%; à 35 jours la régénération est très apparente et développée (figure 15). Sur la même combinaison, 40% des cals de tiges de la variété spunta ont développés des amas très rapprochés, à partir de 30 jours de culture (figure16).

Sur le milieu 1 avec la combinaison 0,5 mg BAP /0,5 mg 2,4-D chez les deux variétés, la régénération observée semble être faite par embryogénèse somatique, car les amas formés présente au départ une structure globulaire ensuite cotylédonaire. Mais cela est difficile à confirmer en se basant seulement sur des observation au binoculaire

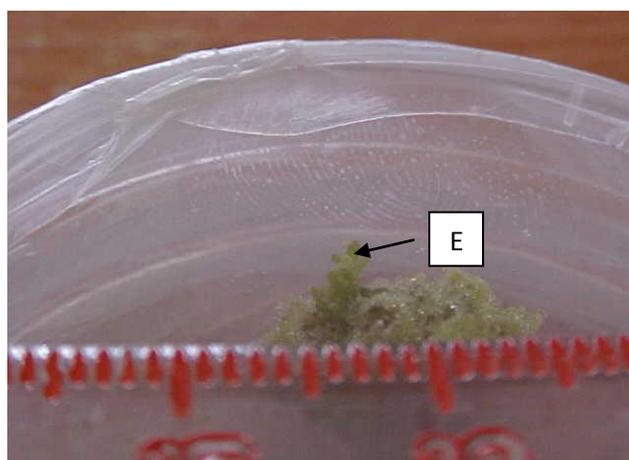
Chez la variété spunta la régénération a été enregistrée seulement sur le milieu 1. Par contre chez la variété kondor, 12% des cals multipliés sur le milieu 5 ont développés des bourgeons à 30 jours de culture et après 35 jours de culture, les bourgeons sont bien différenciés (figure 17). Les cals formés sur le reste des combinaisons ne présentent pas du tout de régénération.



**Figure15:** Régénération sur des cals de tiges var. kondor induits sur le milieu 1 (0.5mg BAP/0.5mg 2,4-D).



**Figure 16:** régénération sur cal de tige var. spunta formés sur la combinaison 0.5mg BAP/0.5mg 2,4D



**Figure17:** bourgeon sur un cal de tige var. kondor induit sur le milieu 5 (0.5mg BAP/4mg 2,4-D).

➤ **Effet du milieu MGA<sub>3</sub> sur le développement de plantules :**

Après 35 jours les fragments de cals présentant une régénération sont transférés sur le milieu de développement contenant de la gibbérelline. La reprise et le début de développement sont observés dès la première semaine pour les deux variétés (figure 18, figure 19).

Chez la variété kondor, le taux de reprise été de 90% pour les cals issus du milieu 1 avec une moyenne de 20 plantules par cal. Pour le milieu 5, la reprise été de 66,7% avec une moyenne de 4 plantules seulement par cal. Après 4 semaines des plantules de plus de 4 nœuds se sont développées (figure 18).

Chez la variété spunta, le taux de reprise a été de 95%, les cals portés en moyenne plantules. Après 4 semaines les plantules ont développé plus de 4 nœuds (figure 19).



(a)



(b)

**Figure 18 :** développement de plantules régénérées sur cals des tiges var. kondor (a) après une semaine; (b) après 4 semaines.



(a)



(b)

**Figure 19:** développement de plantules régénérées sur cals des tiges var. spunta (a) après une semaine (b) plantule de 4 semaines de développement.

### **1.3 Feuilles :**

#### **➤ Effet des différentes combinaisons BAP/2,4D sur la callogénèse et la régénération:**

Les résultats de l'effet des différentes combinaisons BAP/2,4-D sur la callogénèse des feuilles, sont présentés dans le tableau 4-5 pour la variété kondor et dans le tableau 4-6 pour la variété spunta.

Chez les deux variétés, la callogénèse des explants de feuilles est précédée par un gonflement de l'explant après 5 jours de culture sur le milieu 1, le milieu 4 et le milieu 5; quant à l'initiation des cals, elle est observé après une semaine. Par contre, sur les deux autres milieux, le gonflement est observé après une semaine et les cals s'initient après 10 jours pour le milieu 3 et 15 jours pour le milieu 2.

Les différentes combinaisons BAP/2,4-D ont affectées le pourcentage d'induction de callogénèse chez les deux variétés, le pourcentage le plus élevé est de 88% et a été enregistré chez la variété kondor sur la combinaison 0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4-D. Sur cette même combinaison, un pourcentage de 86% est enregistré chez la variété spunta. Pour ce facteur d'étude qui est le pourcentage d'induction de cals les milieux de culture sont classés après le milieu 1 pour les deux variétés comme suit : le milieu 4, ensuite le milieu 5 suivi du milieu 3 et dernier le milieu 2. Les pourcentages d'induction de cals sont plus élevés chez la variété kondor (tableau 4-5; tableau 4-6).

La formation du cal sur l'explant chez les deux variétés diffère sur chaque milieu, mais commence toujours des extrémités ensuite s'étend sur l'explant ou pas (tableau 4-5; tableau 4-6).

L'enracinement des cals de feuilles n'a pas été beaucoup présent comme pour les cals de tiges et de racines; mais c'est toujours sur le milieu 2 avec la combinaison 0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4-D que le pourcentage le plus élevé est enregistré (tableau 4-5; tableau 4-6).

L'effet des combinaisons BAP/2,4-D sur la couleur, la consistance et la texture des cals était différents; sur le milieu 1 et le milieu 4, les cals sont verts compacts et globuleux. Sur les deux milieux 2 et 3, les cals sont friable et lisse (tableau 4-5; tableau 4-6).

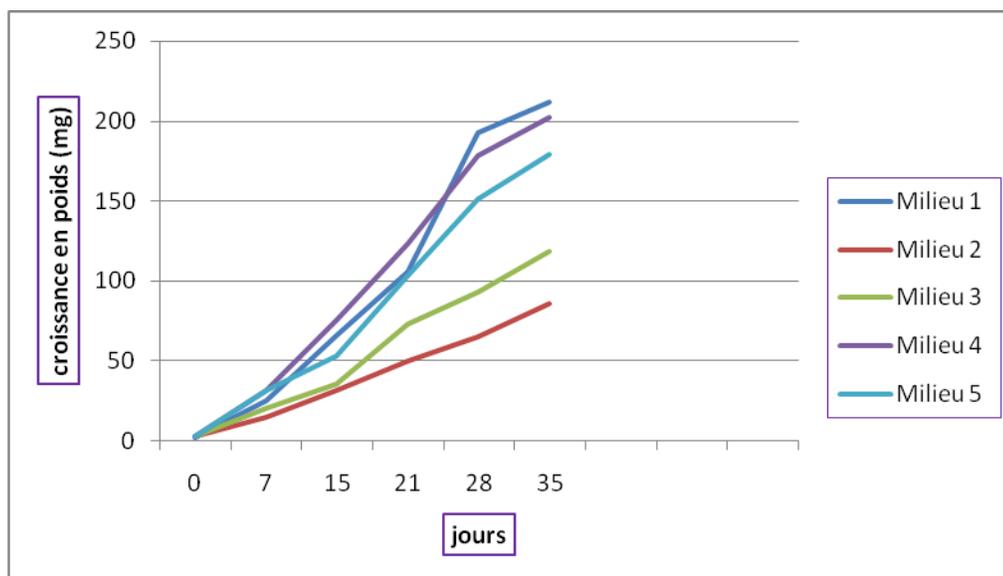
**Tableau 4-5:** Résultats des paramètres étudiés pour la callogénèse des feuilles de la variété Kondor.

Milieux	Induction de cals	initiation des cals	formation du cal	enracinement	consistance	couleur
<b>Milieu 1</b> (0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D)	88 %	gonflement après 5 jours, initiation après une semaine	sur toute les extrémités ensuite sur une grande partie de la surface	0 %	compact globulaire	vert
<b>Milieu 2</b> (0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D)	42 %	gonflement après une semaine, initiation après 15 jours	seulement aux extrémités blessées de l'explant	40 %	friable et lisse	32 % vert claire 10% vert avec des zones blanchâtres
<b>Milieu 3</b> (0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D)	58 %	gonflement après une semaine, initiation après 10 jours	seulement aux extrémités blessées de l'explant	36 %	friable et lisse	vert claire
<b>Milieu 4</b> (0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D)	86 %	gonflement après 5 jours, initiation après une semaine	sur toutes les extrémités ensuite s'étends sur une partie de l'explant	0 %	compact peu globulaire	22 % vert 64 % vert foncé
<b>Milieu 5</b> (0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D)	82 %	gonflement après 5 jours, initiation après une semaine	sur toute les extrémités	2,4 %	50 % peu compact granulaire 32% peu compact peu globulaire	72 % vert 10 % vert avec des zones blanchâtres

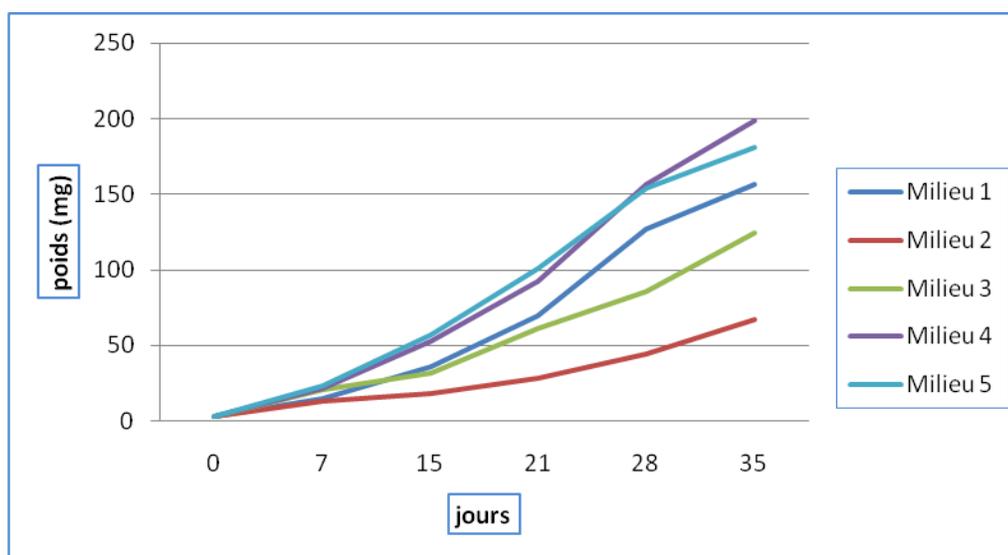
**Tableau 4-6:** Résultats des paramètres étudiés pour la callogénèse des feuilles de la variété Spunta.

Milieux	Induction de cals	initiation des cals	formation du cal	enracinement	consistance	couleur
<b>Milieu 1</b> (0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D)	86%	gonflement après 5 jours, initiation après une semaine	sur toute les extrémités ensuite sur une grande partie de la surface	6,97 %	compact globuleux	vert
<b>Milieu 2</b> (0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D)	40 %	gonflement après une semaine, initiation après 15 jours	seulement aux extrémités blessées de l'explant	40 %	friable et lisse	vert claire avec des zones blanchâtres
<b>Milieu 3</b> (0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D)	54 %	gonflement après une semaine, initiation après 10 jours	seulement aux extrémités blessées de l'explant	7,4 %	Friable, lisse et peu granuleux	vert claire
<b>Milieu 4</b> (0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D)	80%	gonflement après 5 jours, initiation après une semaine	sur toutes les extrémités ensuite s'étends sur une partie de l'explant	12,5 %	compact globuleux	vert
<b>Milieu 5</b> (0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D)	78 %	gonflement après 5 jours, initiation après une semaine	sur toute les extrémités	0 %	peu compact granuleux	vert

La croissance des cals de feuilles sur le milieu 4 et le milieu 5 est la plus élevée et la plus rapide au bout de 35 jours de culture pour spunta; par contre pour kondor se sont le milieu 1 et le milieu 4 qui ont eu les taux de croissance les plus élevés le long de la culture. Les cals multipliés sur le milieu 3 et le milieu 2 ont eu une croissance inférieur aux autres milieux (courbe 8; courbe 9).



**Courbe N°8:** croissance des cals de feuilles var. kondor sur les différents milieux de cultures testés.



**Courbe N°9 :** croissance des cals de feuilles var. Spunta sur les différents milieux de cultures testés.

**Milieu 1 :** 0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D;

**Milieu 2 :** 0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D;

**Milieu 3 :** 0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D;

**Milieu 4 :** 0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D;

**Milieu 5 :** 0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D.

Chez la variété kondor, la régénération a atteint un pourcentage de 44 % sur le milieu 1 (0.5 mg BAP /0.5 mg 2,4-D) et seulement 14 % sur le milieu 4 (0.5 mg BAP /3 mg 2,4-D) à partir de 30 jours de culture (figure 22).

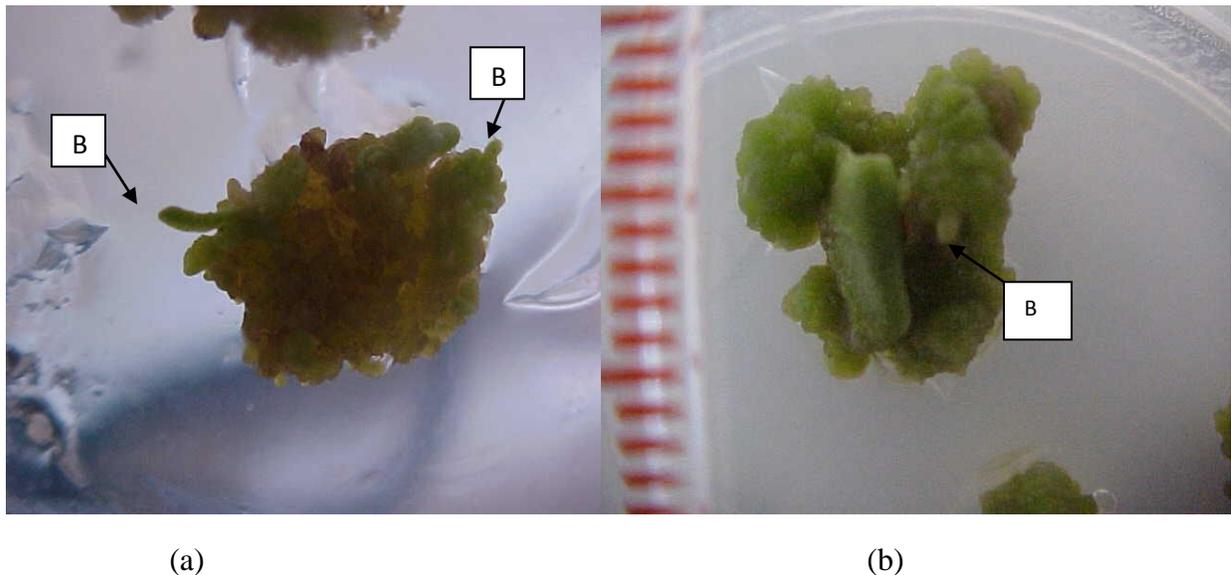
Pour la variété spunta la régénération est de 14 % chez le milieu 1 (0.5 mg BAP /0.5 mg 2,4-D) au bout de 35 jours de culture. Chez les autres milieux, il n'y a pas eu de régénération (figure 23).

Chez les deux variétés, la régénération s'est effectuée par bourgeonnement; car les bourgeons sont bien différenciés.

➤ **Effet du milieu MGA<sub>3</sub> sur le développement de plantules :**

Le développement des plantules après le transfère sur le milieu contenant 0,05mg GA<sub>3</sub>, a initié après 10-15 jours pour les deux variétés.

Chez kondor, le taux de reprise été de 77,27 % pour les cals issus du milieu 1 avec une moyenne de 17 plantules par cal. Pour le milieu 4, la reprise été de 57,14% avec une moyenne de 5 plantules seulement par cal. Pour spunta, le taux de reprise été de 42,85% avec une moyenne de 3 plantules par cal. Après 4 semaines les plantules développées chez les deux variétés sont de 2 à 3 nœuds (figure 24; figure 25).



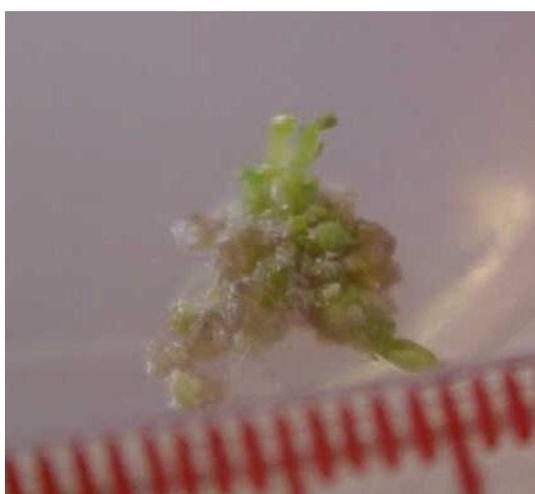
**Figure 22:** (a )bourgeons après 35 jours(b ) bourgeons après 30 jours induits sur les cals de feuilles var. kondor sur le milieu 1(0.5mg BAP/0.5mg 2,4-D).

B : bourgeon.



**Figure 23:** bourgeon sur cal de feuilles var spunta formés sur la combinaison 0.5mg BAP/0.5mg 2,4D.

B : bourgeon.



(a)



(b)

**Figure 24 :** développement des bourgeons issus de cal des feuilles (a) 2 bourgeons à 15 jours (b) fragment portant plusieurs bourgeons après 4 semaines de développement var. kondor.



**Figure 25:** développement des bourgeons issus de cal des feuilles var. spunta, après une semaine.

#### **1.4 Récapitulatif des résultats de la partie 1 :**

La régénération sur des explants de racines n'a pas été accomplie dans les conditions testées. Malgré que, chez la variété kondor sur les cals obtenus dans le milieu 4, des bourgeons ont été observés mais ils se sont pas développés après le transfère sur le milieu MGA<sub>3</sub>.

En ce qui concerne les tiges, la régénération a réussie chez les deux variétés. Pour la variété kondor, elle est constatée sur le milieu1 et le milieu5; mais c'est sur le milieu 1 que le taux le plus élevé a été enregistré.

Chez la variété spunta seul le milieu 1 a induit une régénération sur les cals.

Pour les deux variétés, la régénération est induit sur des cals verts compacts et globuleux avec un pourcentage de 80% et une moyenne de 20 plantules/ cal chez la variété kondor; et un pourcentage de 40% et une moyenne de 12 plantules/ cal chez la variété spunta. Après le transfère sur le milieu MGA<sub>3</sub> des plantes entières se sont développés chez les deux variétés.

Quant aux cals des feuilles, la régénération de plantules a été induite pour les deux variétés. Chez la variété kondor, la régénération a été observée sur les cals multipliés sur le milieu 1 et le milieu 5. Mais c'est sur le milieu 1 comme pour les tiges que le taux le plus élevé a été enregistré avec 44% et une moyenne de 17 plantules/cal. Chez la variété spunta , 14% seulement de cals ont permis une régénération sur le milieu1 avec une moyenne de 3 plantules/cal.

À l'issue de ces résultats, les explants de racines ne seront pas employés dans le reste de l'expérimentation puisqu'ils n'ont pas été appropriés à la régénération chez les deux variétés étudiées.

## 2. Partie 2 :

L'objectif de cette partie, est de déterminer la tolérance à différentes concentrations de NaCl pour les deux variétés étudiées et de sélectionner des intervalles de concentrations à utiliser pour la sélection de calcs tolérants. Pour cela, deux expérimentations ont été menés. La première en condition *in vivo* et la deuxième en condition *in vitro*.

### 2.1 Essai sous serre :

L'objectif de cet essai est de déterminer la tolérance des deux variétés à la salinité au premier stade de développement; ce stade dur en moyenne 30 jours et comporte deux courtes phases : l'émergence et le début du développement végétatif. Pour cela, des tubercules prégermés de cette variété ont été plantés dans des pots et irrigués avec des concentrations croissantes de NaCl.

#### 2.2.1 Effet du stress salin sur l'émergence des plantules :

Le pourcentage d'émergence chez la variété spunta est de 100% pour les traitements: T0 (0g/l), T3 (3g/l), T5 (5g/l), T7 (7g/l), T9 (9g/l), T12 (12g/l). chez la variété kondor les traitements T0, T3, T5, et T7 ont permis aussi une émergence de 100%. Pour les deux traitements T15 (15g/l) et T18 (18g/l) chez spunta et T9, T15, T18 chez kondor; l'émergence a été inhibée; ces derniers traitements ne sont pas pris en considérations dans le reste de l'expérimentation pour chaque variété.

L'effet de la salinité sur la date d'émergence a fait l'objet d'une analyse de variance représentée dans le tableau 5-1 pour la variété kondor et le tableau 5-2 pour la variété spunta :

**Tableau 5-1:** résultats de l'analyse de variances à un seul facteur, l'effet des traitements sur la date d'émergence var. kondor.

variances	DDL	carrés moyens	test F	probabilité	E.T.	C.V.
totale	11	7,9				
traitements	3	24,31	21,34	0,0018		
variance blocs	2	3,58	3,15	0,1159		
variance résiduelle 1	6	1,14				
					1,07	5,6%

**Tableau 5-2:** résultats de l'analyse de variances à un seul facteur, l'effet des traitements sur la date d'émergence var.spunta.

variances	DDL	carrés moyens	test F	probabilité	E.T.	C.V.
<b>Totale</b>	17	3,86				
<b>traitements</b>	5	10,32	15,75	0,0002		
<b>variance blocs</b>	2	3,72	5,68	0,0224		
<b>variance résiduelle</b>	10	0,66				
<b>1</b>					0,81	6,4%

L'analyse de variances montre un effet hautement significatif des traitements sur la date d'émergence chez les deux variétés, cet effet est présenté par les moyennes de jours entre la plantation et l'émergence pour chaque traitement dans les tableaux suivants :

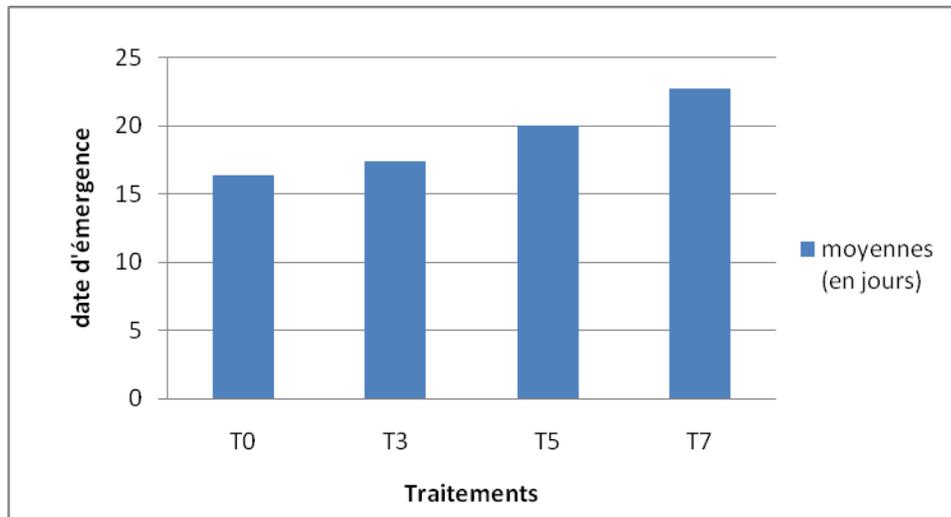
**Tableau 5-3:** moyennes de la durée en jours entre la plantation et l'émergence pour les différents traitements var. kondor.

Traitements	T0	T3	T5	T7
<b>Moyennes(en jours)</b>	16,33 ± 1,15	17,33 ± 0,58	20,0 ± 0	22,67 ± 2,31

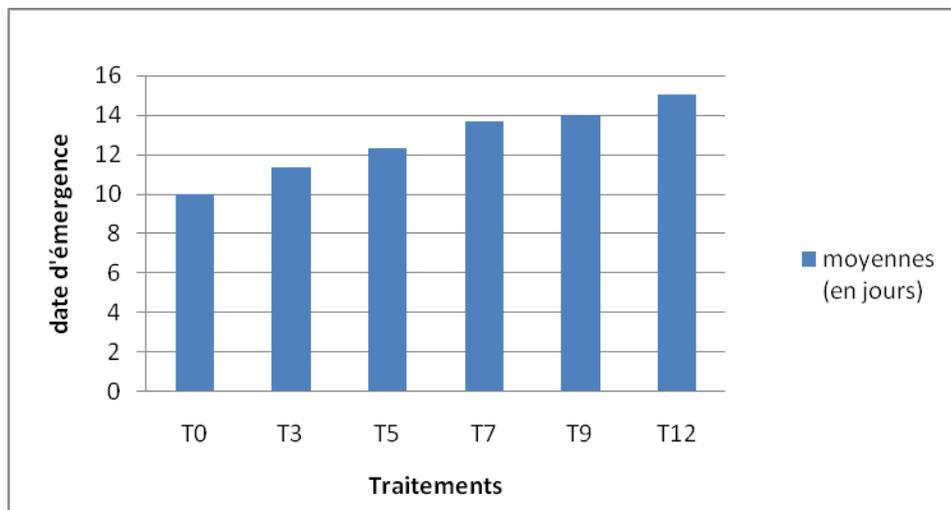
**Tableau 5-4:** moyennes de la durée en jours entre la plantation et l'émergence pour les différents traitements var.spunta.

Traitements	T0	T3	T5	T7	T9	T12
<b>Moyennes(en jours)</b>	10,0 ± 0	11,33 ± 1,15	12,33 ± 0,57	13,67 ± 1,53	14,0 ± 1,73	15,0 ± 0

Chez la variété spunta les tubercules non soumis au stress salin ont émergés après 10 jours de la date de plantation. Une eau d'irrigation à 12g/l de NaCl a retardé l'émergence de 5 jours. Donc, chaque gramme de NaCl retarde l'émergence de 0,41 jours en moyenne. Chez la variété kondor, les tubercules non soumis au stress salin ont émergés après 16,33 jours en moyenne de la date de plantation. Une eau d'irrigation à 7g/l de NaCl a retardé l'émergence de 6,34 jours. Donc, chaque gramme de NaCl retarde l'émergence de 0,9 jours en moyenne.



**Figure 26:** effet des différents traitements sur les dates d'émergences chez la variété Kondor.



**Figure 27:** effet des différents traitements sur les dates d'émergences chez la variété Spunta.

On peut dire que la variété kondor est plus sensible que spunta vis-à-vis du stress salin pour ce facteur qui est la date d'émergence.

Selon le test de Newman et Keuls les moyennes des dates d'émergences pour les différents traitements sont classées en groupes comme suit :

**Tableau 5-5** : Résultat de la comparaison des moyennes des dates d'émergences var. kondor.

Traitements	Groupes homogènes
T7	A
T5	B
T3	C
T0	C

**Tableau 5-6** : Résultat de la comparaison de moyennes des dates d'émergence pour la variété spunta.

Traitements	Groupes homogènes
T12	A
T9	AB
T7	AB
T5	BC
T3	CD
T0	D

Pour la variété kondor, la comparaison des moyennes a révélé une différence non significative entre le témoin T0 et le traitement T3, et une différence hautement significative entre T0 et le reste des traitements.

Pour la variété spunta, la comparaison des moyennes a révélé une différence significative entre le témoin T0 et le traitement T3, et une différence hautement significative entre T0 et le reste des traitements. Une différence non significative est constatée entre T7 et T9.

### **3.3.1 Effet de la salinité sur le début du développement végétatif :**

L'effet de la salinité sur le début du développement végétatif des deux variétés a été mis en évidence par le suivi de la hauteur des tiges sur une période de 30 jours après la date de plantation pour les différents traitements. Des analyses de variance ont été effectuées, les résultats sont présentés dans les tableaux suivants :

**Tableau 5-7:** résultats de l'analyse de variance à deux facteurs, l'effet des traitements et de la durée des traitements sur la hauteur des tiges var. kondor.

<b>Variances</b>	<b>DDL</b>	<b>carrés moyens</b>	<b>test F</b>	<b>probabilité</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>Totale</b>	35	20,07				
<b>Traitements</b>	3	42,98	43,82	0,0000		
<b>Temps</b>	2	249,98	254,9	0,0000		
<b>inter facteurs</b>	6	5,72	5,83	0,0010		
<b>variance blocs</b>	2	8,76	8,93	0,0015		
<b>variance résiduelle 1</b>	22	0,98				
					0,99	18,3%

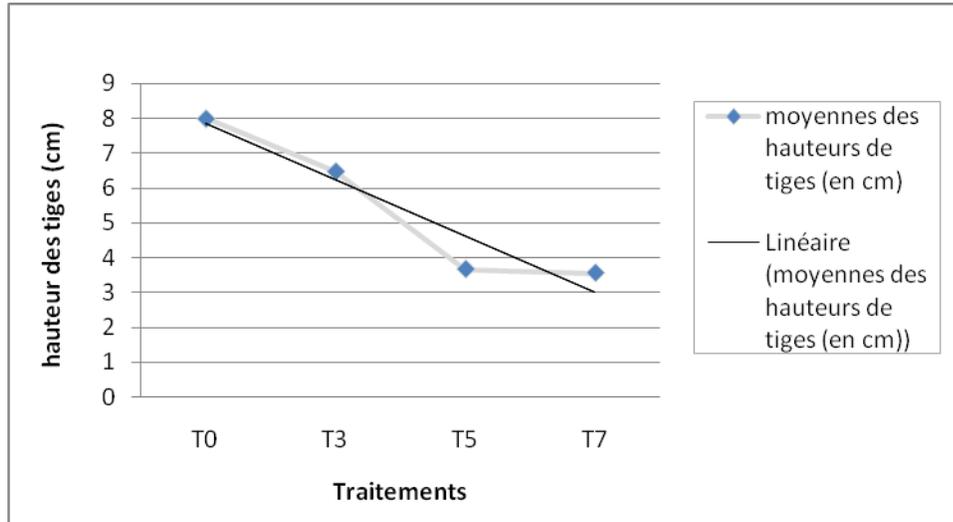
**Tableau 5-8:** résultats de l'analyse de variance à deux facteurs, l'effet des traitements et de la durée des traitements sur la hauteur des tiges var. spunta.

<b>Variances</b>	<b>DDL</b>	<b>carrés moyens</b>	<b>test F</b>	<b>probabilité</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>Totale</b>	53	20,06				
<b>Traitements</b>	5	59,2	24,12	0,0000		
<b>Temps</b>	2	301,56	122,88	0,0000		
<b>inter facteurs</b>	10	7,88	3,21	0,0053		
<b>variance blocs</b>	2	0,98	0,4	0,6777		
<b>variance résiduelle 1</b>	34	2,45				
					1,57	15,0%

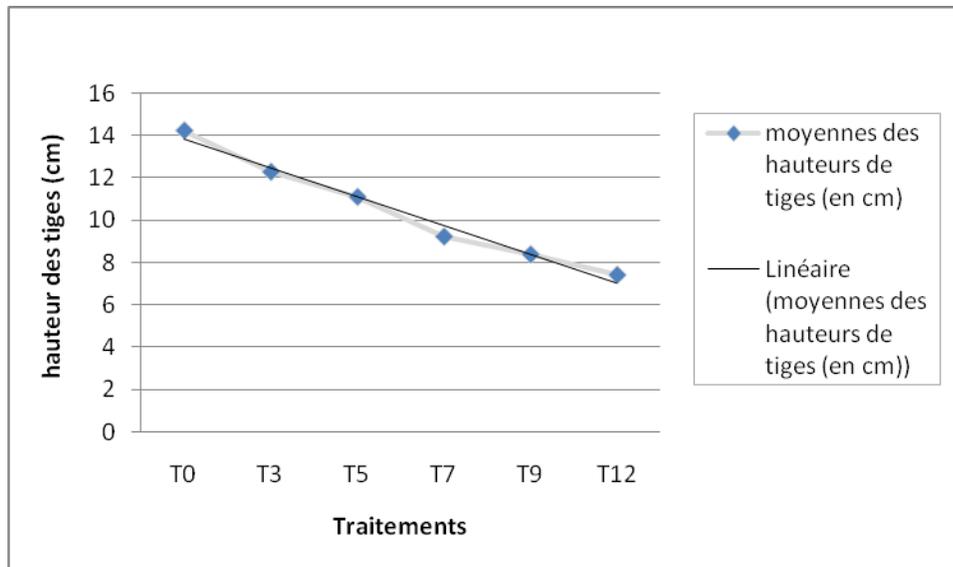
Les analyses de variances montrent que l'effet des différents traitements et de leur durée est hautement significatif sur le début du développement végétatif chez les deux variétés.

Les courbes établies par les moyennes des hauteurs de tiges des deux variétés pour chaque traitement, et représentées en dessous montrent l'effet croissant des traitements sur la croissance des tiges.

Une diminution de 6,8 cm en moyenne est constatée à 12 g/l de NaCl chez la variété spunta. Pour la variété kondor, une diminution de 4,44 cm en moyenne est constatée à 7 g/l de NaCl.



**Courbe 10 :** Effet des différents traitements en NaCl sur la hauteur des tiges après 30 jours de la date plantation var. kondor.



**Courbe 11:** effet des différents traitements en NaCl sur la croissance des tiges chez la variété spunta.

Les courbes tracées sont des courbes de régression de tendance linéaire dont l'équation est représentée comme suit:

$$y = a x + b.$$

a : coefficient de régression ou pente;

b : constante.

-Pour la variété kondor :

$$y = - 1,613x + 9,46.$$

Le coefficient de détermination :  $r^2 = 0,9096$ .

-Pour la variété spunta :

$$y = - 1,3583x + 15, 184$$

Le coefficient de détermination :  $r^2 = 0,9815$ .

Selon les équations déterminées on peut dire qu'une augmentation de la concentration de NaCl, entraîne une diminution de la hauteur des tiges chez les deux variétés.

Les valeurs de  $r^2$  expriment que l'ajustement des estimations des deux équations est bon. En ramenant cette valeur en pourcentage, on peut dire que 90,96% de la variabilité des hauteurs de tiges chez kondor et 98,15% chez spunta est expliquée par la liaison avec les traitements en NaCl.

Une comparaison multiple est réalisée pour chaque variété des moyennes des hauteurs des tiges selon chaque traitement. La comparaison multiple est établie par le test de Newman-Keuls. Les tableaux 5-9 et 5-10 démontrent les résultats :

**Tableau 5-9:** Résultat de la comparaison des moyennes de hauteurs des tiges pour les différents traitements var. Kondor.

Traitements	Groupes homogènes
T0	A
T3	B
T5	C
T7	C

**Tableau 5-10:** Résultat de la comparaison des moyennes de hauteur de tiges pour chaque traitement var. spunta.

Traitements	Groupes homogènes
T0	A
T3	B
T5	B

<b>T7</b>	C
<b>T9</b>	CD
<b>T12</b>	D

Les résultats du test pour la variété kondor présentés dans le tableau 5-9 montrent une différence non significative entre le traitement T5 et le traitement T7, et une différence hautement significative entre le témoin T0, le traitement T3 et le groupe formé par le traitement T5 et T7. Ceux de la variété spunta présentés montrent une différence non significative entre le traitement T3 et le traitement T5, ils forment le même groupe. Une différence significative existe entre le traitement T7 et T9; les différences entre le reste des traitements sont hautement significatives.

Une comparaison multiple des hauteurs de tiges selon la durée du traitement par le même test de Newman-Keuls est effectuée aussi pour chaque variété.

Les tableaux ci-dessous démontrent les résultats :

**Tableau 5-11:** Résultat de la comparaison des moyennes de hauteurs des tiges selon le temps. Variété Kondor.

<b>Temps (jours)</b>	<b>Groupes homogènes</b>
<b>30 j</b>	A
<b>24 j</b>	B
<b>17j</b>	C

**Tableau 5-12 :** Résultat de la comparaison des moyennes de hauteur de tiges à différentes période de la culture.

<b>Temps (jours)</b>	<b>Groupes homogènes</b>
<b>30 j</b>	A
<b>24 j</b>	B
<b>17j</b>	C

Les résultats du tableau 5-11, exposent des différences hautement significatives entre l'ensemble des moyennes comparées et c'est la moyenne enregistrée à 30 jours qui est la plus significative.

Les résultats du tableau 5-12, montrent des différences hautement significatives entre l'ensemble des moyennes comparées et c'est la moyenne enregistrée à 30 jours qui la plus significative.

De cela, des indices de tolérance sont calculés à partir des moyennes notées à 30 jours de développement pour les deux variétés (tableau 5-13; tableau 5-14). Il est à souligner que plus la valeur de l'indice est grande, plus la tolérance est importante.

**Tableau 5-13** : les valeurs des indices de tolérances basés sur la hauteur des tiges à 30 jours pour chaque traitement, variété kondor.

Traitements	Indice de tolérance
T3	0,92
T5	0,61
T7	0,47

**Tableau 5-14** : les valeurs des indices de tolérances basés sur la hauteur des tiges à 30 jours pour chaque traitement, variété spunta.

Traitements	Indice de tolérance
<b>T3</b>	0,85
<b>T5</b>	0,77
<b>T7</b>	0,64
<b>T9</b>	0,58
<b>T12</b>	0,49

Une échelle de tolérance théorique est proposée pour comparer les indices de tolérances calculés pour les différents stress aux valeurs théoriques de cette échelle (tableau 5-15).

**Tableau 5-15** : échelle de tolérance au sel pour la hauteur des tiges.

Classes	échelle
Sensible	$IT \leq 0,25$
Moyennement sensible	$0,25 < IT \leq 0,50$
Moyennement tolérante	$0,50 < IT \leq 0,75$
Tolérante	$0,75 < IT \leq 1$

Les valeurs de ces indices de tolérance, montrent au stade de développement étudié, que la variété kondor est tolérante au traitement T3, et moyennement tolérante au traitement T5. Pour le traitement T7, cette variété se montre sensible. Quant à la variété Spunta, elle se montre tolérante au traitement T3 et T5 et moyennement tolérante aux deux traitements T7 et T9. Elle est aussi moyennement sensible au traitement T12. Ces résultats correspondent au classement établi par le test de Newman et Keuls des moyennes des dates d'émergences pour les différents traitements chez la variété spunta.

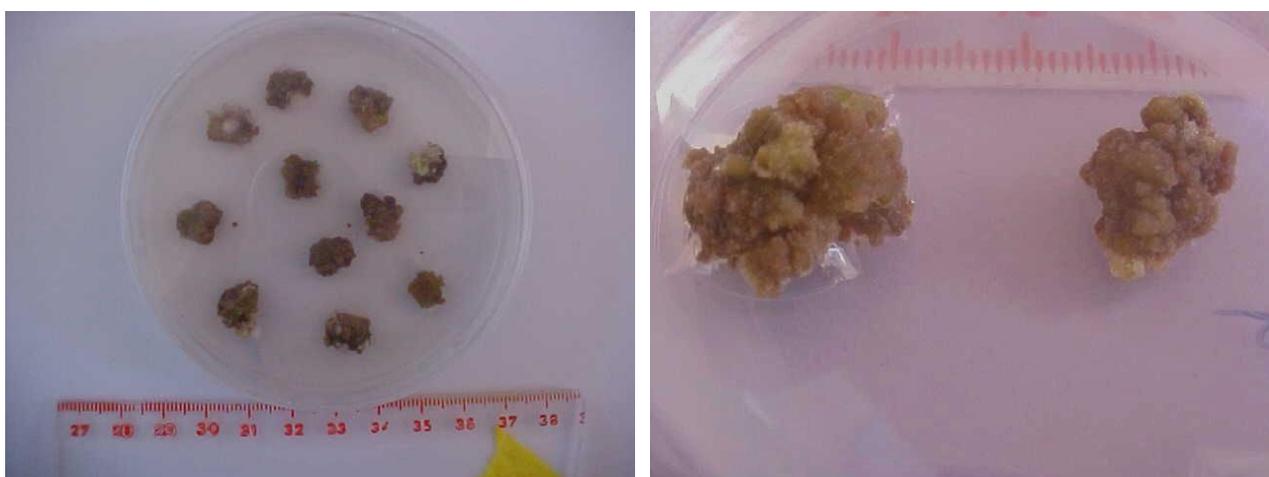
### 3.4 Tolérance des cals à la salinité :

30 calcs de tiges et de feuilles des deux variétés ont été repiqués sur des milieux de cultures contenant des concentrations croissantes de NaCl (de 1 à 18 g/l).

L'effet du sel sur la croissance des calcs a été mis en évidence par un suivi des poids des calcs sur 24 jours de culture.

### 3.4.1 Effet de la salinité sur la croissance des calcs de tiges :

Une semaine après la mise en culture, les calcs de tiges de la variété kondor repiqués sur les concentrations 15g/l, 16g/l, 17g/l et 18g/l de NaCl sont morts; chez la variété spunta aussi, les calcs repiqués sur les milieux contenant 17g/l et 18g/l de NaCl sont morts. Ils ont brunis et se sont vitrifiés. Pour chaque variété ces concentrations sont éliminées du reste de l'expérimentation et considérées comme létales.



**Figure N°28** : calcs de tiges morts, à gauche var. kondor sur 15g/l de NaCl ,et à droite var. spunta sur 17g/l.

Les poids des calcs de tiges ont fait l'objet d'une analyse de variances pour chaque variété dont les résultats sont présentés dans les tableaux suivants :

**Tableau 6-1** : Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs, l'effet des traitements et de la durée des traitements sur la croissance des calcs de tiges de la variété kondor.

Variances	DDL	carrés moyens	test F	probabilité	E.T.	C.V.
Totale	179	1216,21				
Traitements	14	5888,22	2642,96	0,0000		
Temps	3	21820,04	9794,05	0,0000		

<b>inter facteurs</b>	42	1655,76	743,2	0,0000		
<b>variance blocs</b>	2	0,45	0,2	0,8183		
<b>variance résiduelle 1</b>	118	2,23				
					1,49	1,3%

**Tableau6-2** : Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs, l'effet des traitements et de la durée des traitements sur la croissance des cals de tiges de la variété spunta.

<b>Variances</b>	<b>DDL</b>	<b>carrés moyens</b>	<b>test F</b>	<b>probabilité</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>Totale</b>	203	1270,38				
<b>Traitements</b>	16	3581,39	1656,19	0,0000		
<b>Temps</b>	3	50442,36	23326,7	0,0000		
<b>inter facteurs</b>	48	1019,94	471,67	0,0000		
<b>variance blocs</b>	2	5,69	2,63	0,0739		
<b>variance résiduelle 1</b>	134	2,16				
					1,47	1,2%

Les analyses de variances révèlent l'existence de différences hautement significatives dans le poids des cals en fonction des différents traitements et en fonction de la durée de la culture chez les deux variétés (à 8 jours, 16 jours et 24 jours).

Les moyennes des poids sont classées par le test de Newman-Keuls en groupes homogènes. Le tableau 6-3 présente le classement pour la variété kondor et le tableau 6-4 ceux de la variété spunta

**Tableau 6-3:** résultat de la comparaison des moyennes des poids des cals des tiges selon les différents traitements var. kondor.

<b>Traitements</b>	<b>Groupes homogènes</b>
<b>T0</b>	A
<b>T1</b>	B
<b>T2</b>	C

<b>T3</b>	D
<b>T4</b>	E
<b>T5</b>	F
<b>T6</b>	G
<b>T7</b>	H
<b>T8</b>	I
<b>T10</b>	J
<b>T9</b>	JK
<b>T13</b>	KL
<b>T14</b>	KL
<b>T12</b>	KL
<b>T11</b>	KL

La comparaison ainsi présentée des moyennes de poids des cals de tiges de la variété kondor révèle l'existence de différences hautement significatives entre les traitements T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T10. Une différence significative entre T10 et T9. Les traitements T11, T12, T13, T14 forment un groupe homogène de sensibilité.

**Tableau 6-4:** Résultat de la comparaison des moyennes des poids des cals de tiges de la variété spunta pour les différents traitements.

<b>Traitements</b>	<b>Groupes homogènes</b>
<b>T0</b>	A
<b>T2</b>	A
<b>T1</b>	A
<b>T3</b>	B
<b>T5</b>	B
<b>T4</b>	B
<b>T6</b>	C
<b>T7</b>	D
<b>T8</b>	E
<b>T9</b>	F

<b>T11</b>	F
<b>T10</b>	F
<b>T12</b>	G
<b>T13</b>	G
<b>T14</b>	H
<b>T15</b>	I
<b>T16</b>	J

La comparaison des moyennes montre l'existence de plusieurs groupes de sensibilité:

T0, T1, T2 / T3, T4, T5 / T6 / T7 / T8 / T9, T10, T11 / T12, T13 / T14 / T15 / T16. Au sein de ses groupes il n'existe pas de différences significatives.

Le classement des moyennes selon le facteur temps par le même test de Newman- Keuls est présenté dans le tableau 6-5 pour la variété kondor et dans le tableau 6-6 pour la variété spunta.

**Tableau 6-5 :** Résultats du classement des moyennes des poids des cals de tiges à différentes périodes de la culture var. kondor.

<b>Temps (jours)</b>	<b>Groupes homogènes</b>
<b>24 j</b>	A
<b>16 j</b>	B
<b>8j</b>	C
<b>0j</b>	D

**Tableau 6-6:** Résultat de la comparaison des moyennes des poids des cals de tiges de la variété spunta à différentes périodes de la culture.

<b>Temps (jours)</b>	<b>Groupes homogènes</b>
<b>24 j</b>	A
<b>16 j</b>	B
<b>8j</b>	C
<b>0j</b>	D

Pour les deux variétés, ces résultats révèlent une différence hautement significative entre la moyenne initiale, et celle à 8 jours, à 16 jours et à 24 jours. La moyenne à 24 jours de culture se présente comme la plus significative. Pour cela les taux de croissance et les indices de tolérances sont calculés à partir des moyennes de poids des cals à 24 jours de culture.

Taux de croissance en poids (mg)= poids moyen des cals pour un traitement donné à 24 jours de culture moins le poids moyen initial des cals.

Le poids moyen initial des cals de tiges de la variété kondor est de 90,44 mg.

Le poids moyen initial des cals de tiges de la variété spunta est de 90,12 mg.

Les indices de tolérance sont déterminés par le rapport du taux de croissance du cal en présence de stress sur celui noté en absence de stress.

Dans le but d'une meilleure discrimination de la tolérance des cals aux stress salin en se basant sur leur taux de croissance; une échelle de tolérance théorique est proposée pour comparer les indices de tolérances calculés pour les différents stress aux valeurs théoriques de cette échelle (tableau 6-7).

**Tableau 6-7:** échelle de tolérance au sel pour le taux de croissance des cals.

Classes	échelle
Très sensible	$IT \leq 0,16$
Sensible	$0,16 < IT \leq 0,33$
Moyennement sensible	$0,33 < IT \leq 0,50$
Moyennement tolérante	$0,50 < IT \leq 0,66$
Tolérante	$0,66 < IT \leq 0,83$
Très tolérante	$0,83 < IT \leq 1$

Les résultats des taux de croissance et des indices de tolérance sont présentés pour la variété kondor et la variété spunta respectivement dans le tableau 6-8 et le tableau 6-9.

**Tableau 6-8:** taux de croissance et indices de tolérance des cals de tiges de la variété kondor après 24 jours de culture.

Traitements	Taux de croissance (mg)	Indices de tolérance
T0	144,59	1

T1	136,23	0,94
T2	122,23	0,84
T3	109,09	0,75
T4	73,16	0,50
T5	52,23	0,36
T6	34,36	0,23
T7	25,13	0,17
T8	15,43	0,10
T10	10,76	0,07
T9	10,53	0,07
T12	4,06	0,02
T13	3,73	0,02
T14	3,23	0,02
T11	2,86	0,01

Selon les indices de tolérances calculés les cals de tiges de la variété kondor se montrent très tolérants aux concentrations de 1g/l et 2g/l de NaCl avec un pourcentage de croissance de plus de 84%, et tolérants à la concentration de 3 g/l de NaCl avec 75,45% de croissance, ces cals sont aussi moyennement sensibles aux concentrations 4g/l et 5g/l de NaCl. Pour les traitements T6 et T7 avec respectivement 23,74% et 17,38% de croissance, les cals de tiges se montrent sensibles, de T8 à T14 les cals de tiges sont très sensibles.

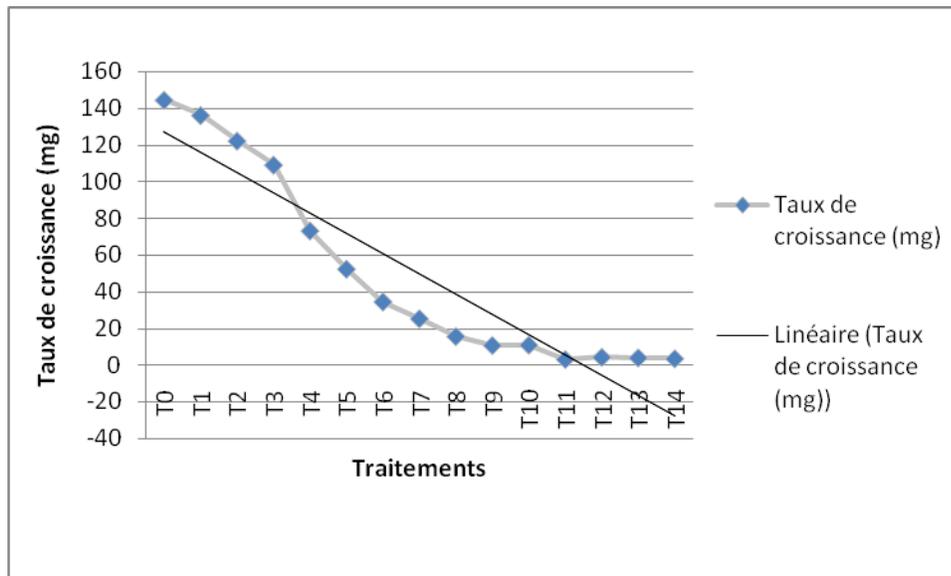
**Tableau 6-9:** taux de croissance et indices de tolérance des cals de tiges de la variété spunta après 24 jours de culture.

Traitements	Taux de croissance (mg)	Indices de tolérance
<b>T0</b>	123,55	1
<b>T1</b>	121,88	0,98

<b>T2</b>	121,88	0,98
<b>T3</b>	119,88	0,97
<b>T4</b>	117,28	0,94
<b>T5</b>	116,21	0,94
<b>T6</b>	86,25	0,69
<b>T7</b>	72,68	0,58
<b>T8</b>	58,88	0,47
<b>T9</b>	54,31	0,43
<b>T10</b>	52,65	0,42
<b>T11</b>	51,01	0,41
<b>T12</b>	35,75	0,28
<b>T13</b>	33,28	0,26
<b>T14</b>	26,05	0,21
<b>T15</b>	15,51	0,12
<b>T16</b>	6,15	0,04

Selon les indices de tolérances calculés les cals de tiges de la variété spunta se montrent très tolérants à l'intervalle de concentration de 1g/l à 5g/l de NaCl où la croissance dépasse 90%, tolérants à la concentrations de 6g/l de NaCl avec 69,81% de croissance, et moyennement tolérants à la concentration de 7g/l de NaCl avec une croissance de 58,83%. Pour les traitements de T8 à T11, les cals de tiges se montrent moyennement sensibles, dans cet intervalle la croissance est entre 41,29% et 47,66%. De T12 à T14 les cals de tiges sont sensibles, la croissance est 20 et 30%. Par contre, ils sont très sensibles aux concentrations de 15g/l de NaCl avec une croissance de 12,55% et de 16g/l de NaCl avec moins de 5% de croissance.

Des courbes ont été établies par les taux de croissance des cals de tiges pour chaque traitement pour les deux variétés, sont représentées en dessous et montrent l'effet croissant des traitements sur la croissance des cals de tiges.

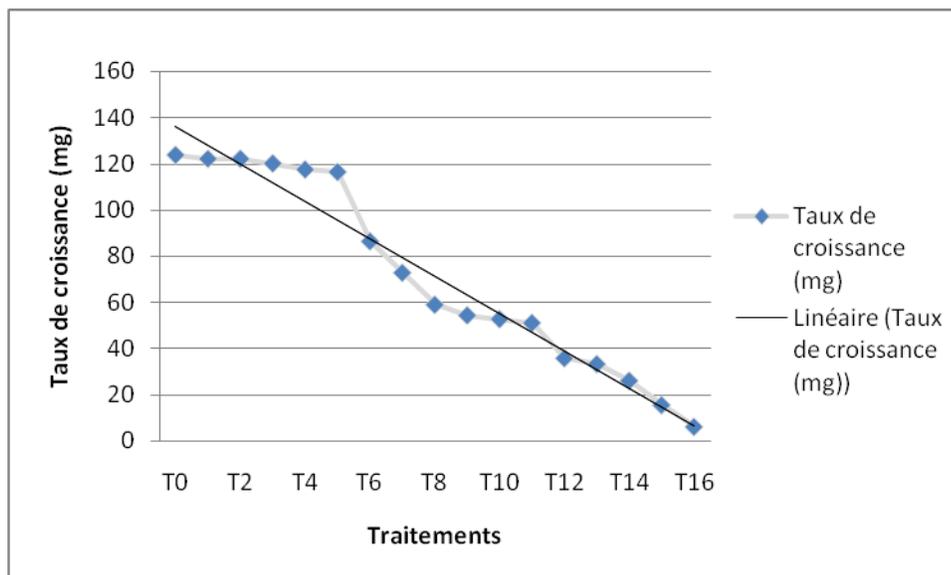


**Courbe 12:** Effet des différents traitements en NaCl sur le taux de croissance des cals de tiges chez la var. kondor après 24 jours de culture.

L'équation de la courbe de régression de tendance linéaire tracée est:

$$y = - 11,035 x + 138,12$$

Le coefficient de détermination :  $r^2 = 0,8643$ .



**Courbe 13:** Effet des différents traitements en NaCl sur le taux de croissance des cals de tiges var. spunta après 24 jours de culture.

L'équation de la courbe de régression de tendance linéaire tracée est:

$$y = - 8,0859 x + 144,14$$

Le coefficient de détermination :  $r^2 = 0,9568$ .

Selon les deux équations déterminées on peut dire qu'une augmentation de la concentration de NaCl, entraîne une diminution du taux de croissance des cals de tiges chez les deux variétés.

La valeur de  $r^2$  proche de 1, exprime que l'ajustement des estimations de l'équation est bon. En ramenant cette valeur en pourcentage, on peut dire que 95,68% de la variabilité des taux de croissance des cals de tiges chez la variété spunta et 86,43 % chez la variété kondor, est expliquée par la liaison avec les traitements en NaCl.

### 3.4.2 Effet de la salinité sur la croissance des cals de feuilles :

Une semaine après la mise en culture, les cals de feuilles de la variété kondor repiqués sur les concentrations 16g/l, 17g/l, 18g/l de NaCl sont morts, ainsi que ceux de la variété spunta repiqués sur les concentrations 15 g/l, 16g/l, 17g/l, 18g/l. Ces concentrations sont éliminées du reste de l'expérimentation et considérées comme létales.

Les poids des feuilles de tiges ont fait l'objet d'une analyse de variance dont les résultats sont présentés dans le tableau 7-1 pour la variété kondor et dans le tableau 7-2 pour la variété spunta :

**Tableau 7-1 :** Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs, l'effet des traitements et de la durée des traitements sur la croissance des cals de feuilles de la variété kondor.

Variances	DDL	carrés moyens	test F	probabilité	E.T.	C.V.
<b>Totale</b>	191	1214,76				
<b>Traitements</b>	15	4797,42	2070,01	0,0000		
<b>Temps</b>	3	33564,02	14482,33	0,0000		
<b>inter facteurs</b>	45	1312,56	566,35	0,0000		

<b>variance blocs</b>	2	3,88	1,67	0,1900		
<b>variance résiduelle 1</b>	126	2,32			1,52	2,0%

**Tableau 7-2:** Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs, l'effet des traitements et de la durée des traitements sur la croissance des cals de feuilles de la variété spunta.

<b>Variances</b>	<b>DDL</b>	<b>carrés moyens</b>	<b>test F</b>	<b>probabilité</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>Totale</b>	179	553,27				
<b>Traitements</b>	14	1556,72	578,25	0,0000		
<b>Temps</b>	3	20766,55	7713,79	0,0000		
<b>inter facteurs</b>	42	347,55	129,1	0,0000		
<b>variance blocs</b>	2	13,3	4,94	0,0088		
<b>variance résiduelle 1</b>	118	2,69			1,64	2,3%

Les analyses de variances révèlent l'existence de différences hautement significatives dans le poids des cals en fonction des différents traitements et en fonction de la durée de la culture (à 8 jours, 16 jours et 24 jours) pour les deux variétés.

Les moyennes des poids de cals des deux variétés ont été classées par le test de Newman-Keuls en groupes homogènes. Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants :

**Tableau 7-3:** classement des moyennes de poids des cals de feuilles de la variété kondor par rapport aux différents traitements.

Traitements	Groupes homogènes
T2	A
T0	A

T1	A
T3	B
T4	C
T5	D
T6	E
T7	E
T8	F
T10	G
T9	H
T12	HI
T11	I
T13	J
T14	K
T15	K

Les moyennes ainsi classées font ressortir des groupes de sensibilité où il n'existe pas de différences significatives comme : T0, T1, T2/ T6, T7/ T14, T15. Entre T9 et T12, il existe des différences significatives ; et entre le reste des traitements des différences hautement significatives sont démontrés par ce classement.

**Tableau 7-4:** Résultat de la comparaison des moyennes des poids des cals de feuilles de la variété spunta pour les différents traitements.

Traitements	Groupes homogènes
T0	A
T1	A

<b>T2</b>	B
<b>T4</b>	C
<b>T3</b>	C
<b>T5</b>	D
<b>T7</b>	E
<b>T6</b>	E
<b>T8</b>	E
<b>T9</b>	F
<b>T10</b>	G
<b>T11</b>	H
<b>T12</b>	H
<b>T13</b>	I
<b>T14</b>	J

Il ressort de ce classement des groupes homogènes dans lesquels il n'existe pas de différences significatives, ces groupes sont: T0, T1/ T2 / T4, T3/ T5 / T6, T7, T8/ T9/ T10/ T11, T12/ T13/ T14. Il existe entre ces groupes des différences significatives.

Le classement des moyennes selon le facteur temps par le même test de Newman- Keuls est présenté dans le tableau 7-5 pour la variété kondor et dans le tableau 7-6 pour la variété spunta.

**Tableau 7-5 :** Résultat de la comparaison des moyennes des poids des cals de tiges de la variété kondor à différents période de la culture

<b>Temps (jours)</b>	<b>Groupes homogènes</b>
<b>24 j</b>	A
<b>16 j</b>	B
<b>8j</b>	C
<b>0j</b>	D

**Tableau 7-6:** Résultat de la comparaison des moyennes des poids des cals de tiges de la variété spunta à différents période de la culture.

<b>Temps (jours)</b>	<b>Groupes homogènes</b>
<b>24 j</b>	A
<b>16 j</b>	B
<b>8j</b>	C
<b>0j</b>	D

Ces résultats révèlent une différence hautement significatives entre la moyenne initiale, et celles à 8jours, à 16 jours et à 24 jours. La moyenne à 24 jours de culture se présente comme la plus significative; pour cela les taux de croissance et les indices de tolérances sont calculés à partir des moyennes de poids des cals à 24 jours de culture.

Le poids moyen initial des cals de feuille de la variété kondor est de 49,75 mg

Le poids moyen initial des cals de feuille de la variété spunta est de 49,8 mg.

Dans le but d'une meilleure distinction de la tolérance des cals aux stress salin en se basant sur leur taux de croissance; les indices de tolérances calculés pour les différents traitements sont comparés aux valeurs théoriques de l'échelle proposer précédemment et présentée dans le tableau 6-7.

Les résultats des taux de croissance et des indices de tolérance pour les deux variétés sont présentés dans les tableaux ci après :

**Tableau 7-7:** Taux de croissance et indices de tolérance des cals de feuilles de la variété kondor.

Traitements	Taux de croissance (mg)	Indices de tolérance
T0	146,5	1
T2	118,46	0,81
T1	116,83	0,80
T3	108,13	0,74

T4	99,5	0,68
T5	82,13	0,56
T7	73,3	0,50
T6	73,23	0,50
T8	46,26	0,32
T9	38,53	0,26
T10	18,23	0,12
T11	15,3	0,10
T12	14,63	0,10
T13	10,3	0,07
T14	5,06	0,03
T15	4,06	0,03

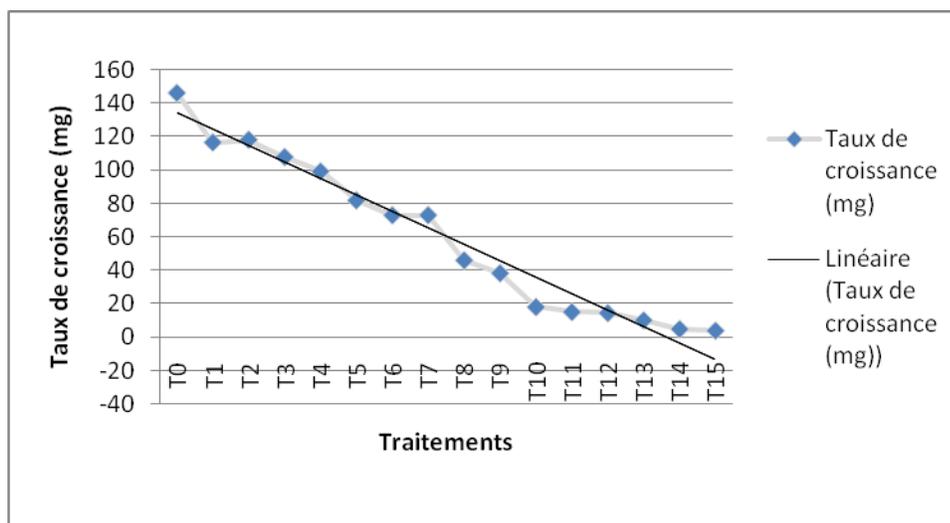
Selon les indices de tolérance calculés, les cals des feuilles de la variété kondor sont très tolérants aux concentrations de 1g/l et 2g/l de NaCl; tolérants aux deux concentrations 3g/l et 4g/l de NaCL et moyennement tolérants à 5g/l de NaCl. ils sont moyennement sensibles aux concentrations 6g/l et 7g/l. Les cals sont sensibles aux traitements T8 et T9, et très sensibles aux traitements de T10 à T15.

**Tableau 7-8 :** taux de croissance et indices de tolérance des cals de feuilles de la variété spunta après 24 jours de culture.

Traitements	Taux de croissance (mg)	Indices de tolérance
<b>T0</b>	81,56	1
<b>T1</b>	78,63	0,96
<b>T2</b>	72,5	0,89
<b>T4</b>	67,83	0,83
<b>T3</b>	67,63	0,83
<b>T5</b>	62,33	0,76
<b>T6</b>	53,13	0,65
<b>T7</b>	51,83	0,64
<b>T8</b>	49,71	0,61
<b>T9</b>	41,23	0,50
<b>T10</b>	34,43	0,42
<b>T11</b>	25,3	0,31
<b>T12</b>	24,43	0,30
<b>T13</b>	11,73	0,14
<b>T14</b>	3,66	0,04

Selon les indices de tolérance présentés au tableau, les cals des feuilles de cette variété, se montrent très tolérants aux traitements T1 et T2 avec une croissance de plus de 88%; et tolérants aux traitements T4, T3, et T5; et moyennement tolérants aux traitements T6, T7, T8 avec une croissance de 60,95% à 65,14%. Pour les traitements T9 et T10 avec respectivement 50 et 42,21% de croissance, les cals sont moyennement sensibles; par contre, pour les traitements T11 et T12 ils sont sensibles. Les cals de feuilles de cette variété sont très sensibles aux traitements T13 avec 14,38% de croissance et T14 avec 4,49% de croissance et T15 avec 2,85% de croissance.

L'effet des traitements en NaCl sur la croissance des cals de feuilles des deux variétés, est présenté dans la courbe 13 pour la variété kondor et dans la courbe 14 pour la variété spunta. Les courbes sont tracées en se basant sur les taux de croissance des cals de feuilles à 24 jours de culture pour chaque traitement.

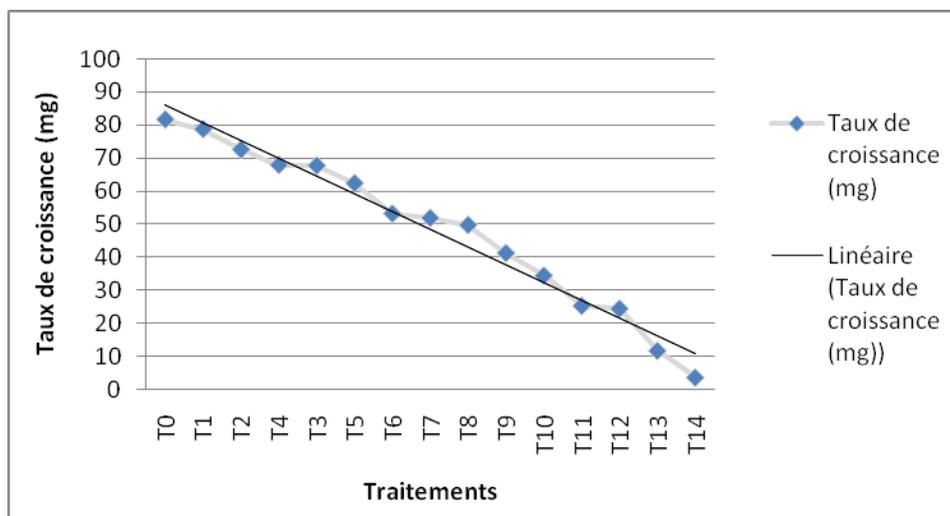


**Courbe 14:** Effet des différents traitements en NaCl sur le taux de croissance des cals de feuilles var. kondor après 24 jours de culture.

Une courbe de régression de tendance linéaire est tracée dont l'équation est :

$$y = - 9,7955 x + 143,78.$$

Le coefficient de détermination :  $r^2 = 0,9621$ .



**Courbe 15:** Effet des différents traitements en NaCl sur le taux de croissance des cals de feuilles var. spunta après 24 jours de culture.

L'équation de la courbe de régression de tendance linéaire tracée est:

$$y = - 5,3657 x + 91,321$$

Le coefficient de détermination :  $r^2 = 0,9745$ .

Selon les équations déterminées on peut dire qu'une augmentation de la concentration de NaCl, entraîne une diminution du taux de croissance des cals de feuilles des deux variétés.

La valeur de  $r^2$  proche de 1 pour les deux variétés, exprime que l'ajustement des estimations des équations est bon. En ramenant cette valeur en pourcentage, on peut dire que 97,45% de la variabilité des taux de croissance des cals de feuilles chez spunta et 96,21% pour la variété kondor, est expliquée par la liaison avec les traitements en NaCl.

Pour chaque variété une comparaison entre les indices de tolérance obtenus in vitro sur culture de cals pour les deux types d'explants feuilles et tiges et ceux obtenus en conditions in vivo sur le premier stade de développement de la variété Spunta s'impose pour sélectionner l'intervalle de concentration à employer dans la sélection de cals tolérants au stress salin, et pour définir l'intervalle de concentration de NaCl auquel la variété spunta est sensible dans les conditions expérimentales testés. Cette comparaison est présentée dans le tableau 8 pour la variété kondor et dans le tableau 9 pour la variété spunta.

Au delà, de 85% de diminution de croissance, on estime que les concentrations en NaCl réduisent fortement la croissance et sont sublétales. Ces concentrations ne seront pas choisies pour sélectionner des cals tolérants.

**Tableau 8** : comparaison des résultats obtenus sur la tolérance de la variété Kondor au stress salin, selon les expérimentations menées in vivo et in vitro.

Classe	Échelle de tolérance	Traitements En culture in vitro		Traitements En conditions in vivo
		Cals des tiges	Cals des	

			feuilles	
<b>Très tolérant</b>	$0,83 < IT \leq 1$	T1 T2	T1 T2	T3
<b>Tolérant</b>	$0,66 < IT \leq 0,83$	T3	T3 T4	
<b>Moyennement tolérant</b>	$0,50 < IT \leq 0,66$		T5	T5
<b>moyennement sensible</b>	$0,33 < IT \leq 0,50$	T4 T5	T6 T7	T7
<b>sensible</b>	$0,16 < IT \leq 0,33$	T6 T7	T8 T9	/
<b>Très sensible</b>	$0,00 < IT \leq 0,16$	T8 T9 T10 T11 T12 T13 T14	T10 T11 T12 T13 T14 T15	T9 T12
<b>létale</b>	$IT \leq 0,00$	T15 T16 T17 T18	T16 T17 T18	T15 T18

Donc, pour la variété kondor les intervalles de concentrations qui vont être employé pour en sélection de cals tolérants à la salinité sont :

- pour les cals de tiges de 4g/l à 7 g/l de NaCl;
- pour les cals des feuilles de 6g/l à 9 g/l de NaCl.

**Tableau 9** : comparaison des résultats obtenus sur la tolérance de la variété Spunta au stress salin, selon les expérimentations menées in vivo et in vitro.

Classe	Échelle de tolérance	Traitements En culture in vitro		Traitements En conditions in vivo
		Cals des tiges	Cals des feuilles	
<b>Très tolérant</b>	$0,83 < IT \leq 1$	T1 T2 T3	T1 T2	T3

		T4 T5		
<b>Tolérant</b>	$0,66 < IT \leq 0,83$	T6	T3 T4 T5	T5
<b>Moyennement tolérant</b>	$0,50 < IT \leq 0,66$	T7	T6 T7 T8	T7 T9
<b>moyennement sensible</b>	$0,33 < IT \leq 0,50$	T8 T9 T10 T11	T9 T10	T12
<b>sensible</b>	$0,16 < IT \leq 0,33$	T12 T13 T14	T11 T12	/
<b>Très sensible</b>	$0,00 < IT \leq 0,16$	T15 T16	T13 T14	/
<b>létale</b>	$IT \leq 0,00$	T17 T18 T19 T20	T15 T16 T17 T18 T19 T20	T15 T18

Pour la variété spunta le seuil de 85% de diminution de croissance est enregistré à partir de 13g/l de NaCl chez les cals de feuilles et à partir de 15g/l de NaCl chez les cals de tiges. Ces observations correspondent aux résultats obtenus en conditions in vivo. Ces concentrations ne seront pas choisies pour sélectionner des cals tolérants.

Les intervalles de concentrations qui vont être employé pour en sélection de cals de cette variété tolérants à la salinité sont :

- pour les cals de tiges de 8g/l à 14 g/l de NaCl;
- pour les cals des feuilles de 9g/l à 12 g/l de NaCl.

#### **4. Partie 3 : sélection des cals tolérants.**

Les cals multipliés dans la partie 2 sur les intervalles de concentrations choisies, ont été repiqués sur un milieu neuf en gardant les mêmes concentrations de NaCl préalables dans le but de sélectionner des cals tolérants chez les deux variétés étudiées et sur les deux types d'explants, tiges et feuilles. Les cals sont repiqués à raison de 50 cals par traitements en NaCl. Les résultats de ce deuxième repiquage sont présentés par variété.

##### **4.1 Variété kondor :**

###### **4.1.1 cals des tiges :**

Le poids moyen des cals repiqués est de  $90,41 \pm 1,6$  mg

Les résultats des paramètres d'études entrepris pour ce stade de l'expérimentation pour les cals des tiges sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 10-1** : Résultats du repiquage des cals de tiges var. kondor sur les milieux de culture contenant les concentrations de NaCl de sélection.

Traitements	poids moyens (mg)à 24jours de culture	Pourcentage de reprise	taux de croissance	indice de tolérance	Brunissement après 24j				Consistance des cals
					total	partiel	parties au contact du milieu	absence	
T0	236,166	96%	145,76	1	/	20,84 %	/	79,16 %	compact globuleux
T4	160,54	76%	70,13	0,48	13,15 %	65,78 %	21,07%	/	compact globuleux
T5	140,394	58%	49,98	0,34	20,69 %	58,62 %	20,69%	/	compact globuleux
T6	121,88	46%	31,47	0,22	21,74 %	65,22 %	13,04%	/	compact globuleux
T7	124,494	42%	34,08	0,23	23,80 %	38,11 %	28,57%	9,52%	compact globuleux

Les cals de tiges sur toutes les concentrations étudiées ont gardés leur consistance de départ c'est-à-dire compact et globuleux. On remarque que même en absence de stress salin y'a un pourcentage de cals (20,84%) qui présentent un brunissement partiel. En comparant les indices de tolérance des cals dans ce repiquage avec ceux du repiquage précédent (partie 2, tableau 6-8), on remarque que la tolérance aux traitements T4, T5 et T6 a légèrement diminué. Par contre, pour le traitement T7 (7g/l de NaCl), la tolérance s'est nettement améliorée en passant de 0,17 à 0,23 dans ce repiquage; cette amélioration s'explique par le faite que 8 cals des 50 repiqués sur ce traitement, se développent aussi bien que le témoin (figure 29).



**Figure N°29** : cal de tige var. kondor, 20 jours de culture sur le traitement T7.

Le tableau ci-dessous présente les taux de croissance des 8 cals qui ont eu un bon développement sur le traitement T7, ainsi que leurs indices de tolérance. Les indices de tolérance sont comparés à l'échelle théorique proposée et présentée précédemment dans le tableau 6-7.

**Tableau 10-2** : taux de croissance après 24 jours de culture des 8 cals multipliés sur T7 présentant un développement proche des témoins.

cals	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6	Cal7	Cal8
Taux de croissance après 24j (mg)	129,56	132,1	124,3	96,2	113,4	121,3	110,5	100,5
Indice de tolérance	0,89	0,9	0,85	0,66	0,77	0,83	0,75	0,68
Brunissement	Au contact du milieu	partiel	Au contact du milieu	partiel	partiel	Au contact du milieu	absence	absence
Tolérance (selon l'échelle tableau 6-7)	Très tolérant			Moyennement tolérant	Tolérant			

Ces cals vont être repiqués et suivis afin de vérifier leur tolérance au stress de 7g/l de NaCl.

#### 4.1.2 cals des feuilles :

Le poids moyen des cals repiqués est de  $50,11 \pm 1,89$  mg

Les résultats des paramètres d'études entrepris pour les cals des feuilles sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 10-3** : Résultats du repiquage des cals de feuilles var. kondor sur les milieux de culture contenant les concentrations de NaCl de sélection.

Traitements	moyennes des poids (mg)à 24j	Pourcentage de reprise	taux de croissance	indice de tolérance	Brunissement après 24j				Consistance des cals
					total	partiel	parties au contact du milieu	absence	
T0	196,434	94%	146,32	1	/	19,15%	/	80,85 %	compact globuleux
T6	121,34	70%	71,23	0,49	14,28 %	57,14%	28,58%	/	peu compact globuleux
T7	119,24	68%	69,13	0,47	17,65 %	82,53%	/	/	peu compact globuleux
T8	92,206	36%	42,10	0,29	44,45 %	55,55%	/	/	peu compact peu globuleux
T9	86,8	32%	36,69	0,25	62,50 %	37,50%	/	/	peu compact peu globuleux

La consistance des cals est devenue en générale peu compact sur les concentrations de 6 et 7g/l de NaCl, sur les concentrations de 8g/l et 9g/l de NaCl les cals sont peu compacts et peu globuleux. Les cals des feuilles aussi comme ceux des tiges présentent en absence de stress 19,15% de cals brunis partiellement. En comparant les indices de tolérance des cals dans ce repiquage avec ceux du repiquage précédent (partie 2, tableau 7-7), on remarque que la tolérance à l'ensemble des traitements a légèrement diminué. Il n'existe aucun cal sur tous les traitements étudiés, qui présente un développement amélioré.

#### 4.1.3 Multiplication et suivi des cals tolérants :

Les cals de tiges tolérants obtenus sous le stress de 7g/l de NaCl, sont repiqués trois fois successifs sur le traitement T7 pour vérifier leur acquisition de la tolérance à cette concentration. Les parties brunis sont sectionnées et les cals sont fractionnés de façon à avoir des cals de la même taille.

Trois cals témoins sont repiqués sur un milieu sans NaCl au même temps que les cals tolérants, pour permettre de calculer les indices de tolérance. La moyenne du taux de croissance de ces cals témoins est à chaque fois présentée dans les tableaux qui suivent.

##### a. Premier repiquage :

Les 8 lignées cellulaires sélectionnées sont repiqués. Les résultats du premier repiquage sont présentés dans le tableau 10-4. Notons que les cals issus du cal6 se sont contaminés.

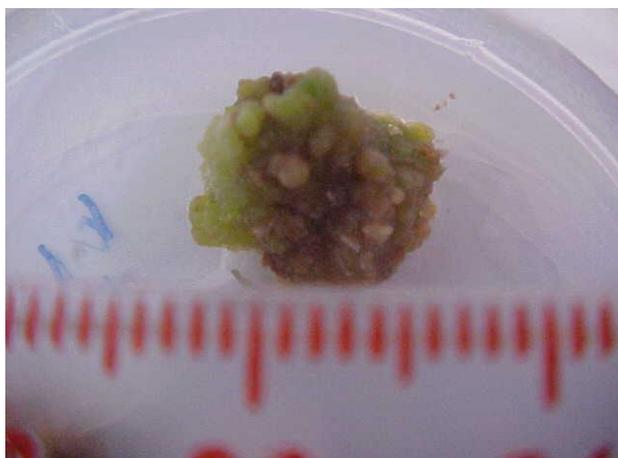
**Tableau 10-4 :** résultats du premier repiquage des cals de tiges var. kondor tolérants à 7g/l de NaCl.

cal origine	cals	taux de croissance à	brunissement	indice de tolérance	tolérance
-------------	------	----------------------	--------------	---------------------	-----------

		24 jours de culture			
cal1	1	130,4	absence	0,89	Très tolérant
	2	126,7	partiel	0,86	Très tolérant
cal2	3	133,7	partiel	0,91	Très tolérant
	4	121,7	au contact du milieu	0,83	Tolérant
cal3	5	120,6	au contact du milieu	0,82	Tolérant
	6	121,2	absence	0,82	Tolérant
cal4	7	45,4	partiel	0,31	Sensible
	8	39,8	total	0,27	Sensible
cal5	9	110,9	partiel	0,75	Tolérant
	10	117,2	une petite partie	0,80	Tolérant
cal7	11	108,4	absence	0,74	Tolérant
	12	115,3	absence	0,78	Tolérant
cal8	13	99,4	absence	0,68	Tolérant
	14	102,3	au contact du milieu	0,70	Tolérant
témoin	15	147,1	absence	1,00	Très tolérant

Ce premier repiquage montre que les cals issus du cal 1 ont gardés le même degré de tolérance, quant aux cals issus du cal 2, un est resté très tolérant et le deuxième s'avère que tolérant à la concentration de 7g/l de NaCl; ceux issus du cal 3 sont dans ce repiquage tolérants. Le cal 4 s'est montré au repiquage précédent moyennement tolérant alors que dans ce repiquage, les deux cals issus de ce dernier ce montrent sensible au traitement T7. Le reste des cals issus du cal 5, du cal 7 et du cal 8 ont gardés le même degré de tolérance.

Les cals issus du cal4 (figure 30) sont donc écartés du reste de l'expérimentation.



**Figure 30** : cal 4.7, var. kondor, redevenu sensible au traitement 7 au deuxième repiquage.

**b. Deuxième repiquage :**

Les résultats de ce troisième sont présentés dans le tableau 10-5.

**Tableau 10-5** : résultats du deuxième repiquage des cals de tiges var. kondor tolérants à 7g/l de NaCl

cal origine	cals	taux de croissance à 24 jours de culture	brunissement	indice de tolérance	tolérance
cal 1.1	1	131,1	absence	0,87	Très tolérant
	2	129,3	une petite partie	0,86	Très tolérant
cal 1.2	3	124,9	partiel	0,83	Très tolérant

	4	126	une petite partie	0,84	Très tolérant
cal 2.3	5	130,4	absence	0,87	Très tolérant
	6	134	une petite partie	0,89	Très tolérant
cal 2.4	7	118,7	partiel	0,79	Tolérant
	8	121,9	absence	0,81	Tolérant
cal 3.5	9	124,1	absence	0,83	Tolérant
	10	119,5	absence	0,80	Tolérant
cal 5.9	11	109	partiel	0,73	Tolérant
	12	111,3	partiel	0,74	Tolérant
cal 5.10	13	105,3	absence	0,70	Tolérant
	14	112,4	une petite partie	0,75	Tolérant
cal 7.11	15	105,9	absence	0,71	Tolérant
	16	110,2	une petite partie	0,73	Tolérant
cal 7.12	17	115	absence	0,77	Tolérant
	18	118,2	une petite partie	0,79	Tolérant
cal 8.13	19	94,6	absence	0,63	Moyennement tolérant
	20	100,2	partiel	0,67	Tolérant
cal 8.14	21	103,5	une petite partie	0,69	Tolérant
	22	100,9	absence	0,67	Tolérant
Témoin	23	150,1	absence	1,00	Très tolérant

Les cals ont gardés le même degré de tolérance à 7g/l de NaCl dans le milieu de culture; sauf un des deux cals provenant du cal 8.13 se montre dans ce repiquage moyennement tolérant. Le reste des cals ont gardés le même degré de tolérance et sont tolérants à la concentration de 7g/l de NaCl.

### c. Troisième repiquage :

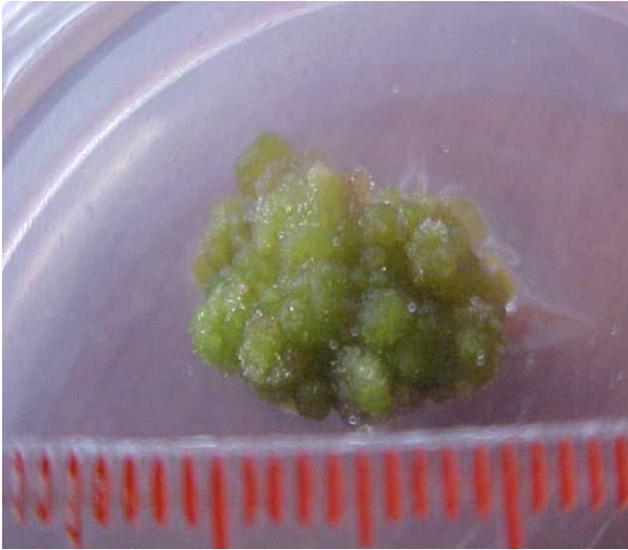
Les résultats du troisième repiquage sont présentés dans le tableau 10-6. Notons que les cals issus du cal 1.1.2, du cal 2.3.5, du cal 2.4.7, du cal 7.11.16 et du cal 7.12.18 se sont contaminés.

**Tableau 10-6 :** résultats du troisième repiquage des cals de tiges var. kondor tolérants à 7g/l de NaCl

cal origine	cals	taux de croissance à 24 jours de culture	brunissement	indice de tolérance	tolérance
cal 1.1.1	1	127,2	absence	0,85	Très tolérant
	2	131,4	absence	0,88	Très tolérant
cal 1.2.3	5	117,7	absence	0,79	Très tolérant
	6	122,3	une petite partie	0,82	Très tolérant
cal 1.2.4	7	126,8	absence	0,85	Très tolérant
	8	125,6	une petite partie	0,84	Très tolérant

cal 2.3.6	9	134,1	partiel	0,90	Très tolérant
	10	131,6	une petite partie	0,88	Très tolérant
cal 2.4.8	13	128,9	une petite partie	0,87	Tolérant
	14	122,3	une petite partie	0,82	Tolérant
cal 3.5.9	15	113,4	partiel	0,76	Tolérant
	16	118,0	absence	0,79	Tolérant
cal 3.5.10	17	116,4	absence	0,78	Tolérant
	18	121,1	absence	0,81	Tolérant
cal 5.9.11	19	106,1	une petite partie	0,71	Tolérant
	20	112,3	partiel	0,75	Tolérant
cal 5.9.12	21	103,3	une petite partie	0,69	Tolérant
	22	109,1	partiel	0,73	Tolérant
cal 5.10.13	23	101,5	absence	0,68	Tolérant
	24	100,3	partiel	0,67	Tolérant
cal 5.10.14	25	113,4	absence	0,76	Tolérant
	26	107,7	absence	0,72	Tolérant
cal 7.11.15	27	105,6	absence	0,71	Tolérant
	28	101,9	partiel	0,68	Tolérant
cal 7.12.17	31	114,0	partiel	0,77	Tolérant
	32	117,6	absence	0,79	Tolérant
cal 8.13.19	33	95,5	une petite partie	0,64	M. tolérant
	34	88,4	une petite partie	0,59	M. tolérant
cal 8.13.20	35	99,4	partiel	0,67	Tolérant
	36	101,5	absence	0,68	Tolérant
cal 8.14.21	37	105,8	une petite partie	0,71	Tolérant
	38	99,5	absence	0,67	Tolérant
cal 8.14.22	39	107,3	partiel	0,72	Tolérant
	40	103,3	absence	0,69	Tolérant
témoin	41	149,0	absence	1	Très tolérant

Tous les cals de tiges de la variété kondor multipliés ont gardés le même degré de tolérance que leurs cals parents.



(a)



(b)



(c)

**Figure 31** : cals de tiges tolérants au traitement T7 sélectionnés, var. kondor. (a) très tolérant; (b) tolérants; (c) moyennement tolérant.

#### 4.2 Variété spunta :

### 3.2.1 Cals des tiges :

Le poids moyen des cals repiqués est de  $90,22 \pm 1,78$  mg

Les résultats des paramètres d'études entrepris pour les cals des tiges sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 11-1** : Résultats du repiquage des cals de tiges var. spunta sur les milieux de culture contenant les concentrations de NaCl de sélection.

Traitements	moyennes des poids (mg) à 24j	reprise	taux de croissance	indice de tolérance	Brunissement après 24j				Consistance des cals
					total	partiel	parties au contact du milieu	absence	
T0	216,134	96%	125,90	1	/	16,67%	/	83,34%	compact globuleux
T8	146,64	52%	56,41	0,45	15,38%	77,92%	7,68%	/	peu compact globuleux
T9	144,08	54%	53,85	0,43	33,34%	51,84%	14,81%	/	peu compact globuleux
T10	138,574	24%	48,34	0,38	33,34%	66,66%	/	/	peu compact globuleux
T11	136,726	22%	46,50	0,37	54,54%	45,45%	/	/	peu compact peu globuleux
T12	121,214	14%	30,98	0,25	42,85%	57,15%	/	/	peu compact peu globuleux
T13	118,1	14%	27,87	0,22	71,43%	28,57%	/	/	peu compact peu globuleux
T14	111	6%	20,77	0,16	100%	/	/	/	peu compact peu globuleux

De 8g/l à 10g/l de NaCl, les cals sont peu compact mais reste globuleux, c'est à partir de 11g/l que les cals deviennent peu compacts et peu globuleux. Les taux de reprise des cals à partir de 10g/l de NaCl sont inférieurs à 25%. En comparant les indices de tolérance des cals dans ce repiquage avec ceux du repiquage précédent (partie 2, tableau 6-9), on remarque que la tolérance de l'ensemble des traitements sauf le traitement T9 à légèrement diminué, avec une moyenne de diminution dans les indices de tolérance de 0,04.

Parmi les 50 cals repiqués sur le milieu contenant 9g/l de NaCl (T9), 1 cal présente un développement supérieur aux autres cals, avec un taux de croissance à 24 jours de culture de 108,28mg. L'indice de

tolérance de ce cal est de 0,86, le cal est donc très tolérant à la concentration de 9g/l de NaCl. Ce cal sera multiplié et suivi afin de vérifier sa tolérance.

### 3.2.2 Cals des feuilles :

Le poids moyen des cals repiqués est de  $49,91 \pm 2,09$  mg

Les résultats des paramètres d'études entrepris pour les cals des feuilles sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 11-2** : Résultats du repiquage des cals de feuilles var. spunta sur les milieux de culture contenant les concentrations de NaCl de sélection.

Traitements	poids moyens (mg) à 24j	Pourcentage de reprise	taux de croissance	indice de tolérance	Brunissement après 24j				Consistance des cals
					total	partiel	parties au contact du milieu	absence	
T0	134,12	98%	84,21	1	/	18,36%	/	81,64%	compact globuleux
T9	90,88	56%	40,97	0,49	35,71%	50,01%	14,28%	/	compact globuleux
T10	81,02	54%	31,11	0,37	37,03%	62,97%	/	/	peu compact peu globuleux
T11	73,7	26%	23,79	0,28	46,15%	53,85%	/	/	peu compact peu globuleux
T12	70,26	20%	20,35	0,24	50,00%	50,00%	/	/	peu compact peu globuleux

À partir de 10g/l de NaCl, les cals sont peu compacts et peu globuleux. 18,36% de cals présentent un brunissement partiel en absence de stress. Les indices de tolérance des traitements présents dans le tableau 11-2 pour ce repiquage sont comparés avec ceux du repiquage précédent (partie 2, tableau 7-8); on constate une diminution de la tolérance. Aucun cal repiqué sur l'ensemble des traitements ne présente un développement supérieur à la moyenne enregistrée dans chaque traitement.

### 3.2.3 Multiplication et suivi des cals tolérants :

Le cal de tiges tolérants obtenu sous le stress de 9g/l de NaCl, est repiqué trois fois successifs sur le traitement T9 pour vérifier sa tolérance à cette concentration. Les parties brunis sont sectionnées et le cal est fractionné de façon à avoir des cals de la même taille.

Trois cals témoins sont repiqués sur un milieu sans NaCl au même temps que les cals tolérants, pour permettre de calculer les indices de tolérance. La moyenne du taux de croissance de ces cals témoins est à chaque fois présentée dans les tableaux qui suivent.

**a. Premier repiquage :**

Les résultats du premier repiquage sont présentés dans le tableau 11-3.

**Tableau 11-3:** résultats du premier repiquage des cals de tiges var. spunta tolérants à 9g/l de NaCl

cals	taux de croissance à 24 jours de culture	brunissement	indice de tolérance	tolérance
1	102,59	absence	0,83	Tolérant
2	104,57	une petite partie	0,84	Très tolérant
témoin	123,90	absence	1	Très tolérant

Un des cals se montre tolérant à la concentration de 9g/l. L'autre cal a gardé le même degré de tolérance, il est très tolérant.

**b. Deuxième repiquage :**

Les résultats du deuxième repiquage sont présentés dans le tableau 11-4. Les cals ont gardés le même degré de tolérance.

**Tableau 11-4:** résultats du deuxième repiquage des cals de tiges var. spunta tolérants à 9g/l de NaCl

cals origine	cals	taux de croissance à 24 jours de culture	brunissement	indice de tolérance	tolérance
cal 1	1	87,3	partiel	0,70	Tolérant

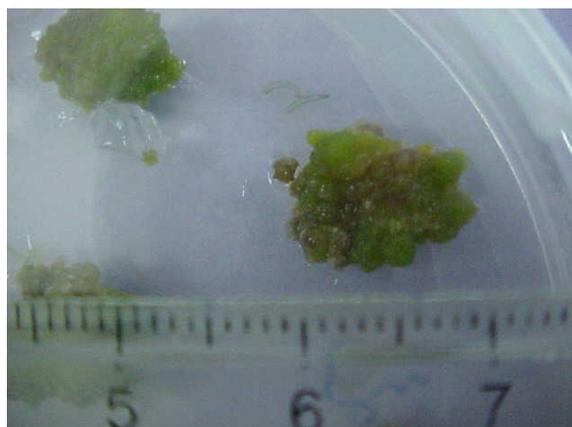
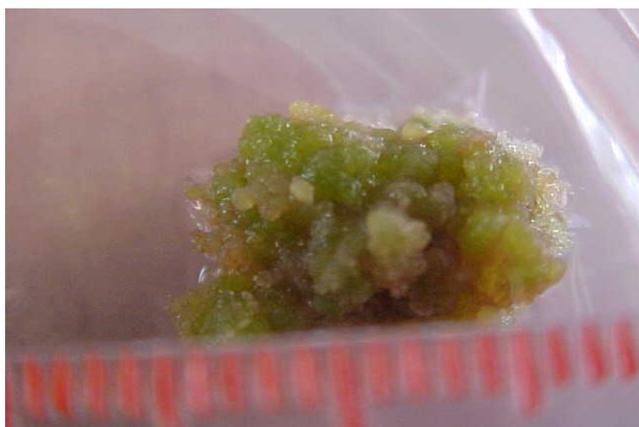
	2	103,0	une petite partie	0,82	Tolérant
cal 2	3	110,3	absence	0,88	Très tolérant
	4	105,3	absence	0,84	Très tolérant
témoin	5	125,1	absence	1	Très tolérant

### c. troisième repiquage :

Les résultats du troisième repiquage sont présentés dans le tableau 11-5. Les cals issus des cals multipliés dans les repiquages précédents ont gardés le même degré de tolérance.

**Tableau 11-5:** résultats du troisième repiquage des cals de tiges var. spunta tolérants à 9g/l de NaCl

cals origine	cals	taux de croissance à 24 jours de culture	brunissement	indice de tolérance	tolérance
cal 1.1	1	86,8	partiel	0,68	Tolérant
	2	92,1	une petite partie	0,72	Tolérant
cal 1.2	3	103,4	absence	0,81	Tolérant
	4	100,3	partiel	0,79	Tolérant
cal 2.3	5	114,1	absence	0,89	Très tolérant
	6	107,4	une petite partie	0,84	Très tolérant
cal 2.4	7	109,1	absence	0,85	Très tolérant
	8	111,6	absence	0,87	Très tolérant
témoin	9	127,8	absence	1,00	Très tolérant



**Figure 32 :** cals de tiges tolérants au traitement T9 sélectionnés, var. spunta.

### 3.3 Récapitulatif des résultats de sélection :

Pour cette sélection, plusieurs fragments de cals de chaque variété ont été cultivés pendant 24 jours en présence de sel, aux concentrations déterminées au préalable pour chaque type d'explant et pour chaque variété. Dans ces conditions, la plupart des cals ont atteint un poids inférieur à celui des cals témoins

cultivés sur un milieu sans sel; même qu'une diminution des indices de tolérance est constaté par rapport au repiquage précédent (repiquage de la partie 2). Cependant, 8 calcs de tiges de la variété kondor se sont développés au moins aussi bien que ces témoins : ils ont été cultivés en présence de 7g/l de NaCl. Un autre cal de tige de la variété spunta a été sélectionné de la même manière sur un milieu contenant 9g/l de NaCl.

Ces calcs ainsi sélectionnés ont ensuite été multipliés et cultivés pendant 72 jours sur les mêmes milieux salins, où la croissance de la majorité est restée la même sauf pour 3 calcs de la variété kondor qui leur degré de tolérance est passé de très tolérants à tolérants ainsi que 2 calcs qui ont eu une croissance très réduite. Ces derniers ont été éliminés. Chez la variété spunta lors de ce premier repiquage, un cal est resté très tolérant, l'autre est devenu tolérant.

Seuls les calcs qui présentent une réelle tolérance sont gardés pour les repiquages suivants.

Après deuxième repiquage, le degré de tolérance de chaque calc s'est stabilisé. Au final :

- Pour la variété kondor : 8 calcs sont très tolérants à 7g/l de NaCl, 24 calcs sont tolérants à cette concentration et 2 calcs moyennement tolérants.
- Pour la variété spunta : 4 calcs sont très tolérants à 9g/l de NaCl et 4 autres calcs en sont tolérants.

## **Discussion :**

Les premiers rapports sur l'embryogénèse somatique et l'organogénèse *in vitro* de la pomme de terre ont été effectués par Lam (1975) et Bragd Aas (1977), qui ont observés des signes de la capacité de régénération dans les tissus de pomme de terre considérés auparavant comme récalcitrants. Ensuite, plusieurs travaux ont été réalisés sur l'embryogénèse somatique à partir de culture d'anthère de pomme de terre (Spory et al., 1978; Johansson, 1986, 1988; Marunenko et al., 1988); et à partir de sections d'embryons zygotiques immatures de la variété Désirée (Petrova and Dedicova, 1992). L'induction

d'embryons somatiques à partir de cellules de pomme de terre issus de tissus mature a été réalisée pour la première fois par De Garcia et Martinez., 1995. Depuis une gamme d'explants de génotypes et de niveaux de ploïdies ont été étudiés pour leurs capacités embryogènes (Seabrook et Douglass, 2001; JayaSree et al., 2001; Vargas et al., 2005; Sharma et Millam, 2004, 2008).

La callogénèse et la régénération de plantules sur les cals ont été réalisés, dans ce travail, en soumettant les explants aux effets combinés des dommages mécaniques (pendant l'excision de l'explant), des régulateurs de croissance, et de la privation des signaux normaux de croissance de la plantes. Avant l'excision, le fragment de plante est intégral du statut physiologique de la plante.

Le processus de l'excision induit un choc physiologique et la privation des signaux normaux de la plante. Sous ce choc imposé, les cellules de l'explant peuvent survivre par l'alternative de régulation et d'adaptation des mécanismes d'exploitation et d'induction (Feher et al.,2003). Sans une nutrition immédiate les cellules mourrait, mais le faite de les mettre directement en culture sur un milieu riche contenant des phytohormones; elles survivent et entre en croissance (Sharma et Millam, 2008).

L'effet des différentes concentrations en auxine et cytokinine sur l'induction de la callogénèse et de la régénération à partir de différents types d'explants des deux variétés de pomme de terre étudiées (var. Spunta et var. Kondor), montrent que les racines, les tiges et les feuilles manifestent une réponse variable quant à leur aptitude à la callogénèse, leur réponse morphogénétique (couleur, consistance), et leur aptitude à la régénération.

Plusieurs travaux exposent le fait que l'utilisation d'auxine et de cytokinine notamment l'acide 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) et le 6-benzylamino purine (BAP) assure le déclenchement et l'induction de callogénèse chez une large gamme d'espèces : *Atriplex halimus* (Ighilhariz et al., 2008) ; la patate douce (Sihachakr et al., 1997); Goyave (Rai et al., 2007); basilic (Gopi et Ponmurugan, 2006); Palmier (Sané et al., 2006; Asemota et al., 2007); Karité et Moabi (Fotso et al., 2008)

Ce fait a été confirmé dans notre étude, car les trois types d'explants testés (racines, tiges, feuilles) pour les deux variétés ont induit une callogénèse; Mais l'influence des concentrations de 2,4-D et de BAP dans le milieu de culture a été très marquée sur la consistance du cal, sa croissance, son pouvoir organogène et sur l'induction d'embryons somatique.

Selon nos résultats, la callogénèse est toujours précédée d'une augmentation du volume des explants, et commence souvent sur les parties blessées de l'explant. L'étendu du cal sur la surface de l'explant et sa croissance sont aussi grandes et rapides que la concentration du 2,4-D est élevée dans le milieu de culture. De cela on peut dire que le BAP combiné à l'apport 2,4-D a permis une nette influence sur la prolifération cellulaire et sur la réactivité de l'explant. La régénération est induite sur les cals vert compact et globuleux,

les cals friables blanchâtres lisses ou granuleux ne sont pas favorables à la régénération. Ces résultats correspondent à celles obtenus par Rashid et Quraishi (1988), sur le blé.

Une faible concentration de 2,4-D de 0,5mg/l associée à la même concentration en BAP pour les deux variétés de pomme de terre étudiées, est la combinaison la plus adéquate pour la formation de cals avec une aptitude à régénérer des embryons et/ou des bourgeons sur les cals de tiges et de feuilles. Le type d'explants a une grande influence sur l'induction de régénération chez les deux variétés, car sur les racines y'a pas eu de développement d'amas méristématiques ou proembryogènes. La variété Spunta a été plus ou moins récalcitrante à la formation d'embryons somatiques avec seulement 40% chez les tiges et 14% chez les feuilles. Par contre, chez la variété kondor, la régénération été plus facilement induite avec 80% chez les tiges et 44% chez les feuilles.

Le développement des plantules après le transfère sur le milieu MGA<sub>3</sub>, s'est effectué à un taux élevé chez les tiges que chez les feuilles.

On a signalé que l'addition de GA<sub>3</sub> aux milieux de culture est exigée pour le développement des embryons somatiques dans la culture de pomme de terre. En son absence, les structures d'embryons reste au stade globulaire (Roset and Bokelman., 1976; Jaret et al., 1981; Martel and De garcia., 1992).

De garcia et Martinez (1995) ont observés que quand le 2,4-D est employé pour induire une régénération sur les cals, celle-ci peut être atteinte dans les milieux avec ou sans GA<sub>3</sub>. Cette observation a été confirmé par Jayasree et al., 2001.

Le transfère des cals portants des embryons ou des bourgeons sur le milieu contenant la GA<sub>3</sub>, conduit au développement de ces structures en plantes feuillées.

Le nombre de plantules régénérées sur les cals, diffère d'un type d'explant à un autre et entre variétés.

L'impact de la salinité sur la date d'émergence et la croissance des tiges au premier stade de développement chez les deux variétés, a été mis en évidence car les traitements en NaCl appliqués ont retardé l'émergence et ont réduit la croissance des tiges a des degrés différents; ces résultats correspond aux résultats de Levy (1992) qui ont porté sur 14 cultivars de pomme de terre.

Au niveau cellulaire, la salinité diminue aussi la croissance des cals voir même l'inhibition totale à des concentrations élevées. Les concentrations létales et sublétales en NaCl sont différentes suivant la variété (Bouharmont, 1991). Dans notre travail, nous avons considéré les concentrations auxquels les deux variétés se montrent très sensibles comme sublétales (diminution de croissance supérieur à 85%). Nous avons constaté aussi que les concentrations létales et sublétales en NaCl sont différentes suivant les types d'explants utilisés pour une même variété.

De façon générale, la croissance des cals est définitivement arrêtée à partir de 15 à 17 g/l de NaCl. Les cals cultivés sur ces concentrations dégénèrent progressivement. Cependant, la variété spunta s'est montrée plus tolérante à la salinité.

L'application du stress salin au premier stade de développement des deux variétés étudiées en condition in vivo, et en culture in vitro sur des cals de tiges et de feuilles a permis une meilleure discrimination pour la limitation de l'intervalle de concentrations en NaCl intéressant la sélection.

Beaucoup de chercheurs appliquent des pressions sélectives faibles ou augmentent progressivement leur intensité, permettant ainsi une adaptation des cellules : cette adaptation se perd au cours d'un passage ultérieur sur un milieu non sélectif et ne se retrouve donc pas dans les plantes régénérées. Pour l'éviter, il semble préférable de déterminer un seuil de létalité et d'appliquer brutalement une pression importante, inhibant totalement la prolifération des cellules normales (Bouharmont, 1991; Meredith, 1984).

La sélection de cellules tolérantes à la salinité par culture in vitro suppose que des variants somaclonaux sont présents. L'apparition de ces variations est due au fait que lorsque des éléments excisés sur la plante donneuse perdent les repérages par les réseaux de signaux ou sont incapables, du fait du milieu de culture notamment de l'utilisation du 2,4-D, de les restructurer, des réactions épigéniques différentes gèrent un déroulement modifié du programme génétique (Demarly, 1996).

Les variations sélectionnées étaient peu nombreuses et elles se sont produites très tôt pendant la culture des cals; elles étaient peut-être déjà présentes dans les explants. Les 8 cals sélectionnés parmi les cals de tiges chez la variété spunta dérivent en effet du même cal de départ, cela augmente les chances de croire que la variation somaclonale était présente lors de la première multiplication du cal avant de le soumettre au stress salin. Par contre, la variation des cals de tiges tolérants sélectionnés chez la variété spunta s'est manifestée probablement après avoir soumis les cals au stress salin.

En phase de sélection certains cals qui se montrent très tolérants ou tolérants au début de l'application du stress salin, perdent leur tolérance au fur à mesure des repiquages; cela est peut-être dû à une adaptation physiologique temporaire.

L'influence néfaste du NaCl sur les cellules peut avoir plusieurs origines : augmentation de la pression osmotique ambiante et déficit hydrique, toxicité des ions et déséquilibre ionique réduisant la disponibilité d'éléments essentiels comme le calcium et le potassium (Beloualy et Bouharmont, 1993).

La tolérance au stress salin notée in vitro, se caractérise par des teneurs élevées en  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  (Hannachi, 1996). Ces deux ions sont généralement supposés être impliqués chez la pomme de terre dans l'ajustement osmotique, nécessaire au maintien du gradient de potentiel hydrique entre les cellules et le milieu additionné de sels (Van Swaaij et al., 1986; Sabbah, Tal, 1990; Sasikala et al., 1993).

## **Conclusion et perspectives :**

Afin de réaliser cette présente étude concernant la sélection de cals de pomme de terre, *Solanum tuberosum* L., variété kondor et variété spunta, nous avons été amenés à déterminer en premier lieu, le milieu de culture et le type d'explant, permettant le développement de cals présentant une aptitude à la régénération chez les deux variétés étudiées. Car, l'utilisation des cultures cellulaires pour l'induction de variabilité et surtout pour leur sélection in vitro n'est possible que pour les variétés capables de régénérer des plantes à partir de cals maintenus en culture pendant plusieurs mois.

La callogénèse chez les deux variétés est influencée par la concentration des phytohormones utilisées. Par contre, l'induction de la régénération et le nombre de plantules régénérées sur les cals est influencée par la concentration des phytohormones, le type d'explant et le génotype.

Cette première partie a permis de conclure que les deux types d'explants, tiges et feuilles, sont les plus adéquats à l'induction de cals et à la régénération. Donc la différenciation est plus facile à obtenir après le passage en cal chez les tiges et les feuilles; et que la combinaison hormonale 0,5mg BAP/0,5 mg 2,4-D qui a été la plus réactive.

Ce travail a permis d'une part, d'évaluer, au premier stade de développement des deux variétés, la tolérance de chacune au stress salin et d'autre part de déterminer l'impact de la salinité sur la date d'émergence et la croissance des tiges à ce stade de développement. Une évaluation de la tolérance et une quantification de la diminution de croissance causée par le stress salin, a été réalisée aussi au niveau cellulaire en soumettant des cals à des concentrations croissantes de NaCl.

La tolérance vis-à-vis du stress salin, est un caractère qui varie entre les deux géotypes de pomme de terre étudiés, cette étude a permis de classer la tolérance des deux variétés pour les différents traitements estimés par des indices de tolérance.

Cette classification nous a permis de déterminer des intervalles de concentrations à utiliser pour la sélection en écartant les concentrations létales.

La variété spunta s'est montrée plus tolérante au stress salin que la variété kondor, *in vivo* et *in vitro*.

La sélection de cals tolérants à la salinité fait appelle aux variant somaclonaux. Dans la sélection entreprise dans notre étude, les variations se sont manifestées sur les cals de tiges pour les deux variétés. Le caractère de tolérance de la majorité des cals de tiges sélectionnés sur le milieu contenant 7g/l de NaCl pour la variété kondor, et sur le milieu avec 9g/l de NaCl pour la variété Spunta; s'est confirmé au cours des trois repiquages effectués sur les milieux salins.

L'induction et la sélection de variations somaclonaux est considérée comme l'application la plus utile des techniques *in vitro* chez beaucoup d'espèces; parmi ses principaux objectifs la tolérance des stress abiotiques comme la salinité. Cette voie est donc prometteuse pour améliorer la tolérance de la pomme de terre au stress salin surtout que la sélection classique chez cette espèce s'avère une approche relativement difficile.

Une étude approfondie reste à faire, notamment en ce qui concerne la régénération de plantules viables sur les cals tolérants, ainsi que la réalisation de plusieurs analyses minérales sur les cals sélectionnés et les témoins, afin de comprendre la nature du caractère sélectionné.

# Références bibliographiques

**ABDULLAH Z., AHMAD R., 1982.** Salt tolerance of *Solanum tuberosum* L. growing on saline soils amended with gypsum. *J. Agron. Crop Sci.* 151, p. 409-416.

**ABRIE A.L et STADEN J.V ., 2001.** Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. *Plant Growth Regulation* , 33,p. 19 - 23.

**ACEVEDO E., FERERES E., 1990.** Resistance to abiotic stress. *In: HAYWARD M.D., BOSEWARK N.O., ROMAGOSA I.. Plant breeding : principles and prospects.* Ed. Chapman and Hall, London, p. 406-418.

**AHMAD R., ABDALLAH Z.U.H., 1979.** Salinity induced changes in the growth and chemical composition of potato. *Pak. J. Bot.*, 11, p. 103-112.

**AMRAR S., 2005.** Age physiologique et influence des conditions de stockage sous froid longue durée dans le développement de la culture de pomme de terre d'arrière saison et de primeur. *In : MACIR.* Institut Technique des Cultures Maraîchères et Industrielles, 2, p.33-40.

**ANAND A. et RAO C.S., 2000.** A rapid *in-vitro* propagation protocol for *Piper barberi gamble* , a critically endangered plant. *In-vitro Cellular et Developmental Biology Plant*, 36,p. 21-25 .

**APSE M.P., AHARON G.S., SNEDDEN W.S., BLUMWALD E.,1999.** Salt tolerance conferred by over expression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Arabidopsis*. *Science.* 285, p. 1256–1258.

**ARSLAN N., MIX G., BASSAM N.E., 1987.** Ermittlung der Salztoleranz in vitro bei wildarten und kultursorten der kartoffel. *Landbauforschung Volkenrode.* 37, p. 128-131. *In: Zhang Y.1998. Development of in vitro bioassays for determination of salinity tolerance in potato (Solanum spp.).* Thèse de doctorat, Université McGill macdonald campus, Montreal, Canada. 147p.

**ASHRAF M.,1994.** Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 13, p. 17–42.

**ASHRAF M., 2004.** Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora*,199, p. 361–376.

**ASHRAF M., ATHAR H.R., HARRIS P.J.C., KWON T.R., 2008.** Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Adv. Agron.*, 97, p. 45–110.

**ASHRAF M., HARRIS P.J.C., 2004.** Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.*, 166, p. 3–16.

**ASEMOTA O., EKE C.R., ODEWALE J.O.,2007.** Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. *African Journal of Biotechnology*,6 (20), p. 2353-2357.

**ATHAR H.R., ASHRAF M., 2009.** Strategies for crop improvement against salinity and drought stress: an overview. *In: ASHRAF M., OZTURK M., ATHAR H.R. Salinity and Water Stress: Improving Crop Efficiency.* Ed. Springer, Germany, 237p.

**AUGÉ R., 1989.** Les phénomènes physiologiques liés à la réalisation des cultures *in vitro*. *In: AUGÉ R., BEAUCHESNE G., BOCCON-GIBOD J., DECOURTYE L., DIGAT B., JALOUZOT R., MINIER R., MORAND J.-Cl., REYNOIRD J.P, STRULLU D.G., VIDALIE H. La culture in vitro et ses applications horticoles.* Ed.Lavoisier, Paris, p. 7-26.

**BAJAJ Y.P.S., 1987.** Biotechnology in agriculture and forestry: Somaclonal variation in crop improvement. *Springer- Verlag, Berlin*, p. 236- 257.

**BARBIER M., DULIEU H., 1980.** Effets génétiques observés sur des plantes de tabac régénérées à partir de cotylédons par culture in vitro. *Ann. Am. Pl.*, 30 (3), p. 321-344.

**BEAUCHESNE G., 1989.** L'historique et les fondements de la culture *in vitro*. In: AUGÉ R., BEAUCHESNE G., BOCCON-GIBOD J., DECOURTYE L., DIGAT B., JALOUZOT R., MINIER R., MORAND J.-Cl., REYNOIRD J.P, STRULLU D.G., VIDALIE H. *La culture in vitro et ses applications horticoles*. Ed.Lavoisier, Paris, p. 7-26.

**BEHNKE M., 1980.** General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *phytophthora infestans*. *Theo. Appl. Genet.*, 56, p.151-152.

**BELAIZI M. et BOXUS P.,1995.** *In-vitro* shoot multiplication of Cork.oak (*Quercus suber L.*) influence of different carbohydrates. *Bull Rech.Agron.Gembloux*, 30, p.1-2.

**BELANGER I.A., 1998.** Enjeux du développement des recherches fondamentales : qu'avons nous appris en analysant le génome d'*Arabidopsis thalian*. *Agronomie* 6, 57p.

**BLAKE J., 1995.** A brief history of coconut tissue culture. In: Oropeza V., Howard F.W., Ashburner G.R. *Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects*. Volume5. Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pays Bas, p. 217–223.

**BLAKE J., HORNUNG R., 1995.** Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera L.*). In: Mohan S.J., Gupta P.K., Newton R.J., *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Volume 2. Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pays Bas, p. 327–340.

**BOXUS P., 1995.** Multiplication végétative: micropropagation et embryogenèse somatique in biotechnologies végétales . B.V. 93, Ed CNED. AUPELF- UREF, 191p.

**BUFFARD-MOREL J., VERDEIL J.L., DUSSET S., MAGNAVAL C., HUET C.,**

**GROSDEMANGE F., 1995.** Initiation of somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera L.*). In: Oropeza C., Howard F.W., Ashburner G.R.. *Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects*. Volume 5. Ed. Kluwer Academic Publishers, Pays Bas, p.217–223.

**BELKHODJA M., BIDAI Y., 2004.** Réponse de la germination des graines d'*Atriplex halimus L.* sous stress salin. *Revue Sécheresse*, 4(15), p.331-335.

**BELOUALY N., BOUHARMONT J., 1993.** Amélioration de la tolérance à la salinité par sélection in vitro chez deux porte-greffes de citrus. In : Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes?. Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext. Paris, p. 301-304.

**BERNSTEIN L., 1959.** Salt tolerance of vegetable crops in the West. *USDA Information Bulletin*, 205p.

**BILSKI J., NELSON D.C., CONLON R.L., 1988.** The response of four potato cultivars to chloride salinity, sulfate salinity and calcium in pot experiments. *Am. Pot. J.*, 65, p.85-90.

**BOOTH R., 1979.** Rapport de visite de l'institut de Développement des Cultures Maraîchères, Algérie, 21-27 Fev.1979. In: F.A.O-2, 2002. World Potato Atlas: Algeria. <http://www.cipotato.org/WPA/Africa/Algeria.htm>.

**BOUHARMONT J., 1991.** Utilisation de la variation somaclonale et de la sélection in vitro à l'amélioration du riz. In: Picard E., 1997. Biotechnologies, Amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, p.1-8.

**BOURGEAIS P., GUERRIER G., STRULLU D.G., 1987.** Adaptation au NaCl de *Lycopersicon esculentum* : Étude comparative de callosités ou de parties terminales de tiges. *Can. J. Bot.*, 65, p.1989-1997.

**BOURGNEUF M.J.F., 2002.** Cultivez la pomme de terre avec ICS. France. <http://www.ics-agri.com/français/pomme-de-terre-fr.htm>.

**BRAGD AAS M., 1977.** Regeneration of plants from callus of potato tubers. *Acta. Horticulturae*, 78, p. 133-137.

**BRESSAN R.A., SINGH N.K., HANDA A.K., KONONOWICZ A., HASEGAWA P.M., 1985.** Stable and unstable tolerance to NaCl in cultured tobacco cells. *Plant. genetic. Proc. Of the Third Annual ARCD Plant Cell Res. Institute- UCLA Symp. On Plant Biol. New York*, p. 755-769. In: Zhang Y., 1998. Development of in vitro bioassays for determination of salinity tolerance in potato (*Solanum spp.*). these de doctorat. Université McGill macdonald campus, Montreal Québec, Canada. 147p.

**BROWN C.L. et LAWRENCE R.H., 1968.** Culture of pine callus on a defined medium . *For. Sci.*, 14, p. 62-63.

**BROWN C.W., 1988:** Gemplasm of *in-vitro* somatic embryogenesis in alfalfa . *Hortscience*, 23(3), p. 526 - 531.

**Boyer J.S., 1982.** Plant productivity and environment. *Science*, 218,p. 443–448.

**Burgutin A.B., Butenko A.G., Kaurov B.A., Iddagoda N., 1996.** In vitro selection of potato for tolerance to sodium chloride. *Russ. J. Plant Sci*, 43, p.520-531.

**CAMEFORT H.,1977:** Morphologie des végétaux vasculaires .Ed DOIN,418p.

**CHARNIERE F., SOTTA B . MIGINIAC E . et HAHNE G., 1998:**Induction of adventitious shoots or somatic embryos on *in-vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiology et Biochemestrie*,36, p. 81-94.

**CHASE S.C., 1963.** Analytic breeding of *Solanum tuberosum*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 5, p.359-363.

**CHRETIEN D., 1992.** La resistance au sel chez le jojoba (*Simmondsia chinensis* LS) : croissance et modifications du contenu lipoprotéique de cals cultivés en présence d'une teneur élevée de NaCl, thèse de Doctorat . Université Paris VI. 144p.

**C.I.P., 2007.** World potato Atlas: Algeria. <http://www.cipatato.org/WPA/Africa/Algeria.htm>.

**COLLIN H.A., BURTON F.M., IBRAHIM K.M., COLLINS J.C., 1990.** Transmission of salt tolerance from tissue culture to seed progeny in *Cucumis blumei*. In: Nijkampa P.A.H., Vanderplas L., Artrijk J., eds. *Progress in plant cellular and molecular biology. Abstracts of the VI<sup>th</sup> International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, p.151.

**COMPTON E.M ., PIERSON B.L et STAUB J.E., 2001.** Micropropagation for recovery of *Cucumis hystrix* . *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 64, p. 63 – 67.

**Cullis C.A., Cleary W., 1986.** DNA variation in flax tissue culture. *Can. J. Genet. Cytol.*, 28, p. 247-251.

**CORRIGNAN G., TRILLION P., 2005.** Catalogue des variétés de pommes de terre produites en France. Ed. Carrousel, Paris, 312p.

**DASGAN H.Y., AKTAS H., ABAK K., CAKMAK I., 2002.** Determination of screening techniques to salinity tolerance in tomatoes and investigation of genotype responses. *Plant Sci.*, 163, p. 695–703.

**DE GARCIA E., MARTINEZ S., 1995.** Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.cv. Désirée from Stem nodal sections. *Journal Plant Physiol.*, 145, p.526-530.

**Demarly Y. et Sibi M., 1996.** *Amélioration des plantes et biotechnologies. 2<sup>ème</sup> édition mise à jour.* Ed. JOHN LIBBEY EUROTTEXT-AUPELF, Paris, 151p.

**DODEMAN V.L ., DUCREUX G. et KREIS M.,1997.** Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* ,313, p. 1493 -1509.

**DOORBOS J.H., ROS B., 1987.** *Catalogue Néerlandais de Variétés de Pomme.de Terre.* Ed : Oosterbaan& le Cointre B.V., Hollande, p.116-117.

**DRUART PH.,1992:** *In-vitro* culture and micropropagation of plum (*Prunus spp*) "Biotechnology in Agriculture and forestry ". *High -Tech and micropropagation*, 18, p. 279-301.

**DSA., 2004.** Direction des services agricoles. *In: MACIR*, revue scientifique et technique de l'Institut Technique des Cultures Maraîchères et Industrielles, 2, p.33-40.

**DUBOIS J., 1989.** *Biotechnologie et amélioration des plantes. Plantes vivrières et tropicales.* Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris. 19-25.

**DURAND J.H.,1958.** Les sols irrigables, étude pédologique. Ed.IMP, Alger, 176, 182p.

**DURCEUX G., ROSSIGNOL L., ROSSIGNOL L.M., 1986.** La pomme de terre. *La Recherche*, 174 (17), p. 193-203.

**EKANAYAKE I.J., DODDS J.H., 1993.** In vitro testing for the effects of salt stress on growth and survival of sweet potato. *Sci. Hort.* 55, p. 239-248.

**EPSTEIN E., 1976.** Genetic potentials for solving problems of soil mineral stress : Adaptation of crops to salinity. In: Wright M.J. *Plant Adaptation to mineral stress in problem soils*. Ed. Ethaca, New York, p.73-82.

**EPSTEIN E., NORLYN J.D., RUSH D.W., KINGSBURY R., KELLEY D.B., WRANA A.F., 1980.** Saline culture of crops: a genetic approach. *Science*, 210, p. 399–404.

**EVANS D.A., 1986.** Application of somaclonal variation. *Biotechnology*, 4, p. 528-532.

**Estrada R., Tovar P., Dodds J.H., 1986.** Induction of in vitro tubers in a broad range of potato genotypes. *Plant Cell Tis. Org. Cult.*,7, p. 3-10.

**F.A.O.STAT., 2006.** Food and Agriculture Organization, United Nations. Statistique agricole : pomme de terre. <http://faostat.fao.org/site/343/default.aspx>.

**F.A.O., 2007.** Food and Agriculture Organization, United Nations. Pomme de terre. <http://www.fao.org/légume/325/aspx>.

**FLOWERS T.J., TROKE P.F., YEO A.R., 1977.** The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 28, p. 89- 121.

**FLOWERS T.J., 2004.** Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.*,55, p.307–319.

**FORTES A.M et PAIS M.S ., 2000.** Organogenesis from internode - derived nodules of *Humulus lupulus* Var. Nugget ( Cannabinaceae): histological studies and changes in the starch content . *American Journal of Botany* , 87 (7), p. 971 - 979.

**FOTSO, SANONNE, NEHEMIE D. T., DENIS O., 2008.** Comparaison des premières étapes de l'embryogénèse somatique chez *Baillonella toxisperma* et *Vitellaria paradoxa* (Sapotacées). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 12(2), p. 131-138.

**FREYTAG A.H., WRATHER J.A., ERICHSEN A.W., 1990.** Salt tolerant sugar beet progeny from tissue cultures challenged with multiple salts. *Plant Cell Rep.*, 8, p. 647-650.

**GALLAIS A., BANNEROT H., 1992.** *Amélioration des espèces végétales cultivées.* Ed. INRA. Paris (France). 768p.

**GEORGE F. et SHERRINGTON P.D ., 1984 .** Plant propagation by tissue culture. *Exegetic Ltd.England*, p. 125 -129.

**GIORGETT L ., VERGARA M.R., EVANGELISTA M., LOSCHIAVO F., TERZI M. et NUTI RANCHI V.,1995.** On the occurrence of somatic meiosis in embryogenic carrot cell cultures. *Mol.Gen.Genet*, 246, p.657 - 662.

**GONDÉ H., CARRÉ G., JUSSIAUX P., GONDÉ R., 1968.** *Cours d'agriculture moderne.* 8<sup>ème</sup> édition. La maison rustique, Paris, p.191-200.

**GREENWAY H., Munns R., 1980.** Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 312, p.149–190.

**Grime J.P.,** Plant Strategies and Vegetation Process, Wiley, New York, 1979.

**GRISSON C., 1983.** *La pomme de terre : caractéristiques et qualités alimentaires.* Ed. TEC et DOC, Paris, France, p. 14-20.

**HABERLACH G., COHEN B., REICHERT N., BAER M., TOWILL L., HELGESON J., 1985.** Isolation, culture and regeneration of protoplasts from potato and several related species. *Pl. Sci.*, 39, p. 67-74.

**HANNACHI C., 1996.** *Amélioration de la tolérance de la pomme de terre (Solanum tuberosum L.) à la salinité (NaCl) par voie biotechnologique.* Thèse de doctorat. Sci. Agron., Fac. Univ. Agron. Grand, Belgique, 152p.

**HANNEMAN R.E., BAMBERG J.B., 1986.** Inventory of tuber-bearing *Solanum* species. Research division, college of agricultural science, Univ. Madison, Wisconsin. *In*: MASSON J., 1990. *Hybridation somatique chez la pomme de terre.* Thèse de doctorat. Université de Paris Sud, Centre D'Orsay, 70p.

**HANNWEG K., WATT M.P .et BERJAK ., 1996.** A simple methode for the micropropagation of *Bowiea volubilis* from inflorescence explants . *Bot.Bull. Acad .Sin.*, 37, p. 213 - 217.

**HANOWER J., HANOWER P., 1984.** Inhibition et stimulation, en culture *in vitro*, de l'embryogénèse des souches issues d'explants foliaires de Palmier à Huile. *C.R. Acad. Sc.*, 298, p. 45-48.

**HARTMAN C., BUYSER J., HENRY Y, FALCONNET D., LEJEUNE B., BENSLIMANE A.A., QUETIER F., RODE A., 1987.** Time-course of mitochondrial genome variation in wheat embryogenic somatic tissue cultures. *Plant Sci.*, 53, p.191-198. *In*: TÉOULÉ E.,1999. Biotechnologie et amelioration des plantes. *In*: RENÉ S., 1999. *Biotechnologies.* 5ème edition. Ed. TEC et DOC, Paris, p. 597-627.

**HAWKES J.G., 1990.** The Potato. Evolution, biodiversity and genetic resources. Ed. Belhaven Press, London, 257p.

**HOBBIE L.J., 1998** : Auxin molecular genetic approaches in *Arabidopsis* . *Plant Physiology et Biochemestrie*, 36 (1), p. 91 -102.

**HOU GAS R.W., PELOQUIN S.J., 1958.** The potentiel of potato haploids in breeding and genetic research. *Am. Potato J.*, 35, p.701-707.

**HOWARD H.W., 1970.** Genetics of the potato, *Solanum tuberosum*. Logos press Ltd, 126 p.

**HU C. Y., WANG P.J., 1983.** Meristem. Shoot- tip and bud cultures. *In: AMMIRATO P.V., EVANS D.A., SHARP W.R., YAMADA Y.. Handbook of plant cell culture. Ed. Macmillan Press, p.177-227.*

**HUSSEY G., STACEY N.J., 1984.** Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato (*S. tuberosum*). *Ann. Bot.*, 53, p. 565-578.

**IGHILHARIZ Z., BOUABDALLAH L., BELKHODJA M., 2008.** Influence Hormonale sur l'Induction de la Callogenèse Chez *Atriplex Halimus L. L.et Atriplex Canescens* (Pursch. Nutt.). *European Journal of Scientific Research*, 24 (2), p. 211-218.

**JARRET R.L., HASEGAWA P.M., BRESSAN R.A., 1981.** Gibberellic acid discs of potato. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 17, p. 285- 830.

**JAYASREE T., PAVAN U., RAMESH M., RAO A. V., JAGAN MOHANREDDY K., SADANANDAM A., 2001.** Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.*, 64, p.13-7.

**JOHANSSON L. B., 1986.** Improved methods for induction of embryogenesis in anther calluses of *Solanum tuberosum*. *Potato research*,29, p. 179-190.

**JOHANSSON L. B., 1988.** Increased induction of embryogenesis and regeneration in anther cultures of *Solanum tuberosum L.* *Potato research*, 31, p. 145-149.

**JOHANSEN R.H., MILLER J.C., NEWSOM D.W., FONTENOT J.F., 1967.** The influence of environment on the specific gravity, plant maturity and vigor of potato progenies. *Am. Potato J.*, 44, p.107-122.

**JONES R. A., 1986.** The development of salt-tolerant tomatoes: Breeding strategies. *Acta Hort.*, 190, p. 101-114.

**KILLICK R.J.,1977.** Genetic analysis of several traits in potatoes by means of a diallel cross. *Ann. Appl. Biol.*, 86, p. 279-289.

**KIM H.S., JEON J.H., JEUNG Y.H., JOUNG H., 1995.** In vitro selection of salt-resistant *Solanum tuberosum* L. varieties. *J. Korean Soc. Hort. Sci.*, 36, p. 172-178.

**KING P.J.et POTRYKUS V., 1978.** In vitro genetics of cereals: problems and perspectives. *Phys. Veg.*, 16(3), p. 381-399.

**KIRKI P. B., HADI S., KUMAR P.A., CHOPRA V.L., 1991.** Production of sodium chloride tolerant *Brassica juncea* L. somaclones and their parent cv. Prakash. *Plant Cell Rep.*,9, p. 684- 687.

**KOCHBA I.D., Ben-Hayim G., Spiegel-Roy R., Saad S., Newman H., 1982.** Selection of stable tolerant callus cells lines and embryos in *Citrus sinensis* L. *Z Pflanzenphysiol*, 106, p. 11-118.

**KOLEV N., 1979.** *Les cultures maraîchères en Algérie*, tome III. Centre national pédagogique agricole, p.95-120.

**KOTCHI S.O., 2004.** *Détection du stress hydrique par thermographie infrarouge. Application à la culture de la pomme de terre.* Thèse doctorat. Université Laval. [www.theses.ulaval.ca/2004/22198/ch04.html](http://www.theses.ulaval.ca/2004/22198/ch04.html).

**LAAM S.L., 1975.** Shoot formation in potato tuber discs in tissue culture. *Am. Potato. J.*, 52, p. 103-106.

**LARKIN P.J., 1987.** Somaclonal variation: history, method, and meaning. *Low state J. Res.*, 61, p. 371-343. *In*: TÉOULÉ E., 1999. Biotechnologie et amélioration des plantes. *In* : RENÉ S., 1999. Biotechnologies. 5<sup>ème</sup> édition. Ed. TEC et DOC, Paris, p. 597-627.

**LARKIN P.J., Scowcroft W.R., 1981.** Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Thèor. Appl. Génét.*, 60, p.197-214.

**LEE M., PHILIPS R.L., 1988.** The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annu. Rev. plant Physiol., Plant Mol. Biol.*, 39, p. 413-437. *In*: TÉOULÉ E., 1999. Biotechnologie et amélioration des plantes. *In* : RENÉ S., 1999. Biotechnologies. 5<sup>ème</sup> édition. Ed. TEC et DOC, Paris, p. 597-627.

**Levitt., J.,1980.** Responses of Plants to Environmental Stresses, Water,Radiation, Salt and Other Stresses. 2<sup>ème</sup> édition, vol. II, AcademicPress, New York, p.56.

**LEVY D., 1985.** Propagation of potato by direct transfer of in vitro proliferated shoot cuttings into the field. *Scientia Horticulturae*, 26, p.105-109.

**LEVY D., FOGELMAN E., ITZHAK Y., 1988.** The effect of water salinity on potatoes (*Solanum tuberosum L.*): physiological indices and yielding capacity. *Potato Res.*,31, p. 601-610.

**LEVY D., 1992.** The response of potatoes (*Solanum tuberosum L.*) to salinity: plant growth and tuber yields in the arid deserts of Israel. *Ann. Appl. Biol.*,120, p. 547-555.

**LEWIS L.N .,1984.** A vital resource in danger. *Calif. Agr.*, 38, p. 33-34.

**LOON V., 2000.** *Catalogue Néerlandais des variétés de pomme de terre*. Ed : NIVAA, France. 255p.

**LOSCHIAVO F., PITTO L., GULIANO G., 1989.** DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variation as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor. Appl. Genetics*,77, p.325–331.

**LUNIN J., GALLATIN M.H., BATCHELDER A.R., 1963.** Saline irrigation of several vegetable crops at various growth stages: Effect on yields. *Agron. J.*,55, p.107-114.

**MAAS E.V., HOFFMAN G.J., 1977.** Crop salt tolerance-current assessment. *J. Irrig. Drain. Div.Am. Soc. Civil Eng.*, 103, p. 115-134.

**Maas E.V.,1984.** Crop tolerance. *Calif. Agric.*, 34, p. 20-21.

**Maas E.V., 1986.** Salt tolerance of plants. *Appl. Agric. Res.*,1, p.12-26.

**MADR., 2007.**Ministère de l'agriculture et du développement rural. *In* : Kaddour D., 2007. Pomme de terre : les canadiens à la ressource pour réduire la tension. *Horizons*, publier le : 19-03-2007, p.4.

**MADDOCK S.E., LANCASTER V.A., RISSIOTT R., FRANKLIN J., 1983.** Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescence of 25 cultures of wheat (*Triticum aestivum*). *J. Exp. Bot.*, 34, p. 915-926.

**MADEC P., PERENNEC P., 1960.** Les relations entre l'induction de la tubérisation et la croissance chez la pomme de terre. *Ann. Physio. Veg.*, 4, p. 5-83.

**MANO Y., TAKEDA K., 2001.** Genetic resources of salt tolerance at germination and seedling stage in wheat. *Jpn J Crop Sci.*, 70, p. 215–220.

**MARGARA J., 1984.** Bases de la multiplication végétative : les méristèmes et l'organogénèse. Ed. INRA, Paris, 254p.

**MARTEL A., DE GARCIA E., 1992.** Formacion in vitro de brotes adventicios en discos de tubérculo de papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Sebago). *Phyton*, 64,p. 53-57.

**MARUNENKO I. M., KUCHKO A.A., BUTENKO R.G., 1988.** Physiological aspects of haploid reproduction in potato by means of anther culture. *Fiziologija rastenij*, 35, p. 136- 143.

**MASSON J., 1990.** *Hybridation somatique chez la pomme de terre.* Thèse de doctorat. Université de Paris Sud, Centre D'Orsay, 70p.

**MASSOUD F.I., 1974.** Salinity and alkalinity as soil degradation hazards. FAO/UNEP Expert consultation on soil degradation, FAO, Roam.

**MATHURIN., 1998.** Pomme de terre. Centre Antilles- Guyane, Unité de Recherche en Productions Végétales INRA.

<http://www.inra.fr/Internet/Produits/dpenv/scienceauquotidien/ficheshtml/31.htm>.

**MAZOYER M., AUBINEAU M., BERMOND A., BOUGLER J., MEY B. et ESTRADE R., 2002.** *Larousse Agricole : le monde agricole au XXIe siècle.* Ed. LAROUSSE, p.498- 501.

**MEREDITH C.P., 1984.** Selecting better crops from cultured cells. *In* : ed. J.P. Gustafson. *Gene manipulation in plant improvement*, p. 503-528.

**MILLER P.R., AMIROUCHE L., STUCHBURY T., MATTHEWS S., 1985.** The use of plant growth regulators in micropropagation of slow growing potato cultivars. *Potato research*, 4(28), p. 479-486.

**MOREL G., WETMORE R H., 1951.** Fern callus tissue culture. *Ann. J. Bot.*,38, p. 141-143. In : HAÏCOUR R., 2002. Multiplication de plantes herbacées in vitro, modèle pomme de terre *Solanum tuberosum L.*. Biotechnologies végétales, techniques de laboratoire. Ed : TEC et DOC. Londres, Paris, New york, p.1-16.

**MORENO L.S., MAITI R.K., GONZALES A.N., STAR J.V., FOROUGHBAKHCH R., GONZALES H.G., 2000.** Genotypic variability in bean cultivars (*Phaseolus vulgaris L.*) for resistance to salinity at the seedling stage. *Indian Agr.*,44, p. 1–12.

**MORPURGO R., RODRIGUEZ D.S., 1987.** In vitro differential response of the potato (*Solanum tuberosum L.*) under sodium chloride stress conditions. *Riv. Di Agric. Subtrop. Trop.*, 81, p. 73-77.

**MORPURGO R., 1991.** Correlation between potato clones grown in vivo and in vitro under sodium chloride stress conditions. *Plant Breed.*, 107, p.80-82.

**MOULE C., 1982.** *Plantes sarclées et divers*. Ed. Maison rustique, Paris, 246p.

**MUNNS R.,1993.** Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.*, 16, p. 15–24.

**MUNNS R., SCHACHTMAN D.P., CONDON A.G., 1995.** The significance of a two-stage growth response to salinity in wheat and barley. *Aust. J. Plant Physiol.*,22, p. 561-569.

**MUNNS R.,2002.** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.*, 25, p. 239–250.

**MUNNS R., 2005.** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.*, 167(3), p.645–663.

**MUNNS R., JAMES R.A., LAÜCHLI A ., 2006.** Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.*, 57, p.1025–1043.

**MUNNS R., TESTER M ., 2008.** Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, p. 651–681.

**MUNNS R.,2009.** Strategies for Crop Improvement in Saline Soils. *In*: ASHRAF M., OZTURK M., ATHAR H.R. *Salinity and Water Stress: Improving Crop Efficiency*. Ed. Springer, Germany, 237p.

**MURASHIGE T., SKOOG F.,1962.** A revised medium from rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, p. 473-497.

**NABORS M.W., GIBBS S.E., BERNSTEIN C.S., MEIS M.E., 1980.** NaCl tolerant tobacco plants from cultured cells. *Z. Pflanzenphysiol.*, 97, p. 13-18.

**NABORS M.W., HEYSER J.W., DIKES T.A., DEMOTT K.J., 1983.** Long duration high frequency plant regeneration from cereal tissue culture. *Planta*, 157, p. 385-391.

**NADLER, A., HEUER, B., 1995.** Effect of saline irrigation and water deficit on tuber quality. *Potato Res.*, 38, p.119-123.

**NAIK P.S., WIDHOLM J.M., 1993.** Comparison of tissue culture and whole plant responses to salinity in potato. *Plant Cell Tis., Org. Cult.*, 33, p. 273-280.

**NIEMAN R.H., SHANNON M.C., 1976.** Screening Plants for salinity tolerance. *In: Wright M.J. Plant adaptation to mineral stress in problem soils. Proc. of a Workshop at national agricul. Lib. Ed. Ethaca, New York, p. 359-372.*

**NITSH J.P. et NOUGAREDE L.A., 1967.** L'action conjuguée des auxines et des cytokinines sur les cellules de moelles de tabac , étude physiologique et microscopique électronique. *Bull Soc Franç* , 13, p. 81 - 118 .

**NOURI-ELLOUZ O., GARGOURI-BOUZID R., SIHACHAKR D., TRIKI M.A., DUCREUX G., DRIRA N.,LAKHOVA L., 2006.** Production of potato intraspecific somatic hybrids with improved tolerance to PVY and *Pythium aphanidermatum*. *Journal of plant physiology*, 163, p.1321-1332.

**NOZERAN R., BANCILHON L., ROSSIGNOL L., GREANAN S.,1977.** Nouvelles possibilités d'obtention et de multiplication rapide de clones sains de pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*). *C.R. Acad. Sci.*, 285, p.37-40.

**NOZERAN R., BANCILHON L., 1972.** Les cultures in vitro en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes. *Ann. Amélior. Plantes*, 22, p. 167-185.

**PALIWAL K.V., YADAV B.R., 1980.** Effect of saline irrigation water on the yield of potato. *Indian J. Agric. Sci.*, 50, p.31-33.

**PLAISTED R.L., SANFORD L., FEDERER W.T., KEHR A.E., PETERSON L.C., 1962.**

Specific and general combining ability for yield in potatoes. *Am. Potato Res.*, 23, p.183-199.

**PERENNEC P., 1982.** Utilisation des espèces sauvages et des formes primitives dans l'amélioration de la pomme de terre. *Le sélectionneur Français*, 30, p.13-19.

**PETROVA A. and DEDICOVA B., 1992.** Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée from unripe zygotic embryos. *J. Plant Physiol.*, 139, p. 539-542.

**PIRI K., ANCEAU C., EL JAAFARI S., LEPOIVRE P., SEMAL J., 1994.** Sélection in vitro de plantes androgéniques de blé tendre résistantes à la salinité. Thèse de doctorat. Fac. Univ. Sci. Agron., Gembloux, Belgique, 168p.

**PONNAMPERUMA F.N., 1977.** Screening rice for tolerance to mineral stresses. *IRRI Res., Philippine, Paper Se*, 6p.

**PONNAMPERUMA F.N., 1984.** Role of cultivars tolerance in increasing rice production on saline lands. In: STAPLES R.C., TOENNIESSEN G.H. *Salinity tolerance in plants*. Ed. Wiley- interscience Pub., John Wiley and Sons, New York, p. 125-150.

**POTLURI S.D.P., PRASAD D.P.V., 1993.** Influence of salinity on auxiliary bud cultures of six lowland tropical varieties of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Cell Tis. Org. Cult.*, 32, p.185- 191.

**RADHAVAN V., 1976.** Experimental embryogenesis of vascular plants, Crops VII. Academic press, London, 603p.

**RAJNCHAPEL-MESSAÏ J.,1987.** La pomme de terre fait peau neuve. *Biofuture*, 60, p. 35-37.

**RAM N.V.R., NABORS M.W., 1985.** Salinity tolerance. In: Cheremisinoff P.N., Ouelette R.P. *Biotechnology: Application and research*. Ed. Technomic, Lancaster, Basel. Chapter 46. Pp: 623-642.

**RASHID H. and QURAIHI A., 1988.** High frequency embryogenic callus induction and its regeneration in three wheat cultivars. *In: Piri K., Anceau C., EL Jaafari S., Lepoivre P., Semal J., 1994. Sélection in vitro de plantes androgéniques de blé tendre résistantes à la salinité. Thèse de doctorat. Fac. Univ. Sci. Agron., Gembloux, Belgique, 168p.*

**RENGASAMY .,2006.** World salinization with emphasis on Australia. *J. Exp. Bot.*, 57(5), p. 1017–1023.

**REHMAN S, HARRIS PJC, ASHRAF M .,2005.** Stress environments and their impact on crop production. *In: Ashraf M., Harris P.J.C., Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches.* Ed. Haworth Press, New York, p. 3–18.

**REINERT J., 1959.** Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von adventivem-bryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta*, 58, p. 318-333. *In: ZRYD J.P., 1988. Cultures de cellules, tissus et organes végétaux : Fondement théoriques et utilisations pratiques.* Ed. Presses polytechniques Romandes, Lausanne, Suisse, 305p.

**REYNOLDS M, TUBEROSA R., 2008.** Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11, p. 171–179.

**ROBERT D., DUMAS C., BAJON C., 1998.** *La reproduction : biologie végétale. Volume 3.* Ed. DOIN, France, 265p.

**ROGERS M.E., CRAIG A.D., MUNNS R, COLMER T.D, NICHOLS P.G.H., MALCOLM C.V., BARRETT-LENNARD E.G., BROWN A.J., SEMPLE W.S, EVANS P.M., COWLEY K, HUGHES S.J., SNOWBALL R., BENNETT S.J., SWEENEY G.C., DEAR B.S., EWING M.A ., 2005.**The potential for developing fodder plants for the salt-affected areas of southern and eastern Australia: an overview. *Aust. J. Exp. Agr.*, 45, p. 301–329.

**ROEST S., BOKELMAN G.S., 1976.** Vegetative propagation of *Solanum tuberosum L. in vitro*. Potato Res., 19, p. 173-181.

**ROSS H.,1986.** Potato breeding- Problems and perspectives. In: BANNEROT H., GALLAIS A., 1992. *Amélioration des espèces végétales cultivées*. Ed. INRA, Paris, 768p.

**ROUSSELLE P., LE BERRE J., BOZEC M., RIAUX Y., LARRUE-AUROUSSEAU F., HEDOU P., 1988.** Estimation of some genetic parameters in potatoes. Consequences for selection. Ed. Pudoc, Wageningen, p. 22-25.

**ROUSSELE P., ROBERT Y., CROSNIER J.C., 1996.** *La pomme de terre*. Ed. INRA, Paris, 607p.

**ROSSIGNOL- BANCILHON L., NOZERAN R., QURASHI A., DARPAS A., 1980.** Début d'exploitation d'un des moyens d'extension chez la pomme de terre : les néoformation sur cals. *Réunion Eucarpia, section légume*, Versailles, p.192-200.

**ROSSIGNOL, 1988.** La pomme de terre de qualité. Congrès national, Paris, 156p.

**ROWLAND G.G., MCHUGHEN A., MCONIE C., 1989.** Field performance at saline- affected sites of a somaclonal variant of McGregor flax selected for salt tolerance in vitro. *Can. J. Plant Sci.*, 69, p. 49-60.

**RUTTENCUTTER G., HAYNES F.L., MOLL J., MOLL R.H., 1979.** Estimation of narrow sense heritability for specific gravity in diploid potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *phureja* and *stenotomum*). *Am. Potato J.*, 56, p.447-453.

**SABBAH S., TAL M., 1990.** Development of callus and suspension cultures of potato resistant to NaCl and mannitol and their response to stress. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 21,p. 119- 128.

**SABBAH S., TAL M., 1995.** Salt tolerance in *Solanum kurzianum* and *S. tuberosum* cvs Alpha and Russet Burbank. *Potato Res.*, 38, p.319-330.

Sané D., Aberlenc-Bertossi F., Gassama -Dia Y.K., Sagna M., Trouslot M.F., Duval Y. and Borgel A. (2006). Histological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Annals of Botany* 98 (2): 301-308.

**SASIKALA D., POTLURI P., DEVI P.D., 1993.** Influence of salinity on axillary bud cultures of six lowland tropical varieties of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 21,p. 185- 191.

**SAXENA N.P., SAXENA M.C., RUCKENBAUER P., RANA R.S., EL-FOULY M.M., SHABANA R., 1994.** Screening techniques and sources of tolerance to salinity and mineral nutrient imbalances in cool season food legumes. *Euphytica*, 73, p. 85-93.

**SEABROOK J.E.A., DOUGLASS L.K., 2001.** Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. *Plant cell reports.*, 20, p. 175-182.

**SERRANO R., GAXIOLA R., 1994.** Microbial models and salt stress tolerance in plants. *Plant Sci.*, 13, p. 121-138.

**SHAH G.H., WAINWRIGHT S.J., MERRETT M.J., 1993.** Cation tolerance in callus cultures of *Medicago sativa* L. tolerant to sodium chloride. *Plant Sci.*, 89, p. 81-84.

**SHANNON M.C., MCCREIGHT J.D., 1984.** Salt tolerance of lettuce introductions. *Hort. Sci.*, 19, p.673-675.

**SHANNON M.C., NOBLE C.L., 1990.** Genetic approaches for developing economic salt tolerant crops. Ed. ASCE, New York, 71, p. 161-185.

**SHANNON M.C., 1996.** New insights in plant breeding efforts for improved salt tolerance.

*Hort. Technology*, 6, p. 96-99.

**SHANNON M.C., GRIEVE C.M., 1999.** Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia*

*Horticulturae*, 78, p. 5- 38.

**SHARMA S.K., Millam S., Hedley P.E., McNicol J., Brayan G.J., 2008.** Molecular regulation of osmotic embryogenesis in potato : an auxin led perspective. *Plant Mol. Biol.*, 68, p. 185-201.

**SHEPARD J., 1982.** La régénération *in vitro* de plantes de pomme de terre. *Pour la science*, 57, p. 34-47.

**SIBI M., 1974.** Création de variabilité par culture de tissus *in vitro* sur *Lactuca sativa L.* Thèse de spécialité. Univ paris- sud, 128p.

**SIBI M., 1981.** Hérité de variants épigéniques obtenus par culture de tissus *in vitro* chez les végétaux supérieurs. Thèse Univ Paris- Sud, 280p.

**SILVA J.A.B., OTONI W.C., MARTINEZ C.A., 2001.** Microtuberization of andean potato species (*Solanum spp.*) as affected by salinity. *Scientia Horticulturae*, 89, p. 91-101.

**SKOOG F., MILLER C.O.,1957.** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol., 11, p. 118-130.

**SMITH W.A., MURASHIGE T., 1984.** A method for quantitative study of development in somatic embryo in plant cell culture. *In vitro*, 20, 256p.

**SPORY S., JACOBSEN E., WENZEL G., 1978.** Production of manohaploid embryoids and plantlets in cultures anthers of *solanum tuberosum*. *Plant Science letters*, 12, p. 47-54.

**STARSTING G., 1977.** Cultures maraichères spéciales. INRA, Alger, 12p.

**SZABOLCS I.,1994.** Soils and salinisation. *In: Marcel Dekker. Handbook of Plant and Crop Stress*. Ed. M Pessarakali, New York, p. 3–11.

**Tai G.C.G., 1976.** Estimation of general and specific combining abilities in potato. *Can. J. Genet. Cytol.*, 18, p. 463-470.

**TAL M., 1984.** Selection for stress tolerance. *In : EVANS D. C., SHARP W.R., AMMIRATO P.V., YAMADA Y.. Hand book of plant cell culture*.Volume . Ed. MacMillam, New York, p. 481-488.

**TAL M., 1990.** Somaclonal variation for salt tolerance. *In: Bajaj Y.P.S. Biotechnology in agriculture and forestry: Somaclonal variation in crop improvement*. Ed. Springer- Verlag, Berlin, p. 236- 257.

**TAL M., 1993.** In vitro methodology for increasing salt tolerance in crop plants. *Acta Hort.*, 336, p. 69-78.

**TÉOULÉ E., 1999.** Biotechnologie et amélioration des plantes. *In* : RENÉ S. Biotechnologies. 5<sup>ème</sup> édition. Ed. TEC et DOC, Paris, p. 597-627.

**TESTER M., DAVENPORT R., 2003.** Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Ann. Bot.*, 91, p.503–507.

**THOMAS E., KING P.J., POTRYKUS V., 1979.** Improvement of crop plants via single cells in vitro: an assessment. *Zeit Pflanzenzùch*, 82, p. 1-30.

**THOMPSON P.G., MENDOZA H.A., 1984.** Genetic variance estimates in a heterogenous potato population propagated from true seed. *Am. Potato J.*, 61, p.697-702.

**TISSERAT B., ESAN E.B., MURASHIGE T., 1979.** Somatic embryogenesis in vascular angiospermes. *Hort. Rev.*, 2, p. 1-78.

**VAN HOORN J.W., KATERJI N., HAMDY A., MASTRORILLI M., 1993.** Effect of saline water on soil salinity and on water stress, growth, and yield of wheat and potatoes. *Agric. Water Manage.*, 23, p.247- 265.

**VAN GENUCHTEN M.T.H., HOFFMAN G.J., 1984.** Analysis of crop salt tolerance data. *In*: SHAINBERG I., SHALHEVET J.. *Soil salinity under irrigation process and management*. Springer, New York, p. 258-271.

**VAN DER ZAAG D.E., 1985.** Développement du tubercule. *Nouvelle techniques en Agronomie : pomme de terre Française*, 431, p. 10-13.

**VAN SWAAIJ N., JACOBSEN E., KIEL J., FEENSTRA W.J., 1986.** Slection, characterization and regeneration of hydroxyproline- resistant cell lines of *Solanum tuberosum* L. tolerance to NaCl and freezing stress. *Physiol. Plant.*, 68, p. 359-366.

**VARGAS T.E., DE GARCIA E., OROPEZA M., 2005.** Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures: histological analysis and extracellular protein patterns. *Journal of plant physiology.*, 162, p.449-456.

**VASIL V., VASIL I.K., CHIN- YI LU., 1984.** Somatic embryogenesis in long term callus culture of *Zea mays*. *Am. J. Bot.*, 71, p.158-161.

**WALKER D.R .et PARROTT A.W.,2001.** Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion . *Plant Cell Tissue and organ Culture*, 64, p.55 - 62.

**WANG P.J., HU C.Y., 1980.** Potato tissue culture and its application. *In: Li P.H.. Potato physiology.* Ed. Acad. Press, Orlando, p. 503-577.

**WENZEL G., SHIEDER O., PRZEWOZNY B., SOPORY B., MELCHERS G., 1979.** Comparaison of single cell culture derived from *Solanum tuberosum L.* plants and a model for their application in breeding programs. *Theor. Appl. Genet.*, 55, p. 49-55.

**WENZEL G., FOROUGH-WEHR B., 1990.** In vitro selection. *In: HAYWARD M.D., BOSEMARK N.O., ROMAGOSA I.* Plant breeding: Principles and Prospects. Chapman and Hall, London, p: 352- 370.

**WINICOV I., 1991.** Characterization of salt tolerant alfalfa (*Medicago sativa L.*) plants regenerated from salt tolerant cell lines. *Plant Cell Rep.*, 10, p. 561-564.

**WINTON L.L.,1972.** Callus and cell cultures of Douglas- fir. *For. Sci.*, 18, p. 151-154.

**WISE R.P., Pring D.R., Gegenbush B.G., 1987.** Mutation to male fertility and toxin insensitivity in Texas (T)-cytoplasm maize is associated with a frameshift in a mitochondrial open reading frame. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 84, p. 2858-2862.

**ZENK M.H., 1974.** Haploids in physiological and biochemical research. *In* : KASHA K.J.

*Haploids in higher plants: advances and potential.* Ed. Ontario, Univ Guelph Press, p. 339-354.

**ZERONI M., 1988.** Plant tolerance of salinity in greenhouse- physiological and practical considerations. *Acta Hort.*, 229, p. 55-72.

**ZHANG Y., 1998.** Development of in vitro bioassays for determination of salinity tolerance in potato (*Solanum spp.*). Thèse de doctorat. Université McGill macdonald campus, Montreal Québec, Canada, 147p.

**ZRYD J.P., 1988.** Cultures de cellules, tissus et organes végétaux : Fondement théoriques et utilisations pratiques. Ed. Presses polytechniques Romandes, Lausanne, Suisse, 305p.

**ZURAYK R., Nimah M., Hamze M., 1993.** The salt tolerance potential of local cultivars of eggplant (*Solanum melongena L.*). *Biolog. Agric. and Hort.*, 9, p. 317-324.

# Annexes

## Annexe 1 : milieu de culture de Murashige et Skoog (1962)

---

Macroéléments	(mg/l)
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	440
Mg SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Micro éléments</b>	
Mn SO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KI	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Fe EDTA</b>	

---

---

Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
Fe SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	27,8

---

### Annexe 2 : les vitamines de Morel et Wetmore (1951)

---

Myo- inositol	100 mg/l
Thiamine	1 mg/l
Chlorhydrate de pyridoxine (B6)	1 mg/l
Acide nicotinique	1 mg/l
Panthoténate de calcium	1 mg/l
Biotine	0,01 mg/l

---

### Annexe 3 : Poids moyens des cals des trois types d'explants testés sur les différents milieux de culture pour la variété Kondor.

**Tableau 1** : Poids (mg) moyens des cals de racines variété kondor pour les différents milieux sur 35 jours de culture.

milieux	7 jours	15 jours	21jours	28 jours	35 jours
<b>Milieu 1</b> (0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D)	8,96	15,51	23,35	41,75	49,6
<b>Milieu 2</b> (0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D)	5,02	10,97	17,95	28,55	34,85

<b>Milieu 3</b> (0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D)	10,23	23,01	40,63	59,21	65,71
<b>Milieu 4</b> (0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D)	11,76	25,53	47,85	72,54	79,87
<b>Milieu 5</b> (0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D)	8,82	13,83	24,99	48,64	55,94

**Tableau 2** : Poids (mg) moyens des cals de tiges variété kondor pour les différents milieux sur 35 jours de culture.

<b>milieux</b>	<b>7 jours</b>	<b>15 jours</b>	<b>21jours</b>	<b>28 jours</b>	<b>35 jours</b>
<b>Milieu 1</b> (0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D)	15,61	32,99	61,1	101,26	145,86
<b>Milieu 2</b> (0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D)	13,74	27,06	52,15	82,44	130,59
<b>Milieu 3</b> (0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D)	16,78	36,3	75,3	147,87	225,38
<b>Milieu 4</b> (0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D)	15,67	38,88	80,83	160,98	256,19
<b>Milieu 5</b> (0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D)	17,58	44,91	105,67	204,27	314,54

**Tableau 3** : Poids (mg) moyens des cals de feuilles variété kondor pour les différents milieux sur 35 jours de culture.

<b>milieux</b>	<b>7 jours</b>	<b>15 jours</b>	<b>21jours</b>	<b>28 jours</b>	<b>35 jours</b>
----------------	----------------	-----------------	----------------	-----------------	-----------------

<b>Milieu 1</b> (0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D)	25,53	65,81	106,20	192,39	211,8
<b>Milieu 2</b> (0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D)	14,84	31,15	50,03	65,15	85,7
<b>Milieu 3</b> (0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D)	20,63	35,49	73,33	93,11	118,4
<b>Milieu 4</b> (0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D)	31,56	75,78	123,88	178,81	202,6
<b>Milieu 5</b> (0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D)	31,44	53,05	103,77	151,51	178,98

**Annexe 5 : Poids moyens des cals des trois types d'explants testés sur les différents milieux de culture pour la variété Spunta.**

**Tableau 1 : Poids (mg) moyens des cals de racines variété Spunta pour les différents milieux sur 35 jours de culture.**

<b>milieux</b>	<b>7 jours</b>	<b>15 jours</b>	<b>21jours</b>	<b>28 jours</b>	<b>35 jours</b>
<b>Milieu 1</b> (0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D)	6,51	17,38	28,11	40,16	44,6
<b>Milieu 2</b> (0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D)	5,54	13,32	25,09	30,29	48,15
<b>Milieu 3</b> (0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D)	8,38	19,52	39	72,57	77,51
<b>Milieu 4</b> (0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D)	7,77	29,24	60,76	98,6	110,27
<b>Milieu 5</b> (0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D)	9,45	21,3	41,95	80,15	95,21

**Tableau 2** : Poids (mg) moyens des cals de tiges variété Spunta pour les différents milieux sur 35 jours de culture.

milieux	7 jours	15 jours	21jours	28 jours	35 jours
<b>Milieu 1</b> (0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D)	29,90	79,47	145,40	221,66	261,8
<b>Milieu 2</b> (0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D)	37,30	81,78	132,04	171,75	195,6
<b>Milieu 3</b> (0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D)	31,75	78,89	142,55	223,86	268,6
<b>Milieu 4</b> (0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D)	43,94	100,15	164,24	250,75	312,4
<b>Milieu 5</b> (0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D)	61,56	119,13	194,54	294,75	376,9

**Tableau 3** : Poids (mg) moyens des cals de feuilles variété Spunta pour les différents milieux sur 35 jours de culture.

milieux	7 jours	15 jours	21jours	28 jours	35 jours
<b>Milieu 1</b> (0,5 mg BAP/ 0,5 mg 2,4D)	14,60	35,28	69,14	126,70	156,1
<b>Milieu 2</b> (0,5 mg BAP/ 1 mg 2,4D)	12,95	18,43	28,45	44,21	67,4

<b>Milieu 3</b> (0,5 mg BAP/ 2 mg 2,4D)	20,22	31,67	60,95	85,69	124,4
<b>Milieu 4</b> (0,5 mg BAP/ 3 mg 2,4D)	21,34	52,73	72,59	156,10	198,4
<b>Milieu 5</b> (0,5 mg BAP/ 4 mg 2,4D)	23,24	57,12	100,19	153,82	180,5

**Annexe 6 : Les moyennes de hauteur de tiges pour chaque traitement (essai en pots).**

**Tableau 1 :** moyennes des hauteurs des tiges variété kondor sous l'effet des différents traitements en NaCl.

Traitements	T0	T3	T5	T7
<b>Moyennes(en cm)</b>	8,00	6,48	3,67	3,56

**Tableau 2 :** moyennes des hauteurs des tiges variété Spunta sous l'effet des différents traitements en NaCl.

Traitements	T0	T3	T5	T7	T9	T12
<b>Moyennes(en cm)</b>	14,21	12,27	11,09	9,22	8,38	7,41

**Annexes 7 :** Poids moyens des cals des deux variétés à 24 jours de cultures, pour les différents traitements en NaCl

**Tableau 1 :** poids moyens des cals de tiges de la variété spunta à 24 jours de culture, pour les différents traitements

<b>Traitements</b>	<b>Poids moyens des cals à 24 jours de culture</b>
<b>T0</b>	213,67
<b>T2</b>	212
<b>T1</b>	212
<b>T3</b>	210
<b>T4</b>	207,4
<b>T5</b>	206,33
<b>T6</b>	176,37
<b>T7</b>	162,8
<b>T8</b>	149
<b>T9</b>	144,43
<b>T10</b>	142,77
<b>T11</b>	141,13
<b>T12</b>	125,87
<b>T13</b>	123,4
<b>T14</b>	116,17
<b>T15</b>	105,63
<b>T16</b>	96,27

**Tableau 2** : poids moyens des cals de feuilles de la variété spunta à 24 jours de culture, pour les différents traitements

Traitements	Poids moyens des cals à 24 jours de culture
T0	131,43
T1	128,5
T2	122,37
T4	117,7
T3	117,5
T5	112,2
T6	103
T7	101,7
T8	99,53
T9	91,1
T10	84,3
T11	75,17
T12	74,3
T13	61,6
T14	53,53

**Tableau 3 :** poids moyens des cals de tiges de la variété kondor à 24 jours de culture, pour les différents traitements

Traitements	Poids moyens des cals à 24 jours de culture
T0	235,03
T1	226,67
T2	212,67
T3	199,53
T4	163,6
T5	142,67
T6	124,8
T7	115,57
T8	105,87
T10	101,2
T9	100,97
T12	94,5
T13	94,17
T14	93,67
T11	93,3

**Tableau 4 :** poids moyens des cals de feuilles de la variété kondor à 24 jours de culture, pour les différents traitements

<b>Traitements</b>	<b>Poids moyens des cals à 24 jours de culture</b>
<b>T2</b>	196,37
<b>T0</b>	168,33
<b>T1</b>	166,7
<b>T3</b>	158
<b>T4</b>	149,37
<b>T5</b>	132
<b>T7</b>	123,17
<b>T6</b>	123,1
<b>T8</b>	96,13
<b>T9</b>	88,4
<b>T10</b>	68,1
<b>T11</b>	65,17
<b>T12</b>	64,5
<b>T13</b>	60,17
<b>T14</b>	54,93
<b>T15</b>	53,93