

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique**

Université Saad Dahleb, Blida I  
Faculté des sciences de la nature et de la vie

**Département de biologie des populations et organismes**

## **MÉMOIRE**

De fin d'Etudes en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master En Biologie  
Spécialité : génomique et biotechnologie végétale

**Thème**

**Contribution à l'initiation *in vitro* des cals de  
deux variétés *Spuntaet Désiré* de pomme de  
terre (*Solanum tuberosum* L)**

**Présenté par : Soutenu publiquement le : 26 /05/2015**

**DJAKNOUN AÏSSA**

**GUEMRA MOHAMED EL-HACHEMI**

**Devant le jury composé de :**

**Mme TAKARLIS :.....MAA.....BLIDA 1.....Présidente**

**Mme ZARKAOUL. A :.....MAA.....BLIDA 1.....Promotrice**

**Mme AMEDJKOUH.H :.....MAA.....BLIDA 1 .....Examinatrice**

**Co- Promotrice: Mme KHELAFI .H :.....Chargé de Recherche INRAA**

**PROMOTION 2015-2016**

# dédicace

*Après le nom de Dieu le Miséricordieux et les prières et la paix soient sur Son Prophète Mohammad Messagers de la paix soit sur lui*

*Avant tout, nous rendons grâce à Dieu Tout-Puissant, qui nous a donné la capacité d'accomplir ce modeste travail, qui est une grande réussite pour moi dans les sentiers de l'étude. Louange à Dieu*

*En cette heureuse occasion, et avec un cœur ouvert. Aimeriez- moi offrir mes salutations chaleureuses à tous les gens qui mettent leur confiance en mes capacités. Surtout mes parents merveilleux. Qui m'ont donné la vie. Et tout leur amour. Je leur souhaite-les longé vié et santé*

*Et un salut particulier à ma femme Ibtissem, pour sa patience avec moi et m'encourager le long de la durée du stage. Je lui souhaite le succès dans la piste académique. Sans oublier mes frères Ibrahim, Zakaria, Abed el Djalil – et mes sœurs, Safia, Hafsa, Meriem*

*Ainsi que mon compagnon et binôme. DJAKNOUN Aissa*

*Salutation générale à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ces travaux de près ou de loin*

*Merci*

*GUEMRA Med EL hachemi*

# Dédicaces

En premier lieu je remercie « Dieu » le tout Puissant de m'avoir permis de faire ce travail. En signe d'amour, de gratitude, et de respect, je dédie ce travail : A ma promotrice Madame ZARKAOUI AHLAME ET ma co-promotrice Madame KHELAFI HAFIDA

A mes parents sans qui je ne serai pas où j'en suis aujourd'hui...  
A mes sœur CHAHRAZAD, MARIEM, LILA, FOZIA, et NADJIA.

A mon frère ALI et RABAH, Merci de m'avoir encouragée

A mes chères amies : HAMZA, MIMO, YOUNES, SID ALI, YOUSEF, DJALLEL, ISLAM, ALI, HAKOU, MAHDI

A mon ami et mon binôme, Merci pour ta patience et de m'avoir tenu la main jusqu'aux dernières lignes de ce mémoire... A tous les étudiants de la promotion 2014-2015 options génomique et biotechnologie végétale. Enfin, A ceux qui m'ont éclairés le chemin.

Djagnoun Aissa

# *Remerciements*

*Louange A Allah le seigneur des Mondes*

*Nos sincères remerciements vont :*

Nous tenons à remercier Le Directeur de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA) pour nous a permis de travailler dans le laboratoire de la Division de Biotechnologie et d'Amélioration des Plantes

A Madame KHELAFI HAFIDA et Madame ZARKAOUI AHLEM qui ont fait l'honneur d'encadrés notre travail pour leurs disponibilités, patiences, accueil Qu'elles trouvent ici l'expression de notre reconnaissance

Merci beaucoup

Nous exprimons nos remerciements aux honorables membres de jury :

Mme TAKARLIS et Mme AMAEDJKOUH.H

Pour avoir accepté de juger ce mémoire

Nous remercions également madame Djemali Lamia qui nous a encourager pendant tous le travail

A Madame le Chef de département de Biologie des populations et organismes

Madame TAIL GHANIA

Sincère remerciement

Promo 2015-2016



<b>Figure 01:</b> Le cycle végétatif de la pomme de terre.....	<b>06</b>
<b>Figure 2 :</b> Micropropagation et microtubérisation de la pomme de terre par culture <i>in vitro</i> (d'après AMBROISE, 2002 ; HAÏCOUR, 2002).....	<b>16</b>
<b>Figure 03 :</b> Rôle des hormones dans l'organogénèse cas d'auxine et de cytokinine.....	<b>18</b>
<b>Figure 05 :</b> plante de pomme de terre (spunta, Désiré).....	<b>21</b>
<b>Figure 06 :</b> Préparation de la solution finale du milieu de culture.....	<b>24</b>
<b>Figure 07 :</b> Organisation du plan de travail.....	<b>27</b>
<b>Figure 08 :</b> Autoclave .....	<b>Annexe 01</b>
<b>Figure 09 :</b> pH Mètre .....	<b>Annexe 01</b>
<b>Figure 10 :</b> Balance de Précision.....	<b>Annexe 01</b>
<b>Figure 11 :</b> Plaque Chauffante .....	<b>Annexe 01</b>
<b>Figure 12 :</b> Etuve.....	<b>Annexe 01</b>
<b>Figure 13 :</b> Hotte A Flux Luminaire.....	<b>Annexe 01</b>
<b>Figure 14 :</b> Stérilisateur à Billes.....	<b>Annexe 01</b>

<b>Tableau I</b> : Les principaux producteurs de pomme de terre au monde (FAO, 1998) (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture).....	<b>02</b>
<b>Tableau II</b> : La production de pomme de terre en Algérie (Statistique de pomme, de terre, 2004 : Direction des Services Agricoles de la wilaya de Constantine).....	<b>03</b>
<b>Tableau III</b> : compositions de milieu MS I et MS II.....	<b>24</b>
<b>Tableau IV</b> : le pourcentage des cals obtenues dans le milieu MS I (spunta /désiré ) .....	<b>30</b>
<b>Tableau V</b> : le pourcentage des cals obtenues dans le milieu MS II (spunta/ désiré).....	<b>32</b>
<b>Tableau VI</b> : comparaison entre les deux milieux (spunta/désiré) .....	<b>34</b>
<b>Tableau VII</b> : comparaison entre les deux variétés (spunta/désiré) .....	<b>35</b>
<b>Tableau VIII</b> : l'effet des explants sur la formation des cals .....	<b>35</b>
<b>Tableau IX</b> : Constituants du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) .....	Annexe 03

## Liste des abréviations

---

**A** : Apex

**ANA** : Acide naphthalène acétique.

**BAP** : 6- BenzylAminoPurine

**CIP** : Centre International de la Pomme de terre (Pérou).

**Dr** : Désirée

**EN** : Entre-nœud

**g/ha** : Gramme par hectare.

**GH** : Groupes homogènes.

**MS** : Muraschige & Skoog.

**F** : feuilles.

**N** : nœud

**pH** : Potentiel hydrogène.

**Sp**: Spunta

**UE** : Union Européenne

**2.4 D** : Acide 2.4Dichlorophénoxyacétique (Auxine)



## Résumé

Notre expérimentation porte sur la culture *in vitro* de la pomme de terre par l'utilisation de la variation somaclonal pour l'obtention de cals, Sur deux variétés de pomme de terre à savoir ; Désirée et Spunta dans deux milieux MS a savoir MSI sans NAA et BAP et MSII avec NAA et BAP .cette étude nous a permis de connaître l'effet de la composition minérale des milieux d'induction sur les processus organogénèse des deux variétés étudiées. Par ailleurs, elle nous a permis de connaître que les méristèmes constituant les explants ont des bonnes aptitudes organogénèse. Cette première génération représente la phase de micropropagation qui a pour but l'obtention d'une quantité suffisante de vitro plants sains.

Nous avons par la suite étudié l'obtention de cals obtenues de ces deux variétés selon deux Types de milieux MS et selon différentes concentrations de 2.4.D. Le milieu MS II a présenté un taux des cals très élevée 66.08% des cals chez la variété spunta et chez la variété désiré 72.58% par rapport au milieu MSI qui présenté un pourcentage des cals 43.29 chez la variété spunta et 56.91 chez la variété désiré. Le nombre le plus répondu des cals est obtenue au niveau des nœuds et entre-nœuds chez les deux variétés et dans les deux milieux MS le pourcentage varie entre 43.99 jusqu'à 85.33% chez la variété spunta et de 50 jusqu'à 88% chez la variété désiré.

**Mots clés :** Culture *in vitro*. Milieu standard MS, cal, organogénèse, Micropropagation, NAA, BAP, vitro plant.

**Abstract:**

Our job is to focus on improving the potato by the use of somaclonal variation for obtaining callus on two apple varieties namely land; Desiree and Spuntain two MS first MSI absent to ANA and BAP and MSII with ANA and BAP environments. It allowed us to know the effect of the mineral composition of induction media on organogenesis processes of both varieties studied. Furthermore, these studies allowed us to conclude that the meristem explants are organogenesis have good skills. This first generation is micro propagation phase which aims to obtain a sufficient amount of healthy plants *in vitro*. We then studied the obtaining of callus obtained from these two varieties in two MS media types namely hormone-free MS and MS according to ANA and respectful concentrations. The MS medium II presented a very high rate of calli compared to MS medium.

**Keywords:** *In vitro* culture, The standard MS medium, callus, caulogenesis, rooting, micro propagation, ANA, BAP, organogenesis.

## ملخص:

يتمثل عملنا التجريبي في المختبر على استخدام التباين somaclonal لصنفين من البطاطا Désirée و Spunta للحصول على الأكناب في وسطين MS مختلفين هما MSI بدون NAA و BAP، و MSII الذي يحتوي على NAA و BAP. هذا دراسة سمحت لنا بمعرفة تأثير التركيب المستعمل على إنتاج الأعضاء لكل صنف من الأصناف المدروسة. سمحت لنا أيضا بإنتاج الخلايا الإنشائية المرستيمية هيببراعملديهم قدرات جيدة لعملية التمايز أو التخلق. هذا الجيل الأول هو مرحلة الإكثار الدقيقة الذي يهدف إلى الحصول على كمية كافية من النباتات الصحية المختبرية ويمثل مرحلة micropropagation.

ونحن نجد ذلك نسبة الحصول على الأكناب التي تم الحصول عليها من الصنفين الوسطين MS بتركيز مختلفة D 2.4، حيث أن الوسط MS II أعطى معدل مرتفع جدا في الأكناب 66.08% عند Spunta أما بالنسبة لـ Désirée 72.58% مقارنة بالوسط MSI الذي أعطى 43.29% عند Spunta و 56.91% عند Désirée.

ومن هنا استنتجنا أن كمية الأكناب المحصل عليها موجودة بكثرة في العقدو بين العقد لصنفين الوسطين المدروسين.

**كلمات البحث:** الزرعة خارج التربة، وسط زرعي MS، الأكناب، النباتات المختبرية، NAA، BAP، micropropagation.

# Table des matières

Introduction.....	1
<b>Chapitre I : Recherche bibliographique</b>	
I.1. Origine.....	2
I-1-2- Importance économique.....	4
I-1-2-1- Dans le monde.....	5
I-1-2-2- En Algérie.....	6
I-1-3- Caractéristiques botaniques de la pomme de terre.....	7
I-1-3-1- Position taxonomique.....	8
I-1-3-2- Description botanique de la plante.....	9
I-1-4- Propagation de la pomme de terre.....	11
I-1-4-1- Multiplication à partir de tubercules.....	13
I-1-4-2- Multiplication <i>in vitro</i> .....	13
I-1-4-2- 1- Historique de la culture <i>in vitro</i> .....	13
I.1.4.2.2. Définition Culture des tissus <i>in vitro</i> .....	14
I.1.4.2.3. Le milieu de culture.....	14
I-1-4-2-4- Différentes technique de la culture <i>in vitro</i> .....	15
I.1.4.2.5- Variation somaclonale.....	19
I.1.4.2.6-Transformation génétique.....	20
I.1.4.2.7-Les avantages de la culture <i>in vitro</i> .....	20
I.1.4.2.8-Inconvénients.....	21
<b>Chapitre II - Matériel et Méthodes</b>	
II.1.-Matériel.....	22
II.1.1- Matériel non biologique.....	22
II.1.2- Matériel Végétal .....	22
II.2.Méthodes.....	23
II.1.2.2.-. Milieux utilisées.....	23
II.2.2. Stérilisation.....	26
II.3.Mise en culture.....	26

## **Chapitre III - Résultats et discussion**

<b>III.- Résultats.....</b>	<b>30</b>
<b>III-1- Initiation des cals.....</b>	<b>30</b>
<b>III-2-Effet du milieu MSI sur la formation de cals de 02 variétés Spunta et Désiré.....</b>	<b>30</b>
<b><u>III-3-Effet du milieu MSII sur la formation de cals de 02 variétés Spunta et Désiré.....</u></b>	<b>32</b>
<b>III.4 - La comparaison entre les deux milieux MS I et MS II .....</b>	<b>34</b>
<b>III.5- comparaison entre les deux variétés (spunta/désiré).....</b>	<b>35</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>36</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>38</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

La pomme de terre *Solanum tuberosum* L appartient à la famille des *Solanacées* originaires des pays andins, connue à l'échelle mondiale par sa grande consommation est classée en deuxième position après les céréales (Meziane d, 1991).

En plus de son importance dans l'alimentation, la pomme de terre est aussi utilisée par voies biotechnologiques dans la production des vaccins contre le diabète et l'hépatite (Arakawa et al., 1999).

La production de pomme de terre en Algérie ne satisfait pas les besoins du consommateur, ce qui fait de nous un pays dépendant de l'étranger surtout en matière de semence ; les statistiques de l'union européenne (2002) nous indiquent que l'Algérie dépense 64 millions d'euros à l'UE pour la semence de pomme de terre. Ces semences importées ne présentent pas souvent les qualités requises et leur génotype n'est pas toujours conforme à nos conditions édaphoclimatiques (Anonyme 2002).

De même la semence peut présenter quelques contaminations virale vu que celle-ci est très connue par sa sensibilité à de nombreuses infections qui lui sont transmises à chaque génération par le tubercule et pour lequel aucune lutte chimique n'est possible.

Pour faire face à ces problèmes, plusieurs pays ont introduit les techniques de micropropagation et de microtubérisation dans l'industrie de production de semences, ces techniques restent encore peu utilisées en Algérie. Dans ce cadre, il était intéressant d'étudier la microtubérisation afin de produire des microtubercules (vitrotubercules), ceux-ci peuvent être considérés comme la semence du future en raison de leur grande utilité pour l'agriculture : c'est leur petite taille qui fait leur avantage de sorte nous pouvons les conserver pour une longue durée jusqu'au moment de leur utilisation, nous pouvons peut aussi les transporter d'une région à l'autre et sans aucune difficulté et les produire à n'importe quelle époque de l'année. référence

le travail que nous avons proposé s'inscrit dans le but d'améliorer l'état sanitaire des semences et d'obtenir des cals, dans un temps plus court, il nous permet aussi de les améliorer du point de vue qualitatif et quantitatif et de ce fait les introduire dans le schéma de production de semences dans l'industrie agricole. Afin de réaliser ces objectifs : notre travail est attelé à étudier la calogénèse en utilisant les techniques de cultures *in vitro* et en se basant sur l'effet du génotype, et du milieu de culture.

Pour mener à bien notre étude, nous avons utilisé deux variétés de pomme de terre, à savoir, Désirée, Spunta, sur deux milieux différents.

## I .Généralité sur la pomme de terre

### I.1- Origine

La pomme de terre a pris naissance dans les pays andins et plus particulièrement près de Littoral du Pérou, 8000 à 9000 ans avant JC. Les Incas l'ont cultivé sous le nom de papa et elle porte toujours ce nom en Amérique latine. Les zones les plus riches en espèces sont le centre du Mexique. L'habitat s'étage de 0 à 4000 m et regroupe des zones de type arbustifs et prairial (**Anonyme, 2000**).

Il n'existe aucune documentation qui précise la date d'arrivée de cette plante en Europe. nous pensons, cependant, que la pomme de terre arriva quelques années avant la fin du XVIème siècle et ceci par deux entrées; la première en Espagne vers 1570 et la seconde aux îles Britanniques (1588-1593) (**Rousselle et al., 1996**).

En Algérie, la pomme de terre a probablement, été introduite une première fois au XVIème siècle par les Maures andalous qui ont propagé les autres cultures dans la région comme par exemple : la tomate, le poivron, le maïs, et le tabac puis elle est tombée dans l'oubli n'ayant pas suscité d'intérêt.

Dans la deuxième moitié du XIXème siècle, les colons vont la cultiver pour leur usage, car les algériens y sont réticents malgré les disettes successives. C'est la dernière grande famine des années 30/40 qui viendra à bout de cette opposition (**Meziane, 1991**).

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) appartient à la famille des Solanacées, genre *Solanum* (**Quezel et Santa,1963**), comprend 1000 espèces dont plus de 200 sont tubéreuses (**Dore et al .,2006 ; Hawkes,1990**) , on pensait autrefois que la pomme de terre était issue d'une plante sauvage unique, l'espèce (*S tuberosum*), dès 1929, les botanistes avaient montré que cette origine était plus complexe et que l'on retrouvait parmi les ancêtres des espèces de pomme de terre cultivés, des plantes sauvages différentes (**Rousselle et al.,1992 ; Dore et al., 2006**).

L'espèce cultivée dans nos régions, *Solanum tuberosum* L. *subsp. Tuberosum* comprend plusieurs centaines de variétés différents par la forme, la couleur, la texture ou encore par le contenu en amidon des tubercules.

## I.1.2- PRODUCTION DE LA POMME DE TERRE

### I.1.2.1-Dans le monde

La pomme de terre (*Solanum tuberosum*) est une récolte végétale d'importance économique dans le monde entier. Les cultivateurs produisent environ 325 millions de tonnes de pomme terres annuellement (livre du monde, 2000), alors que la production était de 100 millions de tonnes dans les années 90 et de 30 millions de tonnes dans les années 60. Durant ces dix dernières années, la production a augmenté annuellement de 4,5% en moyenne, alors que celle de la superficie de plantation a augmenté de 2,4% (CIP, 1998).

Dans le monde de la nutrition, la pomme de terre occupe la quatrième place après le blé, le riz et le maïs (CIP 1995).

Les principaux producteurs de pomme de terre au monde sont présentés dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Les principaux producteurs de pomme de terre au monde (FAO, 1998) (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)

#### Producteurs Production en 1998 (million de tonnes)

Production mondiale	290,2
Chine	47,8
Russie	31,3
Pologne	25,9
Etats-Unis	21,4
Inde	19,2
Ukraine	17,5

### I.1.2.2- En Algérie

La pomme de terre est l'un des produits les plus importants pour l'alimentation de la population algérienne : elle occupe la deuxième place après le blé.

La production en Algérie est en évolution (tableau 02), en 2003, nous avons noté des niveaux de production jamais atteints par le passé : 18 799 180 quintaux avec un rendement de 212 qx / ha.29

Ain Defla est classée première ville productrice de pomme de terre au niveau national avec un taux de 14%.

L'Algérie avec l'Egypte, l'Afrique du sud et le Maroc fournissent 80% de la production de pomme de terre en Afrique (CIP1, 1999). Ce pourcentage reste insuffisant car la production Algérienne ne couvre pas la demande du consommateur.



La semence en Algérie reste toujours un problème à résoudre. Les statistiques de l'union européenne (2002) classe l'Algérie comme premier pays importateur des produits agricoles de l'UE (à partir des douze états partenaires sud méditerranéen) avec un volume de 1,206 milliard d'euros. Parmi ces importations, nous notons 64 millions d'euros pour la semence de pomme de terre.

**Tableau 2** : La production de pomme de terre en Algérie (Statistique de pomme, de terre, 2004 : Direction des Services Agricoles de la wilaya de Constantine).

Années	Production en quintaux
1990	8 085 410
1991	10 773 480
1992	11 575 250
1993	10 652 210
1994	7 159 360
1995	12 000 000
1996	11 500 000

1997	9 475 180
1998	11 000 000
1999	9 962 680
2000	12 076 900
2001	9 672 320
2002	761 800
2003	18 799 180

CIP : Centre International de la Pomme de terre (Pérou).

### I.1.3-Caractéristiques botaniques de la pomme de terre

#### I.1.3.1-Position taxonomique

Sa classification exhaustive est présentée par **Hawkes, 1990** :

- Règne : *plantae* (Végétaux supérieurs)
- Embranchement : *Spermatophytes*
- Sous-embranchement : *Angiospermes*
- Classe : Dicotylédones
- Sous-classe : *Asteridae*
- Ordre : *solanales*
- Famille : *Solanaceae*
- Genre : *Solanum* L.
- Sous-Genre : *Potatoe* (G. Don) D'Arcy
- Section : *Petota* Dumort
- Sous-section : *Potatoae*
- Super-série : *Rotata*
- Série/Groupe : *Tuberosa* (cultivées)
- Espèce : *tuberosum*
- Sous-espèce : *tuberosum*

#### Description Botanique de la plante :

La plante est une espèce herbacée vivace par ces tubercules mais cultivée en culture annuelle selon **Rousselle et al., (1996)** ; La plante comporte à la fois des tiges aériennes et des tiges souterraines (**Darpoux et Debelley, 1967**). Les mâles sont stériles (environ 1/3 des variétés). Les fruits sont des baies qui peuvent contenir jusqu'à 200 graines. Les tubercules sont à la fois l'organe de multiplication et de consommation. Tous ses caractères morphologiques sont très variables et une caractéristique variétale plus ou moins influencée par le milieu (**Gallais et Bannerot, 1992**).

#### Description de l'Appareil aérien :

L'appareil aérien est constitué de plusieurs tiges principales souvent ailées, la plante adoptant avec l'âge un port plus ou moins étalé (caractéristique variétale). Les feuilles sont alternes,

composées imparipennées et comportent de 7 à 15 grandes folioles latérales primaires flanquées de folioles secondaires, de folioles intercalaires et de folioles se distinguant par leur mode d'insertion sur le rachis (**Rousselle et al., 1996**). Les fleurs sont souvent stériles. La production de fruit (baie sphérique) est donc généralement rare.

### **Description de l'Appareil souterrain :**

L'appareil souterrain comprend le tubercule mère desséché, les stolons (tiges souterraines diagéotropes) portant éventuellement des tubercules fils dans leur région subapicale ainsi que des racines adventives (**Rousselle et al., 1996**). Il représente la partie la plus intéressante de la plante puisqu'on y trouve les tubercules qui confèrent à la pomme de terre sa valeur alimentaire. Cultivé pour la consommation, pour la transformation ou comme semence, le tubercule représente environ 75 à 85 % de la matière sèche totale de la plante (**Rousselle et al., 1996**).

- **Structure externe du tubercule**

A l'extrémité apicale du tubercule, ou couronne, se trouve le bourgeon terminal ou apical tandis qu'à l'opposé, du côté proximal, se trouve le point d'attache du stolon, l'ombilic (Fig.1). Les yeux, disposés régulièrement sur le tubercule suivant une phyllotaxie spiralée (Fig.1), correspondent à l'emplacement des bourgeons axillaires. Des lenticelles parcourent la surface du tubercule et jouent un rôle essentiel dans la respiration du tubercule (**Rousselle et al., 1996**)

- **Structure interne du tubercule**

En coupe longitudinale d'un tubercule mature (Fig1), on distingue de l'extérieur vers l'intérieur : le périderme, le cortex ou parenchyme cortical, l'anneau vasculaire composé de phloème externe, de xylème et de parenchyme vasculaire. On peut également remarquer la zone périmédullaire ou parenchyme périmédullaire contenant le phloème interne et enfin, la moelle ou parenchyme médullaire (Fig.1) (**Rousselle et al., 1996**). Les différents parenchymes (cortical, périvasculaire, périmédullaire, médullaire) contiennent de grandes quantités de grains d'amidon qui diffèrent par leur taille (diamètre de 7 à 32  $\mu\text{m}$ ) et leur forme (ovoïde, sphérique) (**Rousselle et al., 1996**).

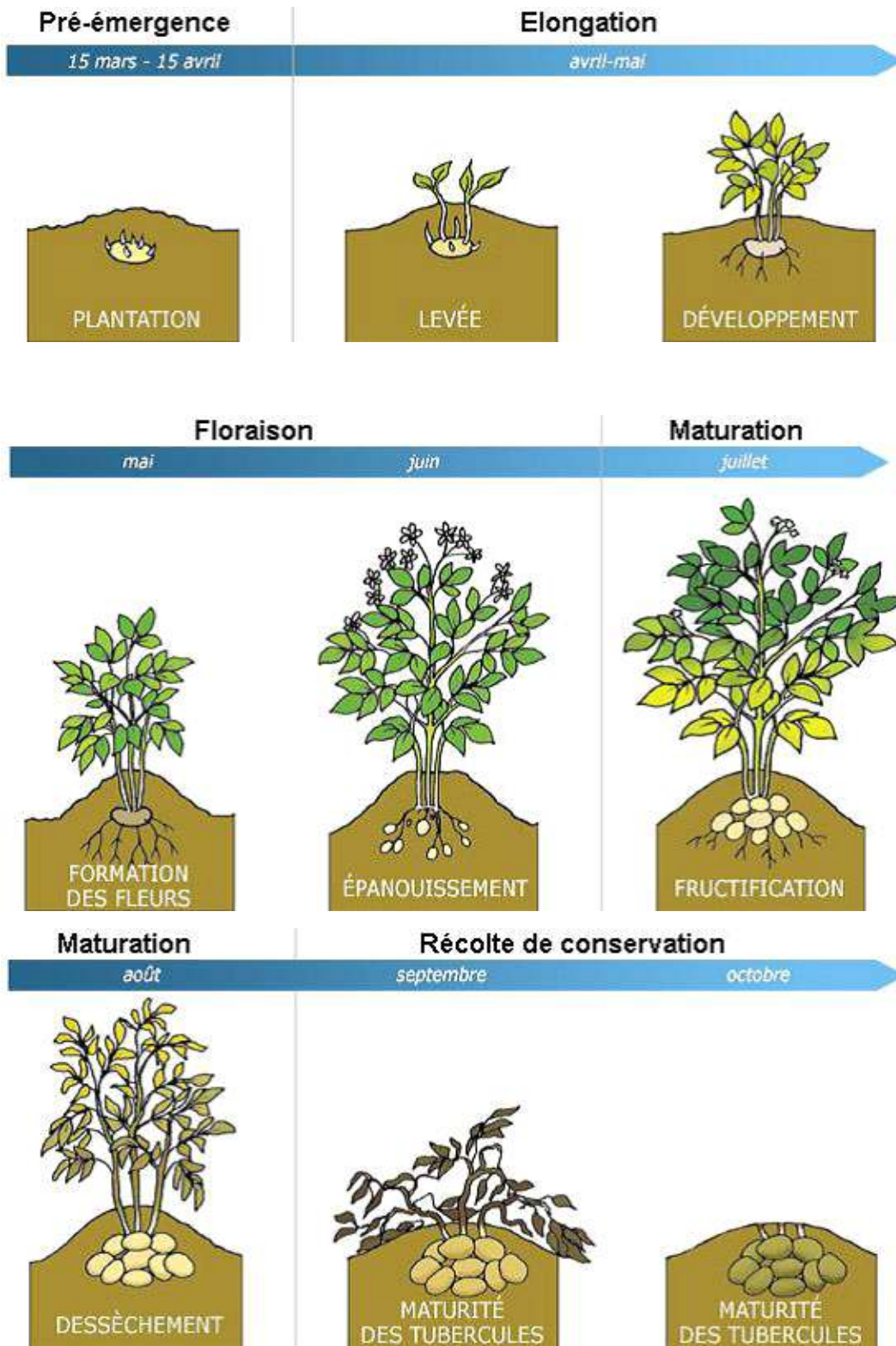


Figure 01 : Le cycle végétatif de la pomme de terre (Anonyme, 1998b).

### I.1.3.1- Cycle de reproduction et physiologie

- **Cycle sexué :**

Le fruit est une baie sphérique ou ovoïde de 1 à 3 centimètres de diamètre, il contient généralement plusieurs dizaines de graines (**Bernhards, 1998**), et peut contenir jusqu'à 200 graines (**Rousselle *et al.*, 1992**). La pomme de terre est très peu reproduite par graines dans la pratique agricole, cependant la graine est l'outil de création variétale (**Soltner, 2005a**). La germination est épigée et les cotylédons sont portés au-dessus du sol par le développement de l'hypocotyle. En conditions favorables, quand la jeune plante a seulement quelques centimètres de hauteur, les stolons commencent à se développer d'abord au niveau des cotylédons puis aux aisselles situées

- **Cycle végétatif :**

Le tubercule n'est pas seulement un organe de réserve, c'est aussi un organe qui sert à la multiplication végétative. Cette dernière se déroule en quatre étapes :

- La dormance
- La germination
- La croissance
- La tubérisation

- **dormance**

Après la récolte, la plupart des variétés de pommes de terre traversent une période où le tubercule ne germe pas, quelles que soient les conditions de température, d'éclairage et d'humidité. Il s'agit de la période de dormance, et sa durée dépend beaucoup de la variété et des conditions d'entreposage, et surtout de la température (**Peron, 2006**). Pour hâter la germination, on peut traiter chimiquement les tubercules de semence ou les exposer alternativement à des températures élevées et basses (**Anonyme, 2003**).

- **germination**

Selon **Ellisseche (2008)**, lorsqu'un tubercule est placé dans des conditions d'environnement favorables (16-20°C, 60-80% d'humidité relative) aussitôt après la fin de son repos végétatif,

il commence à germer. Après une évolution physiologique interne les tubercules deviennent capables d'émettre des bourgeons, une évolution interne du tubercule conduit d'abord à un seul germe qui se développe lentement et dans ce cas c'est toujours le germe issu du bourgeon terminal qui inhibe les autres bourgeons : ce phénomène est la dominance apicale (**Soltner, 2005a**). Puis un petit nombre de germes à croissance rapide se développent. Ensuite un nombre de plus en plus élevé de germes démarrent, traduisant une perte progressive de la dominance apicale. Ils s'allongent lentement, se ramifient, deviennent filiformes et finalement tubérisent. (**Bernhards, 1998**).

- **croissance**

Une fois le tubercule mis en terre au stade physiologique adéquat, les germes se transforment en dessous du sol en tiges herbacées pourvues de feuilles ce qui rend la plante autotrophe dès que la surface foliaire atteint 300 à 400 cm<sup>2</sup> (**Rousselle et al., 1996**). Les bourgeons axillaires donnent, au dessus du sol des rameaux, et en dessous, des stolons (**Soltner, 2005a**).

- **tubérisation**

Le tubercule est la justification économique de la culture de pomme de terre puisqu'il constitue la partie alimentaire de la plante et en même temps, son organe de propagation le plus fréquent. Ce phénomène de tubérisation commence d'abord par un arrêt d'élongation des stolons après une période de croissance. La tubérisation est réalisée dès que le diamètre des ébauches est le double de celui des stolons qui les portent. Outre les processus de multiplication cellulaire, le grossissement des ébauches de tubercules s'effectue par accumulation dans les tissus des substances de réserve synthétisées par le feuillage. Ce grossissement ralentit puis s'arrête au cours de la sénescence du feuillage (**Bernhards, 1998**). Le modèle de développement suivi par les tubercules varie considérablement entre les tubercules d'une même plante. Une hiérarchie s'établit entre ces organes de stockage qui entrent en compétition pour les nutriments : les tubercules croissant le plus vite limitent le développement des autres tubercules (**Verhees, 2002**).

- **Variétés**

Les variétés de la pomme de terre sont extrêmement élevées, chaque variété possède une description officielle basée sur de nombreux caractères morphologiques et quelques caractères physiologiques lui permettant d'être toujours identifiable, différenciable visuellement des

autres variétés (**Peron, 2006**). Toutefois, certains caractères descriptifs peuvent légèrement varier en fonction de l'époque et du lieu de culture. Les objectifs de production poursuivis dépendent du type de culture (**Reust, 1982**) :

- Pomme de terre primeur : limiter le nombre de tubercules au profit de leur grosseur et d'une extrême précocité, les principales variétés utilisées sont Nicola, Diamant, Roseval, Yesmina, Timate et Charlotte.
- Pomme de terre plant : nombre élevé de tubercules de calibre moyen et d'une bonne précocité.
- Pomme de terre de consommation (marché du frais) : un nombre élevé de tubercules d'un calibre moyen à grand, sans toutefois dépasser le calibre supérieur.

Les variétés les plus utilisées sont Desirée, Spunta, Diamant, Lisetta et Kondor.

- Pomme de terre de consommation (transformation industrielle) : un rendement élevé en tubercules et amidon.

#### **I.1-4. Propagation de la pomme de terre :**

**Selon FAO 2008** La propagation de la culture de la pomme de terre, originaire des Andes, dans le reste du monde est certes une belle aventure, mais elle a commencé par une tragédie. La conquête du Pérou par les conquistadors espagnols, de 1532 à 1572, a détruit la civilisation inca et provoqué la mort - à cause de la guerre, des épidémies et du désespoir - d'au moins la moitié de la population.

Les conquistadors étaient venus chercher de l'or, mais le véritable trésor qu'ils ont rapporté en Europe c'est *Solanum tuberosum*. La première trace de la culture de la pomme de terre en Europe date de 1565, dans les îles Canaries. En 1573, elle est attestée en Espagne. Peu de temps après, les tubercules voyagent à travers l'Europe sous forme de présents exotiques: le roi d'Espagne envoie au pape à Rome, qui en offre à l'ambassadeur auprès du Saint-Siège à Mons, et ce dernier à un botaniste à Vienne. Les pommes de terre, qui étaient déjà cultivées à Londres en 1597, gagnèrent la France et les Pays-Bas peu de temps après.

Mais une fois que *Solanum tuberosum* eut droit de cité dans les jardins botaniques, elle suscita moins d'intérêt. Si l'aristocratie européenne trouvait ses fleurs admirables, elle jugeait les tubercules tout juste bons pour les cochons et les indigents. Les paysans superstitieux les

tenaient pour vénéneux. Mais l'« ère des découvertes » avait commencé en Europe, et les marins furent parmi les premiers à apprécier la pomme de terre, qu'ils emportèrent pour se nourrir en mer. C'est grâce à eux qu'elle parvint en Inde, en Chine et au Japon au début du XVII<sup>ème</sup> siècle.

La pomme de terre fut particulièrement bien accueillie en Irlande, la fraîcheur du climat et les sols humides se révélant propices à sa culture. Lorsqu'ils émigrèrent aux États-Unis au début du XVIII<sup>ème</sup> siècle, les Irlandais apportèrent le tubercule, qui fut dénommé « pomme de terre irlandaise ».

La propagation de la pomme de terre en tant que culture vivrière dans l'hémisphère Nord fut retardée par le poids des habitudes alimentaires mais aussi parce que qu'elle relevait du défi: comment une plante cultivée depuis des millénaires dans les Andes pouvait-elle s'adapter à un climat tempéré? Une infime partie seulement de son riche réservoir de gènes avait quitté l'Amérique du Sud et il fallut attendre 150 ans pour qu'apparaissent des variétés adaptées aux longs jours d'été.

Ces variétés firent irruption à un moment critique. Dans les années 1770, la majeure partie de l'Europe continentale étant dévastée par la famine, l'importance de la pomme de terre pour la sécurité alimentaire devint une évidence. Le roi de Prusse, Frédéric le Grand, ordonna à ses sujets de s'adonner à sa culture pour compenser les mauvaises récoltes de céréales, tandis que le scientifique français Parmentier parvenait à prouver qu'elle était « comestible ». (A peu près à la même époque, de l'autre côté de l'Atlantique, le président nord-américain Thomas Jefferson faisait découvrir les frites à ses invités à la Maison-Blanche.)

Après quelque hésitation, les agriculteurs d'Europe, y compris en Russie, où la pomme de terre était affublée du nom de « pomme du diable », commencèrent à la cultiver à grande échelle. Après avoir constitué la réserve alimentaire de l'Europe durant les guerres napoléoniennes, en 1815 la pomme de terre était devenue une culture de base dans le nord de l'Europe. A la même époque, au Royaume-Uni, la révolution industrielle transformait la société rurale, poussant des millions de paysans à venir grossir la population des villes. Dans les nouveaux centres urbains, la pomme de terre devint le premier aliment moderne facile à utiliser: énergétique, nourrissante, facile à cultiver sur de petites parcelles, bon marché et facile à cuisiner à peu de frais.



L'augmentation de la consommation de pommes de terre au XIX<sup>ème</sup> siècle aurait contribué au recul du scorbut et de la rougeole, à l'accroissement du taux de natalité et à l'explosion démographique en Europe, aux États-Unis et dans l'Empire britannique.

## **I.2-Multiplication *in vitro***

### **II.2.1.-Historique :**

Les premières tentatives pour maintenir en suivie des organes vivant isolés datent plus de 130 ans ; il s'agissant alors de conserver vivants des fragments de queue de têtards de grenouilles.....

Les premiers pas de la culture *in vitro* proprement dite sont dus à un allemand, G, **Haberlandt**, au début de siècle (1902). Il obtint ainsi, sur un milieu de Knop amélioré, la survie durant plusieurs mois de petits amas cellulaires (poils staminaux ou glanduleux ou des fragments d'épiderme). Mais il n'y avait pas de multiplications cellulaires, et finalement, l'équipe d'**haberland** resta sur un échec. Ce furent les cultures de tissus animaux qui prirent le relais, et en 1912 **Alexis Carrel**, réussissait la culture indéfinie de cellules de cœur d'embryon de poulet par repiquage successif.

Il fallut attendre 1922 pour que de nouveaux espoirs apparaissent pour la culture de tissus végétaux.

Mais c'est en 1939 qu'il publie ses premiers résultats sur la culture indéfinie de tissus de carotte. **Nobecourt** sur le même matériel, et **White** aux Etats\_ Unis sur des tissus de tabac tumoral, publient, la même année, des résultats analogues. La culture *in vitro* de tissus végétaux a vraiment vu le jour à partir de ce moment là.

En 1949 **LIMASSET et COURNUET** publiaient leurs observations sur l'absence de virus dans les méristèmes de tabac virosé. **G.Morel et C.Martin** mirent à profit ces observations et entreprirent de mettre en culture *in vitro* des méristèmes de *Dahlia* et de pomme de terre atteints de maladies à virus. A partir de ces méristèmes, ils obtinrent *in vitro* des plantes entières qui furent remises en culture normale et se révélèrent saines au contrôle.

Après avoir distancé, jusqu'en 1934, la culture des tissus végétaux, la culture de tissus animaux n'a pas fait par la suite de progrès spectaculaires. Par contre la culture *in vitro* de cellules ou de tissus ou d'organes de plantes a littéralement explosé dans tous les sens (**Auge et al., 1986**)

En 1955, la découverte de la kénétine, substance douée d'une puissante activité calogène, puis d'autres cytokinines ont permis de provoquer presque à volonté la

néoformation de bourgeons adventifs ; Cette multiplication végétative *in vitro* fut enfin facilitée par la mise au point à partir de 1962 de solutions minérales particulièrement appropriées (Margara, 1984).

### **I.2.2-Biotechnologie et amélioration de la pomme de terre :**

La multiplication végétative est un mode de reproduction qui se déroule en dehors des phénomènes de sexualité et qui permet la propagation d'individus génétiquement identiques (Robert *et al.*, 1998). Ce phénomène ne fait pas intervenir la méiose, mais un autre processus très strict de division cellulaire, sans remaniement du nombre de chromosomes : la mitose (Maarouf, 2000). La multiplication végétative s'effectue naturellement et artificiellement (Camble et Reec, 2004). La pomme de terre est une plante modèle pour l'application des cultures *in vitro* et de toutes les techniques qui en découlent.

### **I.2.3- Définition Culture des tissus *in vitro* :**

La multiplication *in vitro* est un mode de reproduction asexué (reproduction végétative artificielle) (BOCCON-GIBBOD, 1989).

Le terme de culture *in vitro* est appliqué à toute culture sous verre (tube, bocal, etc...) en milieu aseptique. Le principe général consiste à prélever un fragment de tissu végétal, à le placer sur un milieu nutritif et provoquer grâce à un équilibre adéquat des éléments de culture le développement d'une plantule. L'ensemble des opérations qui se déroulent en condition stériles est suivi d'une acclimatation sur un milieu approprié (BOUTHERIN et BRON, 2002).

### **II. 2.4. Le milieu de culture :**

Un milieu de culture est une solution aqueuse comprenant des sels minéraux, des éléments organique (sucres, vitamines, acide aminée) et éventuellement des phytohormones ou régulateurs de croissance. Cette solution aqueuse est la plupart du temps solidifiée par une substance extraite des algues : agar-agar ou gélose (AUGE, 1989 ; TEOULE, 1993).

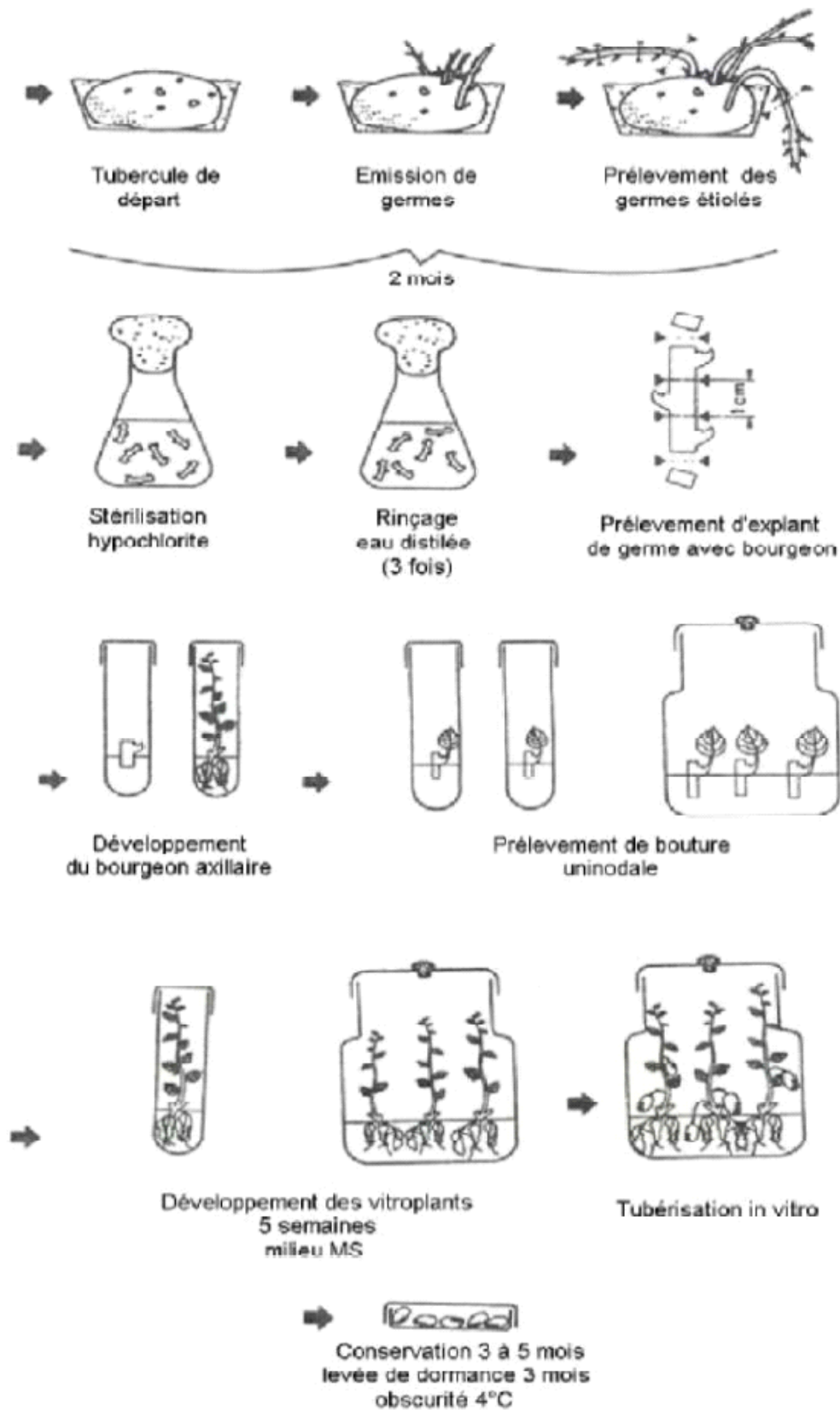
**I.2.5- technique de la culture *in vitro* :****La micropropagation :**

La micro- propagation *in vitro* apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé (**Ochatte, 2005**). Cette technique permet la multiplication végétative de plusieurs plantes alimentaires, médicinales, horticoles (**Bretonneau, 2006**).

La micropropagation consiste en une prolifération des bourgeons axillaires préexistants sur l'explant mère. Ceci offre une grande garantie de conformité génétique et une bonne stabilité des caractères au cours des repiquages successifs (**Zryd, 1988**). Elle est ainsi employée pour la production de pomme de terre de semence et pour la collection et la distribution du germoplasme dans le monde entier. A cette fin, des vitro plants indemnes de virus sont utilisés comme produit de départ.

L'analyse moléculaire des vitro plants propagés a prouvé que la micro propagation donne des vitro plants génétiquement stables (**Potter et Jones, 1991**).

Les vitro plants de pomme de terre n'exigent pas d'hormones exogènes pour s'enraciner. En fait ils peuvent être propagés sur un milieu simple (**Vinterhalter et al., 1997**). La micro propagation *in vitro* est plus ou moins utilisée dans la production de plantes conformes pour les premières générations de multiplication. Selon LÊ (2001) pour produire des plantes génétiquement modifiées, la régénération doit donner des plantes conformes.



**Figure 2 :** Micropropagation et microtubérisation de la pomme de terre par culture *in vitro* (d'après Ambroise, 2002 ; Haïcour, 2002).

**Régulateurs de croissance :**

**a- gibbérellines** : Acide gibbérellique retarde la formation des tubercules et stimule l'élongation des stolons (Vreugdenhil et Struik, 1989). Okazawa (1967) a observé que le niveau de cette hormone diminue juste avant la tubérisation.

**b-cytokinines** : Les cytokinines exogènes stimulent le processus de microtubérisation (Lian *et al.*, 1998) et à leur tête la BAP (Donnelly *et al.*, 2003).

Selon LIAN *et al.* (1998) des meilleurs résultats ont été obtenu en présence de BAP et de CCC. En outre PALMER *et* SMITH (1969) ont montré que les Cytokinines tel que la Kinétine et la BA stimulent la formation des tubercules.

**c- auxines** : Obata *et al.* (1979) ont observé un niveau d'auxines très élevé dans les pointes des stolons pendant les premiers temps de formation des tubercules et il diminue quand les tubercules grandissent.

**d- acide abscissique** : Kraus et Marschner (1998) ont suggéré que l'ABA peut inhiber l'effet de gibbérelline.

**e- éthylène** : L'éthylène inhibe l'élongation du stolon (Vreugdenhil et Struik, 1989) et produit des tubercules morphologiquement incomplets et qui ne contiennent pas d'amidon (Catchpole et Hillman, 1969). Cependant les traitements avec l'éthylène exogène sont utilisés pour stimuler la germination des microtubercules en stade de dormance (Suttle, 1998).

**f- acide jasmonique** : Dans des études récentes de (Pruski *et al.*, 2002), l'utilisation de l'acide jasmonique à une concentration de moins de 5µm donnent un meilleur développement de racines et des tiges.

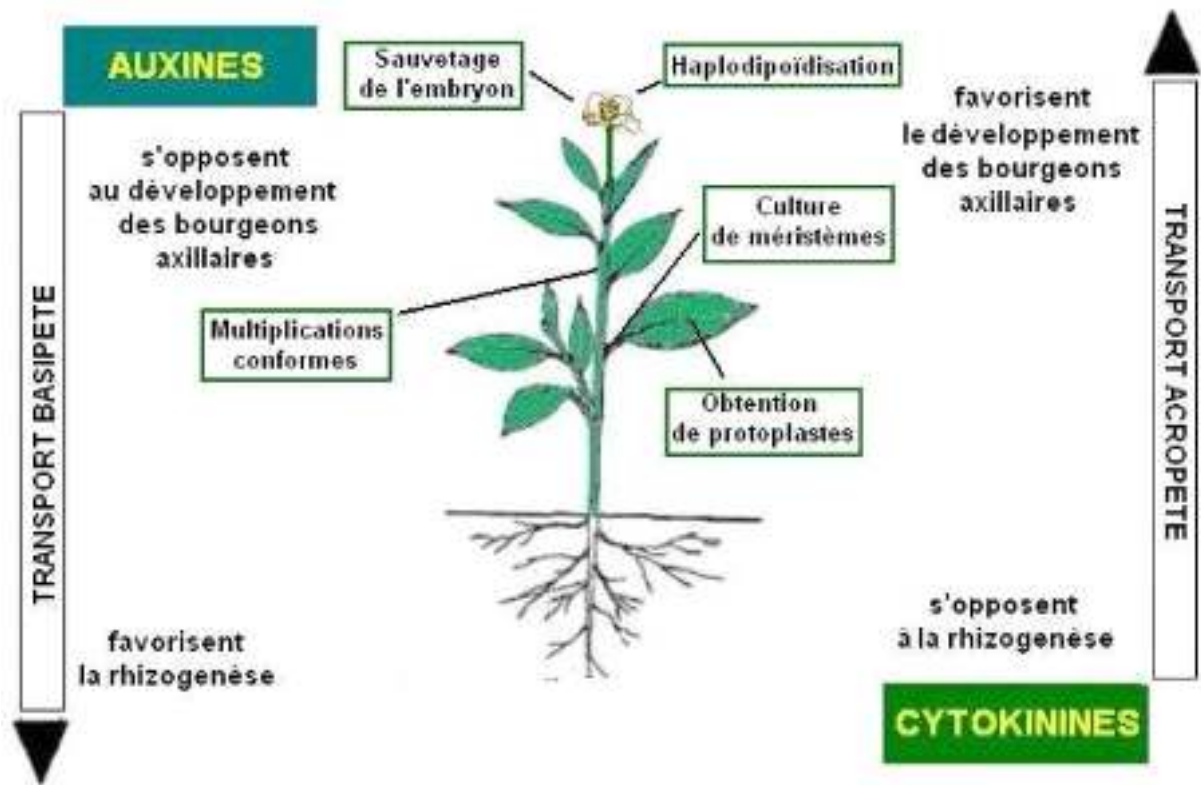


Figure 03 : Rôle des hormones dans l'organogénèse cas d'auxine et de cytokinine.

### I.2.6- Variation somaclonale

D'après Nowbuth *et al.*, (2005) on appelle variation somaclonale des modifications du phénotype des plantes qui apparaissent le plus souvent lors de la régénération de nouvelles plantules à partir de tissus déjà différenciés.

Larkin et Scowcroft (1981) ont montré, à l'issue d'un travail de recherche, qu'il pouvait être très intéressant d'exploiter la variabilité génétique induite par certaines cultures *in vitro*, dans le but de création variétale. Ils s'appuyaient sur quelques exemples modèles comme celui de la pomme de terre et de la canne à sucre où ils ont contribué à faire adopter le terme de variation somaclonale, désignant toute variation génétique induite par le seul fait de cultiver des tissus, des cellules, ou des organes qui ont pour objectif l'établissement de cellules différenciées sous des conditions de cultures *in vitro* définies (Wenzel, 1994, Snyder et Belknap 1993) ; ont observé que les plantes de pomme de terre régénérées présentent un faible niveau de variation somaclonale comparée avec celles dérivées des protoplastes.

Lors de la régénération de plant à partir de tissu *in vitro*, de nouveaux phénotypes peuvent apparaître : ce phénomène appelé variation soma-clonale. Elle est utilisable dans un

programme d'amélioration génétique si le caractère nouveau héritable ; dans le cas de la pomme de terre il suffit qu'il soit transmissible et stable par multiplication végétatif. Cette méthode peut être intéressante aux parasites s'il est possible de faire un tri *in vitro* par exemple avec le filtrat cellulaire d'un champignon comme *Phytophthora infestans* ou *Fusarium sp A*. À l'heure actuelle, seuls des résultats préliminaires ont été menés (**Cassells *et al.* 1991 ; Tompson *et al.* 1986**). Le problème rencontré est souvent celui de la cible puisque l'apparition d'un caractère utile est un événement rare et que l'on constate l'apparition de caractères défavorables.

### **I.2.7-Transformation génétique :**

La pomme de terre est souvent prise comme plante modèle pour les recherches sur la transformation génétique. De nombreux travaux portent sur cette technique (**Concilio *et al.*, 1990 ; Wastie *et al.*, 1993**). La transformation est la plus souvent obtenue par l'intermédiaire du vecteur *Agrobacterium tumefaciens* ou *rhizogenes*. Des essais ont également été faits par électroporation. Les caractères visés sont de type mono-génique. Les premières tentatives ont porté sur la résistance aux antibiotiques comme caractère marqueur. Ensuite, des plantes transformées ont été obtenues qui présentent des résistances au virus X, Y ou enroulement par incorporation du gène de la protéine capsidale ou gène induisant des erreurs dans la réplication, des résistances aux insectes grâce au gène de la toxine de *Bacillus thuringiensis*, une résistance à *Erwinia carotovora* par incorporation d'un lysozyme de bactériophage. Des travaux sont en cours qui concernent les qualités biochimiques du tubercule (type d'amidon, composition en acides aminés). Les résultats scientifiques de tous ces travaux sont très intéressants, toutefois le problème de l'utilisation pratique se pose : il est lié, d'une part, à la réglementation très restrictive sur la multiplication des organismes génétiquement modifiés hors des environnements confinés et, d'autre part, aux règles juridiques et commerciales de protection des obtentions végétales. Les essais en vraie grandeur sont de ce fait exceptionnels, cela devrait évoluer rapidement.

### **I.2.8-Les avantages de la culture *in vitro* de la pomme de terre :**

La production *in vitro* de tubercules pourrait se substituer à la méthode actuelle du micro bouturage avec les avantages suivants :

- Possibilité des les stokers au froid pendant une longue durée et de cette façon la conservation des génotypes et réaliser ainsi des plantations déphasées soit sous abris ou en plein champ.
- Possibilité de pouvoir les planter mécaniquement en plein champ (semoir de précision à pois chiche), et possibilité d'enrobage (régulateurs de croissance, engrais et produits phytosanitaires)
- Facilité de leur transport d'une région ou d'un pays à l'autre, particulièrement les pays souvent très éloignés demandeurs de plants de très haute qualité.
- Production d'un tel matériel exigeant moins de moyens matériels en infrastructures donc en principe moins onéreuse.
- Production et disponibilité des microtubercules à n'importe quelle époque de l'année.
- Ils peuvent être directement semés dans le sol.
- Problème de transmission de maladies écarté (en partie) vu que cette technique permet l'amélioration de l'état sanitaire du matériel végétal utilisé.
- Les microtubercules présentent l'avantage de pouvoir être fabriqués à contre saison par rapport aux boutures. (**Ould Ramoul, 1997**).

### **I.2.9-Inconvénients**

Cette technique présente cependant, certaines limites, à savoir :

- La petite taille et l'origine du tubercule confèrent à ce dernier une fragilité et une sensibilité accrues aux attaques extérieures.
- La levée de dormance est assez lente et irrégulière.
- Le ratio « nombre de microtubercules / nombre de boutures » est relativement faible et mérite d'être augmenté.
- L'exigence d'une main d'œuvre qualifiée pour les repiquages axéniques et pour la récolte (**Deza, 1991**).



## 🚩 Objectif et lieu de stage

Notre expérimentation s'est déroulée au niveau de laboratoire de la division Biotechnologies et Amélioration des Plantes de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA) à la station expérimentale Mehdi Boualem de BARAKI

L'objectif de ce travail est l'initiation de la calogènes par l'utilisation de la variation soma-clonale (Obtention de cals).

### II.1.Matériel

#### II.1.1.Matériel non biologique

Le matériel utilisé au laboratoire (l'appareillage, la verrerie et les milieux de culture) est mentionné en **Annexe 01**.

#### II.1.2.Matériel Végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de vitro plants de pomme de terre des 02 variétés testés, à savoir Spunta et Désiré, nous ont été fournis par le laboratoire de production de semences et d'amélioration de la pomme de terre de Tiaret (INRAA).

Les vitro-plants sont placés dans une chambre de culture à une température de  $25 \pm 2$  °C et une photopériode de 16 h lumière / 8 h Obscurité.



**Figure 05 : vitro plante de pomme de terre (spunta, Désiré)**

## II.2.Méthodes

### II.2.1.Milieux culture :

Nous avons utilisé le milieu (MURASHIGE et SKOOG, 1962). Composé de ; Macroéléments, micro-élément, sucre saccharose, les régulateurs de croissance, l'eau.(voir Annexe )

#### II.2.1.1. Milieux de culture de micropropagation

##### Milieu à base de produits chimiques

##### Le milieu de base MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962).

Ce milieu est utilisé pour l'obtention des cals sur les 02 variétés de pomme de terre Les constituants principaux de ce milieu sont l'eau ionisée et les sels minéraux qui se répartissent en deux groupes, les macroéléments (N, P, K, S, Mg, Ca) et micro-éléments (Fe, B, Mn, Zn, Cu, N, Co, Mo, I). La source de carbone est le saccharose. Le milieu est solidifié avec de l'agar.

#### a- Préparation de la solution mère de macroéléments

Pour la préparation de la solution mère de macroéléments, les différentes macros éléments (A)...voir annexe (3) constitués de sels sont dissoutes dans 600 ml d'eau distillée en chauffant légèrement en cas de nécessité. La solution obtenue est transvasée dans un flacon et ajustée à 01 litre avec de l'eau distillée puis conservée au réfrigérateur.

#### b- Préparation de la solution mère de micro-éléments

Pour l'obtention de la solution mère de microéléments, les différents micro éléments (B) constitués des oligoéléments sont dissout dans 600 ml d'eau distillée en chauffant légèrement si c'est nécessaire Concernant le cuivre ( Cu) , le cobalt (Co), 10 mg de chaque élément est dissout dans 10 ml d'eau distillée et 2,5 ml de chaque solution est ajouté avec les autres éléments préalablement dissout.

La solution finale est ajusté à un (01) litre et puis conservé au réfrigérateur.

#### c- Préparation de la solution mère des hormones

Les régulateurs de croissance choisis sont pesés et dissout dans quelques gouttes (2 ml solvants appropriés).

La solution est transférée dans un flacon de 100 ml et complétée à 100 ml avec l'eau distillée puis la rangée au réfrigérateur.

- **Préparation du milieu MS (Murashige et Skoug, 1962)**

Le milieu de culture MS est préparé dans un bécher de 1 litre en agitation continue contenant 500 ml d'eau distillée et les différents éléments suivants :

- 40 ml de macro-éléments.
- 10 ml de micro-éléments.
- 10 ml de fer.
- 10 ml d'acides aminés et vitamines.
- 100 mg de myo-inositol.

Le pH du milieu est ajusté à 5,7

Le milieu contenu dans un ballon est complété avec de l'eau distillée à 1 litre, ensuite déposé sur une plaque chauffante en agitation continue en ajoutant 30 g/l de saccharose ensuite 8 g/l d'agar (pour solidifier le milieu de culture), le tout est porté à ébullition jusqu'à dissolution de toutes les particules d'agar.

Au cours de cette expérimentation, deux (02) milieux de base MS (Murashige et Skoog, 1962) à savoir MS1 et MS2. Ont été utilisés, Le milieu MS2 est additionné de différentes concentrations de 2,4D en plus du NAA et BAP. Le milieu MS1 est additionné de différentes concentrations de 2,4D en plus de la kinetine. (Tableau 3).

**Tableau 3** : compositions de milieu MS I et MS II :

Milieu de base MS	Auxine		Auxine	Cytokinine	Cytokinine
	Concentrations de 2,4D mg		NAA mg	BAP mg	Kinetine
<b>MSI</b>	0	0.0			<b>0.25 mg</b>
	1	0.4			
	2	0.8			
	3	1.2			
	4	1.6			
<b>MSII</b>	0	0.0	<b>1 mg</b>	<b>0.5 mg</b>	
	1	0.4			
	2	0.8			
	3	1.2			
	4	1.6			

## II.2.2. Stérilisation

### II.2.2.1. Stérilisation du milieu de culture

Les milieux MS1 et MS2 avec les différentes concentrations d'hormones sont ajustés à un pH 5.7 .et mis à stériliser dans un autoclave à 120°C et une pression de 1 bar pendant 20 min. La technique de culture *in vitro* exige cette température afin de s'assurer de la destruction des bactéries. Après l'autoclavage, les milieux stériles sont répartis dans des boites de pétri stérile.

### II.2.2.2. La Stérilisation des instruments

Tous les instruments métalliques (pincés, scalpels, bistouris) sont mis dans l'étuve à une température de 170° à 180° C pendant 1 heures, L'utilisation de ces instruments se fait sous une hotte stérile. Avant et après chaque manipulation, les instruments sont stérilisées à l'aide d'un stérilisateur à billes.

### II.2.2.3. Stérilisation des explants de pomme de terre :

Les cultures de tissus végétaux se heurtent à des problèmes de brunissement à cause des contaminations par divers agents (bactéries, champignons ...) ce qui exige l'utilisation de solutions stérilisantes telles que le chlorure de sodium et l'éthanol à 70%.

- Les plants de pomme de terre issus *in vitro* sont coupés à leur base pour les débarrasser de leurs racines. Les explants utilisés dans l'expérimentation sont : les apex ; feuilles, entre nœuds et nœuds.
- La stérilisation de ces explants se fait selon le protocole suivant :
  - Les explants sont mis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 15 minutes ;
  - Ils sont rincés avec l'eau distillée stérile 3 à 4 fois pendant 5 minutes chacune
  - les explants sont déposés sur papiers stérile pour assécher les explants et sont enfin mis en culture dans des boîtes de pétri contenant le milieu de culture.

## II.3.Mise en culture

### II.3.1.Zone du travail

Pour réussir la culture *in vitro* il est nécessaire de respecter les conditions d'asepsie totale, de ce fait toutes les manipulations seront réalisées sous hotte à flux d'air laminaire stérile, avec cependant quelques précautions à respecter (**Fig. 07**), à savoir :

- Allumage de la hotte, au moins une demi-heure avant chaque manipulation.
- Nettoyage de la hotte avec de l'éthanol (90°), sans oublier de vaporiser à l'alcool tous les instruments nécessaires au travail pendant toute la durée des manipulations.
- Les instruments de travail (scalpels et pinces) stérilisés dans une étuve sont mis dans un stérilisateur à billes à 250 °C pendant 02 min et déposés sur un support métallique stérile. (il faut toujours doubler les instruments de travail, pour permettre le refroidissement de l'un tandis que l'autre est en usage.).

- Tous les instruments de travail doivent être à la portée du manipulateur de façon à faire le minimum de gestes à faire au cours de la manipulation (de grands mouvements entraînent des déplacements d'air donc des risques de contamination).
- Les mains doivent être lavées et stérilisées à l'alcool
- Les instruments stérilisés doivent être disposés de façon à les avoir dans une aire stérile.
- Ne pas toucher avec les doigts les ouvertures instruments et les explants.
- Pour la respiration, se munir d'un masque qui permet de rejeter l'air expiré vers l'arrière.



**Figure 07 :** Organisation du plan de travail

### **II.4- Mise en culture des explants à partir des vitro plants :**

Les vitro plants de pomme de terre sont extraits du milieu de croissance pour utiliser les différents explants des plants.

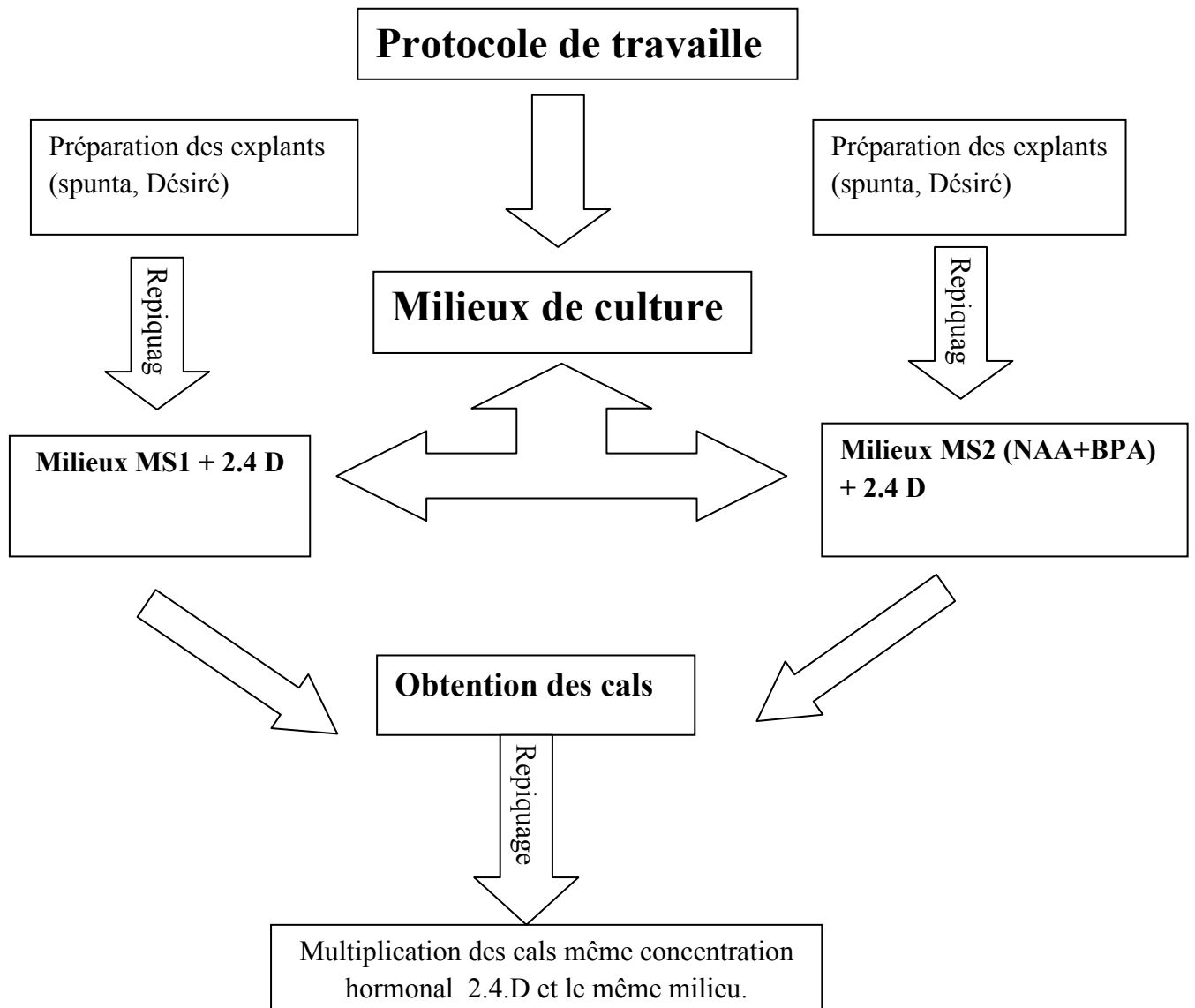
Les cals sont initiés à partir de différents explants à savoir l'Apex, nœuds, entre nœuds et les feuilles. Les explants sont stérilisés selon la méthode mentionnée ci-dessus.

Les explants sont mis en culture sur les différents milieux. Les explants sont repiqués dans un milieu frais chaque 02 semaines.

### **II.5. Incubation des explants**

L'Incubation se fait dans une chambre à culture bien éclairée pour assurer la photosynthèse au cours de toute la période d'incubation et chaque 15 jours, nous multiplions le nombre des cals par d'autre repiquage.

Fig. 08 : Organisation du plant de travailles





**III- Résultats**

**III-1- Initiation des cals.**

Le but de cette étape est l'induction des cals sur les différents explants de 02 variétés de pomme de terre à savoir la Spunta et la Disirée.cal cultivar. Les explants testés sont les apex (A), feuilles (F), nœuds (N) et entre nœuds (EN).

**III-2-Effet du milieu MSI sur la formation de cals de 02 variétés Spunta et Désiré.**

**Tableau IV :** le pourcentage des cals obtenues dans le milieu MS I.

Concentrations 2,4D mg/L			Variété Spunta			Variété Désiré			Pourcentage % dessèchement /contamination	
			Nombre D'explants	Nombre de cals	% de cals	Nombre D'explants	Nombre de cals	% de cals	Spunta	Désiré
0	0.0	A	10	4	40	10	5	50	60	50
		F	20	10	50	20	6	30	50	70
		N	15	9	60	15	10	66,66	40	33.34
		EN	20	7	35	20	6	30	65	70
1	0.4	A	10	5	50	10	6	60	50	40
		F	20	9	45	20	4	20	55	80
		N	15	9	60	15	10	66.66	40	33.34
		EN	20	13	65	20	8	40	35	65
2	0.8	A	10	3	30	10	8	80	70	20
		F	20	4	20	20	4	20	80	80
		N	15	5	33.33	15	12	80	66.67	20
		EN	20	12	60	20	10	50	40	50
3	1.2	A	10	2	20	10	8	80	80	20
		F	20	9	45	20	4	20	55	80
		N	15	5	33.33	15	15	100	66.67	0
		EN	20	20	100	20	12	60	0	40

4	1.6	A	10	4	40	10	9	90	60	10
		F	20	0	0	20	5	25	100	75
		N	15	5	33.33	15	15	100	66.67	0
		EN	20	9	45	20	14	70	55	30

Le tableau IV montre que les différents explants mis en culture sur le milieu MS1 avec 04 concentrations de 2,4D et pour les 02 variétés (Spunta et Désiré) ne réagissent pas tous de la même manière. Le pourcentage de cals obtenu varie entre 0 et 100%. En fonction de la concentration de 2,4D et le type d'explant utilisé, nous remarquons que le taux des cals est plus élevé avec les nœuds et les entre nœuds en comparaison avec les feuilles et les apex pour la variété Spunta.

Contrairement, pour la variété Désiré, le taux de cals obtenu varie entre 20 et 100%. Le pourcentage de calogènes le plus élevé est obtenu avec les nœuds sur le milieu MS1-[4] et MSI-[5] et les apex avec un taux variant de 50 à 90%. Concernant les apex, plus la concentration de 2,4D augmente plus le nombre de cals obtenu augmente.

Pour les concentrations du 2,4 D dans le milieu, nous remarquons que le pourcentage des cals obtenu augmente en augmentant la concentration de 2,4D pour la variété Spunta, à l'exception des nœuds avec une concentration de [4] 1.6 mg/L, ayant donné 33.33% et les feuilles et les entre nœuds dont le pourcentage de cals est respectivement de 0 % et 45 % pour une concentration de 2,4D de [4] 1.6 mg/L chez la variété Spunta. Pour la variété Désiré, le nombre de cals est proportionnel à la concentration de 2,4 D, à l'exception des feuilles où le milieu MS1 a donné 30 % de cals alors que le milieu MS2, le pourcentage de cals est de 20% en utilisant les feuilles.

L'utilisation des apex, comme explant, pour induire des cals a montré que le taux de calogènes est compris entre 20 et 50% pour la variété Spunta et de 50 à 90% pour la variété Désiré. Le pourcentage des cals pour la variété Spunta ne dépend pas de la concentration de 2,4D appliquée ; contrairement pour la variété Désiré où le pourcentage de cals augmente en augmentant la concentration de 2,4D.

L'obtention des cals à partir des feuilles a montré que le taux de cals obtenu varie entre 0 et 50% chez la variété Spunta alors que chez la variété Désiré, le taux de cals est compris entre 20 et 30%. L'application des 05 concentrations de 2,4 D n'affecte pas la formation de cals chez les 02 variétés.

Les nœuds pour l'induction des cals ont montré une différence dans le pourcentage ; chez la variété Spunta, le pourcentage obtenu varie entre 33,33 et 60% alors que chez la variété Désiré, le taux est

entre 66,66 et 100%. Concernant les 05 concentrations de 2,4D utilisés, pour la variété spunta il n'existe pas de corrélation entre les doses testés et le taux de calcs formés. Au contraire, chez la variété Désiré, le pourcentage de calcs est en croissance quand la concentration de 2,4D augmente.

Avec les entre - nœud utilisés comme explants chez la variété Spunta , le pourcentage de calcs est compris entre 35 % et 100% en montrant qu'il n'y a pas de corrélation entre les concentration de l'hormone testés et le taux de production de calcs. Chez la variété Désiré, le taux de calcs formé est entre 30 et 70%. A l'opposé de la variété Spunta , le pourcentage de calcs est en augmentation quand la concentration de 2,4D augmente chez la variété Désiré.

**III-3-Effet du milieu MSII sur la formation de calcs de 02 variétés Spunta et Désiré**

**Tableau V : le pourcentage des calcs obtenues dans le milieu MS II (spunta/ désiré)**

Concentrations 2,4D		Variété Spunta			Variété Désiré			% dessèchement /contamination		
			Nombre D'explants	Nombre de calcs	% de calcs	Nombre D'explants	Nombre de calcs	% de calcs	spunta	Désiré
0	0.0	A	10	4	40	10	6	60	60	40
		F	20	5	25	20	5	25	75	75
		N	15	10	66.66	15	10	66,66	33.34	33.34
		EN	20	12	60	20	15	75	40	25
1	0.4	A	10	6	60	10	7	70	40	30
		F	20	11	50	20	5	25	50	75
		N	15	10	66.66	15	12	80	33.34	20
		EN	20	12	60	20	16	80	40	20
2	0.8	A	10	10	100	10	8	80	0	20
		F	20	12	60	20	6	30	40	70
		N	15	14	93,33	15	13	86.66	6.67	13.34
		EN	20	13	65	20	18	90	35	10
3	1.2	A	10	4	40	10	9	90	60	10
		F	20	0	0	20	10	50	100	50
		N	15	15	100	15	14	93.33	0	6.67
		EN	20	20	100	20	19	95	0	5

4	1.6	A	10	10	100	10	10	100	0	0
		F	20	12	60	20	11	55	40	45
		N	15	7	46.66	15	15	100	53.33	0
		EN	20	15	75	20	20	100	25	0

Concernant les apex, le taux de la callogénèse varie entre 40 et 100% pour la variété Spunta alors que pour la variété Désiré, il est entre 60 et 100%. Le pourcentage des cals pour les deux variétés augmente en fonction de la dose de 2,4D appliquée ; plus la dose de 2,4D augmente plus le taux de cals augmente à l'exception du milieu MSII avec une dose de 4 mg/ml.

L'utilisation des feuilles comme explant pour la formation de cals a montré que pour la variété Spunta, le taux de callogénèse varie entre 0 à 60% alors que pour la variété Désiré, le pourcentage de cals obtenu varie entre 25 et 55%. Ce taux augmente aussi avec la croissance de la dose de 2,4D à l'exception du milieu MSII avec une dose de 4 mg/ml qui n'a pas donné aucune cal.

Avec les nœuds utilisés comme explants chez les variétés Spunta et Désiré, le pourcentage de cals est compris entre 66,66 % et 100% pour les deux variétés.

Les entre nœuds, comme explants pour induire les cals, ont montré un pourcentage compris entre 60 et 100% chez la variété Spunta et de 75 à 100% chez la variété Désiré. En plus, pour 02 variété, le taux de cals augmente en augmentant la concentration de 2,4D à l'exception du milieu MSII avec une dose de 4 mg/ml où un taux de 100% est enregistré alors qu'avec une dose de 5 mg le taux est de 75% seulement concernant la variété Spunta.

Les quatre types d'explants de pomme de terre Apex, feuilles, entre nœuds et nœuds montrent une capacité à former les cals et ont réagi positivement sur les deux milieux MS1 enrichi par 2.5 mg/L de la kinétine et MS2 contenant en plus NAA et BPA contenant différentes concentration de 2,4D avec les 02 variétés de pomme de terre.

Cependant les nœuds et les entre nœuds ont produit un nombre plus important de cals par rapport aux feuilles et aux apex qui ont montré leur difficulté à produire une grande quantité de cals en comparaison avec les autres explants pour la variété Spunta. Cependant, la variété Disirée, en plus des nœuds et les entre nœuds, les apex ont montré aussi une grande capacité de produire des cals.

Le pourcentage de callogénèse formés pour les 02 variétés (Spunta et Disiré) de pomme de terre sur le milieu MSII varie d'un type d'explant à l'autre. Le plus faible pourcentage variant de 0 à 55% est obtenu avec les feuilles contrairement aux nœuds et entre nœuds qui ont formé respectivement 66.65% à 100 % et 75% à 100%.

## III.4 - La comparaison entre les deux milieux MS I et MS II

Tableau VI : comparaison entre les deux milieux (spunta/désiré)

Concentration 2,4D mg/L		Variété Spunta		Variété Désiré	
		MS I en présence de la kénitine	MSII en présence de NAA et BAP	MS I en présence de la kénitine	MSII en présence de NAA et BAP
0	0.0	46,25	47.91	44,16	56,66
1	0.4	55	59,16	46,66	63,75
2	0.8	35,83	79,58	57.5	71,66
3	1.2	50	60	65	82,08
4	1.6	29,4	83,75	71.25	88,75

La comparaison des deux milieux sur les deux variétés Spunta et Désiré a montré que le milieu MSII montre une grande capacité à former des cals par rapport au milieu MSI. En plus, la présence de 2,4D dans le milieu favorise l'induction de la callogénèse. En plus dans les deux milieux et pour les deux variétés plus on augmente la concentration de l'hormone 2,4D plus le pourcentage de cals augmente sauf dans le cas de la concentration 4 a 1.6 mg/L si possible une contamination . Nous constatons aussi que le nombre des cals obtenues (%) en milieu MS I est plus faible par rapport au milieu MSII contenant les régulateurs de croissances BAP et NAA.

**III- 5-Effet des deux variétés Spunta et Désiré sur la formation de cals sur le MSI et MSII**

**Tableau VII : comparaison entre les deux variétés (spunta/désiré) :**

Variétés	MSI (%)	MS II (%)
Spunta	43,29	66,08
Désiré	56,91	72,58

Les deux variétés à savoir la variété Spunta et Désiré ont montré une aptitude à produire des cals sur les deux milieux (MSI et MSII). Cependant, nous remarquons que la variété Désiré a donné un pourcentage plus élevé de cals avec 56,91% de cals sur le milieu MSI et 72,58% sur le milieu MSII alors que la variété Spunta a formé respectivement 42,08 % et 63,39% sur les milieux MSI et MSII.

**III.6-Effet des différents explants sur la formation de cals sur le MSI et MSII et sur les deux variétés Spunta et Désiré.**

**Tableau VIII : l'effet des explants sur la formation des cals :**

Explants	Spunta		Désiré	
	MSI	MSII	MSI	MSII
<b>A</b>	36	68	72	80
<b>F</b>	32	39	23	37
<b>N</b>	43,99	85,33	82,66	85,33
<b>EN</b>	61	72	50	88

Dans le tableau VIII, nous avons comparé la capacité des différents explants utilisés, à savoir les apex, les feuilles, les nœuds et les entre-nœuds, à former des cals. Tous les explants ont présenté la capacité de produire des cals mais à des taux différents en fonction de l'explant, du milieu et de la variété. A noter, que les résultats obtenus dans la comparaison des milieux MSI et MSII présenté dans le tableau s'est faite sans prendre en considération l'effet de la concentration de 2,4D.

Concernant les apex, le pourcentage de callogénèse est, chez la variété Spunta, de 36% sur le milieu MSI et de 68% sur le milieu MSII alors que le taux, chez la variété Désiré, est de 72% sur le milieu MSI et de 80% sur le milieu MSII.

Pour les feuilles, le pourcentage de cals obtenu chez la variété Spunta est de 32% sur milieu MSI et de 39% sur le milieu MSII ; Chez la variété Désiré, le taux de cals sur le milieu MSI est de 23% et de 37% sur le milieu MSII.

Les nœuds ont montré une capacité de callogénèse de 43,99% sur le milieu MSI et de 85,33% sur le milieu MSII pour la variété Spunta. La variété Désiré a présenté un taux de 82,66% sur le milieu MSI et de 85,33% sur le milieu MSII.

Les entre-nœuds ont présenté un pourcentage de cals sur le milieu MSI de 61% et de 72% sur le milieu MSII pour le milieu Spunta alors que chez la variété Désiré le taux est de 50% sur le milieu MSI et de 88% sur le milieu MSII.

**III -7-Effet des régulateurs de croissance sur la callogènes.**

**II- 7-1- Effet du milieu MSI avec les différentes concentrations de 2.4D sur la formation de cals sur les 2 variétés Spunta et Désiré**

**Tableau IX : l'effet des différentes concentrations de l'hormone 2.4D sur la formation des cals dans le milieu MSI :**

Variété		Spunta	Désiré
Concentrations 2,4D (mg/ l)			
<b>T (0)</b>	<b>0.0</b>	46,25	44,16
<b>1</b>	<b>0.2</b>	55	46,66
<b>2</b>	<b>0.4</b>	35,83	57,5
<b>3</b>	<b>1.2</b>	49,58	65
<b>4</b>	<b>1.6</b>	29,58	71,25

Le milieu MSI est additionné de 05 concentrations de 2,4D ( 0, 1 , 2, 3 et 4 en présence de 0.1 mg de NAA et 0.5 mg de BAP. La formation des cals ne corrèle pas avec l'augmentation de la concentration de 2,4 D chez la variété Spunta. Pour cela, nous remarquons que avec 0mg /l de 2,4 D (considéré comme témoin), le pourcentage de cals obtenu est de 46,25 % alors qu'avec une concentration de 1.6 mg/l de 2,4D, le taux de callogénèse n'accède pas les 29,58%. Contrairement à la variété Désiré où le pourcentage de cals augmente en augmentant la concentration de 2,4D. Sur le milieu MS en absence de 2,4D (Témoin), le pourcentage de cals formé est de 44,16%, il est de 46,66% avec une concentration de 0.2mg/l alors le pourcentage a atteint 71,25% en présence d'une concentration de 1.6 mg/l de 2,4D.

### II- 7-2- Effet du milieu MSII avec les différentes concentrations de 2.4D sur la formation de calcs sur les 2 variétés Spunta et Désiré

**Tableau X : l'effet des différentes concentrations de l'hormone 2.4D sur la formation des calcs dans le milieu MSII :**

Variété		Spunta	Désiré
Concentrations 2,4D (mg/ l)			
<b>T (0)</b>	<b>0.0</b>	47,91	56,66
<b>1</b>	<b>0.2</b>	59,1	63,75
<b>2</b>	<b>0.4</b>	79,58	71,66
<b>3</b>	<b>1.2</b>	60	82,08
<b>4</b>	<b>1.6</b>	83,75	88,75

Le milieu MSII est additionné de 05 concentrations de 2,4D ( 0, 1 , 2, 3 et 4 mg/L) en présence de 0.25 mg de Kinetine. La capacité de la formation des calcs croît avec l'accroissement de la dose de 2,4D appliquée sur le milieu MSII chez les deux variétés à savoir la Spunta et la Désiré. Cependant, la variété Désiré montre plus de capacité de produire des calcs en comparaison avec la variété Spunta. Par exemple, avec une dose de 0mg/l , la variété désiré a produit 56,66% de calcs alors que la variété a produit 47,91 % de calcs. Bien que, nous remarquons qu'avec la dose 3mg/l de 2,4D fait l'exception, puisque la variété Spuntaa produit que 60% de calcs en comparant avec une dose de 2 mg/l et 4 mg/l de 2,4D qui ont respectivement formé 79,58 % et 83,75 %.



**Discussion**

La méthode de la variation somaclonale est considérée comme un excellent supplément aux méthodes conventionnelles dans l'amélioration des plantes. Une autre source de création de la variabilité chez les plantes est l'induction de mutation. Cette technique a été utilisée avec succès dans l'amélioration du rendement, de la qualité, la résistance aux maladies et ravageurs chez les plantes cultivées (Brar & Jain, 1998).

Une combinaison *in vitro* technologie et la mutagenèse a été recommandé dans l'amélioration des cultures à multiplication végétative comme par exemple la pomme de terre (Novak *et al.*, 1992; Maluszynskiet *al.*, 1995).

Avant l'application de la mutation, il est important de maîtriser l'étape de la production des cals. Cependant, la formation des cals est tributaire de plusieurs facteurs dont les plus communs, sont les génotypes (variétés), la source des explants, la période *in vitro* et les conditions de culture.

Dans le présent travail, les explants utilisés sont les apex, feuilles, entre-nœuds et les nœuds de deux variétés de pomme de terre à savoir la Spunta et la Désiré. Tous les explants utilisés présentent une aptitude à former des cals chez les deux variétés testées (Spunta et Désiré) mais à des taux différents. L'application de 05 concentrations de 2,4D (0, 1, 2, 3 et 4mg/L) avec la présence de 0,5 mg/l de BAP et 0,1 mg/l de NAA pour le premier milieu, et la présence de 0,25 mg/L de kinétine a montré une corrélation entre l'augmentation de la dose de 2,4D et le taux de callogénèse à quelques exceptions.

En comparant les deux variétés, la réponse à la callogénèse est différentes, puisque la variété Desire a donné un taux plus élevé que la variété Spunta. Ceci montre que la variation somaclonale dépend du génotype testé comme il a été décrit par Roestet *al.* (1981). Ils ont montré une variabilité de 43% chez le cultivar de *Begoniahiemalis* et seulement de 7% chez les autres variétés. De même, l'incidence des différences dans la variation somaclonale chez la pomme de terre ont été observé ; les variétés Russet et Burbank ont montré une variabilité élevée par rapport aux variétés Kennebec and Superior (Rietveldet *al.*, 1993).

L'application d'un traitement hormonale montre aussi un effet sur la formation des cals. Aussi, Mangolin *et al.* (2002) ont montré une variabilité génétique dans la formation de cals chez *Cereusperuvianus* avec une concentration de 4 mg/l de 2,4-D and 4mg/l ou 8 mg/l de kinétine. Larkin (1987) a rapporté qu'une longue période d'incubation *in vitro* des cals augmenterait la variation somaclonale par rapport à l'exposition de cals pendant une période plus courte.

La culture de tissus est considéré comme une étape essentielle pour l'amélioration des plantes.

Les hormones de croissance régulent les réponses chez les différents milieux. L'augmentation de la concentration d'auxine dans le milieu avec de la cytokinine, augmente le pourcentage d'induction de cals. Uniformément chez les trois variétés testées de pomme de terre (Diamand, Carinal et Désiré) (Irshad *and al.*, 2010).

Cependant, quand les concentrations de deux auxines spécialement le 2,4D et la NAA décroissent en stabilisant la cytokinine (BAP), le pourcentage de l'induction des cals obtenu diminue et une faible réponse a été obtenu, seulement 22% ont été observé chez la variété Diamant de pomme de terre. Ces observations ont montré que la concentration de cytokinin, auxines contrôle en réalité la division cellulaire ainsi la formation des cals (Irshad *and al.*, 2010).

## Conclusion

---

Le milieu MSI est additionné de 05 concentrations de 2,4D ( 0 , 1 , 2, 3 et 4 mg/L) en présence de 0.25 mg de Kinetine. La capacité de la formation des cals croît avec l'accroissement de la dose de 2,4D appliquée sur le milieu MSI chez les deux variétés à savoir la Spunta et la Désiré. Cependant, la variété Désiré montre plus de capacité de produire des cals en comparaison avec la variété Spunta. Par exemple, avec une dose de 0mg/l , la variété désiré a produit 56,66% de cals alors que la variété a produit 47,91 % de cals. Bien que, nous remarquons qu'avec la dose 1.2mg/l de 2,4D fait l'exception, puisque la variété Spunta a produit que 60% de cals en comparant avec une dose de 0.4 mg/l et 1.6 mg/l de 2,4D qui ont respectivement formé 79,58 % et 83,75 %.

La capacité des différents explants utilisés, à savoir les apex, les feuilles, les nœuds et les entre-nœuds, à former des cals. Tous les explants ont présenté la capacité de produire des cals mais à des taux différents en fonction de l'explant. Concernant les apex, le pourcentage de callogénèse varie de 36% à 80% selon les variétés.

Pour les feuilles, le pourcentage de cals obtenu oscille entre 32% et de 39% pour la variété Spunta et Désiré. variété Désiré,.

Concernant, les nœuds ont montré une capacité de callogénèse allant de 43,99% à 85,33% sur le deux variétés Spunta et Désiré.

La variété Spunta ainsi que la variété Désiré ont présenté une capacité de callogénèse, par l'utilisation des entre-nœuds, variant entre 50% et 88%.

Il a été observé qu'il existe un grande différence, dans la capacité de former des cals, chez les explants testés Les feuilles ont présenté le taux de callogénèse le plus faible alors que pour les autre explants où la production de cals a atteint 88%. Il a été noté que la différence dans le développement des cals par rapport aux différents explants (Apex, feuilles, entre-nœuds et nœuds) chez la variété Diamont de la pomme de terre n'était pas grande (Haqueand *al.*, 2009)

En conclusion, ce présent travail est une étude préliminaire pour développer la méthode de la variation somaclonale en étudiant d'autres paramètres comme la taille et le poids des cals , l'explant le plus approprié, la maîtrise de la technique de régénération et d'acclimatation ainsi que la recherche d'autres milieux de culture permettant de produire un nombre le plus élevé de cals en fonction des variétés de pomme de terre testés.

## Conclusion

---

Toutes ces études pourraient être utiles pour développer des protocoles adaptés pour intégrer dans un schéma d'amélioration génétique de la pomme de terre.

### A

**Anonyme., 2000.** Histoire de la pomme de terre, Fédération des producteurs de pomme de terre de Québec CF.PPTQ : [www.fpptq.aq.ca](http://www.fpptq.aq.ca).

**Ambroise A., 2002.** Microtubérisation : Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). In Biotechnologies végétales, Techniques de laboratoire. Robert Haïcour, 2002. Ed Lavoisier. Londre-Paris-New York, pp 67-77.

**Anstis PSP Northcote, DH., 1973.** The initiation growth and characteristics of a tissue cultures from potato tubers jour, Exp, pot 24, 24,425-441

**Auge A., 1989.** La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Chapitre 2 : les phénomènes physiologiques liés à la réalisation des cultures in vitro. P 7 – 29.Ed : Lavoisier Tec et Doc. J.B Bailliere. 225 Pages

**Auge A., Boccon-Gibod J., 1989.** La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Chapitre 5 : les applications à l'horticulture. Pages 63-89. Ed : lavoisier tec et doc J.B.Bailliere. 225 pages.

**Arakawa T., Yu J., Langridge W.H., 1999.** Food plant-delivered cholera toxinB subunit for vaccination and immunotolerization. Adv Exp Med BioI464:161- 178.

### B

**Bretauudeau A., 2006.** Les techniques de culture in vitro et la micropropagation des espèces végétales .,IPR/Kolibougou Koulikoro B P 06.

**Bernhards U., 1998.** La pomme de terre *Solanum tuberosum* L. Monographie .Institut National Agronomique Paris – Grignon.

**Behnke., 1979** sélection of potato callus for résistance to the culture filtrate of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plant. Theor. Appl. Gene., 55, 69,71.

**Boccon-Gibod J., Jalouzot R., 1989.** Les biotechnologies en horticulture, possibilités et perspectives .In La culture in vitro et ces application horticoles. Ed J.B. Bailliéte. pp 91-131.

**Boutherin B., Bron G., 2002.** Multiplication des plantes horticoles. Ed : 2 tec et doc. 248 pages

**Brar, D.S., Jain , S.M. 1998.** Somaclonal variation: Mechanism and application in crop improvement. **In: *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement.*** (Eds.):

### C

**Centre International de la Pomme de terre, 1995.** La Papa en Cifras. Produccion Uso, Consomo y Comercializacin.

**Centre International de la Pomme de terre, 1998.** La Papa en Cifras. Produccion Uso, Consomo y Comercializacin.

### D

**Doré C., Varoquaux F., Coordinateur., 2006 .**Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées RINRA.

**Darpoux R., Debelley M., 1967.** Les plantes sarclées. Edition. J.B. Baillère et fils france. Collection d'Enseignement Agricole. 307p.

**Deza L.G., 1991.** Construction à la caractérisation de variants somaclonaux obtenus à partir d'explants de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L ssp. *tuberosum* cv. Désirée) irradiés aux rayons Gamma. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, U.E.R. de phytopathologie, Belgique, 127p.

**Donnelly D.J., Coleman W.K., Coleman S.E., 2003.** Potato microtuber production and performance : A review . American journal of potato research, vol 80: 103-115.

**DE Fossarda. 1976,** Tissue culture of plant propagation university of new england armidal NSW AUSTRALI 455.

### E

**Ellissèche, D. 2008.** Production de pomme de terre; quels défis pour aujourd'hui et pour demain?

### G

**Gallais A., Bannerot H., 1992.** Amélioration des espèces végétales cultivées; objectifs et critères de sélection. INRA, Paris, y768 p.

### H

**Hawkes J G., 1990.** The potato. Evolution, biodiversity and genetic resources. Londres : Belhaven Press. 259p.

**Haque, A.U; M. A. Samad.Shapla ,T. L. 2009.***In vitro* callus initiation and regeneration of potato.Bangladesh J. Agril. Res. 34(3) : 449-456.

### I

**Irshad,A., Idress A. N., Saleem Haider, M., Arshad Javed, M., Aslam JAVED, M., Latif, Z., Husnain T. 2010.** In Vitro Induction Of Mutation In Potato Cultivars.**Pak. J. Phytopathol.** Vol. 22(1): 51-57.

### L

**Larkin, P.J. 1987.** Somaclonal variation: history,method and meaning. **Iowa State Journal ofResearch**, v.61, p.393.434.

### M

**Meziane D., 1991.** Histoire de la pomme de terre .Detitique n°25 pp:29.

**Margara J., 1984.** Base de la multiplication végétatives .Les méristèmes et l'organogenèse. Institut National de la recherche Agronomique(INRA), 262p.

**Maluszynski, M., Ahloowalia, Bs., Sigurbjornsson, B. 1995.**Application of in vivoand in vitro mutation techniques for cropimprovement.**Euphytica**.85(1-3):303-15.

**Mangolin, C.A., Ottoboni, L.M.M., Machado, M.F.P.S. 2002.**Rapd Markers To evaluatecallus tissue of *Cereus peruvianus*Mill(Cactaceae) maintained in different growth

regulator combinations. *Biochemical Genetics*.v.40, n.9/10, p.351.358.

### N

**Nowbuth L., C L LE., Agroscope RAC changines., 2005.** Teneur non- conforme en ADN comme indicateur de variation soma clonale chez la pomme de terre .suisse agric .37 (6):257-266.

**Nowbuth L et LE C.L., 2004.** An important aspect of somaclonal variation in potato (*Solanum tuberosum* L.).In Teneur non- conforme en ADN comme indicateur de variation soma clonale chez la pomme de terre .suisse agric .37 (6):257-266.

**Novak, F.J., BRUNNER, H.1992.** Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. *IAEA Bull.* 4:24-33.

### O

**Ochatte C., 2005.** Growth, quality and biotechnology, WFP publisher .Finland.

**Ould Ramoul A., 1997.** Etude des possibilités de production de semences de pomme de terre *Solanum tuberosum* L. variété Désirée à partir de minitubercules issus de cultures *in vitro*. Thèse de magistère INA ALGER.

**Obata-Sasamoto H., Suzuki H., 1979.** Activities of enzymes relating to starch synthesis and endogenous levels of growth regulators in potato stolon tips during tuberization. *Physiologia Plantarum* 45, 320-324.

### P

**Potter R H., Jones M G K., 1991.** An assessment of genetic stability of potato *in vitro* by molecular and phenotypic analysis. *Plant Science* 76, 239-248.

**Péron J Y., 2006.** Références productions légumières, 2ème édition. synthèse Agricole p 538-547.

**Péron J Y., 2006.** Références productions légumières, 2ème édition.synthèse Agricole p 538-547.

### Q



**Quézel P. Santa .S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales .Ed .C.N.R.S, Paris.

### R

**Rousselle P., Robert Y., Crosnier J C., 1996.** La pomme de terre – Production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations. 1 éd. Paris : INRA Editions. P278.

**Rousselle P., Rousselle B., Ellisseche D ., 1992 .**La pomme de terre in Amélioration des espèces végétales cultivées .Gallais A , Bammerot H .1992.

**Reust W., 1982.** Contribution à l'appréciation de l'âge physiologique des tubercules de pommes de terre(*Solanum tuberosum* L.) et étude de son importance sur le rendement (thèse de doctorat). Zurich : Ecole Polytechnique Fédérale, 113 pp.

**Rietveld, R.C.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M.1993.**Somaclonal Variation In tuber disc-derived populations of potato. II. Differential effect of genotype. **Theoretical and Applied Genetics**, v.87, p.305-313.

**Roest, S.; Van Berkel, M.; Bokelmann,G.S.1981.**The Use Of Ana *In Vitro* adventitious bud technique for mutation breeding of *Begonia hiemalis*.**Euphytica**, v.19, p.381-388.

### S

**Soltner D., 2005a.** Les grandes productions végétales, phytotechnie spéciale-céréales-plantes nsarclées-prairies .Collection Sciences et Techniques Agricoles 20eme édition 472P.

### T

**Tourte Y., Bordonneau M., henry M., 2005.** Le monde des végétaux, organization, physiology et génétique .édition Dunod .p 384.

**Teoule E., 1993.** Biotechnologie.4<sup>em</sup> Ed : Tec et Doc. 904 Pages

### V

**Vinterhalter D., Vinterhalter B., Calovic., 1997.** The relationship between sucrose and cytokinins in the regulation of growth and branching in potato cv Désiree shoot cultures. Acta

## Référence bibliographique

---

Horticulturae 462, 319-323.

**Verhees J., 2002.** Cell cycle and storage related gene expression in potato tubers (Thèse de doctorat) . Wageningen : Wageningen Agricultural University, 133 p

### **Z**

**Zryd J P., 1988.** Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Lausanne, Suisse : Presses Polytechnique Romandes, 305 p.

# Annexes

---

## Annexe I : : Le matériel utilisé en laboratoire L'appareillage



**Figure 09 :** Autoclave



**Figure 10 :** PH mitre



**Figure 11 :** Balance de précision



**Figure 12 :** Plaque chauffante



**Figure 13 :** Etuve



**Figure 14 :** Hotte à flux lumineaire



**Figure 15 : Stérilisateur à billes**



**Figure 16 : Préparation de la solution finale du milieu de culture**

# Annexes

---

## Annexe 02

### Matériel Nécessaire

Pour le bon déroulement de l'expérimentation ; il est nécessaire de se procurer le matériel suivant :

- L'étuve
- La hotte
- L'autoclave
- Plaque chauffante
- Balance de précision
- Appareil de PH mètre
- Solution de NaOH et HCl (1 fois normale)
- Pipettes graduées de 10 ml et 25 ml
- Bêchers de 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml et 1000 ml
- Fioles de 100 ml, 250 ml, 500 ml et 1000 ml
- Erlènes de 200 ml
- Boîtes de Pétri en verre ou en plastiques stériles
- Un agitateur et un barau magnétique
- Des tubes en verre de 25 x 75 mm et de 25 x 150 mm
- Des bouchons en verre autoclavables
- Du coton hydrophile
- Papier filtre
- Parafilm
- Papier aluminium
- Grandes pinces en acier
- Spatules
- Scalpels et bistouris
- Boite pour rangement et stérilisation des outils
- Lampe à alcool
- Pissettes
- 2 Becs benzènes
- Filtre micropore à 0,2  $\mu\text{m}$
- Appareil de filtration
- Alcool 75° et 95°

## Annexes

- Hypochlorite de calcium ou hypochlorite de sodium
- Eau distillée

### Annexe 03

**Tableau 09** : Constituants du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) :

	<b>Ingrédients</b>	<b>Solution mère Mg/l</b>	<b>Volume de prélèvement</b>	
<b>Macroéléments</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	50ml	<b>A</b>
	KNO <sub>3</sub>	1900		
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440		
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170		
<b>Micro-éléments</b>	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	22.3	10ml	<b>B</b>
	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	10ml	<b>C</b>
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8		
<b>Sucre</b>	Saccharose	20000Mg/l	20000mg	<b>D</b>
<b>Agar</b>	Agar	8g/l	8g	<b>E</b>

# Annexes

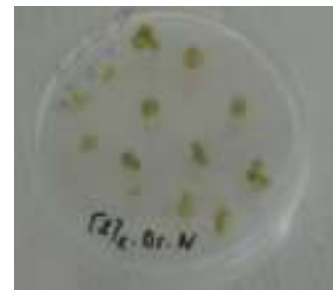
## Annexe 04 : quelques photos de cals obtenues



**Figure 17 : Sp (EN) MSIC5**



**Figure 18 : Sp (N) MSIIC5**



**Figure 19 : Dr (N) MSIIC2**



**Figure 20 : Dr (EN) MSIC3**



**figure 21 : Sp (A) MSIIC1**



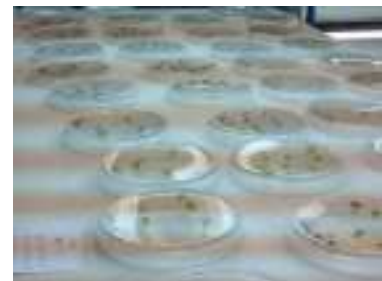
**Figure 22 : Dr (N) MSIC3**



**Figure 23 :**



**Figure 24 : Sp (A) MSII C1**



**Figure 25 : calogénese**

Boite contaminé par des champignon.

## Annexe 05 : les deux variétés utilisées

## Annexes

---



**Figure 26 : Plantule des deux variété de la pomme de terre a gauche Désiré à droite Spunta**



# Annexes

---

# ***ANALYSE Bibliographique***

# *Matériel et Méthodes*

# RESULTATS ET DISCUSSION

# *Introduction*

*Conclusion*

# *Annexes*

# Références bibliographiques



# *Partie expérimentale*