

UNIVERSITE SAAD DAHLAB – BLIDA-

FACULTE DES SCIENCES AGRONOMIQUES ET VETERINAIRES

DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité: AMELIORATION DES PRODUCTION VEGETALES

**CONTRIBUTION A LA MISE AU POINT D'UN SCHEMA DE
PRODUCTION DE SEMENCES DE POMME DE TERRE (*solanum
tuberosum* L.) :
DU MERISTEME AUX PREMIERES GENERATIONS DE PLEIN
CHAMP.**

Par

Dalila OUALHA

Devant le jury composé de:

Mr. BOUTEKRABT .A

Mr KHELIFI.L

Melle BELKAHLA .H

M^{me} CHAOUCH F.Z

Prof. (U Blida)

M C. (I NA -ALGER)

M C. (U. Blida)

C C. (U. Blida)

Président

Directeur

Examinatrice

Examinatrice

Blida, Juin 2005

RESUME

Le milieu MS additionné de gélose (6 g/l), saccharose (25g/l) et l'une des combinaisons hormonales de 0.05 mg /l kénitine + 0.1mg/l GA3 ou 0.02 mg/l BAP + 0.1mg/l GA3 s'est montré le plus favorable pour un bon développement des méristèmes de la variété Désirée. Les générations (G4 et G5) des vitroplants peuvent être acclimatées avec succès directement en serre verre pour la production des minitubercules (génération G0). Le substrat utilisé lors de l'acclimatation des vitroplants joue un rôle important. Les meilleurs résultats sont obtenus avec le mélange (1/3 sable de rivière + 2/3 tourbe) préalablement pasteurisé. Ce type de substrat donne en outre, les meilleurs résultats en terme de rendement et de qualité des minitubercules. Par ailleurs, la densité de plantation des vitroplants peut avoir elle aussi un effet direct sur le rendement en tubercules. Nos résultats montrent que pour produire des minitubercules de qualité, on peut aller jusqu'à la densité de 144 vitroplants/m². Le calibre des minitubercules est influencé par la génération des vitroplants, le type de substrat et la densité de plantation. La qualité des minitubercules (G0) exerce une influence directe sur les générations G1 et G2 de plein champ, et ce en terme de dormance, de dominance apicale, de levée à la plantation, et de rendement (nombre de tubercules et poids). Les résultats de la sérologie ont montré qu'il est tout à fait possible d'assainir la variété Désirée rien qu'en pratiquant la culture de méristèmes.

SUMMARY

The use of the medium Mr. S added with gélose (6 G/l), saccharose (25G/l) and one of the hormonal combinations of 0.05 Mg /L kénitine more 0.1mg/l GA3 or 0.02mg/l BAP/0.1mg/l GA3 was favorable for a good *in vitro* development of the méristèmes of the Désirée variety. The generations (G4 and G5) of the vitroplants can be acclimatized successfully directly in greenhouse glass for the production of the minitubercules (G0 generation).The substrate destined with the acclimatization of the vitroplants plays an important part. The best results are obtained with the mixture (1/3 stream sand + 2/3 peat) pasteurized beforehand. This type of substrate gives moreover, the best results in term of output and quality of the minitubercules. In addition, the density of plantation of the vitroplants can have it also a direct effect on the output in tubers. Our results show that to produce minitubercules of quality, one can go until the density of 144 plants/m². The gauges minitubercules is influenced by the generation of the vitroplants, the type of substrate and the density of plantation.The quality of the minitubercules (G0) exerts a direct influence on the generations G1 and G2 of full field, and this in term of dormancy, apical predominance, lifting to the plantation, and output (a number of tubers and weight).The results of serology showed that it is completely possible to disencumber the Désirée variety of its viruses. These tests must be regularly maintained and carried out until the last generations of full field.

DEDECACES

Je dédié ce modeste travail :

A mes très chers parents,

A mes frères et mes sœurs,

A mon beau frère et mes belles sœurs,

A mes neveux et mes nièces surtout Abd El Kader ,

A toute l'équipe de la SAGRODEV ,

A tout mes amis (es) surtout Yasmine et Afaf.

A la mémoire de Mr Tiranti Idir.

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes vifs remerciements et ma profonde gratitude au Dr. KHELIFI L. Maître de conférences à l'INA d'Alger pour tous les efforts qu'il a consentis durant mon encadrement, pour ses précieux conseils, son aide, sa disponibilité et surtout pour m'avoir toujours encouragée durant la phase délicate et difficile de la rédaction.

J'exprime aussi mes vifs remerciements, au Pr. BOUTKRABT A. de l'Université de Blida pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider mon jury.

Que Dr. H. BELKAHLA maître de conférences, Dr. F.Z. CHAOUCH chargée de cours et Mr M. BENCHAAABENE chargé de cours, tous du département d'agronomie de l'université de Blida, acceptent l'expression de mes vifs remerciements pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer aussi mes sincères remerciements et ma profonde gratitude à la SAGRODEV et surtout son Directeur Générale Mr L.OUALHA pour m'avoir aidée durant mon travail, et pour avoir autorisé la réalisation de ce mémoire au sein de cette entreprise.

Je remercie les équipes des laboratoires de culture IN VITRO et de contrôle phytosanitaires de la SAGRODEV : notamment M^{me} Oualha k, karima, farida, Djamila , Rabah , Riad , Farid , Smail , Moufida et Atmane pour leur aides et encouragements.

Egalement je tiens à remercier M^{elle} SLIMANI ; Mr TIRANTIE ; Mr OUBRAHEM , Mr ZOGHBI ,Mr laouar, Mme Adjess, ami Bendia ET Boutara .

Enfin, je remercie tous mes amis (es) qui de loin ou de près m'ont soutenue et encouragée pour mener à terme ce modeste travail.

TABLES DES MATIERES

RESUME	1
DEDECACES	4
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	10
INTRODUCTION	14
1-BIBLIOGRAPHIE	16
1.1. MONOGRAPHIE DE LA POMME DE TERRE	16
1.1.1. Généralités et historiques	16
1.1.2. Caractères biologiques et botaniques	16
1.1.3. Physiologie de la pomme de terre	18
1.1.3.1. Age physiologique	18
1.1.3.2. Cycle végétatif	20
1.1.4. Phytotechnie de la pomme de terre	26
1.1.4.1. Place de la pomme de terre dans la rotation	26
1.1.4.2. Qualité des plants de pomme de terre à utiliser	26
1.1.4.3. Fertilisation	28
1.1.4.4. Date de plantation	28
1.1.4.5. Soins culturaux	28
1.1. 4.6. Ennemis de la pomme de terre	29
1. 2. IMPORTANCE ECONOMIQUE	34
1. 2.1. Place de la pomme de terre dans le monde	34
1. 2. 2. Place de la pomme de terre en Algérie	36
1.3. PRODUCTION DE SEMENCES DE POMME DE TERRE	38
1.3.1Sélection classique	40
1.3.1.1. Principe de la sélection généalogique	40
1.3.1.2. Technique de la sélection généalogique	41
1.3. 2. Sélection « in vitro » et culture de méristèmes	41

1.3.2.1. Généralités	41
1.3. 2.2. Culture de méristème	42
1.3. 3. Micropropagation	44
1.3.3.1Définition	44
1.3. 3.2. Technique de micropropagation	45
1. 3.3.3. Utilisation de la micropropagation en amélioration des plantes	46
1.3. 4. Acclimatation	46
1. 3. 4.1. Condition de l'environnement de la serre verre	47
1. 3. 4.2. Production de minitubercules	47
1. 3. 5. Conduite de la culture	52
1. 3. 5.1. préparation du sol	52
1. 3. 5.2. La fumure	52
1. 3. 5.3. Préparation du plant	53
1. 3. 5.4. Besoins en eau	53
1. 3. 5.5. Soins culturaux	53
1.3. 5.6. Récolte et Conservation	54
1. 3.6. Conduite de la culture au champ	56
1. 3.7. Contrôle de l'état sanitaire	57
2. MATERIEL ET METHODES	58
2.1. Objectif du travail	58
2. 2. Choix et description de la variété retenue	58
2. 3. Culture de méristèmes	59
2.3.1. Préparation du matériel végétal	59
2.3.2. Désinfection des germes	60
2. 3.3. Excision des méristèmes	60
2.4. Optimisation du milieu de culture pour les méristèmes	61
2.4.1. Milieu de base	61
2.4.2. Composition du milieu en régulateurs de croissance	62
2.4.3. Conditions de culture	64
2.4.4. Paramètres étudiés	64
2.5. Micropropagation	64
2.5.1. Technique	65
2.5.2. Milieu de culture	67
2.5.3 Paramètres étudiés	67

2.6. Production de minitubercules	67
2. 6.1. Conduite de la culture	68
2. 6.2. Facteurs influençant le rendement et le calibre des minitubercules	69
2. 6.3. Paramètres étudiés à la G0 (minitubercules)	73
2.7. Culture en plein champ et production des générations G1 et G2	73
2.7.1 Objectifs	73
2.7.2. Prégermination	74
2.7.3. Préparation du sol	74
2.7.4. Plantation	74
2.7.5. Fertilisation	74
2. 7.5. Irrigation	75
2.7.6. Binage -Buttage	75
2. 7.7. Soins phytosanitaires	76
2.7.8. Récolte	76
2.7.9. Analyse statistique et représentation graphique des résultats	76
3. RESULTATS ET INTERPRETATIONS	77
1. 3.1. Résultats de la désinfection (méristèmes)	77
3.2. Optimisation du milieu de culture pour les méristèmes	78
3. 2.1. Effet des régulateurs de croissance	78
3.3. Effet génération sur la micropropagation	92
3.4. Acclimatation en conditions contrôlées sous serre en verre	95
3.4.1. Conditions d'acclimatation	95
3.4.2. Effet du substrat	96
3.4.3 Effet de la densité de plantation	111
3.5. Production en plein champ des générations G1 et G2	129
3.5.1. Conditions générales de culture	129
3.5.2. Comportement végétatif des plants G1 et G2	130
3.5.3. Production	130
3.5.4. Conservation et prégermination	131
3.6. Tests sérologique attestant l'assainissement	131
3.6.1. Résultats sérologiques de la première génération de vitroplants « G1 »	132

3.6.2. Résultats sérologiques des vitroplants en serre en verre	133
3.6.3. Résultats sérologiques des plants de la génération « G0 » de pré base sous serre en plastique	134
3.6.4. Résultats sérologiques des plants de la génération « G1 » de pré base en plein champ	135
4. DISCUSSION	136
4.1. Culture de méristèmes	136
4.2. Micropropagation	138
4.3. Acclimatation	139
4.4. Production des premières générations sur champ	140
4.5. Assainissement viral	142
CONCLUSION	145
APPENDICES	150
REFERENCES	163

LISTE DES ILLUSTRATIONS ,GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1 : Morphologie et cycle végétatif de la pomme de terre	17
Figure 2 : Courbe de croissance de germes de tubercules d'incubation différente	21
Figure 3 : Stade de germination des plants	22
Figure 4 : Croissance et tubérisation : deux activités antagonistes.	25
Figure 5 : Vue schématique de l'interaction des principaux facteurs externes au cours d'un cycle végétatif de la pomme de terre	27
Figure 6 : Schéma de sélection conservatrice et production du matériel de pré base	39
Figure 7 : Facteurs influençant la grosseur du tubercule	49
Figure 8 : Schéma de principe des facteurs influençant la compétition entre les tubercules d'une tige	50
Figure 9 : Schéma simplifié des facteurs influençant la distribution du calibre des tubercules au niveau de la culture	
Figure 10 : Schéma principal pour le prélèvement d'un méristème	62
Figure 11 : Dispositif expérimental pour l'étude de l'effet substrat de différents Substrats et deux générations sur le rendement des vitroplants	72
Figure 12 : Dispositifs expérimental pour l'étude de l'effet de différentes densités et deux générations sur le rendement des vitroplants	72
Figure 13 : Effet de la concentration de KIN sur le taux de reprise des méristèmes	77
Figure 14 : Effet de la concentration de KIN sur l'évolution de la longueur moyenne des mériplants avant et après repiquage	78
Figure 15 : Effet de la concentration de la KIN sur l'évolution de nombre moyen de feuilles par mériplant avant et après repiquage	79
Figure 16 : Effet de la concentration de KIN sur le taux de nécroses des méristèmes	80
Figure 17 : Effet de la concentration de KIN sur le taux d'anomalies observées Sur Les méristèmes	80
Figure 18 : Effet de la concentration de BAP sur le taux de reprise des méristèmes	81

Figure19: Effet de la concentration de BAP sur l'évolution de la longueur moyenne des mériplants avant et après repiquage	82
Figure20: Effet de la concentration de la BAP sur l'évolution de nombre moyen de feuilles par mériplant avant et après repiquage	86
Figure 21 :Effet de la concentration de BAP sur le taux de nécroses des méristèmes	86
Figure 22 :Effet de la concentration de BAP sur le taux d'anomalies observées sur les méristèmes	87
Figure 23 :Effet de la concentration de GA3 sur le taux de reprise des méristèmes	89
Figure 24: Effet de la concentration de GA3sur l'évolution de la longueur moyenne des mériplants avant et après repiquage	90
Figure 25: Effet de la concentration de la GA3 sur l'évolution de nombre moyen de feuilles par mériplant avant et après repiquage	91
Figure 26 :Effet de la concentration de GA3sur le taux de nécroses des méristèmes	91
Figure 27 :Effet de la concentration de GA3sur le taux d'anomalies observées sur les méristèmes	92
Figure 28 : Effet de la génération sur la longueur moyenne des vitroplants	94
Figure29: Effet de la génération sur le nombre moyen de feuilles par vitroplants	95
Figure 30 : Effet du substrat et de la génération sur la longueur des vitroplants après 42 jours	99
Figure 31: Effet du substrat et de la génération sur le nombre moyen de feuilles par vitroplant après 42 jours	100
Figure 32 : Effet du substrat et de la génération sur le nombre moyen de ramifications par vitroplant après 42 jours	101
Figure 33 : Effet du substrat et la génération sur biomasse des vitroplants à la récolte	101
Figure 34 : Effet du substrat et de la génération sur le rendement moyen en minitubercules plant	102
Figure 35 : Effet du substrats et de la génération sur le poids moyen des minitubercules produits par plant	104
Figure 36: Effet du substrat et de la génération du vitroplant sur le nombre des minitubercules du calibre C1 (< 15 mm) par plant	105
Figure 37 : Effet du substrat et de la génération du vitroplants sur le nombre des minitubercules Du calibre C2 (15à 28 mm) par plant	106

Figure 38 : Effet du substrat et de la génération du vitroplant sur le nombre de minitubercules du calibre C3 (28à 35 mm) par plant	107
Figure39 : Effet du substrat et de la génération du vitroplant sur le nombre de minitubercules du calibre C4 (35 à 45 mm) par plant	
Figure 40 : Effet du substrat et de la génération du vitroplant sur le nombre des minitubercules du calibre C5 (> 45 mm) par plant	109
Figure 41 : Effet de la densité de plantation et de la génération sur la longueur des vitroplants après 42 jours	113
Figure 42 : Effet de la densité de plantation et de la génération sur le nombre moyen de feuilles par vitroplant après 42 jours	
Figure 43 : Effet de la densité de plantation et de la génération sur le nombre moyen de ramifications par vitroplant après 42 jours	115
Figure 44 : Effet de la densité de plantation et la génération sur biomasse des vitroplants à la récolte	116
Figure 45: Effet de la densité de plantation et de la génération sur le rendement moyen en minitubercules par plant	117
Figure 46 : Effet de la densité de plantation et de la génération sur le poids moyen des minitubercules produits par plant	
Figure 47: Effet de la densité de plantation et de la génération du vitroplant sur le nombre minitubercules du calibre C1 (< 15 mm) par plant	119
Figure 48 : Effet de la densité de plantation et de la génération du vitroplants sur le nombre minitubercules C2 (15à 28 mm) par plant	
Figure 49 : Effet de la densité de plantation et de la génération du vitroplant sur le nombre de minitubercules du calibre C3 (28à 35 mm) par plant	
Figure50 : Effet de la densité de plantation et de la génération du vitroplant sur le nombre de minitubercules du calibre C4 (35 à 45 mm) par plant	121
Figure 51 : Effet de la densité de plantation et de la génération du vitroplant sur le nombre des minitubercules du calibre C5 (> 45 mm) par plant	122
Figure 52 : Effet de la densité de plantation et de la génération des vitoplants sur le poids frais de la biomasse de la partie aérienne des plants d'un m2	123
Figure 53 : Effet de la densité de plantation et de la génération des vitoplants sur le poids frais des minitubercules produits par m2	124

Figure 54 : Effet de la densité de plantation et de la génération des vitoplants sur le poids frais de la biomasse de la partie aérienne des plants d'un m ²	125
Figure 55 : SCHEMA POURSUIVI POUR LA PRODUCTION DES PLANTS DE POMME DE TERRE SAIN	144
Figure 56 : SCHEMA DE LA PRODUCTION EN MASSE DE PLANTS SAINS Prototype de la chine de production de plants de pomme de terre réalisé à la SAGRODEV (GULLAL-Sétif)	149

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Influence de l'âge physiologique des plants sur le développement de la culture	19
Tableau 2 : Facteurs stimulants la durée de dormance	20
Tableau 4 : Exportations de la pomme de terre	28
Tableau 5 : principales maladies cryptogamiques de la pomme de terre et moyens de lutte	30
Tableau 6 : principaux parasites et moyens de lutte	31
Tableau 7 : Principaux virus de la pomme de terre et modes de transmission	32
Tableau 8 : Production mondiale de pomme de terre entre 1998 et 2002	34
Tableau 9 : Exportations de la pomme de terre (en tonnes) des principaux pays	35
Tableau 10 : Production mondiale de plants de pomme de terre en tonnes : (1998-2002)	35
Tableau 11 : Evolution des superficies, des productions et des rendements (1998/2002) de la pomme de terre en Algérie	36
Tableau 12 : Importations et productions de plants de pomme de terre en Algérie	37
Tableau 13 : Caractères agronomiques de la variété Désirée	59
Tableau 14 : composition du milieu de base	61
Tableau 15: balances hormonales testées pour la culture de méristèmes	62
Tableau 16 :Les besoins de la pomme de terre en unité fertilisante appliqués sur les deux générations en plein champ	75
Tableau 17 :Taux de contamination pour les trois expériences de la culture de méristème	77
Tableau 18 : Tableau récapitulatif des résultats précédents	88
Tableau 19 : Estimation de la production de la G1 sous serre en plastique à la récolte	131
Tableau 20 : Résultats des tests sérologiques sur les vitroplants G1 <i>in vitro</i>	132

Tableau 21 : Résultats des tests Elisa-DAS et IFA sur les vitroplants en serre verre (expérience effet substrat et générations)	133
Tableau 22 : Résultats des tests Elisa-DAS et IFA sur les vitroplants en serre verre (expérience effet densités et générations)	134
Tableau 23 : Résultats sérologiques des plants de la « G0 » cultivés sous serre en plastique (2002-2003)	134
Tableau 24: Résultats sérologiques des plants de la 1 ^{ère} génération de pré base « G1 » en plein champ 2003	135
Tableau 25 :Effet des différentes balances hormonales sur la réactivité des méristèmes et leurs développement	137

INTRODUCTION

De nombreux auteurs s'accordent pour souligner l'importance de la pomme de terre dans l'alimentation humaine. Elle constitue pour notre région (Maghreb) un produit stratégique aussi bien pour les marchés locaux que pour les marchés internationaux d'autant plus que les conditions agroclimatiques (climat et sols favorables) lui permettent d'être cultivée pratiquement durant toute l'année. Cependant, malgré ces potentialités agroclimatiques l'Algérie se trouve, encore hélas, parmi les 1^{ers} pays importateurs de plants (semences) de pomme de terre pour satisfaire ses besoins sans cesse croissants. En effet, les statistiques de la FAO (2003), montrent une tendance à la hausse de la consommation des algériens en pomme de terre (actuellement environ 45K kg par an et par habitant).

Les besoins annuels de l'Algérie en semences de pomme de terre oscillent entre 187 500 et 200 000 tonnes (CNCC, 2003) pour emblaver environ 80.000 ha et produire 1200 000 tonnes de pomme de terre de consommation. En 2002-2003 les importations de semences ont permis de combler environ 64 % de nos besoins, soit 108.000 tonnes, toutes classes confondues (SE, E, A). Or, la production algérienne en semences est jusqu'à présent essentiellement basée sur le recyclage des semences importées, la SE pour produire la E, et la E pour produire la A, ce qui est loin de satisfaire la demande locale. En outre les semences importées ne présentent pas toujours les qualités requises (présences de certaines maladies de quarantaine : virus, bactéries et champignons) (CNCC ,2003).

Cette situation de dépendance totale vis-à-vis l'étranger en matière de semences de pomme de terre est le résultats d'un certains nombre de problèmes, notamment d'ordre organisationnel et technique. Ceci malgré que cette culture bénéficie d'un traitement particulier de la part des pouvoirs publics qui ont toujours inscrit la disponibilité de la pomme de terre parmi les axes prioritaires de la politique agricole algérienne. C'est dans ce contexte que le ministère de l'Agriculture en collaboration avec le gouvernement Canadien a engagé en 1980 la création d'un centre de production de plants de pré-base à Guellal (Sétif). Ce centre avait

comme principale mission la satisfaction de la demande Algérienne en semences de pomme de terre. La région Sétifienne a été choisie pour ses conditions climatiques, soit disons, défavorables au développement des populations aphidiennes qui constituent le principal vecteur des maladies virales. Cependant, la partie canadienne n'a pas mis à la disposition du centre un schéma de production de semences de pomme de terre directement utilisable. C'est la raison pour laquelle, ce centre n'est devenu opérationnel qu'après sa réorganisation en société dotée d'une gestion autonome en 1998, puis la mise en place par des chercheurs Algériens d'un schéma de base permettant d'initier la production de ces semences (Djennane & Khelifati, 1996, Loughreib et Mahmoudia, 1997, Ould Ramoul 1997, Yahia Messaoud, 1998, , Toubal, 1997, Ali ben Ali & Alamir, 1998 ; Khelifi, 1999, Khelifi et al., 2002, Khelifi et al., 2002 Khelifi *et al* 2002, Lahmissi et al., 2003, Benalia, 2004, Lahmissi, 2004).

Le présent travail s'inscrit dans ce cadre et constitue une suite à un travail initié en 1998-1999 dans le cadre de l'obtention d'un diplôme d'ingénieur (Oualha, 1999). Il a comme objectif principal la maîtrise de certaines phases nécessaires (assainissement par culture de méristèmes, micropropagation, acclimatation, culture de plein champ) pour produire une semence de pomme de terre de qualité certifiée.

CHAPITRE 1

BIBLIOGRAPHIE

1.1.Monographie de la pomme de terre :

1.1.1.Généralités et historique

La pomme de terre est une culture potagère, industrielle et fourragère très précieuse. La diversité de ses utilisations est due à ses remarquables propriétés alimentaires, et sa haute valeur énergétique fait d'elle l'une des plus importantes cultures dans le monde.

La pomme de terre est originaire de l'Amérique du Sud, des hauts plateaux de la cordillère des Andes [15]. Elle a été introduite en Europe, d'abord en Espagne en 1657, puis un peu plus tard en Irlande. Elle s'est ensuite répandue à l'occasion des guerres et des famines, à travers toute l'Europe pour gagner au fur et à mesure, le reste du monde [16].

En Algérie, son introduction par les Français n'a eu lieu que vers 1856, qui ont cultivée la pomme de terre au début en primeur. En 1898, l'Algérie était déjà un pays exportateur de pomme terre et les premiers chiffres d'exportation atteignaient 3 000 tonnes par an [17].

1.1. 2. Caractères biologiques et botanique

La pomme de terre (Figure1.1) est une herbacée annuelle considérée comme pérenne, pour son aptitude à se reproduire par ses tubercules. Son système aérien est constitué d'un ensemble de tiges portant des feuilles composées d'aspect et de couleur variables ainsi que des fleurs de couleur blanchâtre à violacée pouvant donner, en cas de fertilité, des fruits globuleux appelés baies contenant des graines dites « True seeds = vraies semences ».

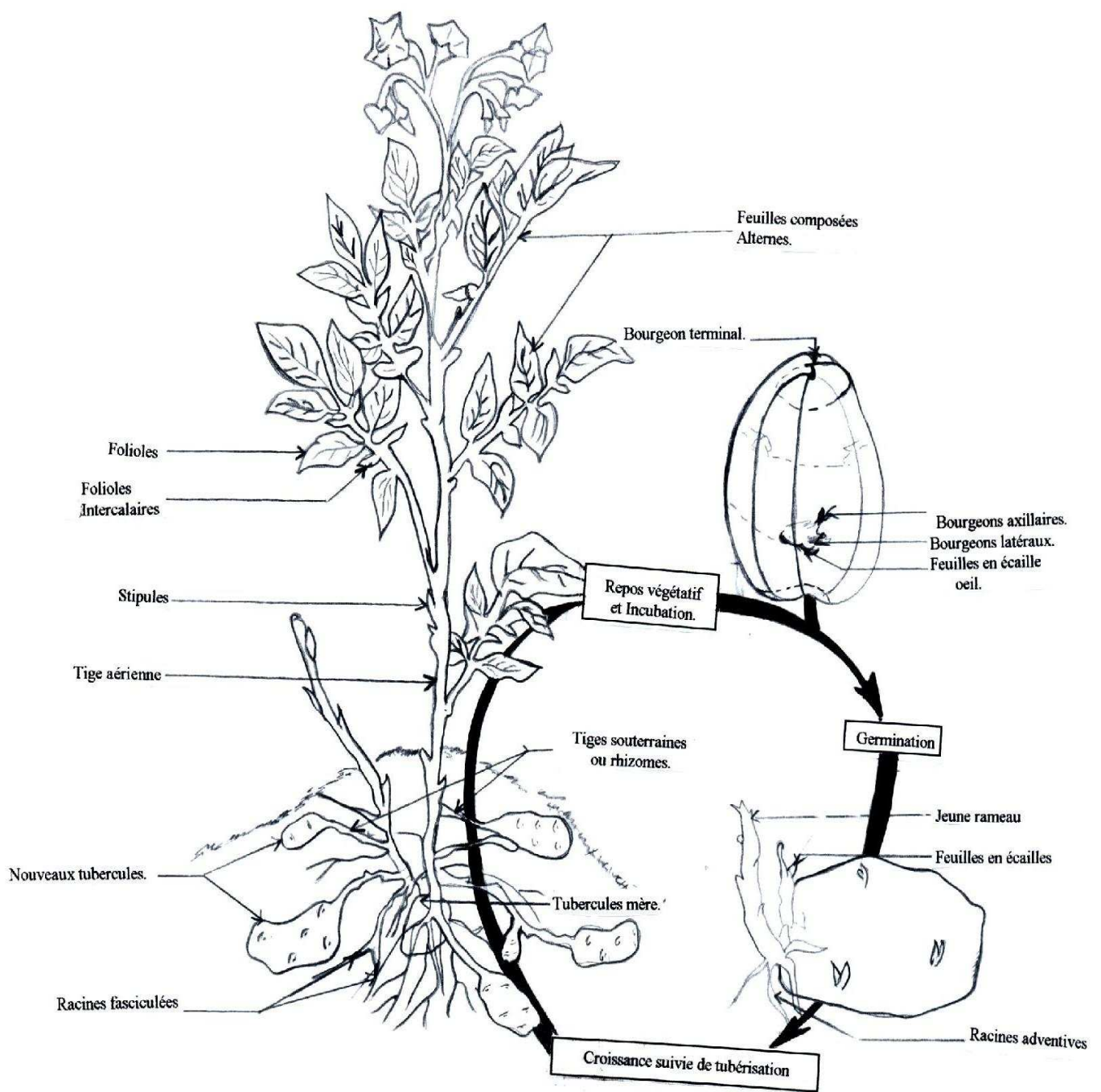


Figure 1.1 : La morphologie de la pomme de terre et son cycle végétatif [18]

Le système souterrain représente la partie la plus importante de la plante [19] Il se compose de nombreuses racines fines et de tiges souterraines relativement courtes appelées « Stolons ». Ces stolons se renflent à leurs extrémités et donnent des tubercules qui sont des tiges gorgées d'eau, de féculés et d'amidon. Ils constituent les organes de réserve de la plante [20, 21]

La pomme de terre appartient à la famille des solanacées et comporte plusieurs espèces. Elle forme une série polyploïde complète au nombre chromosomique de base $n=x=12$. Sa variabilité s'illustre par ses variétés qui sont nombreuses et différentes entre elles par un certain nombre de caractéristiques morphologiques :

- forme de tubercule, finesse, couleur de la peau (jaune, rouge et violette), couleur de la chair (blanche et jaune) et profondeur des yeux,
- forme, pigmentation et pilosité des germes,
- port de l'appareil végétatif, forme des tiges, des feuilles et folioles.

La pomme de terre est aussi connue pour son polymorphisme qui touche à la fois les tiges, les feuilles et les tubercules. Il semblerait qu'il soit de nature génétique, mais les conditions du milieu peuvent aussi l'influencer [22]

Sur le plan cultural, les éléments de choix variétal sont : la précocité de maturité, la précocité de tubérisation, la productivité et la résistance aux parasites [23, 24].

1.1. 3. Physiologie de la pomme de terre

3.1 1.1. 3.1-Age physiologique

Le tubercule est un organe de réserves riches en eau, en substances nutritives et conserve une vie active même dans la période dite de repos. De ce fait, il subit tout au long de son existence, l'effet du milieu où il se trouve, ce qui présente des répercussions sur sa descendance, par voie végétative [24].

L'âge physiologique joue un rôle important sur le développement de la culture de pomme de terre.

Il influe considérablement sur la précocité de la levée, la vigueur des plantes, le nombre de tiges et de tubercules par plante et par conséquent, le rendement final et la répartition des calibres à la récolte [25, 26, 27, 25, 28] (tableau1.1).

L'âge physiologique se mesure par le degré de développement qu'il a atteint [29], ce qui correspond selon SAUNDERS (1988) à l'âge relatif interne des tubercules par opposition à l'âge chronologique mesuré par unité de temps.

Bien que l'âge des tubercules débute au moment de leur initiation et non à partir du défanage ou de la récolte, il n'est pratiquement évalué qu'au moment de la plantation en faisant référence au niveau du développement des germes et de la consistance du tubercule. Cependant, les températures basses (2 à 4°C) retardent la germination et par conséquent affectent le début de la mesure de l'âge physiologique.

Ceci conduit à penser que la levée de la dormance et l'âge physiologique ne coïncident nécessairement pas [30]. Par ailleurs, la méthode de mesure peut s'effectuer par la sommation des températures qu'accumule le tubercule durant sa conservation au dessus d'un seuil qui est généralement (+ 4 °C).

Tableau 1.1 : Influence de l'âge physiologique des plants sur le développement de la culture. [24].

	Plants jeunes.	Plants vieux.
- Levée.	Lente.	Rapide.
- Sensibilité aux accidents de levée : boulage.	Très faible.	Elevée.
- Croissance des plantes.		Rapide.
- Nombre de tige.	Lente.	Moyen à élevé (selon les variétés).
- Hauteur des fanes.	Moyen à faible.	Courtes.
- Durée de végétation.	Hautes.	Plus courte.
- Nombre de tubercules par plante.	Longue.	Moyen à élevé (selon les variétés).
- Calibre des tubercules		Plus grand défanage.
- Rendement :		
- natif.	Bas.	Elevé.
- à maturité.	Elevé.	Moins élevé.
- Sensibilisation aux virus (infection I ^{aire}).	Elevée.	Moindre.

3.2 1.1.3.2-Cycle végétatif :

4.2.1 1.3.2.1-Dormance :

4.2.1 **BURTON (1966) définit la dormance comme étant la balance des facteurs qui empêchent la croissance des bourgeons des tubercules même lorsque ceux-ci sont placés dans des conditions optimales d'humidité et de température. Cette balance tend beaucoup plus vers la dormance des bourgeons du talon que ceux de la couronne.**

- **Durée de la dormance :** Elle est évaluée par le temps s'écoulant entre l'initiation du tubercule au champ et sa germination [24, 28].

A côté de cette dormance naturelle, il existe une dormance artificielle plus longue [30], durant laquelle les tubercules apparaissent dormants, mais seulement à cause des conditions qui empêchent leur germination.

La durée de la dormance est un caractère variétal, n'ayant aucune relation avec leur précocité. Elle peut s'étaler de 1 à 4 mois [27].

Exemple : Selon VAN LOON, (1987), la durée de la dormance de la variété désirée est de 119 jours dans les conditions de stockages suivantes :

- température : 18 °C,
- humidité relative : 90%.

Cette durée peut être stimulée par plusieurs facteurs classés selon SAUNDERS, (1988) en deux catégories résumées dans le tableau 1.2 :

Tableau 1. 2 : Facteurs stimulants la durée de dormance.

Facteurs cultureaux.	Facteurs d'environnement.
Plantation de plants germés.	Sols légers.
Plantation précoce.	Humidité du sol faible.
Récolte précoce.	Basses altitudes.
Conservation à hautes températures.	Conditions de croissance sévères.

D'autre part, VAN LOON, (1987) met en évidence que l'application d'un choc thermique sur les tubercules conservés à températures basses (2 °C à 3 °C) pendant 10 à 20 jours suivie d'une conservation à une température relativement haute (20 °C), raccourcit le repos végétatif (Cas de la variété Désirée).

4.2.1 1.1.3.2.2-Germination :

4.2.1

a. Incubation : le tubercule en conservation élabore une substance de tubérisation de nature inconnue, synthétisée d'autant plus vite que la température de conservation est élevée.

b. Germination : elle représente le reflet de l'évolution physiologique du tubercule, se manifeste à travers les germes et se traduit par trois (03) phases (figure3. 2).

La vigueur de repousse après un égermage dépend du moment où il a été réalisé :

- en A (pendant le Stade I) : croissance lente de nouveaux germes (V1).
- en B (pendant le Stade II) : croissance rapide de nouveaux germes (V2).
- en C (pendant le Stade III) : croissance très lente de nouveaux germes (V3).

Mais si l'égermage est pratiqué aux mêmes dates (A et B), sur un tubercule plus incubé, la vigueur des repousses est différente : V1 en A et V2 en B.

c. Dominance apicale : la germination chez les bourgeons se produit de façon acropétale [32], c'est à dire, quand un tubercule est conservé à une température au dessus de 8 à 10 °C, à l'approche de la fin de sa dormance, seul le germe de son œil apical se développe bien [33] tout se passe comme si le germe apical empêche les autres de pousser [28].

Selon VANLOON (1987) ; après l'élimination de ce germe, les autres yeux vont se développer, ceci peut s'obtenir également par l'alternance d'une période de température basse (2 °C à 4°C) suivie d'un choc de température haute (18 °C à 20 °C) ou par voie chimique : la « rindite » ou GA3 [24, 34].

d. Germination maximale : c'est la période de développement normal où plusieurs yeux se mettent à germer. Elle peut durer plusieurs mois [18]. Quand l'âge physiologique est avancé, les germes sont nombreux, minces, fins et ils ont tendance à se ramifier. La vitesse de croissance diminue, le tubercule est proche de son incubation et il est presque épuisé (figure1.3).

Tubercules jeunes		Tubercules vieux	
Dormant.	Dominance de la pousse apicale.	Fin de la période du repos physiologique	Usé
Pas de formation de pousses	Seule la pousse terminale	Formation de plusieurs pousses	Pousses filiformes, tubérisation

Figure1.3 : Stades de germination des plants. [18].

4.2.1 1.3.2.3-Croissance :

4.2.1 La vitesse de croissance des plantes dépend, de l'âge physiologique [25]. Par ailleurs, tous les germes n'émergent pas automatiquement dans le sol, seul une proportion variable se développe en tige, cette proportion dépendra du calibre et du traitement qu'a subi le plant [27]. Une fois levé, les tiges acquièrent progressivement leur autonomie vis à vis du tubercule mère et assureront plus tard la nutrition et la « physiologie » de la plante [35].

4.2.1 1.3.2.4-Tubérisation :

4.2.1 Après un certain temps qui est variable selon les variétés et le milieu, les stolons cessent leurs élongations, et leurs extrémités hautement méristématiques vont se différencier et forment les ébauches de tubercules : c'est la phase de tubérisation [33].

4.2.1 Au cours de cette phase, le bourgeon terminal entre en repos végétatif et les réserves s'accumulent à l'extrémité du stolon pour former le tubercule [36]. Deux phases (séparées par une période de transition) caractérisent la tubérisation :

- **1^{ère} phase** : Introduction de la tubérisation où l'organe spécialisé acquiert l'aptitude de tubérisé [37, 38].
- **Phase de transition** : marquée par l'arrêt de croissance des stolons et la croissance diamétrale de leurs parties sub-apicales[19].
- **2^{ème} phase** : grossissement du tubercule : qui se renfle et accumule des réserves.

Ce grossissement se poursuit jusqu'à l'entrée en dormance du tubercule [39]. A la récolte, tous les tubercules ont le même âge physiologique quelle que soit leur grosseur [40].

Après la tubérisation, seul un certain nombre de tubercules subissent une phase de multiplication et de grossissement intense ; tandis que quelques semaines plus tard, les autres disparaissent, conduisant au développement de seulement 2 à 4 tubercules par tige principale [27]. Ceci reste cependant un facteur variétal.

Le fonctionnement de la plante entière est la résultante de la double impulsion de son feuillage et de son tubercule mère, et dont les stimulations identiques s'ajoutent pour induire la tubérisation.

En effet, dès la levée, le feuillage élabore une substance de tubérisation sans aucun doute identique à celle synthétisée par le tubercule mère en conservation [25]. L'effet du thermophotopériodisme est direct sur la synthèse de la substance de tubérisation (figure 1.4).

Les températures élevées, surtout la nuit et les jours longs favorisent beaucoup plus la croissance végétative au détriment de la tubérisation. Les températures basses (<20°C et peut être <15 °C) et les jours courts favorisent l'élaboration de cette substance inductrice de la tubérisation [41].

On peut noter également que les températures basses favorisent la tubérisation même sous des photopériodes longues alors qu'une température élevée est antagoniste de l'effet bienfaisant des jours courts sur la tubérisation [25]. La réponse à la photopériode et à la température est un caractère variétal. En effet, chaque variété possède un seuil critique de longueur du jour au delà duquel elle ne tubérise plus ou très mal

La plante entière (avec son tubercule mère) peut être comparée à une éprouvette graduée, et la « substance de tubérisation » à un liquide qui s’y acculerait:

I. UN NIVEAU A DOIT ETRE ATTEINT POUR PROVOQUER LE DEPART DE LA TUBERISATION :

Niveau de déclenchement de la tubérisation

En dessous de A, seule la croissance se poursuit. C’est le cas lorsque l’action du milieu est seulement favorable à la croissance.

Substance de tubérisation du feuillage.

En jours trop longs, pour une variété déterminée (plantation tardive par exemple)

Substance de tubérisation du tubercule mère.

Quant la température est trop élevée (surtout la nuit).

II. LA TUBERISATION EST DEFINITIVE, OU IRREVERSIBLE A PARTIR D’UN NIVEAU B :

Substance du feuillage

A ce niveau et au dessus, la croissance s’arrête et la tubérisation seule se poursuit. C’est le cas :

Substance de tubérisation.

1) Quand l’action du milieu est très favorable à la tubérisation : pour les plantations trop précoces en jours courts et température basse, en sol et climat défavorables à la croissance.

Substance du feuillage.

2) Quand le tubercule mère a atteint le « stade d’incubation » par suite d’une mauvaise Conservation. C’est l’« boulage à la levée » accentué par une plantation hâtive en sol humide et froid, et pour les variétés sensibles au boulage.

Substance de tubérisation du tubercule mère.

III. ENTRE LES NIVEAUX A et B, TUBERISATION ET CROISSANCE SE POURSUIVENT SIMULTANEMENT :

Substance de feuillage.

C’est le cas pour les cultures plantées en Avril/Mai en bonnes conditions, avec des plants bien Conservés et bien germés (zone II).

Substance du tubercule mère.

IV. MAIS LA TUBERISATION PEUT S’ARRETER MOMMENTANEMENT :

Si la plante grandit plus vite que le feuillage n’élabore la substance de tubérisation, en période très favorable à la croissance (tout se passe comme si l’éprouvette s’élargissait, ce qui fait descendre le niveau au dessous de A).

Substance du feuillage

La tubérisation peut reprendre par suite : C’est le phénomène de la « repousse », donnant des tubercules « chapelet ».

Substance du tubercule mère

EN BREF, RESUMONS AINSI CET ANTAGONISME TUBERISATION CROISSANCE :

Tubérisation irréversible	croissance arrêtée	température basse - jours courts. tubercule-mère incubé - Influence de la sensibilité variétale.
---------------------------	--------------------	---

Tubérisation réversible	croissance	Température favorable - jours longs tubercule mère peu incubé.
-------------------------	------------	---

Pas de tubérisation	croissance active	Température élevée - jours très longs, tubercule-mère insuffisamment incubé, influence de la variété à la photopériode.
---------------------	-------------------	---

Figure 1.4 : Croissance et tubérisation : Deux activités antagonistes. [42].

Selon TIGUEROS (1988), les germes subissent un vieillissement analogique à celui du tubercule, l'égermage ne peut donc ralentir cette évolution, car les germes qui se forment après auront le même âge et croissent avec la même vigueur qu'auraient eu les précédents. Cependant, l'influence de l'âge physiologique des plants sur le développement de la culture est expliquée par l'importance du rendement obtenu (Figure 1.4).

La Figure 1.5 représente l'interaction entre différents facteurs externes exerçant une influence sur le cycle de la pomme de terre.

1.1.4. Phytotechnie de la pomme de terre :

3.3 1.1.4.1-Place de la pomme de terre dans la rotation :

La pomme de terre est considérée comme une plante sarclée, nettoyante et vient généralement en tête de rotation. En Algérie, et d'une manière générale, notamment au niveau des hauts plateaux, la pomme de terre précède les céréales (cultures salissantes).

3.4 1.1.4.2-Qualité des plants de pomme de terre à utiliser :

1.4.2.1-Choix variétal et état sanitaire :

L'état sanitaire des plants et le choix des variétés utilisées sont des facteurs importants dont dépendent les rendements. Précisant à cet effet, que la production de plants de semences doit répondre au respect rigoureux d'un itinéraire technique. Globalement, cet itinéraire est connu par tous les agriculteurs multiplicateurs du monde. Le multiplicateur détermine ainsi, le type de la culture qu'il désire produire, les variétés préférées par les consommateurs, leurs caractères agronomiques, leurs précocités et la possibilité de les protéger [27].

1.4.2.2. Pré-germination :

Le contrôle de l'âge physiologique ou la prégermination vise à préparer le plant afin qu'il soit dans les meilleures conditions au moment de la plantation.

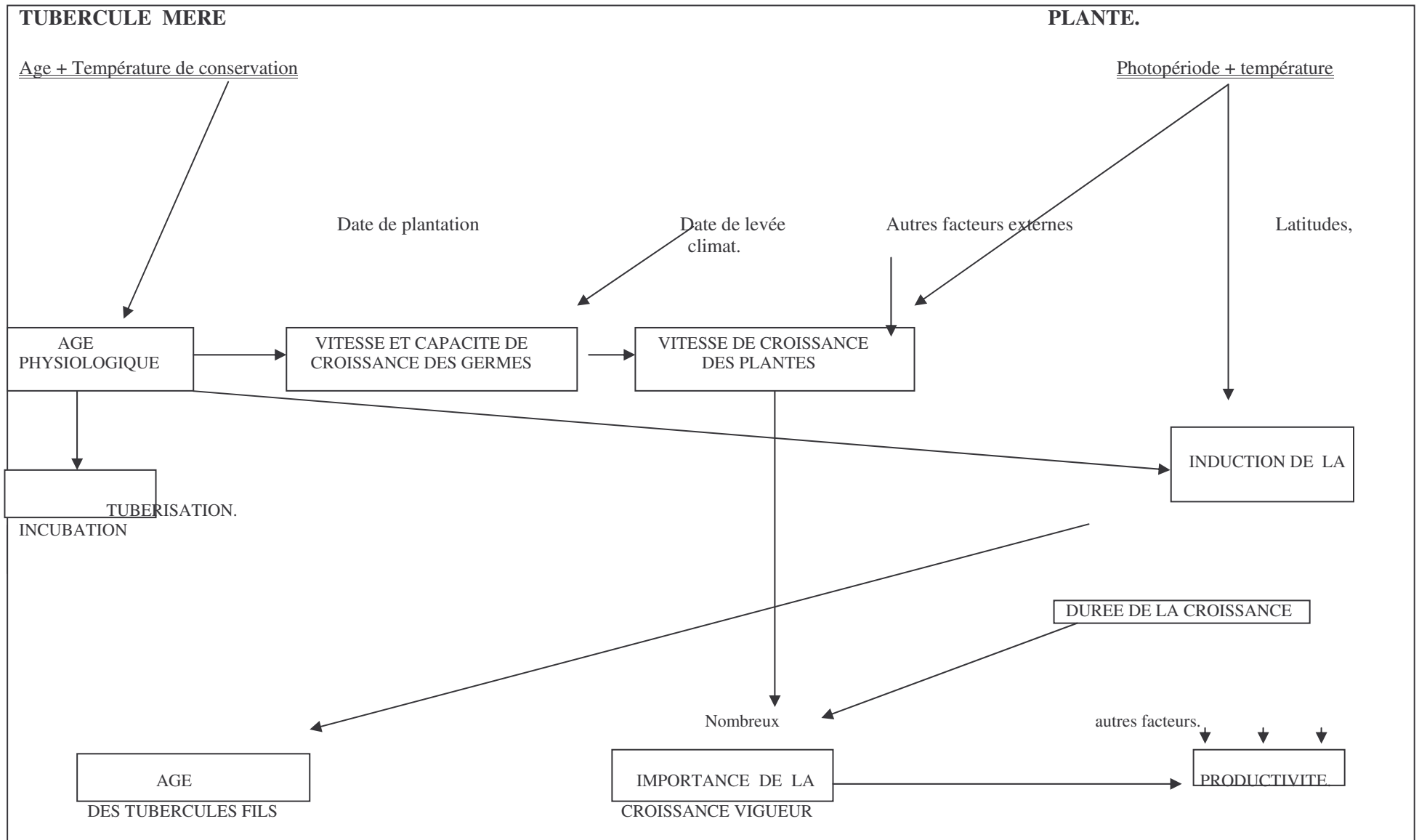


Fig. 4 : Vue schématique de l'interaction des principaux facteurs

Elle se réalise dans des conditions de température, d'aération, d'humidité et de lumière favorables pour obtenir des germes trapus, résistants, capables de lever rapidement aussitôt plantés et de donner des tiges vigoureuses [43].

1.4.3. Fertilisation :

La pomme de terre est une plante exigeante en éléments nutritifs. Ses rendements sont en relation avec l'importance de la fumure qui lui est apportée ; la fertilisation doit être combinée (minérale et organique). On relèvera la prédominance des besoins en potasse

(tableau 1. 4).

Tableau 1. 4 : Exportations de la pomme de terre [42].

	Exportation en kg/tonne Tubercule.	Exportation de fanes (kg/tonne)
Azote.	3,2	2 à 4
Phosphate.	1,6	0,2
Potasse.	6	3 à 6

1.4.4. Date de plantation :

La date de plantation est fonction de la zone de production. Dans les régions des hauts plateaux, en culture de saison, les plantations précoces sont souhaitables tout en évitant les périodes gélives.

1.4.5. Soins culturaux :

1.4.5.1. Buttage : Il permet une bonne nutrition de la plante, de favoriser un grossissement correct et d'assurer une protection efficace contre les attaques de la teigne et du mildiou.

1.4.5.2. Désherbage : Il peut se faire mécaniquement ou par voie chimique (utilisation d'herbicides)

1.4.5.3. Besoins en eau : Ils sont faibles au début du cycle végétatif, très élevé au moment de la formation des stolons et des tubercules (40 à 60 jours après la plantation) et sont minimales à l'approche de la maturité.

1.4.6. Ennemis de la pomme de terre :

Cette culture est sensible à un nombre important d'ennemis naturels qui peuvent causer d'énormes dégâts en un temps court (Tableaux 1.5, 1.6 et 1.7). Cependant à l'heure actuelle, ce sont surtout les maladies virales (incurables) dites de dégénérescence qui semblent attirer le plus l'attention des chercheurs et des producteurs. Il est impératif de ne cultiver que des plants sains, réaliser des épurations précoces pour éliminer les sources d'infections ainsi qu'un bon isolement vis à vis des autres cultures.

Tableau 1.5 : Principales maladies cryptogamiques de la pomme de terre et moyens de lutte.

4.2.1	Nom du parasite	Organes touchés	Description des dégâts	Moyen de lutte
	Mildiou (<i>Phytophthora infestans</i>).	Feuilles. Tiges. Tubercules.	Les symptômes apparaissent après une période chaude et humide : tâche d'abord vert pâle (« tâche d'huile ») puis jaune et enfin brune. Un feutrage blanc à la face inférieure des feuilles. Brunissement et dessèchement, suivi de la destruction totale de la plante. Tache brune marbrée sur l'épiderme. Chair marbrée de couleur rouille. Pourriture sèche ; Parfois pourriture humide due à des champignons ou bactéries secondaires.	Méthodes culturales : . éliminer les plantes malades. . lutter contre les mauvaises herbes. . butter soigneusement. . détruire les fanes en cours d'attaques tardives brutale. Méthodes chimiques : Pulvérisation de : . produits cupriques (sulfate de cuivre, oxyde de cuivre...) . produits organiques de synthèse (manèbe, zinèbe).
	Rhizoctone noir (<i>Rhizoctonia Solani</i>).	Tiges.	Le champignon, qui se conserve sous forme de points noirs sur les tubercules (sclérotés) émet des filaments nécrosant les jeunes tiges, qui se flétrissent, décroissent et pourrissent.	. Rotation des cultures. . Désinfection des plants par trempage avant la mise en germination à l'automne (2 % de formol), au printemps dans des organo-mercuriales.
	Fusariose (<i>Fusarium Coeruleum</i>). Et <i>F. roseum</i> pourriture sèche.	Tubercules.	En cours de conservation : Taches brunes légèrement déprimées, bientôt entourées de rides concentriques. Puis formation de coussinets blanchâtres le long des rides. Pourriture sèche : le tubercule se rotative et devient dur.	. Destruction des tubercules malades. Désinfection des locaux de conservation et de récoltes et de conditionnement, à l'aide de solution à 5% de formol ou de 8-10% de crésyl de solution/m ² .
	Gangrène (<i>Pythium</i>). Gangrène (<i>Phoma exigua</i>).	Tubercules. Tubercules.	Pourriture humide liquéfiant les tubercules blessés, peu de temps après la récolte. Taches en coup de pouce, entraînant légèrement la chaire du tubercule au talon ou au niveau d'une blessure.	Détruire les tubercules malades. Récolte dans les trois semaines suivant le défanage. Eviter de blesser les tubercules. Désinfecter les plants par trempage.

Tableau 1.6: Principaux parasites et moyens de lutte.

Nom du parasite	Organes touchés	4.2.1 Description des dégâts	Moyen de lutte
Nématode Anguillules des racines (<i>Heterodera rostochiensis</i>).	Racines.	<p><u>Végétation faible</u> par endroit dans le champ, Les plantes sont rabougries et les racines peu développées et plus ou moins fourchues :</p> <p>Les radicelles portent des chapelets de <u>petites boules blanches</u>, jaunes et finalement brunes.</p> <p>Les tubercules récoltés sont petits et le rendement peut chuter de 75 %.</p>	<p><u>Allonger la rotation</u> et dans les terres infestées, ne plus cultiver de solanées pendant 5 ans au minimum.</p>
Pucerons (principalement : <i>Mysus persicae</i> , <i>Macrosiphum solani</i> et <i>Aphis ramni</i>).	Feuilles	<p>Petites taches, pales et léger enroulement des feuilles.</p> <p>Le rôle nuisible des pucerons tient surtout à leur <u>rôle de vecteurs</u> (transporteurs) <u>des maladies à virus</u>.</p>	<p>Cultiver les plantes dans les <u>régions peu propices aux pucerons</u> : zones maritimes ventées ou d'altitude.</p> <p><u>Lutte chimique précoce</u> dès l'installation des premières colonies avec un aphicide autorisé à action systémique.</p>
Taupins (plusieurs espèces d'agriotes).	Tubercules.	<p><u>Galeries étroites</u> de 1 à 2 mm dans les tubercules.</p> <p>Ces attaques sont la porte d'entrée de pourritures diverses.</p>	<p><u>Désinfecter le sol</u> à l'aide d'un insecticide, autoriser seulement si le nombre de larves dépasse 30 à 40 au m².</p>
Vers blancs (larve du hanneton, <i>elolantha</i> , <i>melolontha</i>).	Tubercules.	<p><u>Galeries larges</u>, tapissées de fils soyeux, et renfermant des excréments noirâtres.</p>	<p><u>Désinfecter le sol</u> à l'aide d'un insecticide, autoriser seulement si le nombre de larves dépasse 4 à 6/m²</p>

Tableau 1. 7 : Principaux virus de la pomme de terre et modes de transmission.

Virus	Groupes	Symptômes	Mode de transmission	Référence
leafroll virus	<i>Luteovirus</i>	a). Symptômes primaires : Enroulement des jeunes feuilles. b). Symptômes secondaires : Jaunissement port dressé. Enroulement des premières feuilles.	Par pucerons : <i>Myzus persicae</i> ; <i>Myzus ascalonicus</i> , <i>Aphis rhamni</i> . (p)	[44]. [45].
PVY: Potato virus y.	<i>Potyvirus</i> .	a). Symptômes primaires : Bigarrures, nécroses des nervures (restriction des feuilles). b). Symptômes secondaires : Frisolée, mosaïque déformante.	Par pucerons : <i>Myzus persicae</i> , <i>Myzus natus</i> , <i>Aphis rhamni</i> et <i>Aphis fabae</i> ... (NP)	[46]. [49].
PVA: Potato virus A.	<i>Potyvirus</i> .	Mosaïque souvent fugace. Chlorose souvent sévère sur certaines variétés.	Par pucerons : <i>Myzus persicae</i> , <i>myzus circumflexus</i> , <i>Aphis rhamni</i> . (NP)	[46].
PVX: Potato virus X.	<i>Potexvirus</i> .	Mosaïque plane, internervaire. Nécroses et anneaux concentriques sur feuilles.	Sauterelles.	[48].
PVS: Potato virus S.	<i>Carlavirus</i> .	Mosaïque sur certaines variétés. Rugosité, réduction foliaire sur d'autres, absence de symptômes distinctifs pour la plupart.	Pucerons. (NP)	[47]. [46]. [48].
PVM:Potato virus M.	Carlavirus.	Mosaïque internervaire, enroulement mou des feuilles du sommet, feuilles en cuillère. Gaufrage.	Par puceron : <i>Myzus persicae</i> (NP)	[47]. [46].

La pomme de terre est soumise à l'attaque des pathogènes diverses dues à des champignons, des virus et viroïdes, des bactéries et des mycoplasmes .Ces pathogènes, en infestant le feuillage, les racines et/ou les tubercules, provoquent des manques à la levée, un affaiblissement des plantes, une mort prématurée et/ou une mauvaise qualité des tubercules, de plus, diverses maladies peuvent apparaître ou continuer à se développer sur les tubercules pendant la période de conservation entraînant ainsi une perte importante. JELIS et BULTON(1984) estiment par exemple qu'au niveau mondial les maladies causent 32% de pertes, les ravageurs 10%, les mauvaises herbes 6%, contre 15%, 3% et 4% respectivement au Royaume-Uni.

Selon MESSIAEN (1981), la multiplication végétative par tubercules favorise beaucoup plus la propagation des agents pathogènes que la multiplication par graine et il n'est pas rare qu'un tubercule héberge plusieurs agents pathogènes en même temps. Cet état de fait a amené les producteurs de plants à développer des stratégies afin de produire des tubercules d'une bonne qualité phytosanitaire : sélection sanitaire du plant-basée sur l'épuration des lots contaminés, par la mise en œuvre la culture *in vitro*, les traitements fongicides des tubercules et les mesures de quarantaine permettent la protection des zones de production de plants

1.2. Importance économique :

1.2.1. Place de la pomme de terre dans le monde :

La pomme de terre occupe une place importante dans l'économie mondiale. Elle est la 4^{ème} culture après le blé, le maïs et le riz . La consommation de la pomme de terre reflète l'importance qui lui est accordée dans l'alimentation des populations de nombreux pays. A titre d'exemple, selon FAOSTAT (2002), les consommations annuelles par habitant pour l'année 2003 pour certains pays sont :

- Fédération de Russie : 122.3 kg ;
- Belgique Luxembourg : 113 kg ;
- Allemagne : 77.8 kg ;
- France : 66.9 kg ;
- Canada : 45 kg ;
- Chine : 32.7 kg .

Elle est cultivée dans 154 pays et les superficies qui lui sont réservées dépassent 19 Millions d'hectares avec une production annuelle d'environ 310 Millions de tonnes. La production mondiale de pomme de terre est donnée dans le tableau 1.8 :

Tableau 1.8 :Production mondiale de pomme de terre entre 1998 et 2002 [1]

Années	Superficies (ha)	Productions (t)
1998	18.838.400	300.750.000
1999	19.663.200	300.912.000
2000	20.080.000	329.024.000
2001	19.654.000	312.435.000
2002	19.287.000	311.359.000

Selon FAOSTAT (2002), les 5 premiers pays producteurs de la pomme de terre sont :

- la Chine : 66 573 000 t ;
- la Russie : 32 870 000 t ;
- l'Inde : 24 882 000 t ;
- les USA : 20 856 000 t ;
- l'Ukraine : 16 619 000 t.

Les principaux pays exportateurs de pomme de terres sont les Pays- Bas, l'Allemagne, la France, la Belgique et le Canada. Les exportations de ces pays sont données dans le tableau 1. 9 :

Tableau 1. 9 : Exportations de la pomme de terre (en tonnes) des principaux pays [1].

Années Pays	1998	1999	2000	2001	2002
Pays-Bas	1.420.892 t	1.203.674 t	1.347.739 t	1.551.547 t	1.741.565 t
Allemagne	930.475 t	1.102.694 t	1.354.049 t	1.485.974 t	1.290.243 t
France	1.248.937 t	1.136.101 t	1.109.320 t	1.113.815 t	1.023.504 t
Belgique	1.179.823 t	982.022 t	876.725 t	934.834 t	835.279 t
Canada	631.528 t	525.890 t	449.563 t	356.480 t	426.161 t

Quant à la production mondiale de la semence, elle est donnée dans le tableau 1.10 :

Tableau 1.10: Production mondiale de plants de pomme de terre en tonnes :1998-2002 [1].

Années	Productions (t)
1998	35.841.620
1999	35.544.404
2000	36.902.349
2001	36.297.393
2002	35.063.242

Les principaux pays producteurs de semences de pomme de terre sont :

- La Russie : 8.500.000 t ;
- L'Ukraine : 5.000.000 t ;
- La Chine : 3.001.500 t ;
- L'Inde : 2.200.000 t ;
- La Pologne : 2.050.000 t.

1.2.2. Place de la pomme de terre en Algérie :

La pomme de terre requiert une place importante dans la consommation de la population algérienne. La consommation moyenne annuelle est d'environ 45 kg par habitant et les besoins de l'Algérie sont de 1.2 Million de tonnes par an.

La surface consacrée à sa production varie entre 75.000 et 80.000 hectares, toutes catégories et saisons confondues avec des besoins globaux en plants oscillant entre 187.500 et 200.000 tonnes [53]. La production nationale est basée sur la reproduction de plants importés. Elle n'arrive cependant pas à se maintenir à des niveaux de productions répondants aux besoins de consommation de la population d'une campagne à l'autre.

Cette irrégularité est liée aux conditions climatiques, à la conduite de la culture, aux problèmes de disponibilité de la semence, son prix notamment les semences importées. Les données de la production nationale (Tableau 1.11).

Tableau 1.11: Evolution des superficies, des productions et des rendements (1998/2002) de la pomme de terre en Algérie [1].

Années	Superficies (ha)	Productions (t)	Rendements Qx/ ha
1998	68.640	1.100.00	160.25
1999	64.890	996.268	153.53
2000	72.690	1.207.690	166.14
2001	65.790	967.232	147.01
2002	66.000	1.000.000	151.51

Pour la production de plants de pomme de terre, l'Algérie reste encore dépendante des importations (Tableau 1.12) :

Tableau 1.12 : Importations et productions de plants de pomme de terre en Algérie :

Campagnes	Quantités Importées (t)	Production Nationale (t)	Total (t)	Superficies Réalisées (ha).
1999/2000	142 708	58 096	200804	3 658
1998/1999	76 364	36 226	112590	2 899
2000/2001	80 745	44 250	124995	3 226
2001/2002	100 805	90 825	191630	4 602
2002/2003	116 000	108 000	224000	6 774

Source : C.N.C.C 2003

A ces importations correspondent des sorties en devises évaluées de 1998 à 2002 à 215,754 millions de dollars [1].se répartissant comme suit :

- 1998 : 33,537 US\$,
- 1999 : 43,920 US\$
- 2000 : 42,361 US\$,
- 2001 : 25,273 US\$,
- 2002 : 70,663 US\$.

Devant cette situation, la maîtrise du processus de production de plants de pomme de terre et les moyens de son développement deviennent une nécessité afin de réorienter les coûts d'importation de semences de pomme de terre vers d'autres secteurs de l'économie nationale.

1.3. PRODUCTION DE SEMENCES DE POMME DE TERRE : de la sélection classique aux biotechnologies.

La disponibilité d'une semence saine, donnant naissance à des plants sains génétiquement conformes à la variété que l'on désire cultiver, est impératif pour l'agriculteur [54]. C'est là l'objectif de la production de semences qui a pour principe l'obtention de générations saines et identiques sans passer par la graine.

Le point de départ de la production de semences, est un ensemble de tubercules sains conservés en collection [54] , qui vont subir une sélection sanitaire qui permettra l'obtention de tubercules répondants à des normes phytosanitaires admises [54].

La descendance (issue d'une multiplication végétative) des tubercules de départ, doit être suivie de façon individualisée à travers une sélection généalogique et conservatrice rigoureuse [55, 56].

Cette sélection consiste pour chaque génération, à préserver le pouvoir germinatif et les propriétés variétales, à ne multiplier que des plants sains, à réduire au minimum les contaminations et à vérifier à tous les stades le bon état sanitaire, car, il suffit qu'un seul plant soit infecté dans les premières générations pour que la parcelle entière soit déclassée ou carrément éliminée par la suite[54].

Pour ce faire, deux voies sont possibles :

1. Voie classique : sélection par les voies traditionnelles.
2. Voie moderne : sélection clonale utilisant les cultures *in vitro*.

Il faut savoir que ces deux voies comportent deux phases :

- Phase d'obtention : qui consiste en l'obtention de plants de base et de pré-base.
- Phase de multiplication des plants de base et de pré-base pour l'obtention de plants certifiés des classes A et B commercialisables[54].

Les conditions à respecter pour la production de semences se résument en trois points :

- Utilisation de matériel végétal de départ sain,
- Choix de régions non infestées de maladies,
- Suivi de l'itinéraire technique des cultures et réalisation de tests sanitaires.

La pomme de terre est une plante à reproduction végétative. A chaque fois qu'on la multiplie, on ne fait que propager un seul et même individu, donc, un seul et même génotype, on donne à cet ensemble de plantes issues d'une même souche, le nom de clone. Les clones de pomme de terre en dehors de cas de mutations,

conservent parfaitement bien leur pureté variétale d'une génération à une autre. En dehors de la pureté variétale, la valeur des plants dépend essentiellement de leur degré de contamination par divers virus et de l'importance de leur infestation par d'autres maladies cryptogamiques et bactériennes transmises par le tubercule. Ainsi pour l'obtention d'une semence standard d'une qualité appréciable, il est nécessaire d'effectuer une sélection conservatrice ou sanitaire à travers la multiplication par clonage [55].

La sélection généalogique par multiplication végétative est réalisée selon la figure 1.6.

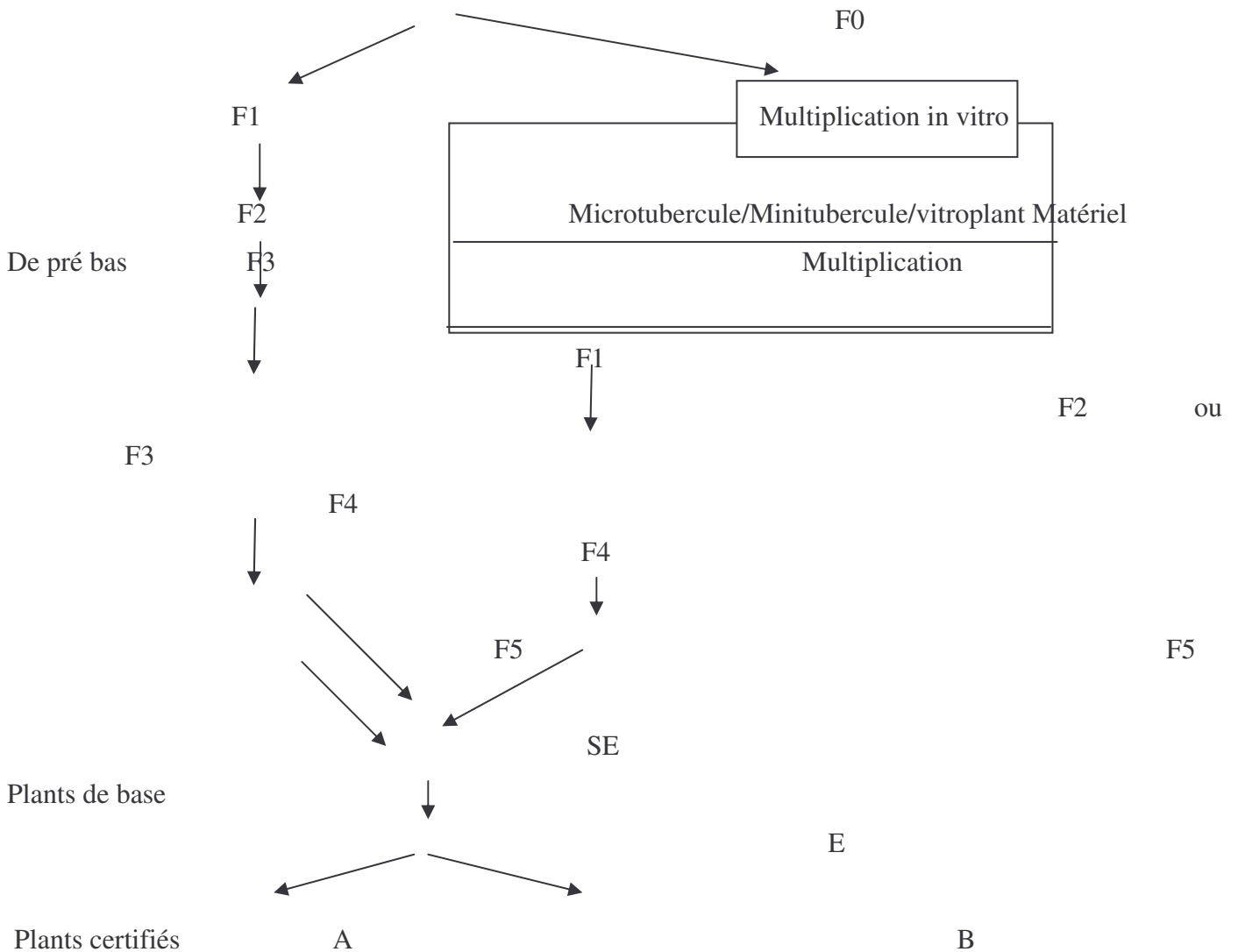


Figure 1. 6 : Schéma de sélection conservatrice et production du matériel de pré –base [57].

- La génération F0 constitue le matériel de départ pour la sélection de matériel reconnu sain par un laboratoire agréé.
- Les générations successives de chaque F0 constituent les familles.

- Le matériel produit in vitro du matériel de pré-base faisant partie de la sélection généalogique.
- Les plantes ou tubercules fournis par le laboratoire in vitro sont considérés comme F1, F2 ou F3.
- Le mainteneur tient un registre dans lequel chaque génération ou chaque famille est identifiée et inscrite.

Si le produit des familles est mélangé, il ne pourra servir qu'à la production de plants de base ou de plants certifiés après au moins deux années de multiplication en plein champ.

En Algérie, le programme de sélection ainsi que l'importance de la production du matériel de pré-base doit être déclaré annuellement au C.N.C.C par écrit et lui permettre de contrôler les cultures et l' exploitation ainsi que la consultation du registre. Des échantillons peuvent être demandés et aux besoins prélevés officiellement.

A la demande du mainteneur ou de son mandataire, le C.N.C.C. peut délivrer une attestation dont laquelle il est déclaré que le matériel provient de multiplication réalisée par une personne responsable (physique ou morale) enregistrée auprès du Centre et que les cultures ont été suivies par ce dernier. Les résultats des tests virologiques doivent être fournis.

1.3.1. Sélection classique «conservatrice » :

Pour une production de pomme de terre saine, il est nécessaire de s'orienter vers la sélection généalogique et appliquer une technique particulière dont l'objectif est de disposer chaque année de tubercules sains[58].

1.3.1.1. Principe de la sélection généalogique :

A partir du tubercule sain, les descendances successives sont multipliées pendant 5 à 8 ans, dans des conditions telles que chaque production soit la plus saine possible. Les productions en provenance de tubercules différents sont maintenues séparées au moins durant les trois premières années [58].

1.3.1.2. Technique de la sélection généalogique :

1.3.1.2.1. Création d'une pépinière de plants sains :

La sélection généalogique est basée sur la multiplication pendant plusieurs années, de familles de plants ayant chacune pour point de départ un tubercule sain.

Le premier travail consistera à créer une réserve de tubercules sains et parfaitement conformes à la variété sélectionnée : ce sera la pépinière de départ [58].

A partir de cette dernière, seront choisies les touffes saines, dont chacune constitue une famille de départ ou « tête de famille Fo ».

1.3.1.2.2. Sélection généalogique des familles :

Les Fo sont plantées dans des conditions d'isolements rigoureuses et la récolte issue de chaque Fo constitue une famille de première année ou F1. Les F1 récoltées séparément, clone par clone, produisent des F2, les uns et les autres sont soumis aux tests de contrôle et la réaction positive d'un seul tubercule entraîne l'élimination totale de la famille dont il est issu. Les descendances successives F3, F4, etc., jusqu'à la huitième année font l'objet d'un examen sérologique[58]. La sélection généalogique aboutit à la production de plants de base pouvant recevoir des certificats Super Elite. Ces plants de base servent à la production de plants certifiés de la classe A et B[59, 38]:

Classe A : issue directement des plants de base (classe Super Elite).

Classe B : issue de plants certifiés classe A.

1.3.2. Sélection « in vitro » et culture de méristèmes.

1.3.2.1- Généralités :

On appelle technique *in vitro*, un ensemble de méthodes faisant intervenir d'une part des éléments d'asepsie et d'autre part, impliquant la mise en place d'un environnement parfaitement contrôlé. A travers la culture *in vitro*, deux cas sont possibles [60, 61, 62]:

- La variabilité : Les vitroplants sont produits à partir de la néoformation d'organes sur des explants inorganisés (cals ou colonies cellulaires). Cette technique est une source de variabilité génétique. On obtient alors des individus non conformes à la plante mère et dont leurs phénotypes peuvent avoir un intérêt particulier dans les programmes de sélection.
- La conformité : Les vitroplants sont obtenus par la stimulation de l'organogenèse sur des explants organisés (tiges, bourgeons, bourgeons se trouvant à l'aisselle des feuilles, etc.) sans passer par la voie de cal.

1.3.2.2. Culture de méristème :

Les espèces végétales sont exposées à de nombreuses maladies et les plus dangereuses sont celles dont les agents peuvent s'installer durablement au sein des plantes, tels que certaines bactéries, mycoplasmes et surtout les virus. La culture de méristèmes permet de briser cet « héritage » de la contamination parasitaire et aussi de régénérer les variétés [64].

L'excision du méristème et sa culture en conditions aseptiques « *In vitro* » permettent d'obtenir une plante indemne qui sera la source potentielle d'un clone sain. La culture de méristèmes est probablement jusqu'à présent, la technique de culture « in vitro » qui a rendu le plus grand service à l'agriculteur. Elle affranchit les espèces à multiplication végétative de la fatalité de la contamination virale [64].

1.3.2.2.1- Historique de la culture de méristèmes :

LOO (1945) fut le premier à réussir la culture d'apex caulinaire, il excisa des pointes de tige d'*Asparagus officinalis* d'une longueur minimale de 5 mm et en régénéra des plantules. [66], en diminuant la taille des explants, il régénéra des plantules à partir d'apex comportant un minimum de trois (03) primordia foliaires et du tissu sous-jacent. SMITH et MURASHIGNE (1970), réussirent cependant à régénérer des plantes à partir d'explants consistant en un dôme méristématique dépourvu de primordium foliaires, chez deux espèces de *Nicotiana L*, *Daucus carota*, *Trapaelune majus* et *Coleus blumei Benth*.

1.2.2.2- Prélèvement du méristème :

La culture d'apex réclame une attention particulière. Les tubercules choisis subissent un traitement particulier à l'avance notamment en Contrôle phytosanitaire :

- Triage des tubercules à apparence saine.
 - Stockage.
 - Prégermination ou levée de dormance par voie physique ou chimique.
 - Numérotation des tubercules qui vont être utilisés pour les méristèmes.
 - Réalisation des tests : test de préculture, test sérologique au cours de la végétation.
- a.** Excision du méristème : sous loupe binoculaire, à l'aide d'une aiguille et d'une lame portée par une manche d'horlogier, le méristème prélevé est d'une taille de 0,1 à 0,3 mm et placé sur le milieu de culture sous une tablette stérile (hotte).
- b.** Condition de culture : Les conditions de culture doivent être adaptées expérimentalement aux espèces (et variétés ...) cultivées. La chambre de culture est programmée pour une photopériode de

12 à 16 h de lumière et à une température de 20 à 25 °C selon le cas. La culture d'apex ne réclame qu'une faible intensité lumineuse, 1000 à 2000 lux soit environ 5 à 10 w/m².

- c. Etapes de la culture : La croissance est lente au cours du premier mois de culture et le développement de l'apex en un bourgeon feuillé s'observe durant le second mois. Le développement d'une tige feuillée (base de la multiplication végétative *in vitro*), nécessite le transfert de l'explant dans un milieu dépourvu de cytokinine.

L'allongement du bourgeon unique ou de l'ensemble des bourgeons se réalise généralement par le transfert dans un milieu sans régulateur de croissance.

1.3.2.2.3. Utilisation pratique de la culture d'apex :

La culture *in vitro* de méristèmes apicaux et d'apex de tiges ont des applications retentissantes en horticulture, puisqu'elle permet l'assainissement viral de plantes à reproduction végétative.

Elle constitue également, directement ou indirectement, le point de départ de techniques nouvelles utilisables dans la constitution de banque de gènes.

- a. Assainissement virale : MOREL et MARTIN (1952 et 1955), KARLIN *et al.*(1987) firent la preuve de l'élimination de virus de dahlia et de pomme de terre par culture *in vitro* de méristèmes apicaux de plantes virosées. Ainsi, l'utilisation de culture de méristèmes apicaux pour l'obtention de végétaux indemnes de pathogènes spécifiques, est devenue courante.

Selon LEPOIVRE et SEMAL (1989), grâce à cette technique, 130 cultivars de pomme de terre ont été traités [71].

Ce type de culture est réalisable avec toutes les plantes à condition d'avoir défini le meilleur moment de prélèvement des apex et un milieu de culture adéquat. Il s'agit en réalité, d'une guérison où la plante n'est pas immunisée contre le parasite et peut être réinfectée au champ[71, 72,73, 74,75].

La taille de l'explant méristématique présente un compromis entre les exigences d'un assainissement complet et la capacité de régénération des plantes. GAZEAU et LIPSHUTZ, (1984) et KARP *et al.*, (1988) rapportent qu'une taille comprise entre 0,3 mm à 0,7 mm du méristème pouvait parer à ces considérations.

La culture d'apex a pour objectif de reconstituer des clones sains à partir de plantes virosées ; car, dans une plante le méristème est indemne de virus [71]. Par la suite, les plantes assainies peuvent alors être multipliées par microbouturage [78].

b. Constitution de banque de gènes : Le méristème apicale est capable par culture in vitro de reproduire une plante entière et conforme à la plante de départ, et peut par sa taille réduite être utilisé dans la constitution de banque de gènes par cryoconservation [78, 79]. En effet, le stockage des méristèmes peut constituer une technique de conservation de germoplasme comme le stockage des graines ou d'organes destinés à la multiplication végétative.

Les plantes régénérées in vitro à partir de plantes saines peuvent être stockées à l'entrepôt pendant des mois sans soins particuliers et peuvent ainsi constituer des collections génétiques.

Dans ce cas, les plantules sont rapidement multipliées pour satisfaire la demande des utilisateurs. Elles sont en outre transportées économiquement de par leur encombre -ment réduit et sans mesures de quarantaine de par leur état sanitaire certifié [64].

1.3.3. Micropropagation :

1.3.3.1. Définition :

Les plantes se reproduisent par la voie sexuelle via les graines, mais elles utilisent pour certaines aussi une autre voie, celle de la multiplication végétative.

La particularité de cette dernière est que les plantes qui en dérivent sont génétiquement identiques à la plante de départ : c'est le clonage végétal qui est exploité depuis des siècles : bouturage, greffage, etc.

La micropropagation dérive de ce phénomène naturel, et repose sur une propriété propre aux végétaux : la totipotence cellulaire. On cultive des explants végétaux stérilement, sur un milieu artificiel et dans un environnement contrôlé, à la suite des subcultures successives, on obtient alors des plantes identiques à la plante de départ et que l'on peut multiplier à l'infini.

1.3.3.2. Technique de micropropagation :

1.3.3.2.1. Explant : L'explant consiste en une microbouture portant au moins un bourgeon.

1.3.3.2.2. Milieu de culture : Selon plusieurs auteurs, la solution de Murashige et Skoog (1962) est la plus couramment employée [74]. L'addition des régulateurs de croissance et de vitamines au milieu n'est pas nécessaire car la pomme de terre répond bien sur un milieu qui n'en contient pas [81].

1.3.2.3. Conditions Environnementales de la culture : Les vitroplants issus de la micro propagation cultivés dans des récipients divers sont placés dans des conditions où la température (23 à 25 °C), la photopériode (16 h de lumière par jour), l'intensité lumineuse (3000 lux) et l'humidité sont entièrement contrôlées pour favoriser la croissance des plantules.

1.3.3.2.4. Croissance et multiplication : Les vitroplants issus de la culture de méristèmes présentent des tiges vigoureuses et de grandes feuilles [19], qui seront alors fractionnées en autant de nœuds qu'elles portent pour initier une nouvelle subculture sur un milieu neuf.

Le rythme de multiplication est de 6 à 7 nœuds toutes les 3 à 4 semaines. Au bout de quelques générations, les vitroplants commencent à présenter des signes particuliers : tige grêle portant des feuilles simples comparables à celles issues de la germination des graines [71, 82]. Ce phénomène est dû à une situation de restriction physiologique qui a provoqué une miniaturisation des cellules initiatrices des méristèmes) [79].

C'est le retour progressif de la plante vers un état juvénile. ROSSIGNOL, BANILHON *et al*, (1980) et NOZERAN, (1985), expliquent ce phénomène par une miniaturisation des méristèmes de la plante due aux conditions écologiques et trophiques tout à fait particulières.

1.3.3.3. Utilisation de la micropropagation en amélioration des plantes :

Cette technique est utilisée en amélioration des plantes à diverses fins :

- Accélération de la sélection.
- Production facile de semence.
- Multiplication rapide des phénotypes nouveaux en vue de leur commercialisation.
- Multiplication rapide des plantes assainies.
- Constitution de banques de gènes rapidement utilisables et facilement accessibles.

1.3.4. Acclimatation

Au cours de cette phase, la plantule produite in vitro doit être adaptée progressivement aux conditions normales des plantes chlorophylliennes, soit à une atmosphère non saturée en vapeur d'eau et à une solution minérale du sol peu concentrée. La culture sur un substrat bien drainant, dans un environnement bien éclairé, constitue les conditions favorables pour un retour réussi vers l'autotrophie.

L'acclimatation doit permettre aux plantules racinées, élevées dans l'ambiance saturée du tube à essai (ne possédant pas ou peu de couches cireuses au dessus de l'épiderme et dont les stomates ne fonctionnent pas toujours normalement) de survivre dans une atmosphère, ensoleillée plus sèche et plus chaude de la serre verre. Pour réussir l'acclimatation, les feuilles ne doivent pas perdre leur turgescence et faner. C'est pourquoi, on doit les maintenir au dessus du sol dans une atmosphère humidifiée aussi rapidement que possible. En outre, les racines doivent devenir plus fonctionnelles par la mise en place des poils absorbants.

1.3.4.1. Condition de l'environnement de la serre verre:

La serre est le plus souvent contrôlée par un système automatique permettant l'obtention de conditions optimales pour ce type de cultures (températures de $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ le jour et $18\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) la nuit pendant les trois premières semaines d'acclimatation. Afin de maintenir le matériel en bon état les longues expositions aux basses températures (5 °C) ou températures élevées (32 °C) doivent être évitées, de même que le rayonnement solaire intense et directe. Si nécessaire, un ombrage est à prévoir.

1.3.4.2. Production de minitubercules:

1.3.4.2.1. Définition d'un minitubercule :

Tubercule de taille qui varie entre 10 à 35 mm et d'un poids de 1,5 à 5 g, produit généralement en serre et dont l'origine peut être un vitroplant ou un microtubercule.

1.3.4.2.2. Choix du substrat :

La réussite de l'acclimatation est sans aucun doute le résultat du choix d'un bon substrat. Ce dernier doit être avant tout dépourvu de pathogènes. Toutefois, l'utilisation de substrat fraîchement pasteurisé entraîne souvent d'importantes infections de surface[82] . Par ailleurs, le substrat doit être bien drainant et

maintenu le plus sec possible en surface pour éviter les nécroses dues aux maladies du collet (causées par un champignon du sol très fréquent, généralement difficilement contrôlables par fongicide : le *Pythium*). Ce parasite est en général un parasite de faiblesse qui cause des dégâts surtout lorsque les conditions de croissance de jeunes plantes ne sont pas optimales [82].

1.3.4.2.3. Type de sol ou substrat :

Il semble selon VAN LOON (1987), que les sols légers favorisent la formation d'un nombre de tubercules légèrement plus élevé que les sols lourds, d'où la nécessité d'utiliser des substrats légers, drainant et fertiles.

1.3.4.2.4. Densité de plantation :

Notons à ce sujet qu'il est possible de définir la densité de plantation en fonction de l'objectif recherché selon la méthode de WIERSMA, (1989).

Espacement entre plants = tige par plant $\times 10^4 \text{m}^2 / (\text{Tiges par m}^2) \times \text{écartement entre rang (cm)}$.

Seul les tiges issues directement du tubercule mère sont prises en considération et leur reconnaissance n'est possible qu'au moment de la récolte.

Par ailleurs, le nombre de générations produites « *in vitro* » est un paramètre à ne pas négliger car il peut influencer le rendement en minitubercules. Il est généralement défini par le nombre final de tubercules à produire en serre, qui, lui aussi est fixé par le producteur en fonction de la demande du marché.

Le rendement total d'une culture est fonction de la qualité de la matière sèche synthétisée par jour et du nombre de jours allant du début de la tubérisation jusqu'à la récolte. En effet, le rendement total dépend essentiellement de la variété, de l'âge physiologique, de la densité de plantation et des conditions de croissance.

La réponse de la culture de pomme de terre aux variations de densités de culture, se manifeste de la façon suivante :

- Aux faibles densités, le rendement par plant est élevé à cause du poids élevé des tubercules (faible concurrence).

- Aux fortes densités de culture, le rendement est toujours élevé, mais il résulte cette fois-ci de l'augmentation du nombre élevé de tubercules récoltés par unité de surface, même si leur calibre et leur poids sont réduits [86].

D'autre part, les plants physiologiquement plus âgés donnent un rendement plus faible que les plants jeunes. Cette différence de rendement, selon, IRITANI, (1987) ne peut être compensée par un apport supplémentaire de fumure.

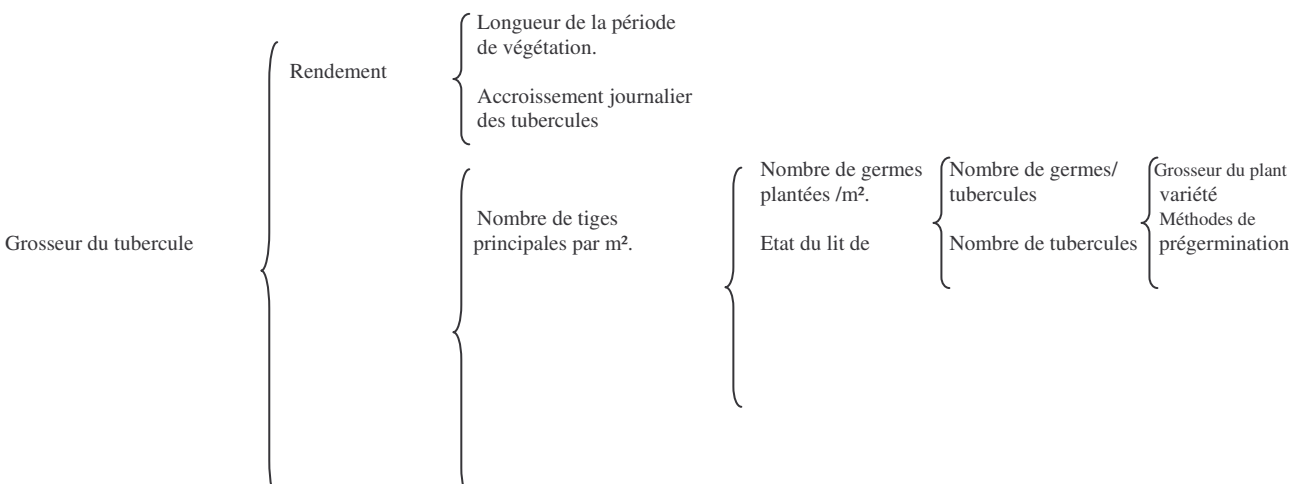
L'augmentation de la densité de plantation, soit par réduction de l'espacement entre plant soit par augmentation du calibre des plants, conduit toujours à une augmentation parallèle du nombre de tubercules par m² [29]. Cependant l'augmentation de la densité de plantation conduit inévitablement à la l'installation d'une forte compétition entre les tiges. Celle-ci se traduit le plus souvent par une chute du nombre de tubercules commercialisables [88].

Notons par ailleurs, qu'en plus des facteurs variété, calibre et âge physiologique, d'autres facteurs peuvent influencer le nombre de tubercules produits par m² notamment (figure 1.7) :

- La compétition créée par l'arrangement spatial fait que les tiges issues des petits tubercules donnent plus de tubercules commercialisables que celles issues des gros tubercules [35].
- Les hautes températures et les jours longs réduisent le nombre de tubercules au cours de la tubérisation [25].
- les stress hydriques survenant au moment de la tubérisation réduisent le nombre de tubercules par tige [89].

Par ailleurs, il est important de noter que pour une même variété, si les conditions de production restent identiques (saison, région, calibre, date de plantation, ...), les résultats obtenus en matière de production de tubercules ne sont jamais les mêmes (Figure 1.7)

[35, 92, 89].



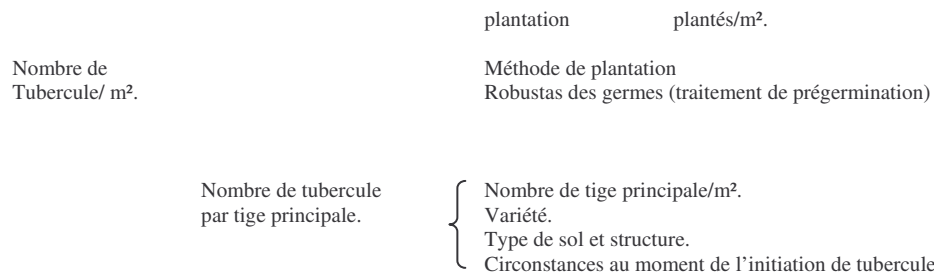
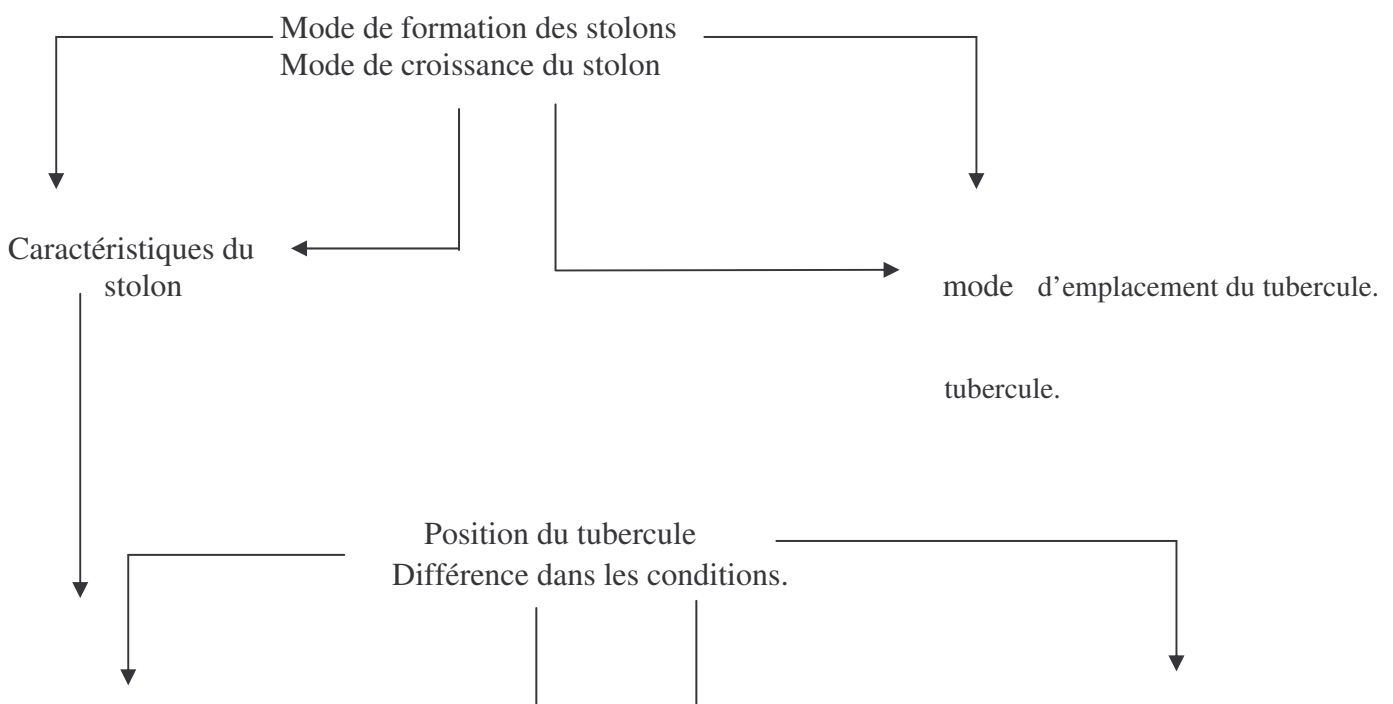


Figure 1. 7 : Facteurs influençant la grosseur du tubercule[91].

La valeur économique d'une récolte de pomme de terre, aussi bien pour la production de plants que pour la consommation dépend essentiellement de sa répartition dans les différents calibres.

Pour la consommation, c'est le calibre 40/60 mm et plus qui est apprécié, alors que c'est plutôt le calibre 35/45 mm qui est d'avantage recherché pour la production de plants. La répartition des calibres dans une production donnée est très difficile à prévoir d'une manière précise[92, 89]. La production d'un calibre particulier peut être envisagée à condition de contrôler un certain nombre de facteurs qu'ils soient liés à la tige ou à la culture (figures 1.8 et 1. 9).



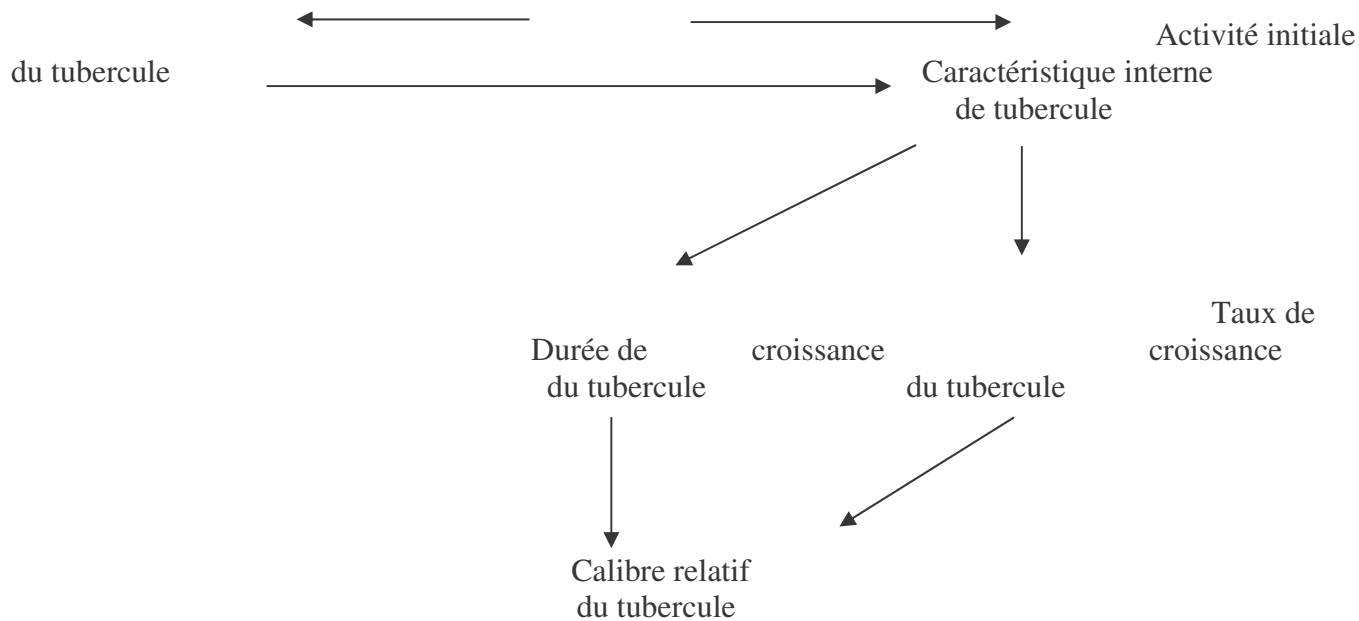
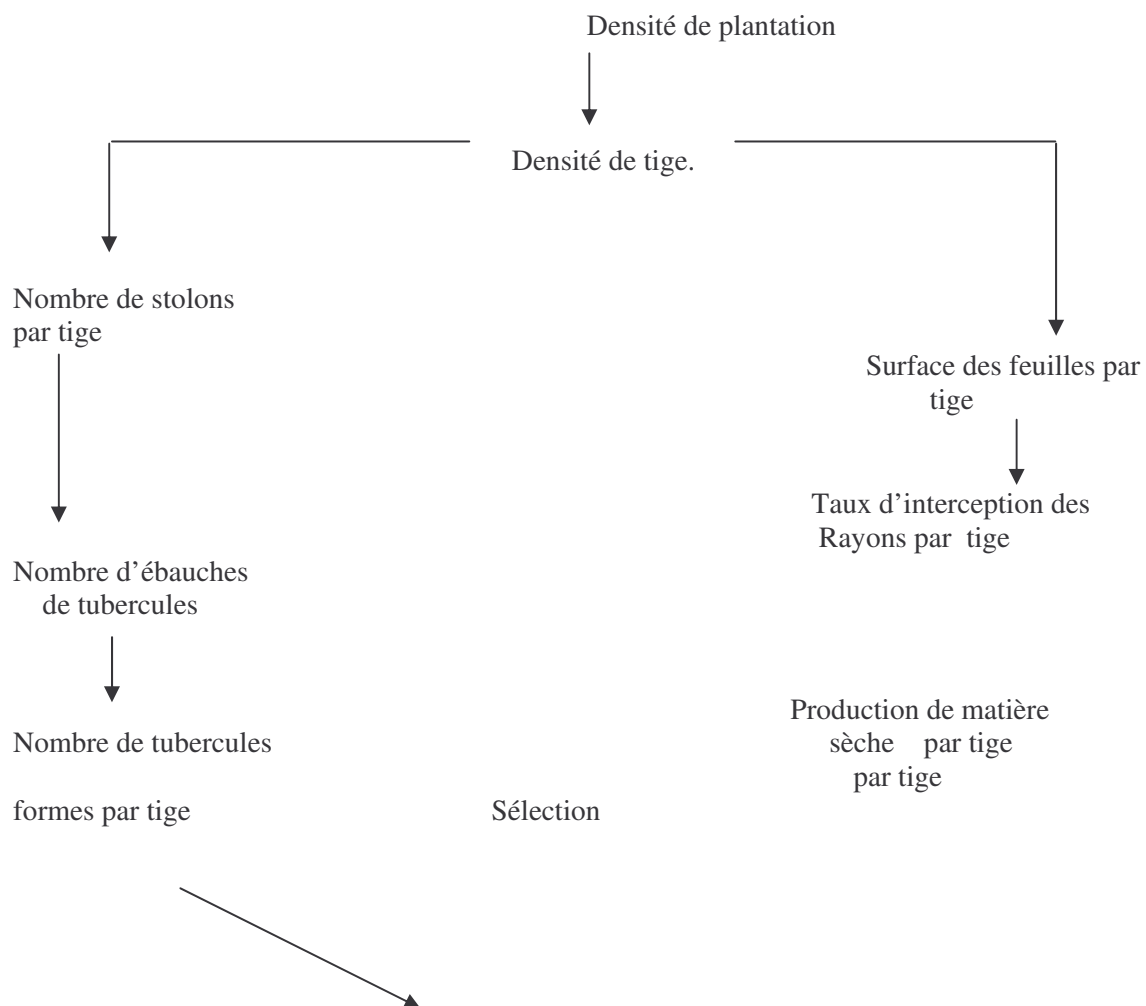


Figure 1.8 : Schéma de principe des facteurs influençant la compétition entre les tubercules d'une tige

[91].



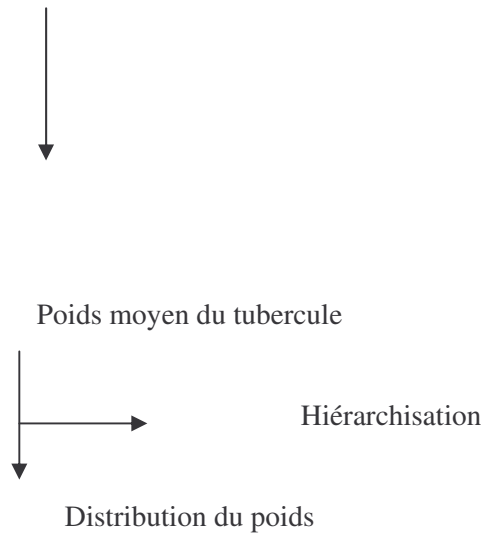


Figure 1. 9 : Schéma simplifié des facteurs influençant la distribution du calibre des tubercules au niveau de la culture[91].

La distribution du rendement dans les différents calibres est définie comme suit : Au fur et à mesure que le rendement total augmente, l'intervalle entre les fractions de calibres s'élargit. Cette relation entre le rendement total et les différentes classes de calibres est particulièrement déterminée par le nombre de tubercules produits par unité de surface [89].

Si les densités de culture sont élevées, la compétition entre le nombre élevé de tubercules fils par m², réduit le calibre de ces derniers, et la différence entre le rendement total et le rendement de la fraction gros calibre est plus prononcé, d'où une production plus importante en petits et moyens calibres[88].

Par ailleurs, il n'est pas moins important de souligner que la distribution des rendements par calibre est aussi liée d'une part à la variété utilisée et d'autre part aux variations climatiques enregistrées durant la saison.



1.3.5. Conduite de la culture :

1.3.5.1.préparation du sol : La préparation du sol est réalisée par des passages moins nombreux mais plus efficaces.

* L'ameublissement profond : Il est avantageusement réalisé sans retournement par des passages croisés de chisels ou de multi- dent.

* la reprise des terres et l'ameublissement superficiel ont pour objectifs :

- Obtenir assez de terre meuble pour constituer les butes (5 cm).
- Limiter le nombre de passages d'outils et de tracteurs.

Le but est d'avoir :

Des réserves accrues en eau par l'ameublissement profond qui augmente la porosité du sol en limitant les ruissellements (perte).

De sols meubles et sans mottes (sol presque soufflé) plus convenable pour la production de tubercules de forme plus régulière et d'un calibre plus gros ; l'absence de mottes facilite aussi la récolte mécanique.

1.3.5.2.La fumure :

Selon SOLTNER (1982) la fumure organique ou minérale sont importantes pour la culture de la pomme de terre à condition d'éviter toute consommation de luxe inutile et coûteuse surtout pour la production de la semence où nous cherchons à limiter la durée de végétation (pour limiter les risques de contamination par les maladies à virus, ne pas masquer les viroses et produire le maximum de petits et moyens calibres).

Le fonctionnement et le mode d'épandage dépendent de la forme d'engrais à utiliser et le type de sol cultivé.

1.3.5.3. Préparation du plant : plantation.

La bonne conduite de la conservation des tubercules et leur niveau de germination optimal constituent la première condition d'une bonne récolte. L'intérêt de la germination est de favoriser la formation de germes trapus et colorés sur des tubercules non ridés, qui conditionnent l'obtention d'un rendement élevé. Les facteurs suivants doivent toujours être pris en considération.

- date de plantation : selon les régions et les climats.
- densité de plantation : selon l'objectif recherché et le calibre utilisé.

- profondeur de plantation : modérée de 8 à 12 cm.

1.3.5.4. Besoins en eau :

le bon pilotage des irrigations donne un bon rendement (irrigation au moment opportun et suivant le type de sol et la saison). Ils sont faibles au début de la végétation et très importants au moment de la croissance foliaire et la tubérisation.

1.3.5.5. Soins culturaux :

-Buttage :

- Favorise la tubérisation.
- Evite le verdissement des tubercules.
- Limite le risque de contamination par le mildiou.

-Binage et desherbage :

- Empêchent la levée des mauvaises herbes.
- Stimulent l'activité biologique du sol par aération superficielle, brisant la croûte de battance.
- Limitent les pertes d'eau par évaporation.

- Désherbage chimique dont l'efficacité dépend de la pluviosité :

Si elle est moyenne entraîne une bonne répartition de l'herbicide. Si elle est élevée en cas de sol filtrant elle conduit à un lessivage de l'herbicide d'où sa phytotoxicité. Et en cas de pluviométrie faible, l'herbicide reste localisé en surface et donc reste aussi peu actif.

1.3.5.6 Récolte et Conservation :

1. Défanage : il présente de nombreux avantages :

- Evite et/ou réduit la contamination des plantes par les maladies à virus disséminées par les pucerons.
- Limite la grosseur des tubercules ;
- En cas d'attaque de mildiou, il empêche le champignon parasite d'atteindre le tubercule ;
- Il facilite la récolte de plus en plus mécanisée.

Deux méthodes de défanage sont possibles :

- défanage mécanique : réalisé par des faucheuses, broyeuses ou arracheuses de fane.
- défanage chimique : utilise divers produits chimiques.

2. Arrachage mécanique : L'arrachage mécanique des tubercules est important, surtout par l'utilisation des arracheuses plus ou moins complètes.
3. Conservation : Elle doit limiter les pertes et garder la valeur du tubercule. Elle débute à l'arrachage d'abord, il faut récolter tôt, 10 à 15 jours après le défanage (dès que la peau des tubercules soit formée).

Il faut cicatriser les tubercules blessés à l'arrachage et suite aux opérations de manutentions. Cette opération se fait vite à chaud (20 °C). Il faut ensuite sécher les tubercules récoltés soit par exposition directe au soleil au moment de la récolte soit par des ventilations par des courant d'air chaud dans des hangars.

Les techniques de conservation doivent tenir compte des exigences suivantes :

- Limiter les pertes de poids.
- Eviter les pourritures.
- Maintenir intact la qualité de goûts des tubercules de consommation, et l'état sanitaire des tubercules de semences.

C'est pourquoi, il est exigé :

- De manipuler le moins possible les tubercules (limiter la respiration et la transpiration).
- De se rapprocher de la température optimum de conservation (4 °C) et 90 % d'hygrométrie.
- D'utiliser un bâtiment isotherme pour éviter les gelées.
- D'empêcher l'accumulation de CO₂ et la condensation d'eau, par une ventilation.

Selon VAN LOON, (1987), le calibre moyen des tubercules continue à augmenter durant la période de croissance, et ce, jusqu'à la maturité, et de ce fait, il est permis de penser que le défanage peut être proposé comme moyen pour contrôler le calibre. En effet, on peut, à travers ce procédé, prévenir la croissance de gros tubercules, surtout s'il s'agit d'une culture destinée à la production de semences. Cependant, SAUNDERS (1987), préconise de manipuler le calibre des tubercules à travers la densité de plantation pour

favoriser la production d'un calibre voulu. Il considère aussi que le défanage n'est pas le moyen « principal » ou l'unique alternative pour le contrôle de la production d'un calibre donné.

1.3.6. Conduite de la culture au champ :

Les soins culturaux et phytosanitaires doivent être appliqués soigneusement. Ils seront développés dans le chapitre matériel et méthode.

1.3.7. Contrôle de l'état sanitaire :

Avant d'être multiplié par les voies classiques ou par les techniques rapides de culture in vitro, les jeunes plantules régénérées seront soumises à différents tests.

Ceci est indispensable, car l'assainissement n'est pas automatique pour une plante régénérée à partir d'un méristème prélevé sur un individu malade, mais ceci n'est vraiment acquis qu'après contrôle phytosanitaire de laboratoire.

De plus, la micropropagation, ne fait que reproduire à un rythme accéléré l'individu de départ, avec ses parasites éventuels, comme dans tout autre type de multiplication végétative et traditionnelle.

Une production de qualité tiendra compte de ces deux étapes. Aucune multiplication intense ne sera entamée sans que l'état sanitaire des plants régénérés n'ait été contrôlé. Le non respect de cette précaution élémentaire, contribuera à l'extension rapide de certaines viroses.

Si les cultures de tissus et plus spécialement les cultures de méristème permettent d'éliminer un grand nombre de viroses chez beaucoup d'espèces, il reste aussi vrai que ces techniques ont été également proposées pour l'éradication d'autres parasites systémiques, tels que certains trachéomycoses, mycoplasmes et quelques bactéries systémiques comme *Xanthomonas pelargaie* et *corynebacterium fascians*.

S'il est généralement admis que le taux d'assainissement est lié à la taille du méristème, ceci n'explique pas tout. En effet aujourd'hui, la microscopie électronique a permis de vérifier certains cas de présence de particules virales dans les cellules méristématiques mises en culture alors que les plantes qui en dérivent se sont avérées saines après test sérologique, c'est le cas du virus X de la pomme de terre [93].

Lorsque les virus sont difficiles à éliminer par culture de méristème, il est possible d'améliorer la technique par un traitement préalablement à la chaleur (thermothérapie) des tissus qui serviront au prélèvement des méristèmes. Cette manipulation permet parfois d'utiliser des méristèmes suffisamment gros, tout en conservant un taux de guérison élevé [94].

Des variétés, ont montré un taux d'assainissement plus grand quand le traitement à 30 °C s'applique au pied mère plutôt qu'aux méristèmes excisés et mis en culture à cette température [95].

Par contre, NOZERAN et ses collaborateurs (1977) éliminent avec succès les virus Y et E en maintenant pendant 3 mois à 36 °C des cultures issues de germes de pomme de terre virosée.

Pour les viroses, les contrôles par indexage (transmission mécanique, greffage, sérologie, ...) sont effectués dès que les plantes ont atteint un développement suffisant.

QUARK (1977) insiste sur la nécessité de répéter les tests dans le temps avant de considérer un mériclone exempté d'un virus donné car, si le virus n'existe que sous forme de traces à la sortie du traitement, il aura par la suite la possibilité de se répliquer et d'être à nouveau décelables. Dans les programmes de production de semences cette précaution semble capitale.

Pour les bactéries et les mycoses, l'utilisation d'un milieu de culture spécifique au pathogène recherché suffit en général à dépister les contaminations en début de cultures. Dans certains cas, on y adjoindra des tests d'immunofluorescence.

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

2.1. Objectif du travail :

L'objectif recherché par notre travail est de contribuer, en se basant sur les études déjà disponibles, à la mise au point d'un schéma de production de semences de pomme de terre : depuis le méristème jusqu'aux premières générations de plein champ.

Les expériences réalisées ont porté sur :

- culture de méristèmes : recherche d'une balance hormonale favorable au développement du méristème,
- micropropagation : étude de l'effet générations sur les capacités de production de minitubercules,
- facteurs déterminants la production de minitubercules dans la serre verre,
- conduite des productions des premières générations sur champ.

Les expérimentations entreprises dans cette étude se sont déroulées au niveau des laboratoires, de la serre et des parcelles de multiplication de la station de la SAGRODEV, Ex Centre National de Développement de la pomme de terre de Guellél (Sétif).

2.2. Choix et description de la variété retenue :

La variété Désirée a été retenue pour l'étude. Ce choix a été dicté par les besoins de la SAGRODEV : variété libre, rustique et très demandée sur le marché national, et les populations de l'est du pays sont connues pour leur consommation des pomme de terre à peau rouge. Le matériel végétal (classe A) utilisé est importé des Pays Bas (Z.P.C). Le tableau ci-dessous résume quelques caractères agronomiques de cette variété :

Tableau 2.13 : Caractères agronomiques de la variété Désirée[96].

Caractéristiques de la variété		
Origine génétique		Urgenta x Depesche.
Caractères descriptifs	<ul style="list-style-type: none"> - Tubercules. - Yeux. - Peau. - Floraison. - Feuilles. - Fructification. - Plante. -Maturité 	Oblongs. Superficiels Rouge. Abondante. Vert foncé. Assez abondante. Haute, dressée. Moyenne à demi tardive
Caractères culturaux et d'utilisation	<ul style="list-style-type: none"> - Calibrage. - Rendement. - Nombre de tubercules/plant. - Résistance à la sécheresse. -résistance aux endommagements. - Matière sèche. 	Gros tubercules Bon à très bon 05. Très bonne résistance 05. 20 %.
Sensibilité aux Maladies.	<ul style="list-style-type: none"> - Mildiou du feuillage. - Mildiou du tubercule. - Galle commune. - PV Y. - PLRV. 	Moyennement sensible. Moyennement sensible. Sensible Peu sensible Assez sensible

2.3. Culture de méristèmes :

2.3.1. Préparation du matériel végétal :

a. Triage : les tubercules disponibles au niveau du laboratoire de contrôle phytosanitaire de la SAGRODEV sont triés selon un diagnostic visuel en se basant sur leurs états sanitaires et aspect externe (absence de blessures, nombre important de germes, etc.,).

b. Nettoyage : les tubercules sont lavés avec de l'eau courante et sont désinfectés avec l'hypochlorure de sodium (0.525 %) pendant 20 minutes et séchés à une température ambiante.

c. Incubation et prégermination : les tubercules sont entreposés à l'obscurité pour l'émission des germes puis transférés à la lumière pendant quarante (40) jours à une température ambiante pour l'obtention de germes trapus,.

e. Test de pré culture : réalisé avant d'entamer le programme de la production de la semence de pré- base.

2.3.2. Désinfection des germes :

La désinfection est réalisée sous hotte à flux laminaire stérile. Les germes prélevés sont placés dans des bédons stériles portant chacun les numéros de tubercule et de germe « méristème » ; cette numérotation est très importante pour le contrôle phytosanitaire.

La désinfection est faite selon la méthode suivante :

- trempage de 15 minutes dans une solution de Javex, composée de :
 - 2 ml de Tween 20 .
 - 5 ml Eau de Javel 32 °
 - QSP : 100 ml.
- Deux (02) rinçages de 05 minutes chacun à l'eau distillée stérile.

Le prélèvement du germe et sa disposition sur le papier filtre, se fait à l'aide d'une pince préalablement stérilisée et flambée au bec Bunsen après chaque usage.

2.3.3. Excision des méristèmes :

Les méristèmes sont prélevés stérilement sur le matériel végétal préalablement désinfecté et ce, grâce à une loupe binoculaire placée sur la table à flux laminaire. Un bistouri stérile muni de lames interchangeables est utilisé pour supprimer les folioles les plus à l'extérieur des explants, ensuite les écailles proches du méristème sont écartées l'une après l'autre à l'aide d'un outil d'horloger équipé d'un éclat de lame de rasoir flambé préalablement après chaque élimination d'écailles jusqu'au dôme méristématique

(Figure 2.10). Avec un nouvel outil, le dôme apical d'une taille variant entre 0.1 à 0.5 mm est excisé puis placé délicatement sur le milieu de culture contenu dans le tube à essai.

La disposition du méristème sur le milieu n'a pas d'importance parce qu'il se développe à n'importe quelle position.

2.4. Optimisation du milieu de culture pour les méristèmes :

2.4.1. Milieu de base :

Le milieu (MS) Murashige et Skoog (1962) est un milieu complet couramment utilisé avec succès pour un grand nombre d'espèces végétales. Sa composition est donnée en annexe 1. Le milieu est stérilisé à l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes. La composition finale de milieu de culture (Tableau 2.14).

Tableau 2.14 : Composition du milieu de base.

Minéraux.	Macroéléments, micro-éléments et FeEDTA de Murashige et Skoog (1962).
Vitamines.	Myo-inositol 100 mg/l. Pyridoxine HCl 0,05 mg/l.
Acides aminées	Acide nicotinique 0,05 mg/l. Thiamine HCl 0,01 mg/l. Glycine 0, 2 mg/l.
Saccharose.	25 g/l.
Agar.	6 g/l.
pH.	5,6 à 5,7.

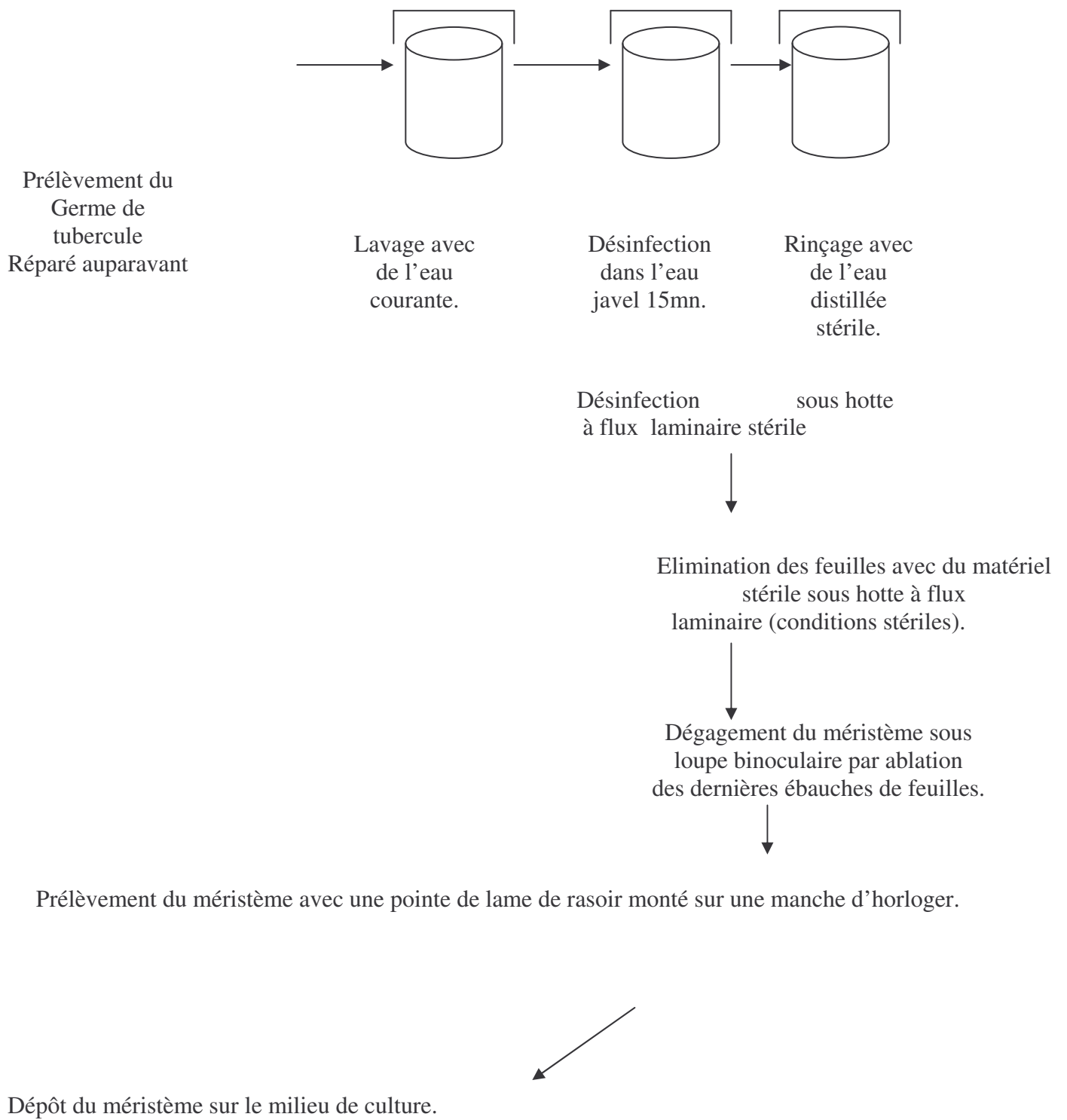


Figure 2.10 : Schéma descriptif pour le prélèvement des méristèmes.

Après autoclavage, le milieu est conservé à une température ambiante à l'abri de la poussière et il n'est utilisé qu'après 1 à 2 jours.

2.4.2. Composition du milieu en régulateurs de croissance :

Le choix et la concentration de l'hormone dépendent de la nature de l'explant cultivé et de l'objectif recherché. Quatre expériences ont été réalisées pour les tests des hormones choisies et leurs concentrations sont données dans le tableau 2.15.

Tableau 2.15: balances hormonales testées pour la culture de méristèmes.

N° de l'expérience.	AG3 mg/l.	Kénitine mg/l.	BAP mg/l.
1 ^{ère} .	0,0	0,00	
	0,1	0,02	
		0,03	
		0,04	
		0,05	
		0,06	
2 ^{ème} .	0,0	/	0,00
	0,1		0,02
			0,03
			0,04
			0,05
			0,06
3 ^{ème} .	0,0	00	/
	0,2	La meilleure dose de l'expérience n°1	
	0,3		
	0,4		
	0,6		
	0,7		
4 ^{ème} .	0,0	/	0,00
	0,3		La meilleure dose de l'expérience n°2
	0,4		
	0,5		
	0,6		
	0,7		

1^{ère}/. AG3 fixe : 0,1 mg/l.

Kénitine variable : 0,02 à 0,06 mg/l.

2^{ème}/. AG3 fixe : 0,1 mg/l.

BAP variable : 0,02 à 0,06 mg/l.

3^{ème}/. Kénitine fixe = la meilleure concentration issue de la première expérience.

AG3 variable : 0,3 à 0,7 mg/l.

4^{ème}/. BAP fixe = la meilleure concentration issue de la première expérience.

AG3 variable : 0,3 à 0,7 mg/l.

Pour chaque expérience, nous avons réalisé un témoin négatif, le milieu MS sans hormones.

Pour les quatre (04) expériences, nous avons évité toutes les balances où le rapport est égal à 1.

Pour chaque balance hormonale 18 répétitions ont été utilisées.

2.4.2.1. Cytokinines :

Dans cette étude, nous avons utilisé des substances à fonction cytokinique (de synthèse) dont les propriétés sont analogues à celles des cytokinines naturelles et qui sont : La Benzyladénine ou 6-Benzylaminopurine (BA ou BAP), la Kinétine (Kin 6-Furfurylaminopurine).

2.4.2.2. Gibbérellines :

Se sont des terpènes, soit des substances huileuses possédant toutes le noyau gibbane. BRIAN *et al.* (1955) IN[65] ont réussi à obtenir une souche de Fusarium produisant une seule gibbérelline qui fut désignée sous le nom d'acide gibbérellique 3 GA3 qui a été utilisée dans ce travail.

2.4.2.3. Préparation des phytohormones :

Pour préparer 100 ml d'une solution mère de Kinétine ou de BAP concentrée 1000 fois, il faut dissoudre 100 mg de Kinétine ou de BAP dans un bécher de 100 ml contenant 10 à 20 ml d' HCl fumant ou KOH (1 N).

Verser dans un ballon jaugé de 100 ml porté à 100 ml avec de l'eau distillée.

Conserver la solution mère dans une bouteille en verre fumé à 4 °C.

Pour la préparation de 100 ml d'une solution mère AG3 à 100 ppm, il faut dissoudre 10 mg d'Acide Gibbérellique (90 % GA3) dans un ballon jaugé de 100 ml et ajusté avec de l'eau distillée. La solution est conservée en bouteille à + 4°C.

2.4.3. Conditions de culture :

Les mériplants sont élevés dans une chambre de culture dans les conditions suivantes :

- températures de 23 à 25 °C, contrôlée à la fois par un thermostat et un thermohygrographe,

- intensités lumineuses de 1000 à 2000 lux mesurées par un luxmètre
- photopériodisme de 16 heures.

Des contrôles périodiques de ces cultures sont réalisés afin d'éliminer les contaminations.

2.4.4. Paramètres étudiés :

Les paramètres étudiés portent sur la longueur de la tige et le nombre de feuilles.

Pour les quatre (04) expériences, nous avons pris en considération les notations suivantes :

- taux de reprise,
- taux de nécroses,
- taux de contamination,
- anomalies et variants.

Après un mois de culture, tous les mériplants sont repiqués sur un milieu « MS » sans hormones pour favoriser leur développement et les mêmes paramètres ont été mesurés.

2.5. Micropropagation :

2.5.1. Technique :

La multiplication des mériplants issus des deux premières expériences (où le développement des vitroplants a été ordinaire) a été faite sur le milieu MS avec :

- un indice de multiplication de 5 à 6 microboutures,
- un cycle de culture de 3 semaines,
- un volume de milieu de 10 ml par tube.

Les conditions de la chambre de culture sont :

- température de 22 °C à 25°C le jour et 18°C la nuit.
- photopériode de 16 heures de lumière.
- intensité lumineuse de 3000 à 5000 lux.

La première génération a été réalisée dans des tubes à essai pour faciliter le diagnostic sérologique des maladies au niveau du laboratoire de contrôle phytosanitaire de la SAGRODEV par les tests suivants :

- **Test ELISA** (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) pour les virus PLRV, PVA, PVS, PVY, PVM, PVX
- **Test IFA** (Immunofluorescence aux Anticorps Monoclonaux) pour les bactéries *Clavibacter* et *Erwinia*.
- **Test sur milieu LPGA** (levure Peptone Glucose Agar) de réaction pour les bactéries de collet (sur racines des mériplants avant leur multiplication *in vitro*).

Aussi, nous signalons que la numérotation nodale des mériplants est très importante dans le cas de la pomme de terre. La procédure des tests est donnée en annexe 02.

Test ELISA :

Protocole Elisa :

1- dépôt des anticorps spécifiant.

- Incubation a 37 °c pendant 2 heures.
- Rinçage des plaques trois fois avec de

2- Dépôt des échantillons :

- Des témoins positif.
- Des témoin négatif.
- Incubation a 4°c durant 24 heures.
- Rinçage des plaques 3 fois.

3- dépôt de l'anticorps couplé à l'enzyme :

- Incubation a 37 °C pendant 2 heures.
- Rinçage des plaques 3 fois.

4- dépôt de substrat :

- incubation a la température ambiante durant 30 minutes.

5- lecture des résultats au spectrophotomètre à 450 nm.

Les bactéries de la pomme de terre visées par le programme de multiplication in vitro :

- L'agent de flétrissement bactérien (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum*).
- L'agent de la pourriture brune (*Ralstonia solanacearum* ex *Pseudomonas solanacearum*).
- L'agent de la pourriture molle (*Erwinia carotovora* var. *atopovora*).
- L'agent de la galle commune (*Streptomyces scabies*).

1- Prélèvement des bactéries à partir d'un :

*Talon.

*Tige de plant issu d'un œilleton (tubercules mère).

*Racine de vitroplants.

2- Isolement par dilution et étalement sur milieu (LPGA, KIB).

3- Étalement sur milieu sélectifs (YEM, PVC, PP, NC).

Incubation à la température 25°C à 27°C.

5- repiquage de colonies suspectes selon des critères variables :

- test de pathogénicité.
- Fluorescence au UV.
- Hydrolyse de l'amidon.
- Croissance positive.
- Sécrétion de polysaccharide ...etc.

2ème méthode :

caractérisation des souches par **Test IFA** (Immunofluorescence aux Anticorps Monoclonaux) :

Protocole IF :

- 1- dépôt de macérât sur le
- 2- fixation des bactéries (b) réaction IF.
- 3- Fixation des anticorps d'espèce spécifique animale (x).
- 4- Fixation des anticorps d'espèce animale (y).
- 5- Fixation des anticorps x couplés à l' FITC (substance fluorescente sous UV) .

6- Lecture au microscope sous lumière UV.

Après le dépistage total, seuls les mériclones déclarés sains par le laboratoire de contrôle phytosanitaire, font l'objet de la micropropagation. Les mériclones virosés sont détruits pour éviter toute recontamination au cours de la micropropagation.

Les mériclones retenus sont bien identifiés tout au long de la chaîne de production.

2.5.2. Milieu de culture :

La micropropagation est réalisée sur le milieu « MS » sans hormones dans des boîtes magenta dont le volume de milieu est de 30 ml / boîte avec 09 microboutures.

2.5.3. Paramètres étudiés :

Les vitroplants multipliés ont fait l'objet d'un suivi biométrique portant sur :

- la longueur de tiges,
- Le nombre de feuilles,
- Les anomalies.

2.6. Production de minitubercules :

La serre utilisée pour la production de minitubercules (G0) est automatisée et permet le contrôle des paramètres climatiques (température, hygrométrie, irrigation etc ...).

Les vitroplants ont été transférés directement dans la serre et plantés dans des pots sous les conditions optimales de culture ce qui permet l'élimination de la phase d'endurcissement en mini serres [13] .

2.6.1. Conduite de la culture :

2.6.1.1. Soins culturaux :

➤ L'irrigation : les vitroplants élevés dans une atmosphère saturée à 100 % d'humidité (récipient) nécessitent à l'intérieur de la serre, une importante humidité relative de l'air. Pour cela, l'irrigation débute par l'aspersion (l'alimentation en eau par les feuilles et les racines) jusqu'à ce que les racines soient suffisamment développées permettant ainsi la reprise et la croissance des plantules. L'irrigation par goutte à goutte est ensuite assurée tout le long du cycle végétatif. Les besoins des plants sont de 30 % au début, de 70% au cours de la tubérisation et diminuent vers la fin du cycle (maturité des minitubercules).

➤ Fertilisation : le substrat utilisé est riche en matière organique. La fertilisation minérale complémentaire est apportée sous forme liquide par irrigation et pulvérisation foliaire (Activeg : 20-20-20. et solupotasse : 43%)

➤ Ajout du substrat : du substrat est ajouté en deux fois jusqu'au remplissage des pots. lors de la phase d'émission des stolons et remplacer ainsi les opérations de buttage.

Le substrat ajouté est le même que celui utilisé au départ (pasteurisé préalablement puis stocké à l'abri des poussières). L'apport d'engrais liquide est effectué consécutivement à l'ajout de substrat et à une bonne irrigation

2.6.1.2. Soins phytosanitaires : Les soins phytosanitaires sont des traitements fongiques et insecticides effectués en alternance (1 fois / 15 jours).

Les tests sérologiques sont réalisés à deux stades de la culture :

- stade développement,
- stade maturité des minitubercules.

Le choix des échantillons a été réalisé en fonction du nombre des plants par clone, et effectué pour chaque plant sur sa partie médiane.

Les tests réalisés sont les mêmes que ceux réalisés au stade vitroplant.

2.6.1.3. Récolte :

Après les résultats de dépistage des maladies, un défanage manuel est effectué, il sert à l'évaluation de la biomasse aérienne par pot et par traitement. La récolte des minitubercules est réalisée 15 jours après le défanage. Les minitubercules ont été récoltés manuellement dans des clayettes désinfectés et étiquetés portant le numéro du clone et du traitement.

Les minitubercules ont été triés et classés selon 05 catégories de calibre :

- inférieur à 15 mm,
- entre 15 et 28 mm,
- entre 28 et 35 mm,
- entre 35 et 45 mm,
- supérieur à 45 mm.

2.6.2. Facteurs influençant le rendement et le calibre des minitubercules :

Deux expériences ont été réalisées :

- la première consiste en l'étude de l'effet combiné de 04 types de substrat avec deux générations de vitroplants et ce, avec une densité de plantation est de 64 plants/m².
- la deuxième expérience consiste en l'étude de l'effet combiné de 04 densités de plantation avec deux générations de vitroplants sur le meilleur substrat de l'expérience précédente.

2.6.2.1. Effet du substrat :

Les critères de choix des substrats sont :

- caractères physico-chimiques : léger, drainant, riche et fertile,
- critères phytosanitaires : indemne de tous parasites phytopathogènes et mauvaises herbes.

Tous les substrats utilisés ont subi une pasteurisation (80 °C) pendant 12 heures à l'aide d'un pasteurisateur.

Les substrats utilisés sont des mélanges composés de :

- Un tiers (1/3) sable noir (SN) de rivière plus deux tiers (2/3) tourbe.
- Moitié (1/2) sable noir (SN) de rivière plus la moitié (1/2) tourbe.
- Un tiers (1/3) sable rouge (SR) plus deux tiers (2/3) tourbe,
- Moitié (1/2) sable rouge (SR) plus la moitié (1/2) tourbe.

Après la pasteurisation, les substrats sont stockés à l'abri des poussières dans des sachets fermés. Selon Boxus (1994), le substrat ne doit jamais être utilisé fraîchement ce qui constitue la cause majeure de toutes les contaminations de surface et de nécroses du collet.

Vu le grand volume des pots, ils sont d'abord remplis à moitié, le reste sera apporté par la suite en deux fractions. La plantation est réalisée lorsque les vitroplants sont enracinés et bien développés. Ils sont retirés manuellement des bocaux, secoués pour éliminer l'excès d'agar ensuite rapidement lavés sous eau courante puis immédiatement plantés en pots.

Au cours de la plantation, chaque pot portera une étiquette d'identification mentionnant le numéro du clone. Dans notre expérience, 04 clones ont été utilisés. Pour chaque traitement de cette expérience, 4 répétitions ont été réalisées, c'est à dire, chaque traitement comporte 04 pots (même substrat, même clone, même densité de plantation et même génération de vitroplants (Figure2.11).

Il y'a lieu de signaler qu'au cours de la plantation, il faut éviter :

- Les basses températures (< 5 °C) où les hautes températures (>32 °C),
- Le rayonnement solaire intense et direct (si nécessaire, un ombrage est à utiliser).

2.6.2.2. Effet de la densité de plantation :

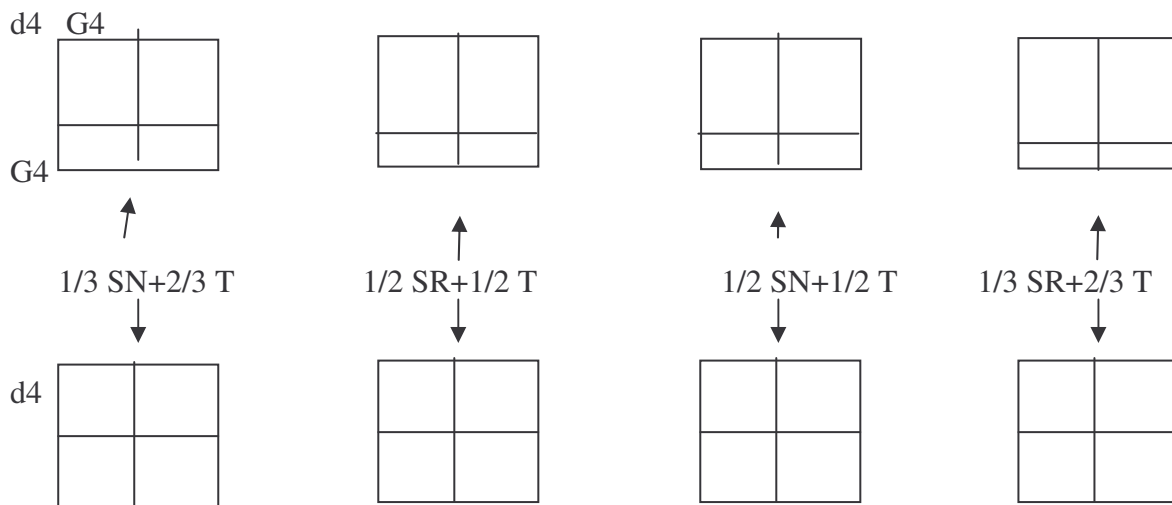
A été étudié en combinant quatre (04) densités de plantation avec deux générations de vitroplants.

Le substrat utilisé est constitué de un tiers (1/3) de sable noir de rivières plus deux tiers (2/3) de tourbe préalablement pasteurisé et stocké. La plantation, le respect de la numérotation et le volume du substrat dans le pot sont identiques à la première expérience.

Les 04 densités de plantation étudiées sont :

- 04 plants / pot (62 plants / m²) ;
- 05 plants / pot (80 plants / m²) ;
- 06 plants / pot (96 plants / m²) ;
- 09 plants / pot (144 plants / m²).

Chaque traitement comporte également 4 répétitions, (Figure 2.12).



G5



un pot

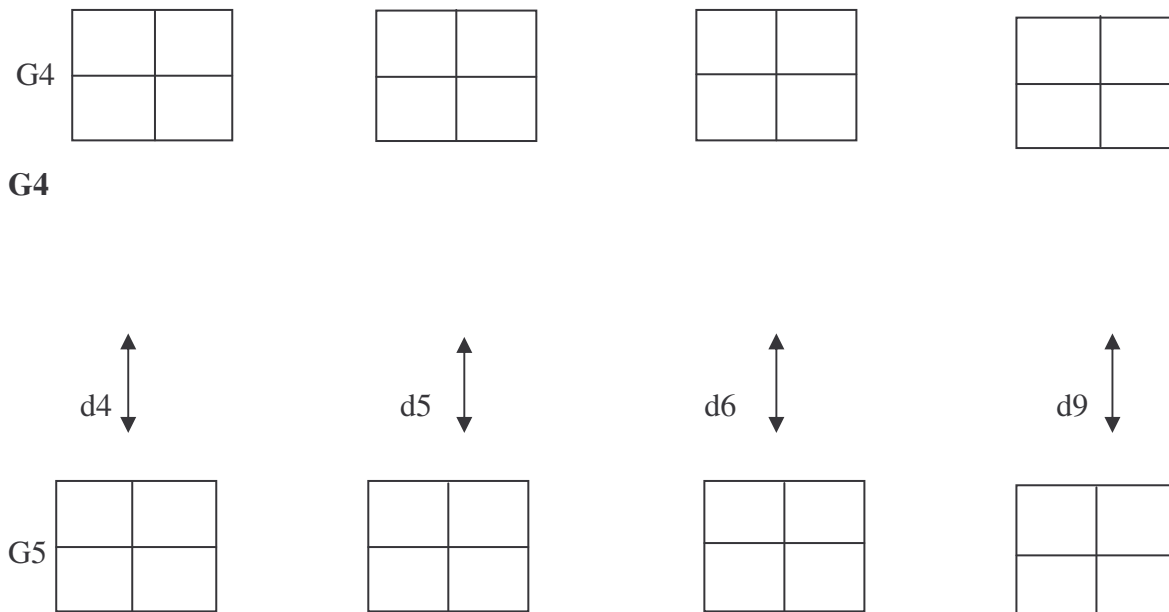
SN = Sable noir.

SR = Sable rouge.

La densité de plantation : d4= 64 plants/m².

G4 : 4^{ème} génération de vitroplants, G5 : 5^{ème} génération de vitroplants.

Figure 2.11 : Dispositif expérimental pour l'étude de l'effet substrat de différents substrats et deux générations sur le rendement des vitroplants.



d4 : 64 plants/m²
 d5 : 80 plants/m².
 d6 : 96 plants/m².
 d9 : 144 plants/m².

Le substrat utilisé est SN2.

Figure 2.12 : Dispositifs expérimental pour l'étude de l'effet de différentes densités et deux générations sur le rendement en minitubercules des vitroplants.

2.6.2.3. Effet de la génération des vitroplants :

Les deux générations de vitroplants de multiplication qui ont fait l'objet des deux expériences précédentes sont la G4 et la G5.

2.6.3. Paramètres étudiés à la G0 (minitubercules) :

Au cours de la végétation sont :

- Taux de reprise ;
- Longueur de la tige ;

- Nombre de feuilles simples et composées ;
- Ramifications.

A la récolte :

- Nombre et poids des mini tubercules / pot / traitement.
- Poids frais de la partie aérienne / pot / traitement.

Les conditions de prégermination des minitubercules :

- 20 à 22 °C.
- Obscurité.
- Aération continue du local.
- Humidité de 60 à 70 %.

Après une bonne germination, les minitubercules sont prêts à être plantés en plein champ.

La production de la G1 en plein champ a été menée sous serres plastiques (milieu protégé).

2.7. Culture en plein champ et production des générations G1 et G2 :

2.7.1. Objectifs :

Les objectifs visés à travers la culture de pleins champs sont:

- Etude du comportement végétatif des plants ;
- Influence de l'origine des minitubercules (production *in vitro*) sur la production ;
- Durée du cycle ;
- Rendement en tubercules ;
- Etat physiologique des tubercules récoltés ;
- Conservation et leur prégermination.

2.7.2. Prégermination :

La prégermination des tubercules est réalisée sous les conditions suivantes :

- Températures de 20 à 22 °C,
- Obscurité totale,
- Humidité de 60 à 70 %.

Une fois le germe apical est apparu, l'égermage est aussitôt réalisé pour favoriser la croissance des autres germes. Après l'apparition des germes, les tubercules sont soumis à une photopériode de 16 heures

(éclairage artificiel) pour favoriser l'apparition de germes trapus (l'obscurité favorise l'aspect filiforme des germes qui se cassent et s'abîment au cours de la plantation).

2.7.3. Préparation du sol :

Les travaux du sol ont été réalisés au mois d'août 2002 pour la G1 et au mois de mars 2003 pour la G2, par un labour profond (environ 40 cm) suivi par des façons superficielles. Avant la plantation, des traitements nématocides ont été réalisés avec du MOCAP à raison de 100 kg/ha.

2.7.4. Plantation :

G1 : la plantation a été réalisée le 12 septembre 2002 sous serres plastiques (milieu protégé) avec une planteuse semi mécanique. La densité de plantation est de 54000 plants par ha (0,25 m entre plants et 0,75 m entre lignes). Chaque clone a été planté à part.

G2 : la plantation de la G2 a été réalisée le 19 avril 2003 en plein champs avec les mêmes paramètres de la G1.

2.7.5. Fertilisation :

Les besoins de la pomme de terre en unité fertilisante sont donnés dans le tableau 2.16 :

Tableau 2.16 : Les besoins de la pomme de terre en unité fertilisante appliqués sur les deux générations en plein champ.

	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
Génération 1	220	180	220
Génération 2	193	150	196

- Pour la G1 : Le premier apport de 90 unités a été apporté en engrais de fond composés (N.P.K. 15.15.15) au moment de la plantation et le deuxième apport de 90 unités a été apporté 25 jours après plantation (N.P.K. 15.15.15). En pleine végétation, un apport de complément a été réalisé avec de l'Urée 43 % (40 unités après 45 jours) et avec du Solupotasse 43 % (40 unités à 02 mois de culture).

- Pour la G2 : Le premier apport de 75 unités a été apporté en engrais de fond composés (N.P.K. 15.15.15) au moment de la plantation et le deuxième apport de 75 unités a été apporté 15 jours après plantation en (N.P.K. 15 .15. 15) juste avant le premier buttage. En pleine végétation, un apport de complément d'engrais a été réalisé avec de l'Urée 43 % (40 unités après 45 jours) et avec du Solupotasse 46 % (40 unités à 02 mois de culture).

2.7.5. Irrigation :

L'eau est un facteur déterminant du rendement, car la couverture des besoins de la culture le long de son cycle permet une bonne production. Les besoins de la pomme de terre varient selon le type de sol, la saison et le type de production. Sous serres en plastique, l'irrigation a été effectuée à la raie, et en plein champ par aspersion. Pour les deux générations, elle est réalisée tous les quatre jours.

2.7.6. Binage -Buttage :

Il a été réalisé en deux fois :

- le premier buttage a été réalisé à 10 % de la levée suivie d'un désherbage chimique (Métribuzine 1 kg/hl). Pour la production de la G1, un retard d'environ 06 jours de levée a été remarqué
- le deuxième buttage a été réalisé dès l'apparition des premiers stolons pour favoriser la tubérisation (50 jours après la plantation).

2.7.7. Soins phytosanitaires :

Les soins phytosanitaires consistent en l'application de traitements fongicides et insecticides à intervalles réguliers et sont réalisés par le laboratoire de contrôle phytosanitaire de la SAGRODEV.

Les tests sérologiques sont réalisés par le laboratoire de contrôle de SAGRODEV puis vérifiés par le CNCC (Centre National de Contrôle et de Certification des semences et plants).

2.7.8. Récolte :

La récolte est réalisée à 127 jours (après 15 jours de défanage). Les opérations suivantes sont effectuées :

- Triage et calibrage.
- Traitement de la semence.
- Conservation en caissette en entrepôt frigorifique

2.7.9. Analyse statistique et représentation graphique des résultats:

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de deux logiciels :

- STATISTICA : ANOVA MANOVA.
- STATITCF : Newmen et Keuls.

Les résultats de l'ANOVA ainsi que les groupes homogènes (lettres majuscules représentés au niveau des graphiques) sont présentés directement sur les graphiques élaborés par Excel de microsoft.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

3.1-Résultats de la désinfection (méristèmes) :

La bonne préparation du matériel végétal du départ est très importante pour la réussite d'un programme de multiplication d'une variété donnée. Le test de pré-culture a une grande importance pour le choix du matériel végétal initial (tubercules de départ en bon état sanitaire). La méthode de désinfection appliquée dans ce travail a été inspirée d'un manuel canadien de laboratoire et adoptée aussi pour d'autres travaux notamment celui de Lahmissi (2004). Après son application sur les germes, cette méthode s'est avérée très efficace car les taux de contamination enregistrés n'ont jamais excédé 2,77% pour toutes les expériences portant sur la culture de méristèmes (tableau 3.16). Ces taux de contaminations peuvent être considérés comme très faibles pour une introduction primaire de matériel végétal prélevé à partir de germes. Cette méthode a donc été adoptée pour l'ensemble du travail.

Tableau 3.16 : Taux de contamination pour les trois expériences de la culture de méristème :

expériences	1 ^{ere} expérience	2 ^{em} e expérience	3 ^{eme} expérience
Nombre total des méristèmes	108	108	108
Nombre des méristèmes contaminés	2	3	2
Taux de contamination (%)	1.85	2.77	1.85

3.2-Optimisation du milieu de culture pour les méristèmes :

Le milieu minéral MS que nous avons utilisé comme milieu de base est un milieu complet, équilibré dont le rapport (anions sur cations) = 93.3 [64]. Ce milieu a déjà donné de bons résultats dans de nombreux travaux similaires.

3.2.1-Effet des régulateurs de croissance

La maîtrise de la balance hormonale est un élément crucial pour un milieu destiné à l'organogenèse *in vitro* [98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105,106]

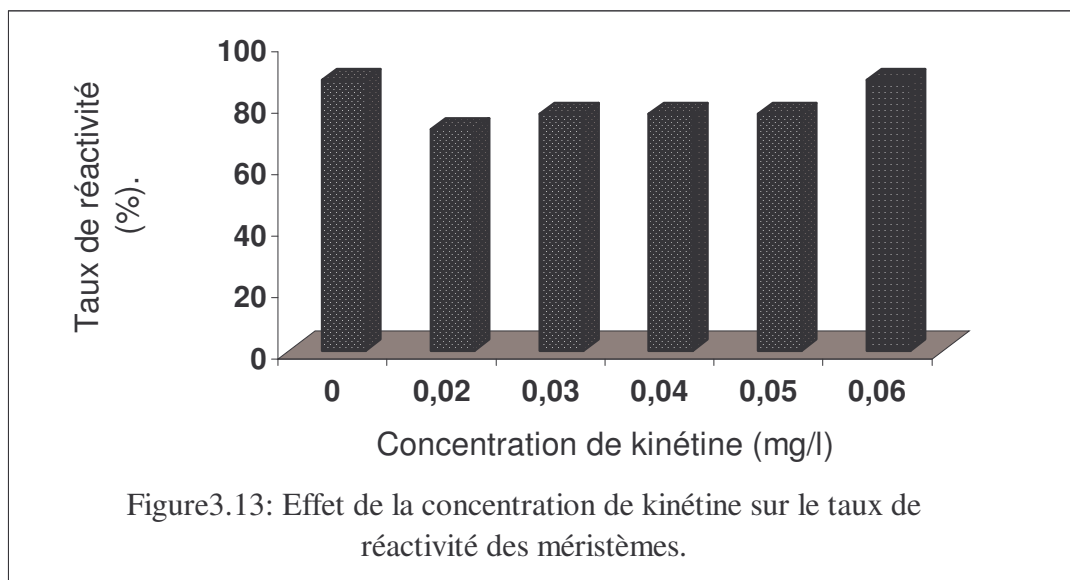
2.1.1- Effet de la concentration de kinétine (kin):

Les traitements kinétine réalisés en présence d'une concentration fixe de GA3 sauf pour le témoin sont les suivants :

1=témoin MS sans kin ni GA3, 2=0,02 mg/l kin, 3=0,03 mg/l kin, 4=0,04 mg/l kin, 5=0,05 mg/l kin et 6=0,06 mg/l kin

a-Taux de réactivité:

Le taux de réactivité varie entre 72% et 88%. La variation de la concentration de kinétine dans le milieu de culture ne semble pas avoir une grande influence sur ce paramètre puisque la différence entre le meilleur traitement et le pire n'est que de 16% (figureIII.13).



b- Longueur des mériplants :

Les vitroplants issus de méristèmes sont appelés mériplants. L'analyse de la variance révèle un effet significatif de la balance hormonale sur la longueur des mériplants, et ce, aussi bien avant qu'après leur repiquage. Cet effet se traduit par des vitesses de croissance variables en fonction de la concentration de kinétine dans le milieu de culture. Ainsi, trois semaines après le transfert sur un milieu sans hormone, les résultats suivants ont été obtenus : croissance rapide (54.14 mm) avec 0.05mg/l de Kinétine, croissance moyenne (20 mm à 33 mm) avec respectivement 0.04 et 0.03 mg/l, et croissance faible (inférieur à 15 mm) avec les concentrations respectives de 0.02 et 0.06 mg/l et sur le témoin. En effet, le test de la PPDS révèle quatre groupes homogènes correspondants à la classification précédente (Figure3.14).

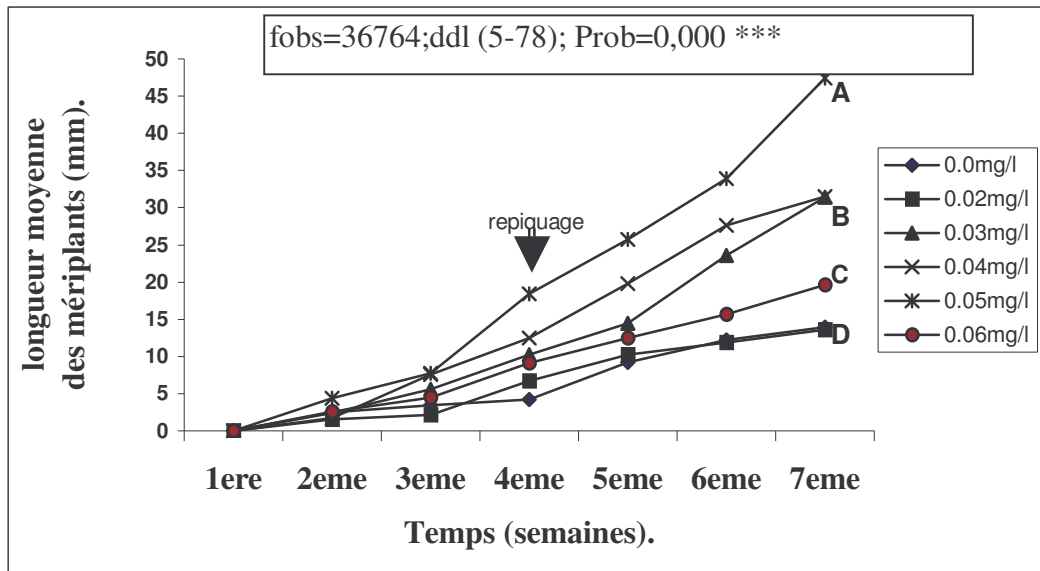


Figure3.14: Effet de la concentration de kinétine sur l'évolution de la longueur des mériplants avant et après repiquage.

c- Nombre des feuilles par mériplant:

L'analyse de la variance révèle l'existence d'un effet significatif des différentes concentrations de kinétine étudiées sur le nombre de feuilles par mériplant.

Le nombre moyen enregistré est de 7,57 au niveau de la 5ème concentration (0,05 mg/l), c'est la valeur la plus élevée. La concentration de 0,06 mg/l vient juste après avec 6,13.

Le témoin et les concentrations de 0,03 et 0,04 mg/l donnent aussi un nombre important de feuilles avec respectivement 5,85 - 5,58 et 5.65, ils constituent ainsi un groupe homogène à part. La concentration de 0.02 mg/l est la moins favorable donnant une moyenne de 3,8 feuilles par mériplant. Le test de la ppds confirme bien cette répartition en quatre groupes homogènes (figure3.15).

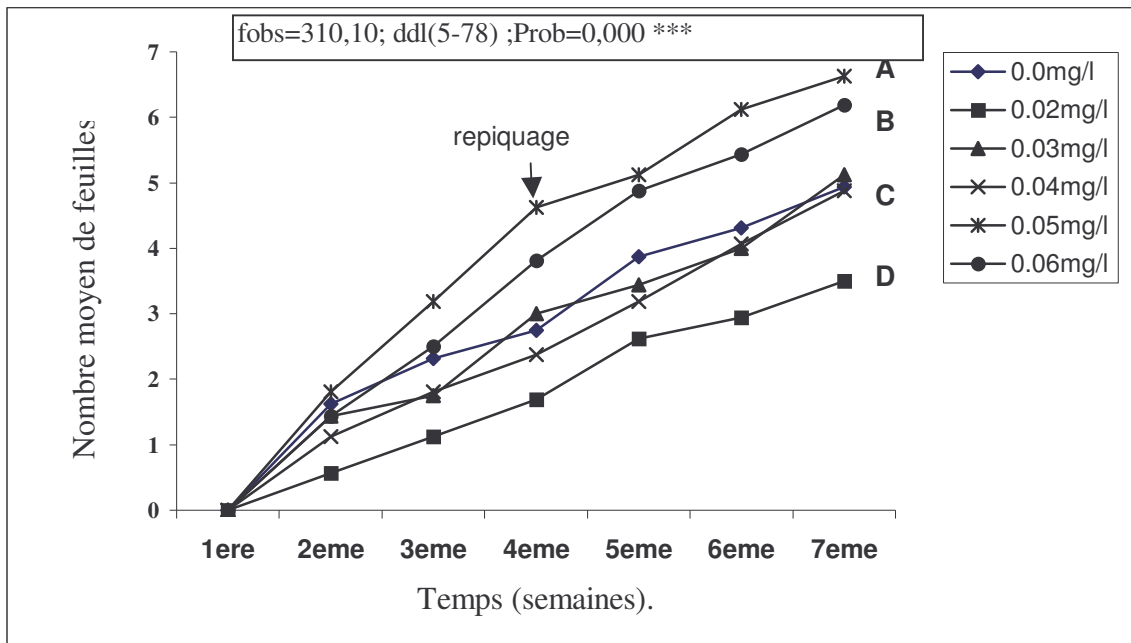
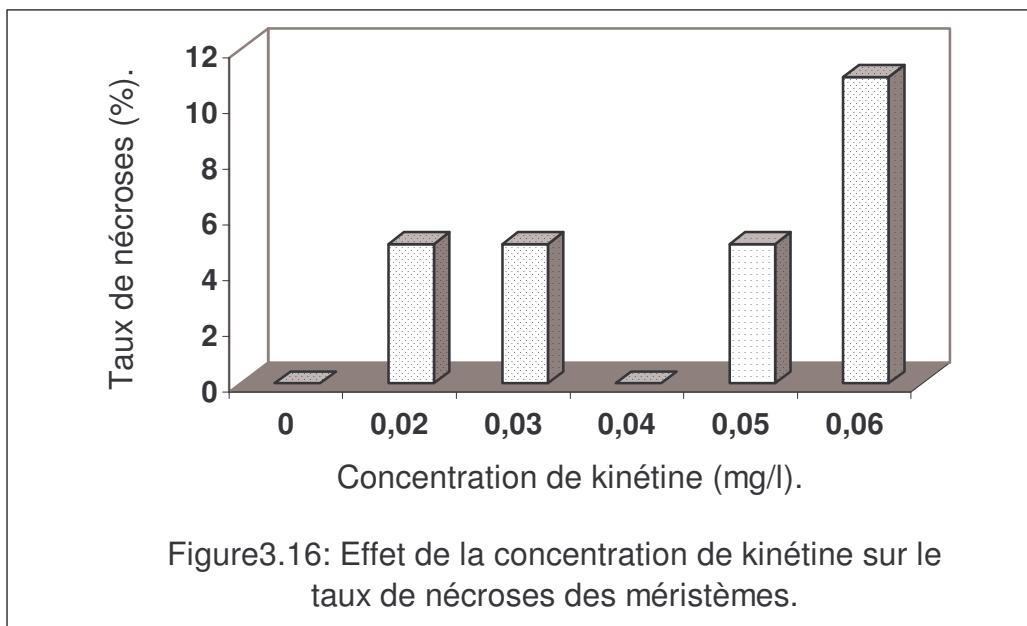


Figure 3.15: Effet de la concentration de la kinétine sur l'évolution de nombre moyen de feuille par mériplant avant et après repiquage.

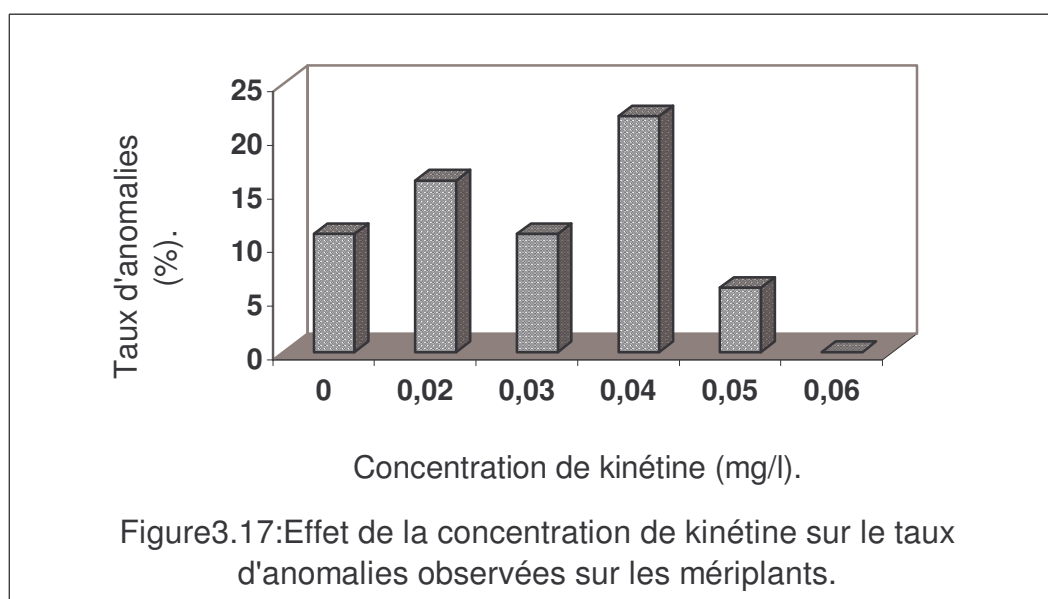
d-Taux de nécrose :

Le taux moyen de nécrose toutes concentrations confondues de kinétine ne dépasse pas 4,62%. Cependant, il varie entre 0% et 11% si nous considérons les différents traitements séparément (figure 3.16). Ces taux restent relativement faibles puisque ils ne gênent en rien la suite des opérations de multiplication.



e- Taux d'anomalies observées sur les mériplants :

Les anomalies observées pour cette expérience sont sous forme de cal à la base des mériplants ou sous forme de bourgeons en rosette. Ces anomalies sont directement éliminées. Leur pourcentage moyen tous traitements confondus est de 12,96% (figure 3.17). Ce pourcentage varie cependant en fonction des traitements entre 0 et 21% (figure3.17)



2.1.2- Effet de concentration de BAP :

Les traitements BAP réalisés en présence d'une concentration fixe de GA3 (0,1mg/l) sont : 1=témoin MS sans BAP ni GA3 ; 2= 0,02 mg /l BAP ; 3= 0,03 mg /l BAP ; 4= 0,04 mg/l BAP ; 5= 0,05 mg /l BAP ; 6=0,06 mg /l BAP.

a- Taux de réactivité :

Le taux de réactivité varie entre 66% et 88%. La variation de la concentration de BAP dans le milieu de culture semble avoir une certaine influence sur ce paramètre puisque la différence entre les résultats extrêmes dépasse les 20% (figure3.18).

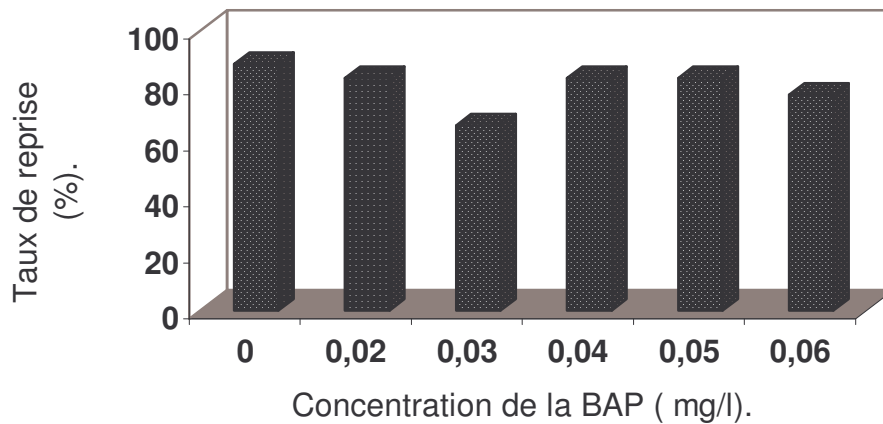


Figure3.18: Effet de la concentration de la BAP sur le taux de reprise des méristèmes.

b- longueur des méristèmes :

L'analyse de la variance révèle un effet significatif de la BAP sur la longueur des méristèmes, et ce, aussi bien avant qu'après leur repiquage. Cet effet se traduit par des vitesses de croissance variables en fonction

de la concentration de BAP appliquée. Trois semaines après le transfert sur un milieu sans hormone, les résultats suivants ont été obtenus : croissance rapide (55.53mm) avec 0.02 mg/l de BAP ; croissance moyenne à faible (inférieure à 20 mm) avec 0.04 - 0.05 - 0.03 - 0.06 mg/l de BAP et le témoin. Le test de la PPDS révèle 2 groupes homogènes correspondant à la classification précédente (figure3.19).

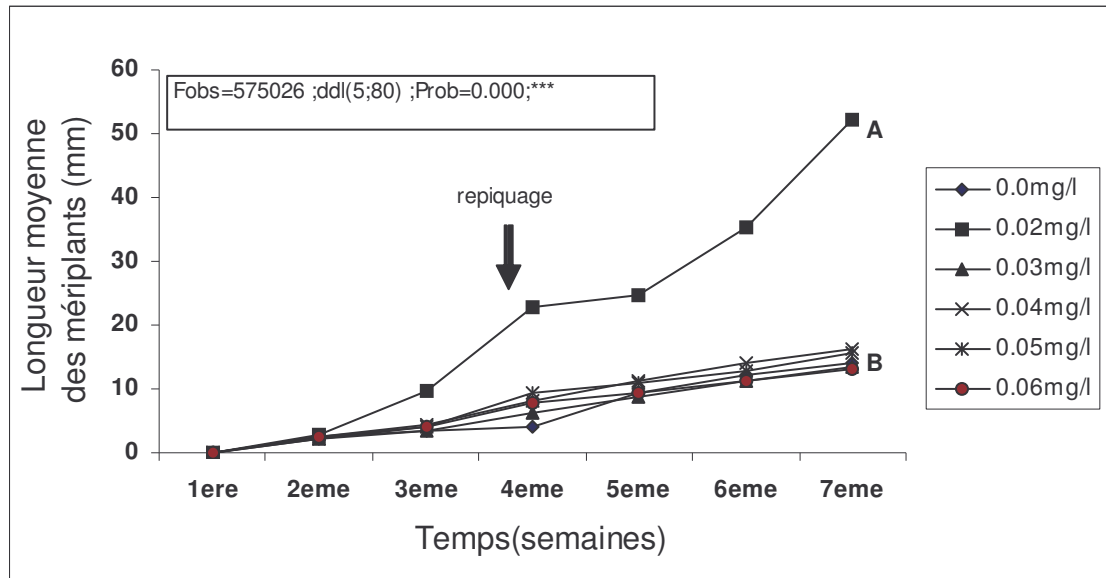


Figure3.19: Effet de la concentration de BAP sur l'évolution de la longueur moyenne des mériplants avant et après repiquage.

c- Nombre des feuilles:

L'analyse de la variance révèle l'existence d'un effet significatif des différentes concentrations de BAP étudiées sur ce paramètre : le nombre moyen enregistré est de 6.31 au niveau de la 2ème concentration (0.02mg/l), c'est la valeur la plus élevée. En absence de la BAP le nombre moyen de feuilles est de 4.94 et au niveau des autres concentrations 0.03 -0.04 - 0.05 et 0.06 mg/l le nombre moyen de feuilles est également important 4.25; 4.86 et 4.42 mais ces valeurs restent inférieures à la valeur enregistrée sur le témoin (4.93). Le test de la PPDS confirme bien cette répartition en 3 groupes homogènes (figure 3.20).

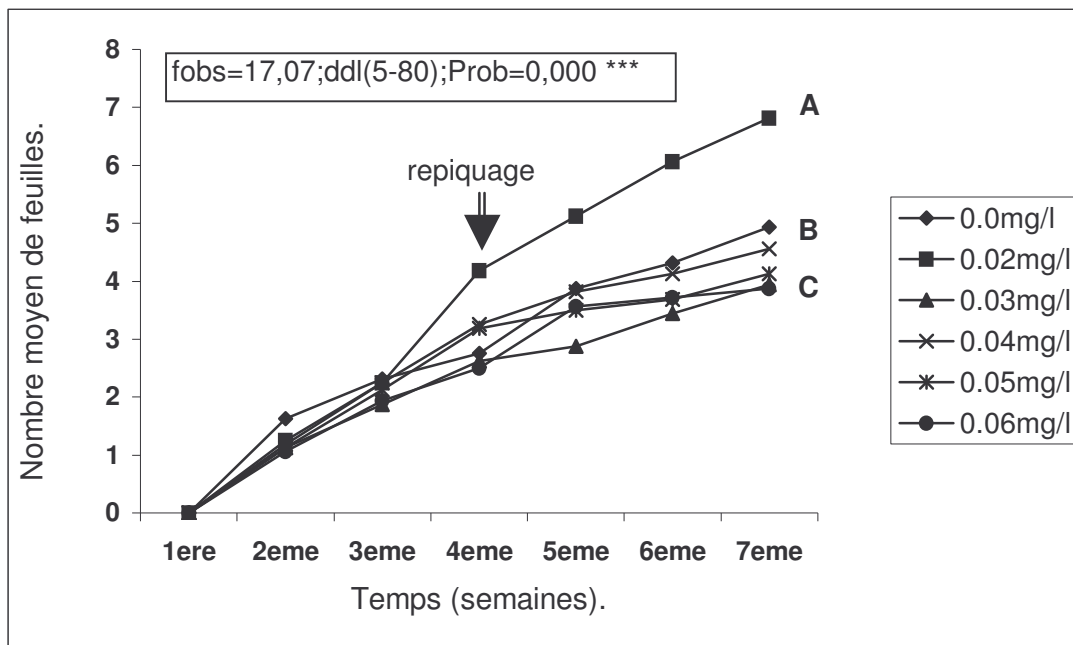
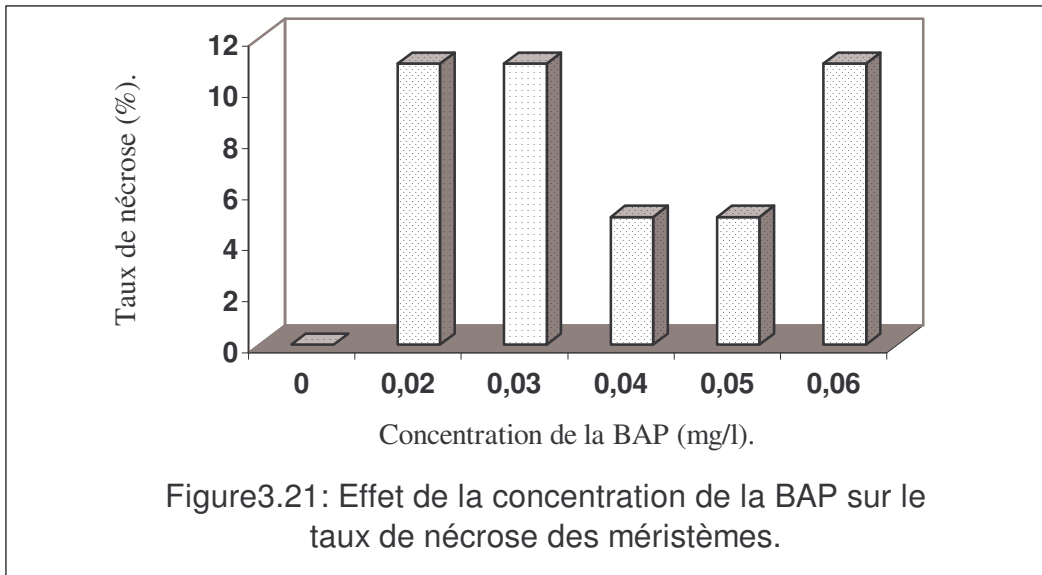


Figure 3.20: Effet de la concentration de BAP sur l'évolution de nombre moyen de feuilles par méristème avant et après repiquage.

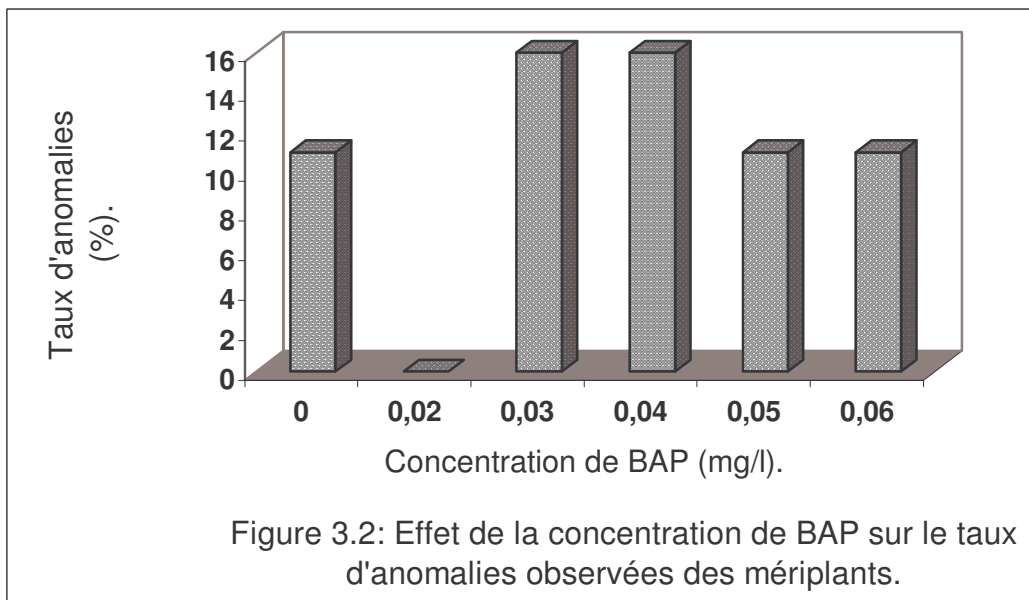
c- Taux de nécroses:

Le taux de nécrose moyen enregistré pour l'ensemble des méristèmes excisés est de 7,40%. Il varie entre 0% et 11% si nous considérons les traitements séparément (figure 3.21). Ceci n'affecte en rien les étapes de multiplication ultérieure.



e- Taux d'anomalies :

Le taux moyen d'anomalies est de 10,18% tous traitements confondus. Cependant, celui-ci varie de 0 à environ 16% si l'on considère les traitements séparément (Figure3.22). Les anomalies observées se présentent le plus souvent sous forme de cals ou de bourgeons en rosettes.



3.2.1.3-Conclusion :

L'étude de l'effet des concentrations de KIN et de BAP en présence de GA3 (0.1mg/l) a montré que Pour la kinétine, la concentration la plus favorable est de 0.05 mg/l (Planche1, **A**), et pour la BAP, la concentration la plus favorable est de 0.02 mg/l(Planche1, **B**). Cependant la comparaison des résultats obtenus avec les concentrations optimales de Kinétine et de BAP, montre que les mériplants obtenus avec la BAP (0.02mg/l) sont mieux adaptés à la micropropagation que ceux obtenus avec la kinétine (0.05mg/l) car ils ne sont touchés par aucune anomalie(Planche1,**E**). Pour le reste des paramètres, les valeurs sont presque identiques (Tableau 3.18). C'est la BAP qui a donc été retenue pour l'expérience suivante (étude de l'effet de la GA3).

Tableau 3.18 : Tableau récapitulatif des résultats précédents :

	KIN 0.05 mg/l	BAP 0.02 mg/l	
Taux de réactivité (%)	78	82	<u>3.2.1.4 - Effet de la concentration de l'acide gibbérellique (GA3 en présence de BAP) :</u>
Longueur moyenne des mériplants (mm)	54.14	55.53	
Nombre moyen de feuilles par mériplant	6.13	6.31	
Taux de nécroses (%)	4.5	13	
Taux d'anomalies (%)	22	0	

Cette expérience a été réalisée suite aux résultats obtenus précédemment. La concentration de 0.02 mg/l de BAP été retenue pour étudier l'effet de concentrations croissantes de GA3 : Témoin MS sansGA3 ni BAP, 1=0.3mg/l de GA3; 2=0.4mg/l de GA3; 3=0.5mg/l de GA3 ; 4= 0.6mg/l de GA3 et ; 5 = 0.7mg/l de GA3.

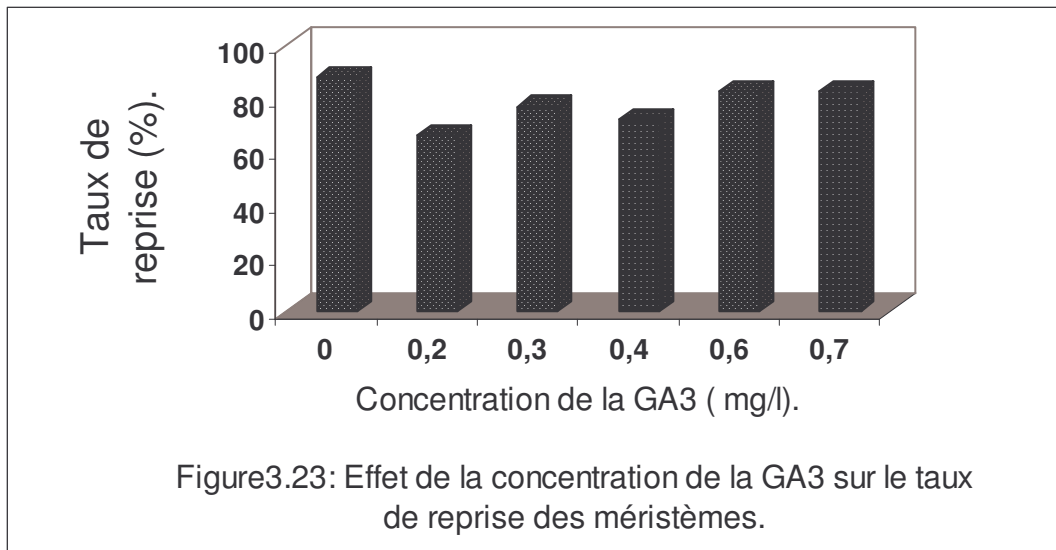
Après un mois de culture seul les méristèmes introduits sur le milieu MS sans hormones ont réagit positivement avec un taux de réactivité de 88%. Pour l'ensemble des autres méristèmes aucune réaction n'a été observée (Planche 1.C) nous nous sommes alors intéressée à l'étude de l'effet de la concentration de GA3 en présence de kinétine (0.05mg/l) au lieu de la BAP.

3.2.1.5-Effet de la concentration de l'acide gibbérellique (GA3 en présence de la kinétine):

Les tests réalisés avec la GA3 en présence de kinétine (0,05 mg/l) sont : 1=Témoin MS sansGA3 ; 2= 0.2mg/l de GA3; 3= 0.3mg/l de GA3; 4=0.4mg/lGA3; 5= 0,05 mg /l kin; 6= 0.6mg/l de GA3; 7= 0.7mg/l de GA3.

a- Taux de réactivité :

Le taux de réactivité varie entre 66% et 83%. La variation de la concentration de GA3 dans le milieu de culture ne semble pas avoir une grande influence sur ce paramètre (figure3. 23).



b- Longueur des mériplants:

L'analyse de la variance révèle un effet significatif de la GA3 sur la longueur des mériplants, et ce, aussi bien avant qu'après leur repiquage.

Cet effet se traduit par des vitesses de croissance variables en fonction de la concentration de la GA3 dans le milieu de culture. Trois semaines après le transfert, sur un milieu sans hormone, les résultats obtenus montrent des longueurs de tiges allant de 5.15 à 14 mm, et ce en fonction des traitements. En effet, le test de la PPDS révèle trois groupes homogènes. C'est en absence totale de GA3 que les meilleurs résultats a été obtenus (figure3. 24).

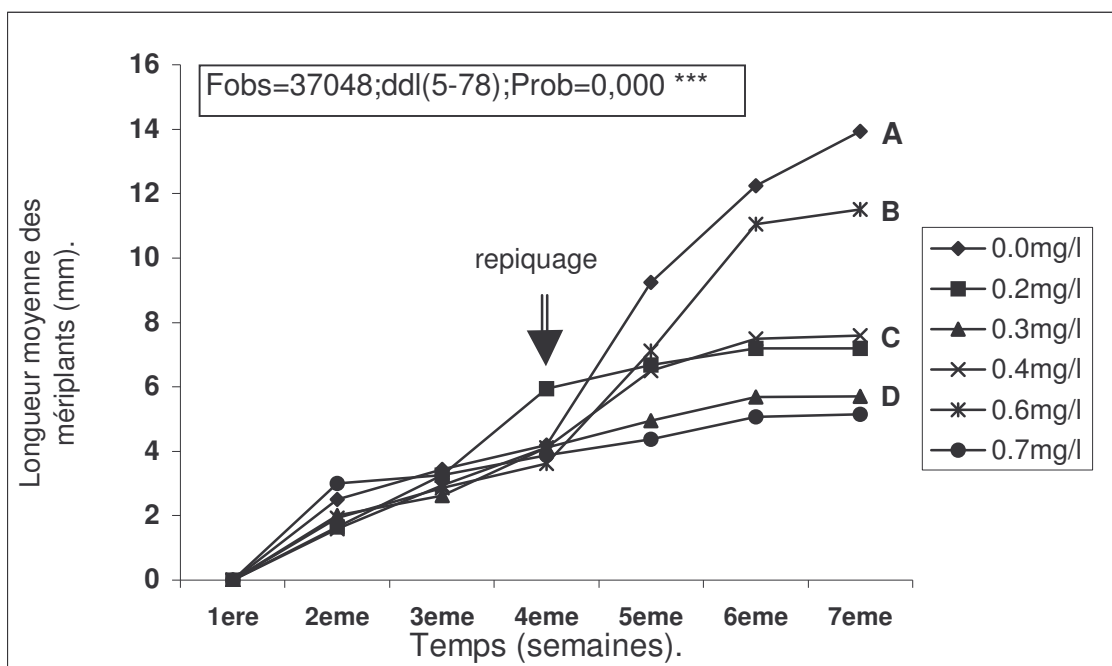


Figure 3.24: Effet de la concentration de GA3 sur l'évolution de la longueur moyenne des mériplants avant et après repiquage.

c- Nombre de feuilles :

L'analyse de la variance révèle l'existence d'un effet significatif des concentrations de GA3 utilisées sur la variation de nombre moyen de feuilles par mériplant. Le nombre moyen enregistré est de 5.5 au niveau de la 4ème concentration (0.4mg/l). C'est la valeur la plus élevée. En absence de GA3 le nombre moyen de feuilles est de 4.93. Les concentrations de 0.6 et 0.3mg/l ont donné un nombre moyen de feuilles important, qui reste cependant inférieur à celui obtenu avec les concentrations précédentes. Le nombre moyen de feuilles le plus faible a été enregistré à la concentration de 0.7mg/l (figure3.25). Les feuilles formées avec l'ensemble des concentrations étudiées sont petites et de couleur vert pale. Le test de la PPDS a révélé l'existence d'une différence significative entre les différents traitements mettant en relief trois groupes homogènes (figure 3.25)

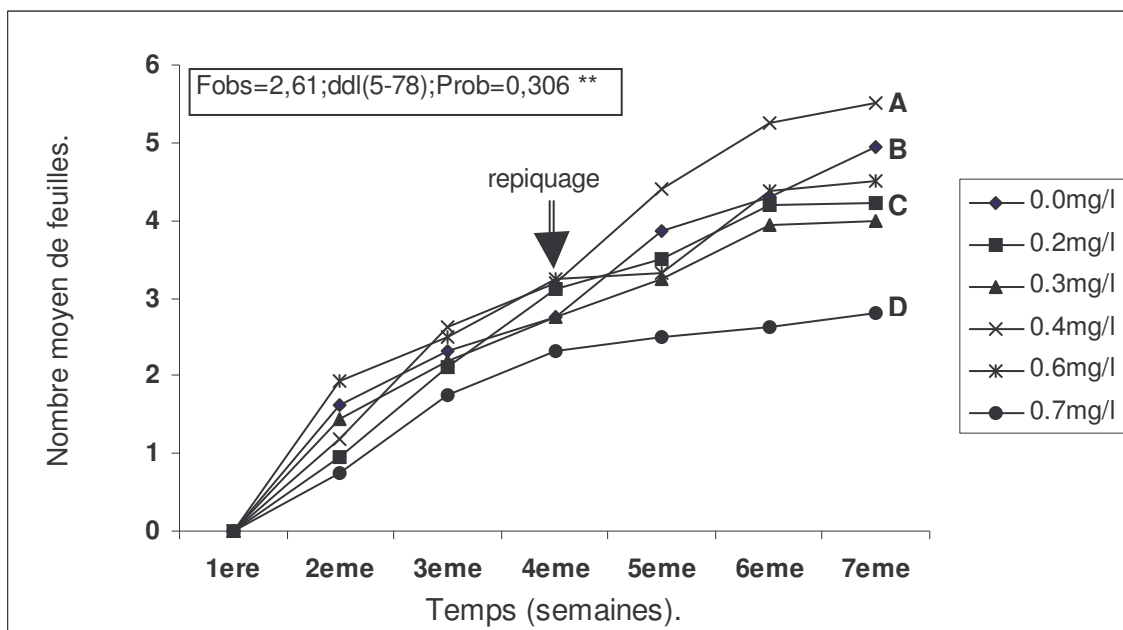


Figure 3.25: Effet de la concentration de la GA3 sur l'évolution de nombre moyen de feuilles par méristème avant et après repiquage.

d- Taux de nécroses :

Le taux de nécrose enregistré pour l'ensemble des traitements est de 9,25 %, il varie entre 0 % et 11% si nous prenons chaque traitement à part (figure 3.26).

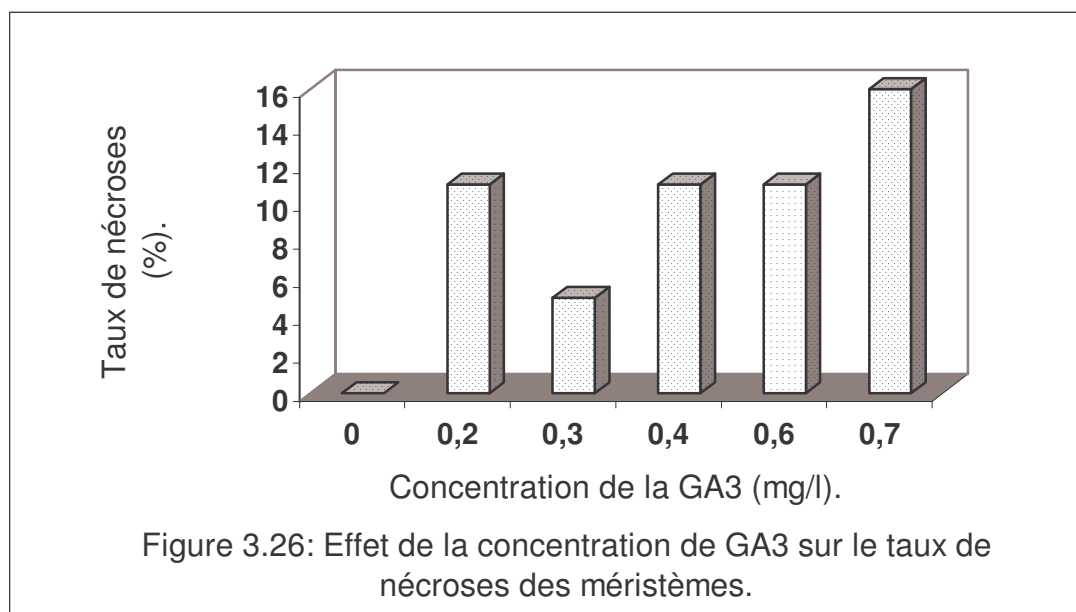
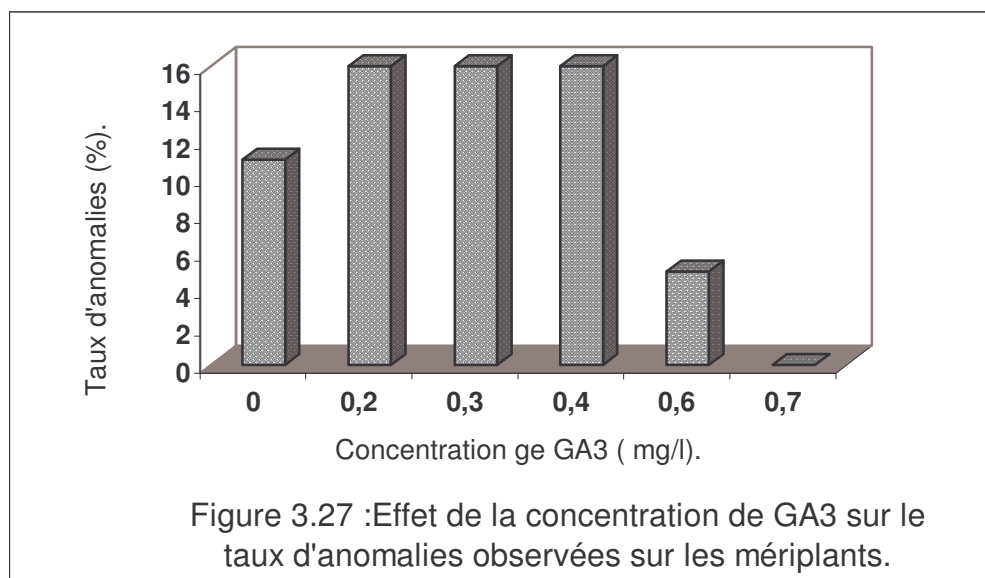


Figure 3.26: Effet de la concentration de GA3 sur le taux de nécroses des méristèmes.

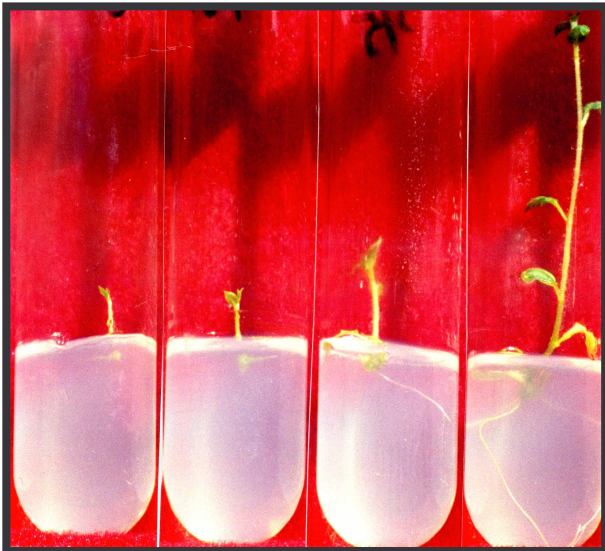
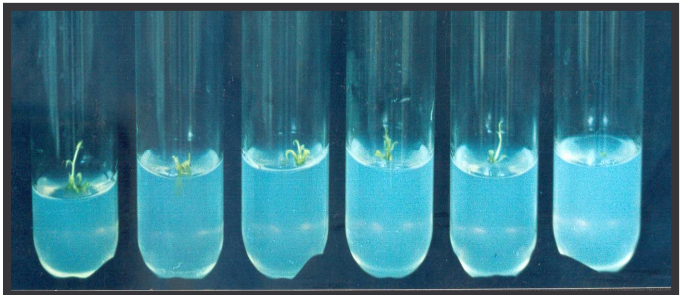
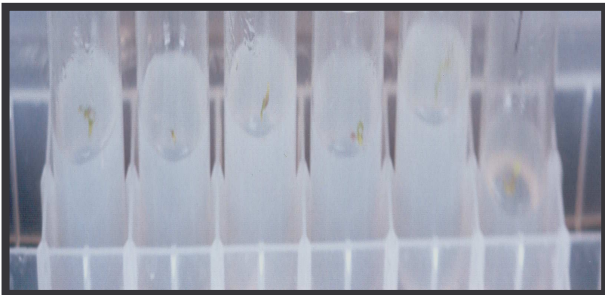
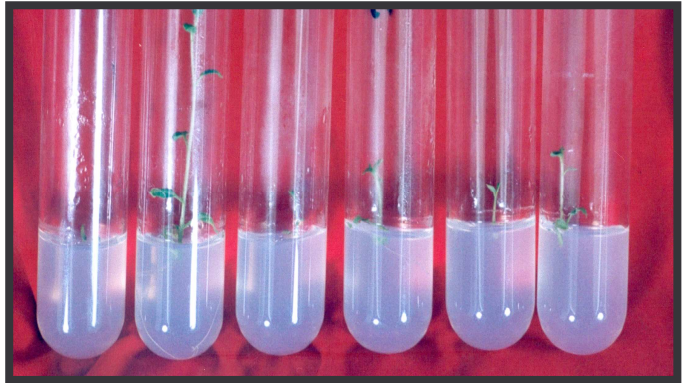
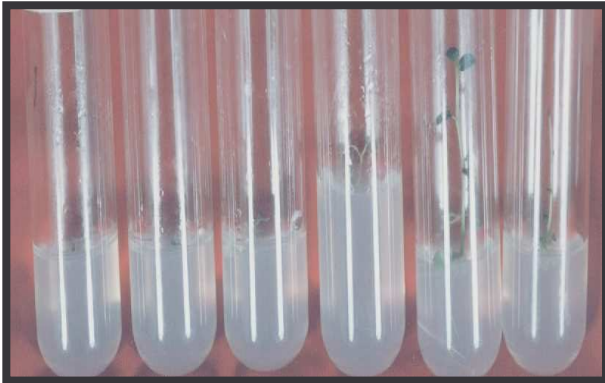
e- Taux des anomalies :

Le taux des anomalies enregistré pour l'ensemble des traitements réalisés est de 11,11 % (Figure 3.27). Au cours de cette expérience, nous avons remarqué que les mériplants obtenus sont caractérisés par des entre nœuds très courts donnant un aspect de rosette et feuilles de très petite taille. Après le repiquage, la forme rosette des mériplants n'a pas disparue donnant ainsi des vitroplants toujours très peu développés.



3.2.1.6 - Conclusion:

Les résultats des deux dernières expériences (étude de l'effet de la concentration de GA3 en présence de BAP ou de KIN) permettent de tirer les conclusions suivantes : la variation de la concentration de BAP ne permet d'apporter aucune amélioration de la qualité des mériplants, et la variation de la concentration de Kinétine entraîne une certaine réactivité des mériplants sans toutefois qu'il y ait une quelconque amélioration de leur qualité. Aucune nouvelle expérience de GA3 n'a donc été retenue, nous nous sommes alors limitée à la concentration initialement utilisée (0,1 mg/l) pour l'étude de l'effet de la BAP et de la kinétine (Planche 1, C-D).



- A : Effet de la variation de la KIN en présence d'une concentration fixe de GA3**
B : Effet de la variation de la BAP en présence d'une concentration fixe de GA3
C : Effet de la variation de la GA3 mg/l en présence de 0.02mg/l BAP
D : Effet de la variation de la GA3 en présence de 0.05mg/l KIN
E : Développement d'un méristème sur un milieu idéal
A.R. = après repiquage

Planche 1 : Effet des balances hormonales sur le développement des méristèmes.

3.3-Effet génération sur la micropropagation :

Le processus de la micropropagation a été déroulé dans la chambre de culture dans laquelle les conditions climatiques suivantes étaient réunies :

- Température : $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ le jour et $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ le nuit.
- Photopériode : 16 heures.
- intensité lumineuse : 5000 lux.

L'effet de cinq générations a été étudié sur la multiplication des vitroplants. Le milieu de base et celui de MS (1962) sans hormone. L'étude est basée sur le développement végétatif : longueur des tiges et nombre de nœuds (feuilles).

3.3.1- Longueur des tiges :

Les résultats obtenus montrent que la longueur de la tige varie en fonction des générations. En effet, l'analyse de la variance révèle un effet significatif de la génération sur la longueur des vitroplants. Le test de la PPDS montre trois groupes homogènes dont le premier est constitué par la G4 (9.27cm), le second par les G3, G2 et G5 et le troisième par la G1 avec 7.5 cm (figure 3.28).

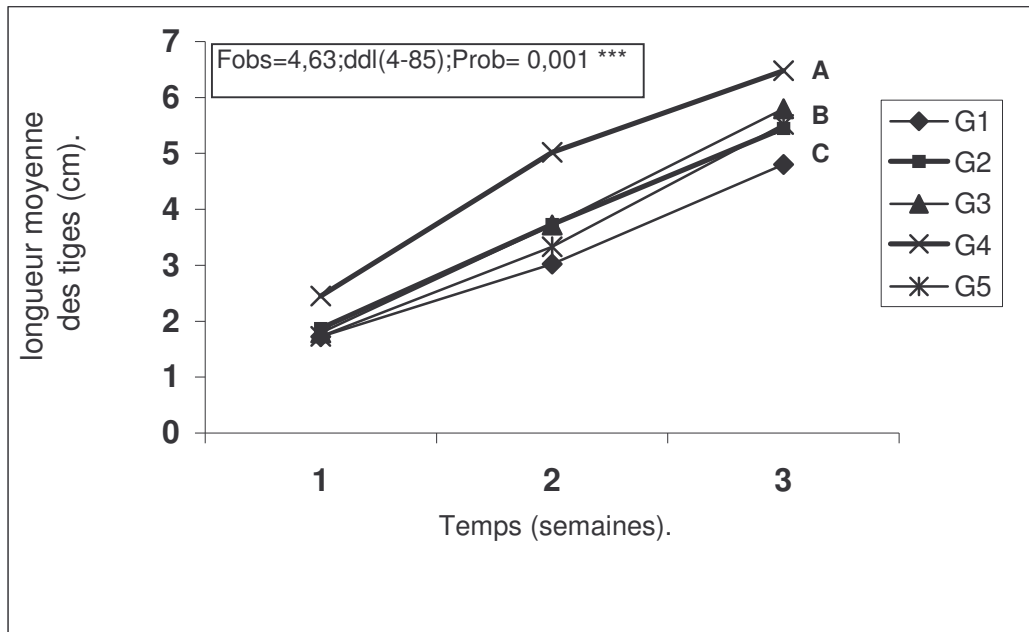


Figure 3.28 : Effet de la génération sur la longueur moyenne des vitroplants.

3.3.2-Nombre de feuilles:

L'analyse de la variance révèle l'existence d'un effet significatif de la génération sur ce paramètre. Le nombre moyen de feuilles le plus élevé est enregistré avec la 3^{ème} génération (6.48) suivi par les G4 - G2 et G1 avec respectivement 5.80 - 5.52 et 5.45. Le nombre moyen le plus faible est de 4.83 feuilles obtenu avec les vitroplants de la G5. Le test de la PPDS montre deux groupes homogènes et un groupe intermédiaire représenté par les G4, G2 et G1 (figure3.29)

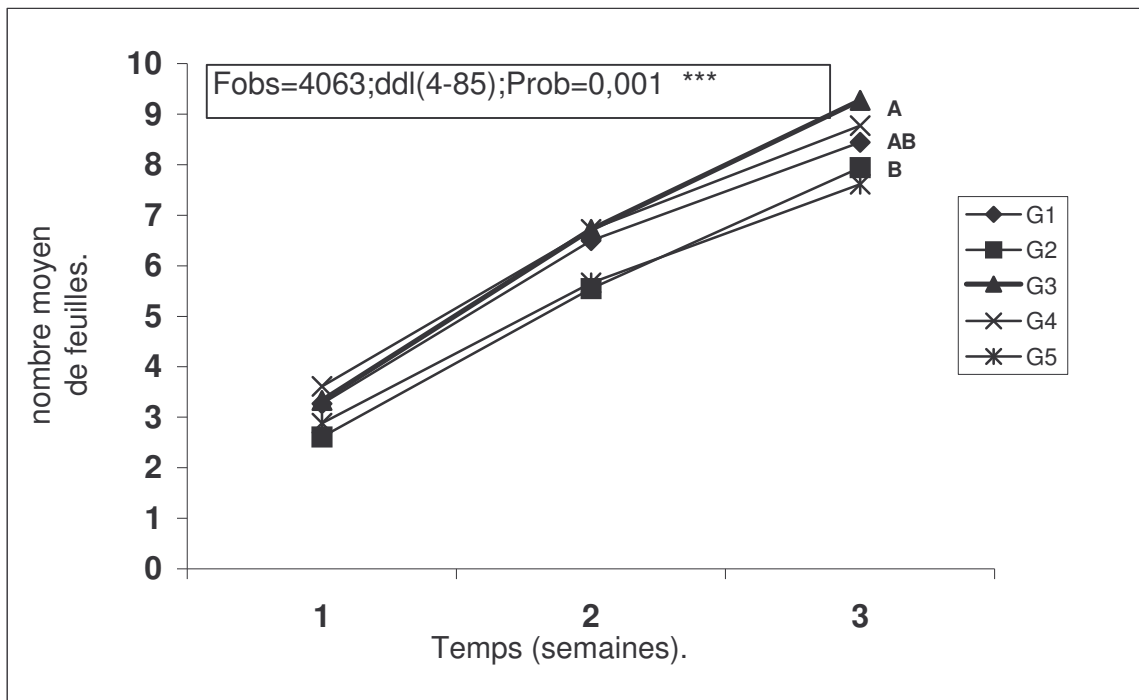
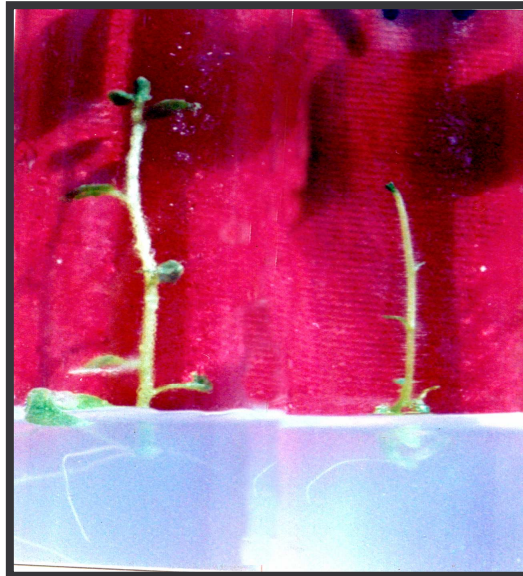


Figure3.29: Effet de la génération sur le nombre moyen de feuilles par vitroplants.

3.3.3-conclusion :

L'étude de l'effet génération montre que les générations G3 et G4 sont les plus favorables pour pratiquer une micropropagation optimale(Planche2), et ce, aussi bien en terme d'élongation des vitroplants qu'en terme de nombre d'entre-nœuds. Cependant, pour des raisons de disponibilité de vitroplants nous n'avons retenu pour la suite de travail que les générations G4 et G5.



A : Mériplants (1ere génération de la micropropagation).
B : Aspect des vitroplants développés dans une boîte magenta G2.
C : Aspect des vitroplants développés dans des tubes à essai G2.
D : Vitroplants de G4.
E : Vitroplants de G5.
F : droite : vitroplants chétif - gauche: vitroplants ordinaire.

Planche 2 : Effet de la génération sur l'aspect des vitroplants

3.3.3-Effet de la densité de plantation :

Deux générations de vitroplants ont été utilisées G4, G5. Les conditions de cultures dans la serre verre sont :

-Température journalière : $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

-Température nocturne : $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

-Photopériode : conditions naturelles (Début Février à Fin Mai).

Le substrat utilisé pour ce test est un mélange de un tiers sable des rivières et deux tiers de tourbe, ce mélange a été sélectionné suite à l'expérience précédente ayant porté sur l'étude de l'effet génération de vitroplants et type de substrat.

Dans le but d'optimiser la densité de plantation (minitubercules de qualité et en quantité suffisante) 4 densités de plantations ont été étudiées : d1 : 64 plants/m², d2 :80 plants/m², d3 :96 plants/m², d4 :144 plants/m².

Une étude biométrique a été effectuée sur le développement des plants durant les 6 premières semaines d'acclimatation. Elle a porté essentiellement sur : la longueur des tiges; le nombre de feuilles simples et composées et le nombre de ramification. La biométrie de minitubercules a été qui en dérivent a été analysée à la récolte.

3.3.3.1- longueur des tiges :

L'analyse de la variance a montré l'existence d'un effet significatif de la génération des vitroplants sur la longueur des tiges, et le test de la PPDS révèle deux groupes homogènes, ce qui prouve que la génération du vitroplants joue un rôle important sur la longueur des tiges durant la phase d'acclimatation (Figure3. 41). Par ailleurs, l'interaction génération x densité est également significative et la PPDS met en évidence 5 groupes homogènes. Ceci laisse penser qu'il existe une certaine affinité entre la génération du vitroplant et la densité de plantation en acclimatation. Ainsi, le meilleur résultat est obtenu avec le traitement G4xd4. Cependant, au lieu de voir une amélioration de la longueur de la tige pour G5 en augmentant la densité de plantation, c'est le contraire qui se produit (Figure3.41).

Par ailleurs, aucun effet densité sur ce paramètre n'a été observé, ceci laisse penser que les vitroplants se comportent de la même manière quelque soit la densité de plantation.

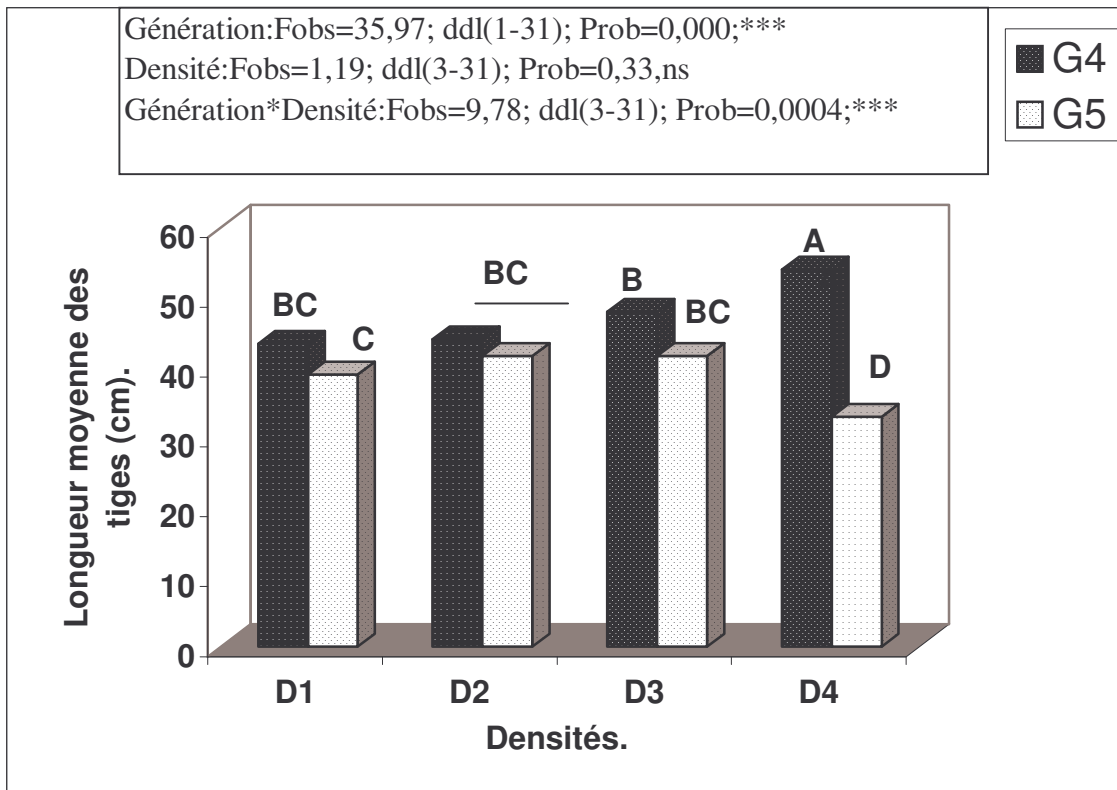


Figure 3.41 : Effet de la densité de plantation et de la génération sur la longueur moyenne des tiges à 42 jours d'acclimatation.

3.3.3.2- Nombre de feuilles :

3.3.3.2.1-Feuilles simples :

Les feuilles simples commencent à disparaître vers le 42^{ème} jour d'acclimatation laissant place aux feuilles composées. Ce phénomène a été observé quelles que soient la génération et/ou la densité de plantation.

3.3.3.2.2-Feuilles composées :

Les résultats obtenus montrent qu'il existe un effet densité sur ce paramètre. Le test de la PPDS confirme cet effet en mettant en évidence deux groupes homogènes. Le premier groupe est composé de d3, d4 et le

deuxième groupe composé de d1 et d2. Aucun effet génération n'a été observé. Cependant, l'analyse de la variance montre un effet d'interaction significatif entre les deux facteurs étudiés sur ce paramètre.

Le test de la PPDS montre ainsi cinq groupes homogènes. Le nombre moyen de feuilles composées le plus élevé a été relevé avec G4*d4 et le plus faible avec G4*d1 (figure3.42).

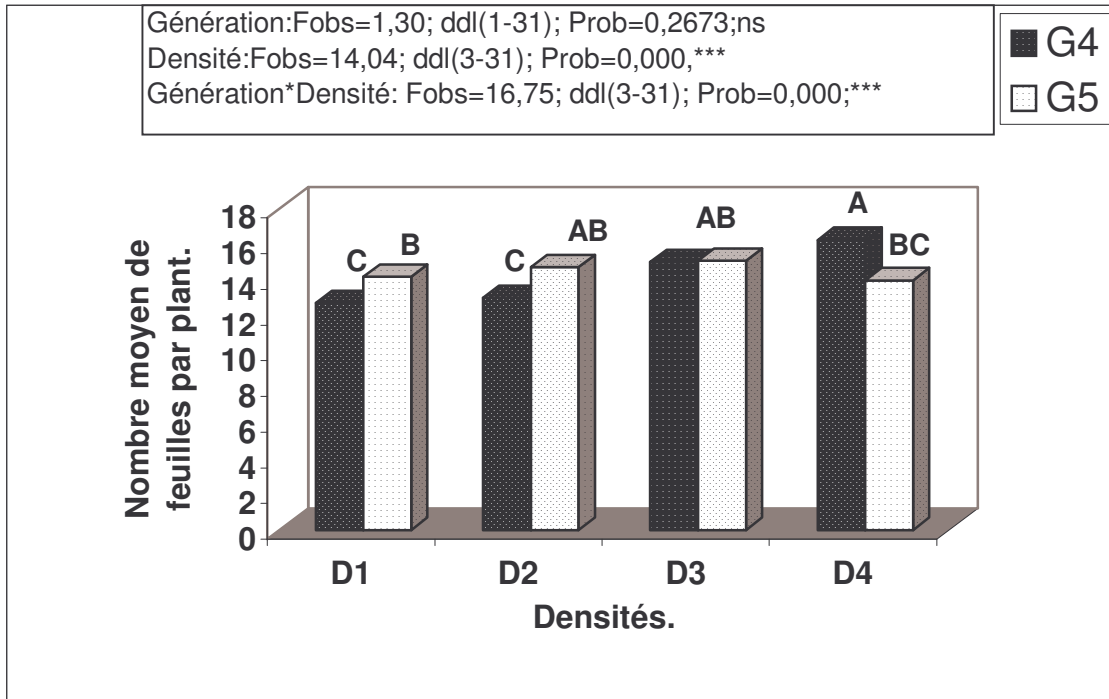


Figure 3.42 Effet de la densité de plantation et de la génération sur le nombre moyen de feuilles par plant à 42 jours d'acclimatation.

3.3.3.3 -Nombre des ramifications :

Le suivi du nombre de ramifications a été réalisé durant les six premières semaines d'acclimatation. Au delà de cette période il devient impossible de continuer les observations sur ce même paramètre (masse végétative importante). L'analyse de la variance a révélé l'existence d'un effet significatif au niveau de l'interaction génération*densité.

Le test de la PPDS a mis en évidence trois groupes homogènes dont le premier est représenté par G4*d1, G4*d2 et G5*d4. Par ailleurs, aucun effet génération ou densité n'a été relevé (Figure 3.43).

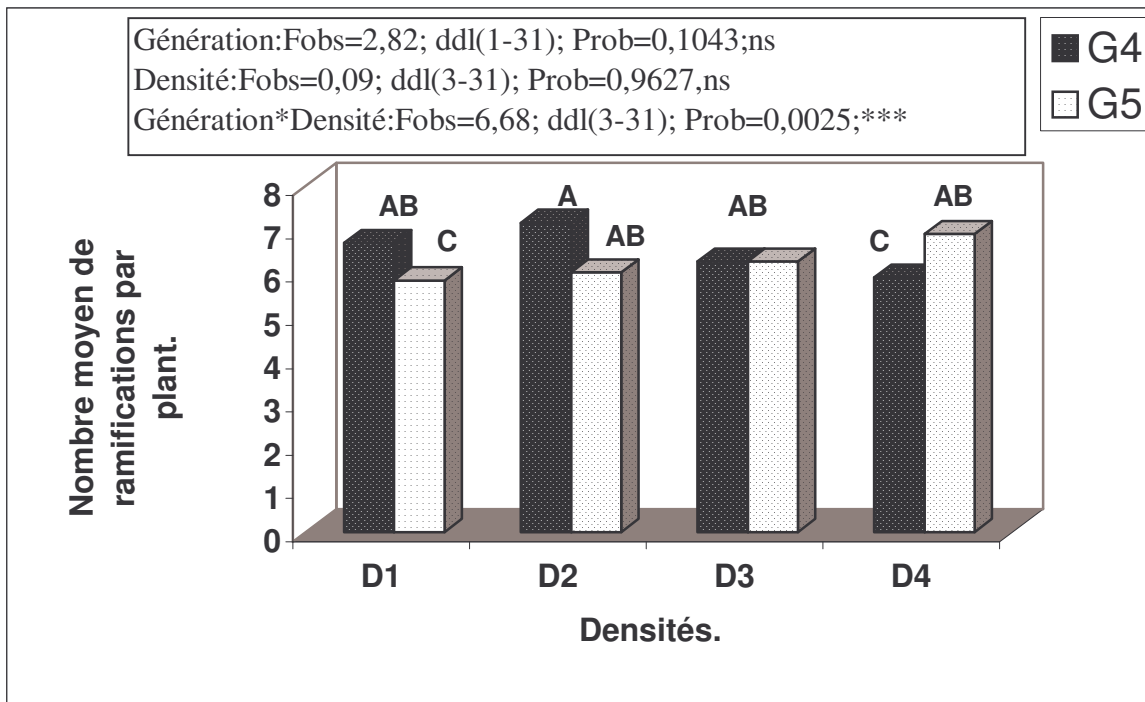


figure 3.43 : Effet de la densité de plantation et de la génération sur le nombre moyen de ramification par plant après 42 jours d’acclimatation.

3.3.3.4-Poids frais de la biomasse de la partie aérienne des plants :

3.5 L’analyse de la variance a montré l’existence d’un effet significatif de la génération sur le poids frais des plants. Le test de la PPDS confirme cet effet où deux groupes homogènes sont obtenus, discriminant ainsi G4 de la G5. L’effet de la densité de plantation s’est révélé très hautement significatif. Les plants de la plus faible densité de plantation sont ceux qui présentent le maximum de poids frais (effet de la compétition réduit), au fur et à mesure que la densité augmente, la PF diminue. Aucun effet interaction génération*densité n’a été révélé (Figure3.44).

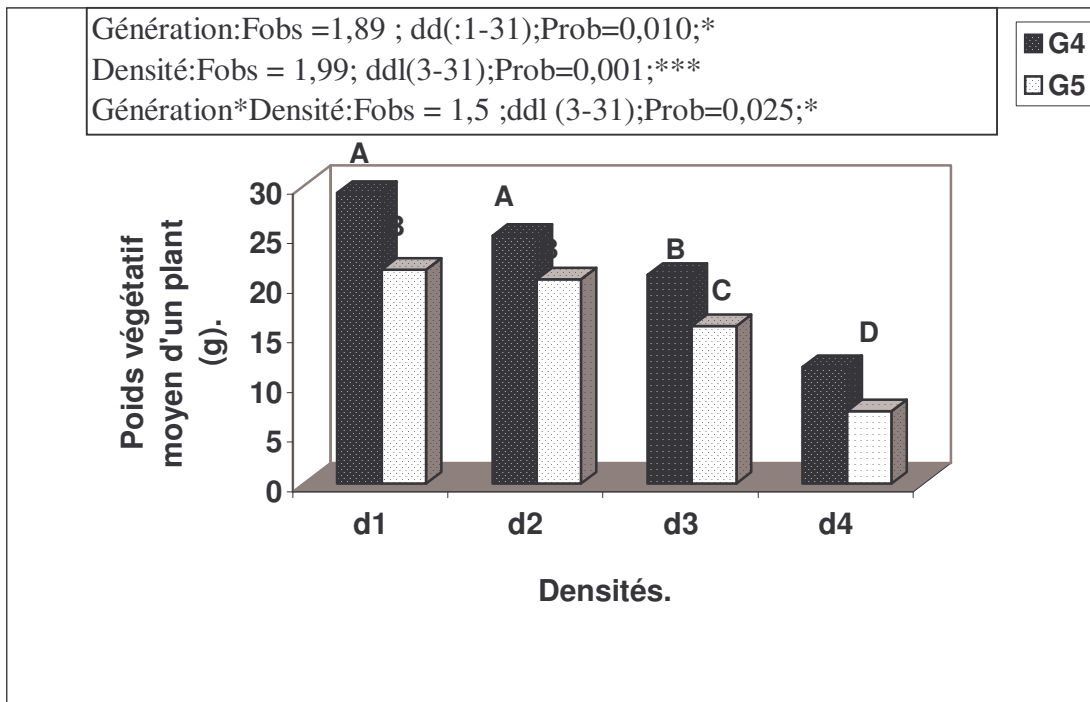


Figure 3.44 : Effet de la densité et de génération sur le poids frais des plants à la récolte.

3.3.3.5-Rendement des vitroplants en minitubercules :

L'objectif recherché par cette expérience est la recherche de la densité de plantation qui permet la production d'un maximum de minitubercules d'un calibre optimal destiné à la culture de plein champ. Le calibre des minitubercules est un critère de choix décisif dans la production la semence de pré-base. Les minitubercules produits ont été répartis selon les cinq classes de calibre de références universellement reconnues

- C1 : < 15] mm ;
- C2 :] 15 à 28] mm ;
- C3 :] 28 à 35] mm ;
- C4 :] 35 à 45] mm ;
- C5 : >] 45 mm.

3.3.5.1-Rendement total en nombre de minitubercules par plant:

L'analyse de la variance a révélé l'existence d'un effet significatif de la génération du vitroplant et de la densité de plantation sur ce paramètre. Pour l'effet génération, le nombre moyen de minitubercules par vitroplant a été obtenu avec la G4. Pour l'effet densité, le nombre le plus élevé a été enregistré avec la d1 (64 plants/m²). Le teste de la PPDS montre 3 groupes homogènes. En outre, la même analyse de la variance montre un effet interaction génération*densité significatif. Le test de la PPDS met en évidence 3 groupes homogènes dont le premier est constitué par G4*d1, le deuxième groupe par G4*d2, G4*d4, G4*d3 et G5*d1, le troisième se compose de G5*d2 et G5*d3, et un groupe chevauchant entre le deuxième et le troisième G5*d1et G4*d4 (Figure3.45).

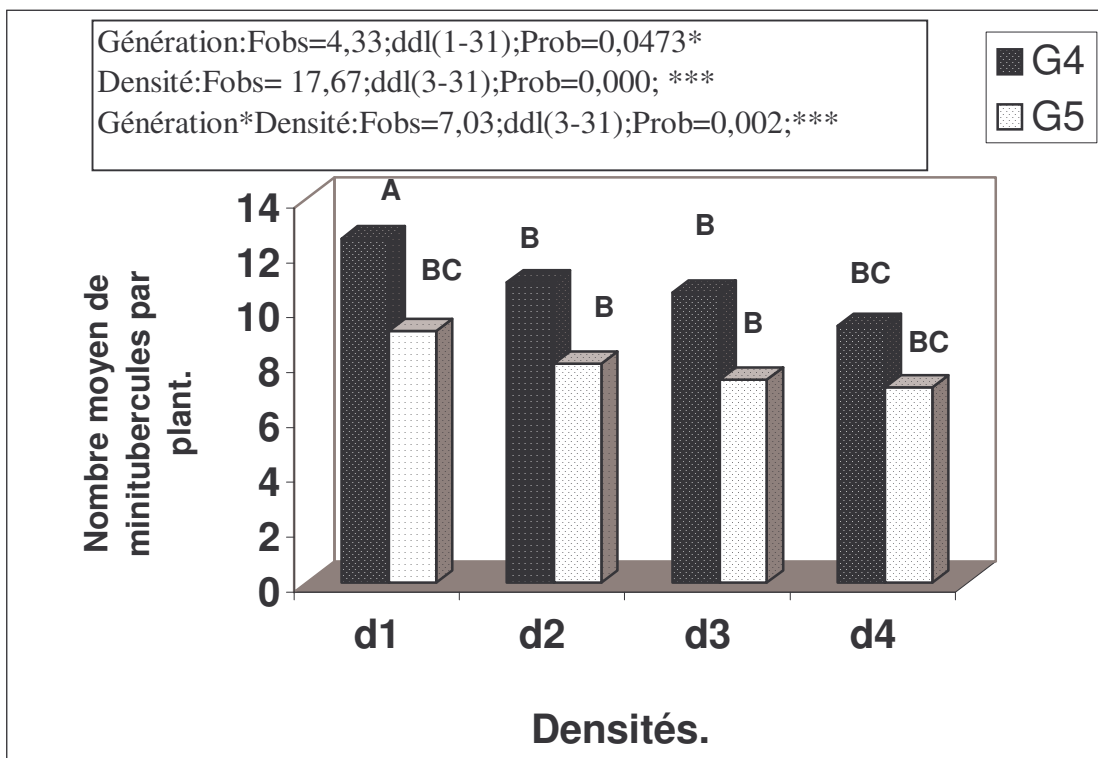


Figure3.45 : Effet de la densité de plantation et de la génération des vitroplants sur le nombre moyen de minitubercules par plant.

3.3.3.5.2-Rendement total en poids de minitubercules par plant :

L'analyse de la variance n'a pas révélé d'effet significatif de la génération sur ce paramètre, ni d'effet d'interaction génération*densité.

Elle a cependant montré l'existence d'un effet significatif de la densité de plantation sur le poids total des minitubercules produit par un plant.

Le test de la PPDS a mis en évidence quatre groupes homogènes, d'où une discrimination totale des 4 densités de plantation (Figure3.46).

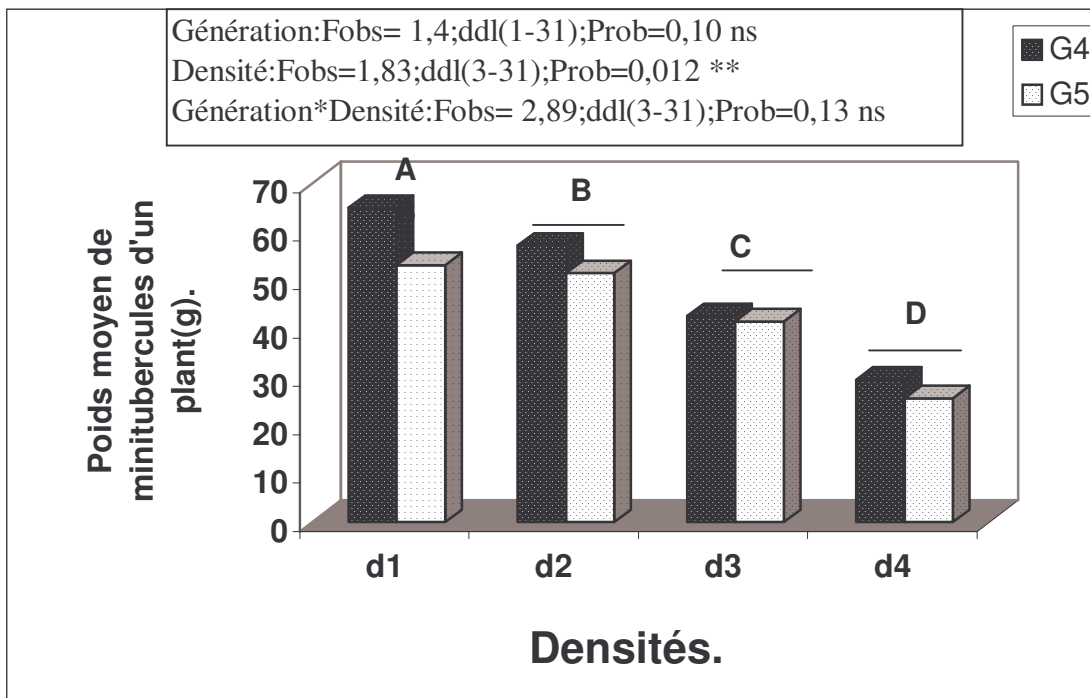


Figure3.46 : Effet de la densité de plantation et de la génération des vitroplants sur le rendement en poids des minitubercules d'un vitroplant.

3.3.3.6-Rendement en nombre de minitubercules par plant et par calibre :

3.3.3.6.1- Calibre C1 : <15 mm.

L'analyse de la variation a révélé l'existence d'un effet significatif de la génération, de la densité de plantation et de leur interaction sur le nombre de minitubercules de ce calibre. Ainsi, selon le test de la PPDS, deux groupes homogènes ont été obtenus pour l'effet interaction. Il s'agit de du groupe 1 constitué du de G4d4 et du groupe 2 constitué de toutes les autres combinaisons génération*densité (Figure3.47)

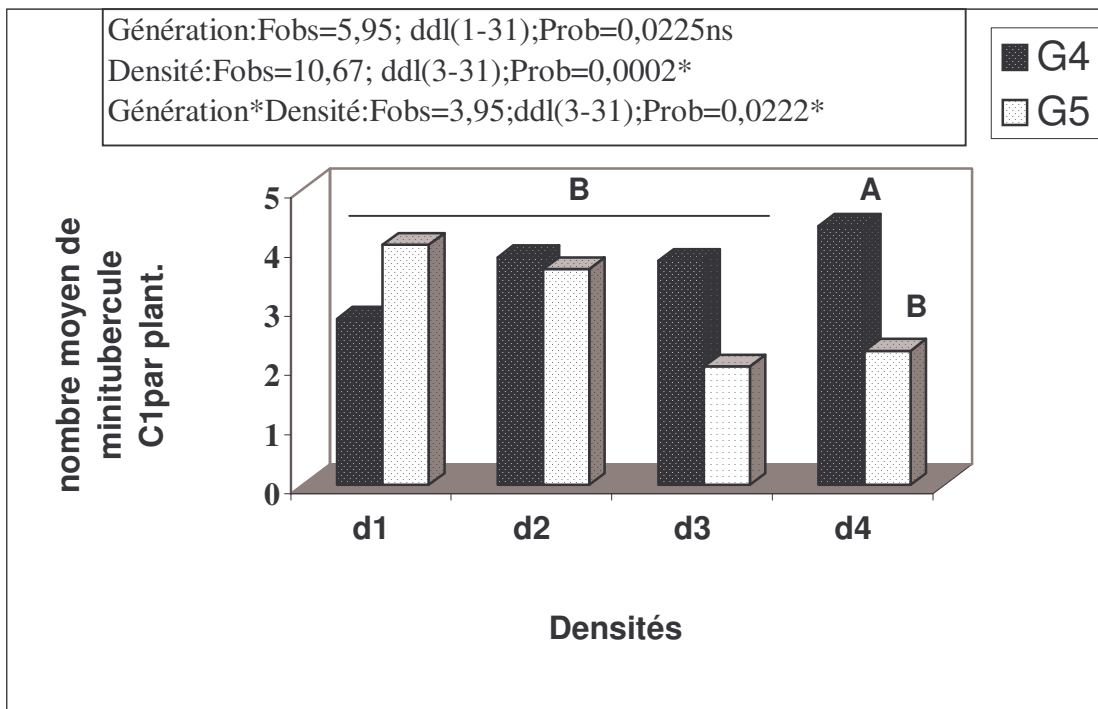


Figure3.47 : Effet de la densité de plantation et de la génération des vitroplants sur le nombre moyen des minitubercules du calibre (C1 inférieur à 15 mm) par plant.

3.3.3.6.2-Calibre C2 : 15 à 28 mm :

L'analyse de la variance n'a montré qu'un seul effet significatif, celui de la densité de plantation. Ceci a été vérifié par le test de la PPDS qui a révélé 2 groupes homogènes dont le premier est constitué de G5*d1 et le deuxième par toutes les autres combinaisons (figure3.48).

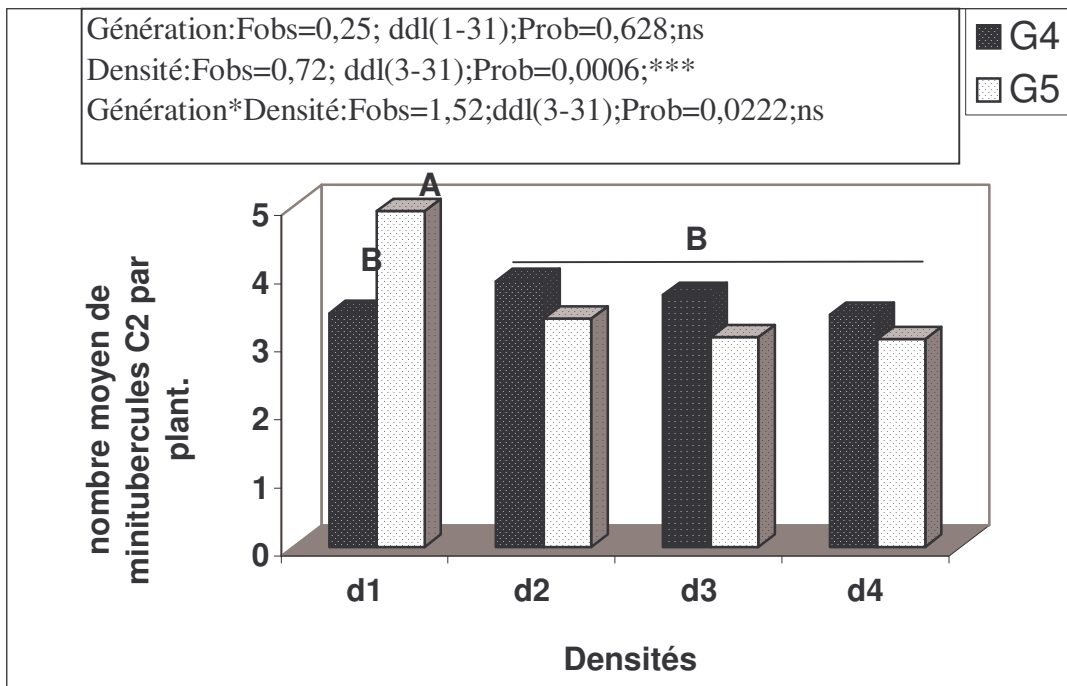


Figure3.48 : Effet de la densité de plantation et de la génération du vitroplant sur le nombre moyen des minitubercules du calibre C2 (15 à28 mm) par plant.

3.3.3.6.3-Calibres C3, C4, et C5 :

L'analyse de la variance n'a révélé aucun effet significatif ni de la génération des vitroplants ni de la densité de plantation ni de leurs interaction sur le nombre de minitubercules de calibre C3, C4 et C5 par vitroplant (figure3.49, figure3.50, figure3.51).

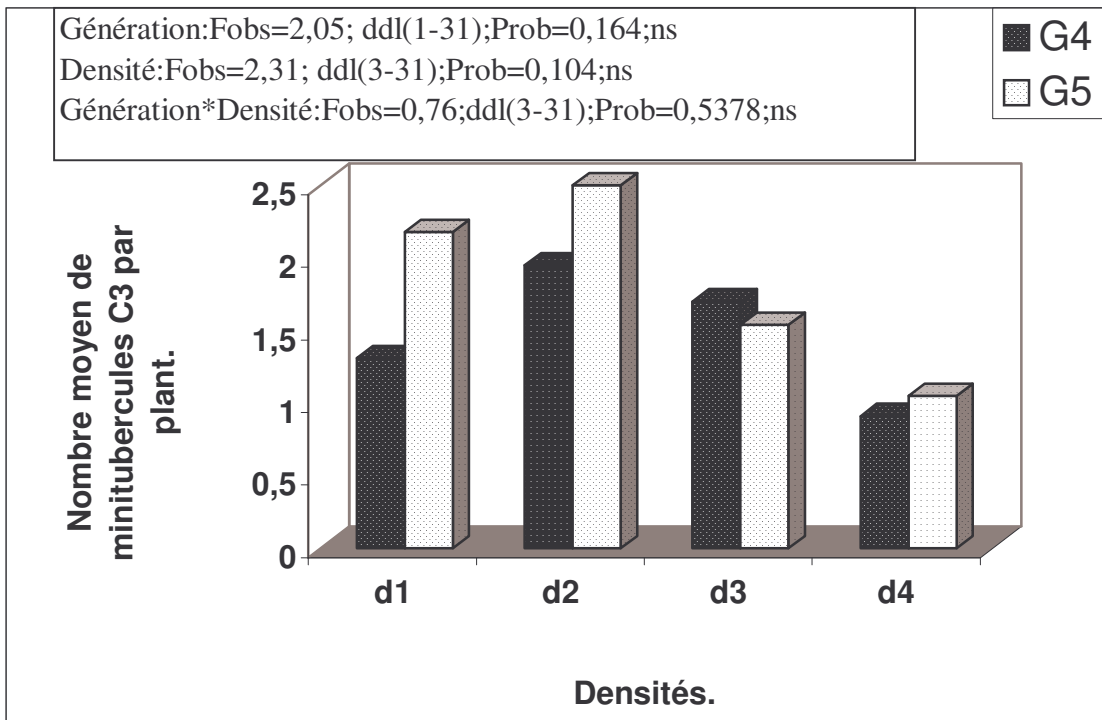


Figure3.49 : Effet de la densité de plantation et de la génération du vitroplant sur le nombre moyen de minitubercules C3 (28 à 35 mm) par plant.

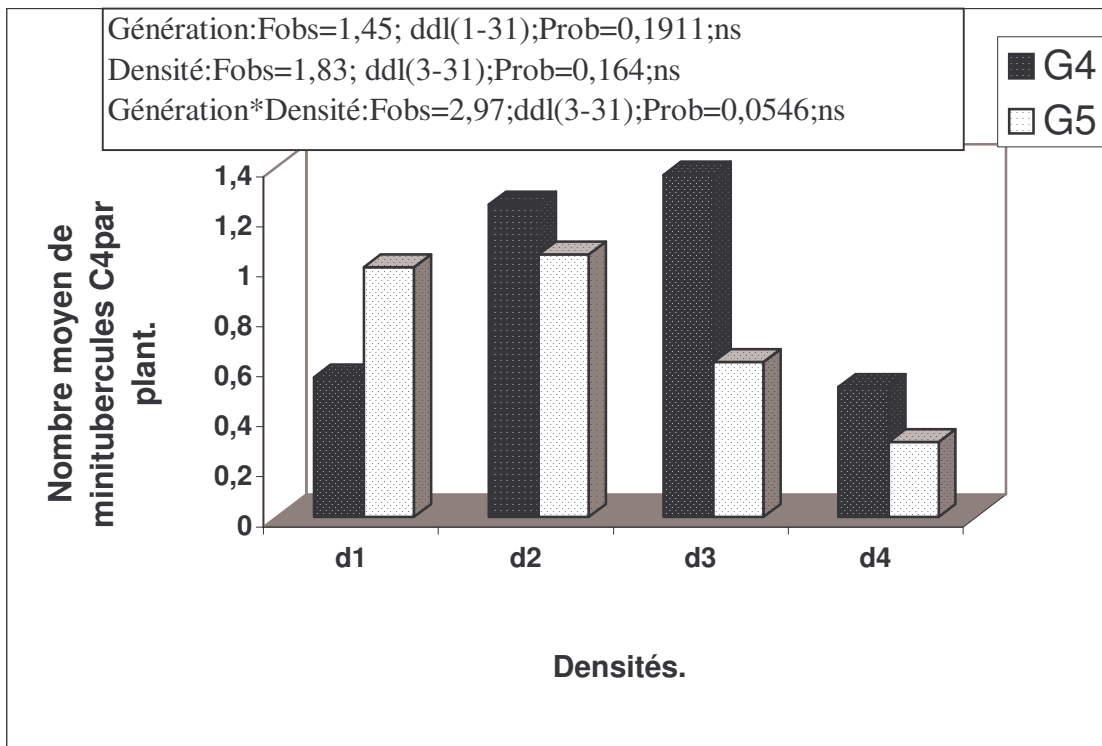


Figure3.50 : Effet de la densité de plantation et de la génération du vitroplant sur le nombre de minitubercules du calibre C4 (35 à 45 mm) par plant

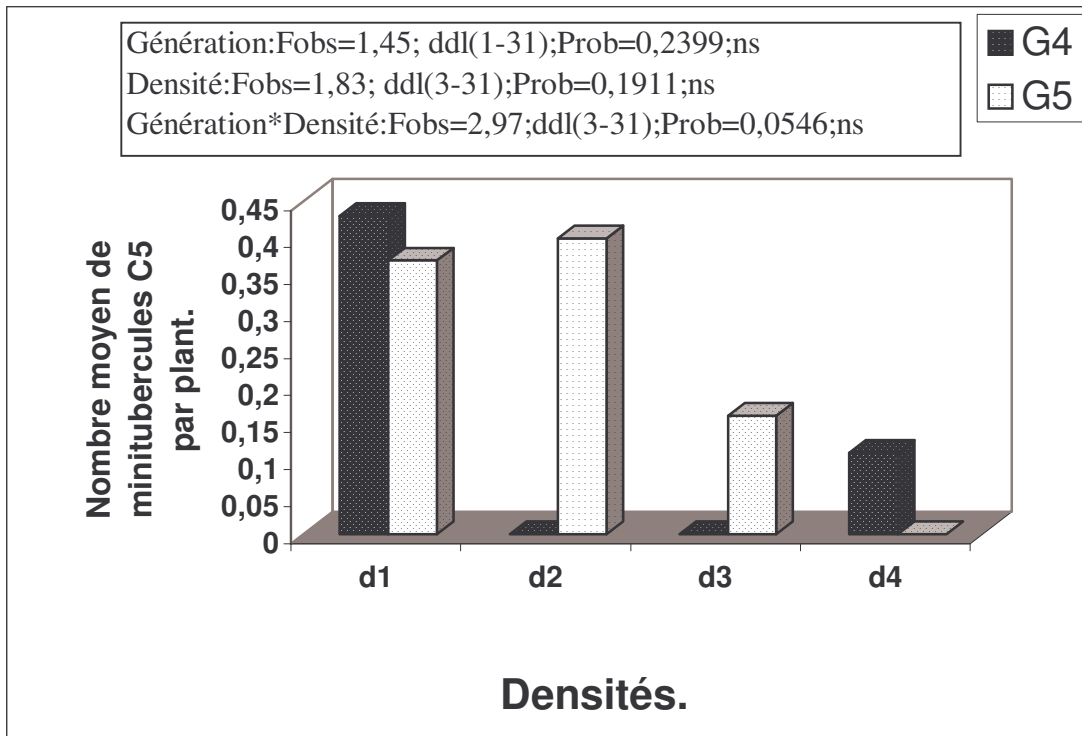


Figure3.51 : Effet de la densité de plantation et de la génération du vitroplant sur le nombre de minitubercules du calibre C5 (> 45 mm) par plant

3.3.3.7- Effet de la densité de plantation et de la génération des vitroplants sur la production des minitubercules par m² de la G0 sous serre en verre :

Pour une meilleure analyse des résultats obtenus lors de l'étude de l'effet de la densité de plantation sur le rendement des vitroplants cultivés sous une serre en verre, nous avons juger nécessaire la réalisation d'une étude statistique des données obtenus par unité de surface(1 m²). C'est un paramètre représentatif pour la rentabilité de la serre installée.

3.3.3.7.1- Effet de la densité de plantation et de la génération des vitroplants sur le poids frais de la biomasse de la partie aérienne des plants d'un m² :

le poids frais de la biomasse végétatif a été étudié le jour de la récolte (stade sénescence). L'analyse de la variance met en évidence un effet significatif de la génération sur ce paramètre. Le test de la PPDS confirme ces résultats et deux groupes homogènes sont dégagés, le premier est constitué par la G4 et le deuxième par la G5.

L'effet densité est également significatif et le test de la PPDS révèle la présence de quatre groupes homogènes le premier est composé de d2, le deuxième groupe par d3, le troisième groupe par d1 et le quatrième par d4. L'effet interaction génération*densité est également significatif et le test de la PPDS met en évidence huit groupes homogènes. (Figure3.52).

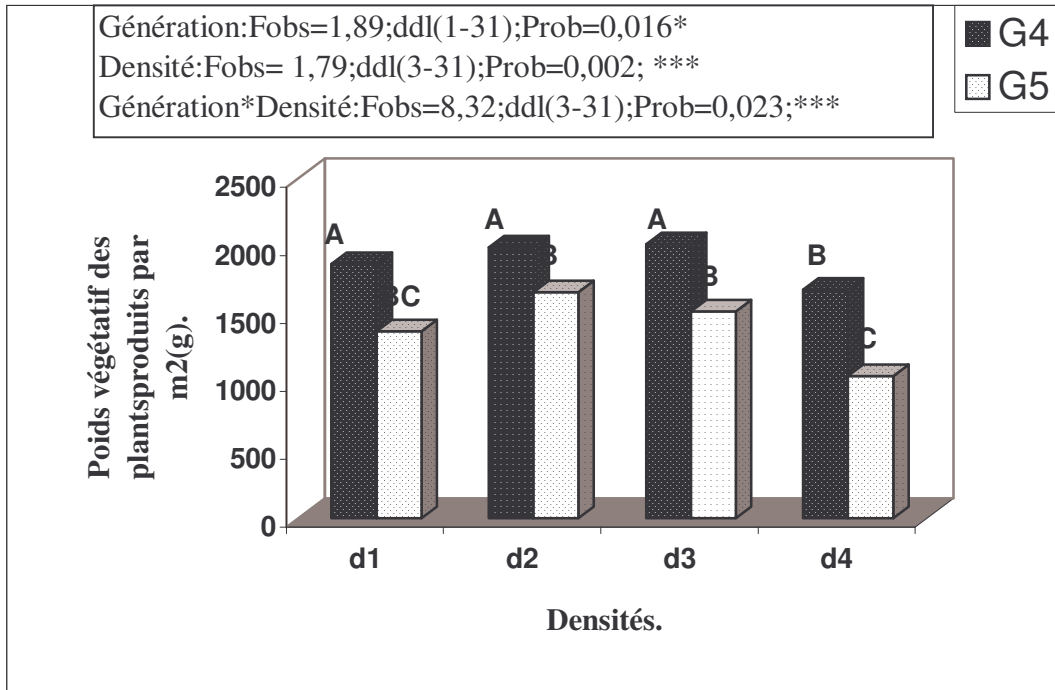


Figure 3. 52 : Effet de la densité de plantation et de la génération des vitroplants sur le poids frais de la biomasse de la partie aérienne des plants d'un m².

3.3.3.7.2- Effet de la densité de plantation et de la génération des vitroplants sur le poids frais des minitubercules produits par un m² :

L'analyse de la variance a révélé la présence d'un effet significatif des deux générations de vitroplants sur le poids frais des minitubercules produits par m². Le poids frais le plus élevé a été obtenu par les plants de la 4^{ème} génération. Ainsi, le test de la PPDS a mis en évidence deux groupes homogènes. Le premier est composé par la G4 et le deuxième par la G5 (figure 3.53).

Concernant l'effet de la densité de plantation sur le poids frais moyen des minitubercules par m² il est également significatif, et le poids frais le plus élevé a été enregistré avec les plants plantés à la densité d2 (80 plants/m²).

Le test de la PPDS montre quatre groupes homogènes (figure3.53). De même l'effet interaction génération*densité a montré un effet significatif. Le test de la PPDS a mis en évidence huit groupes homogènes (Figure3.53).

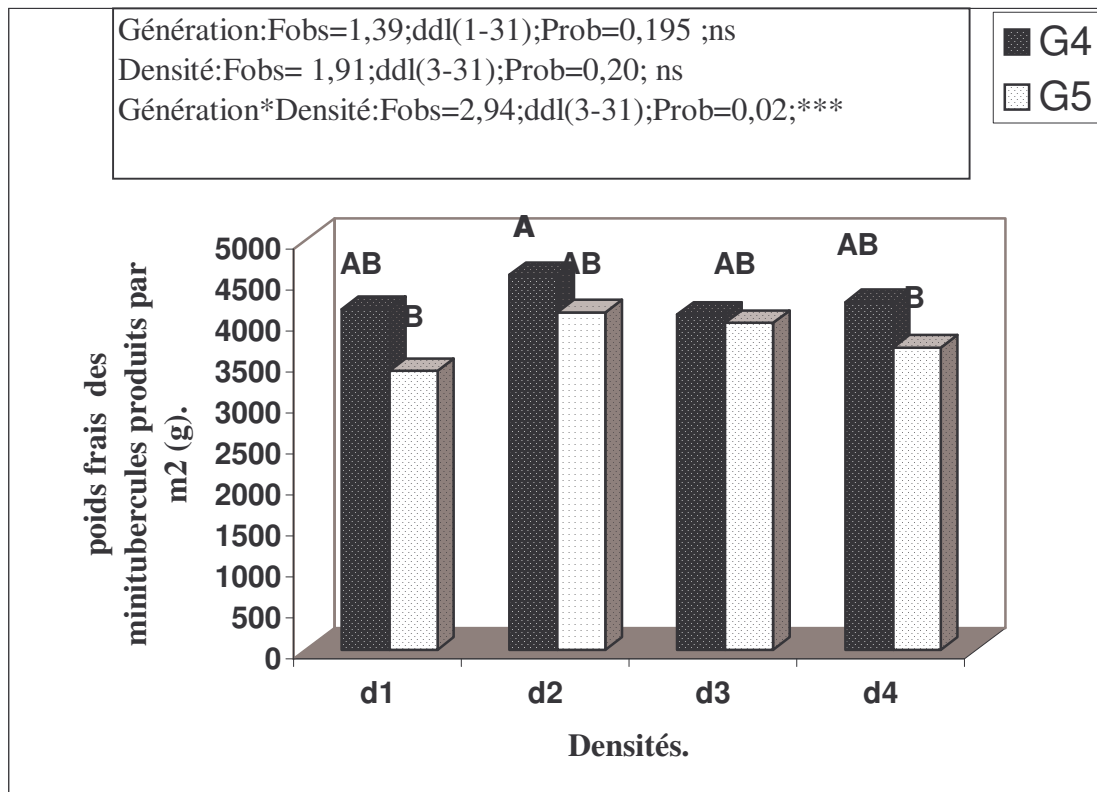


Figure3. 53 :Effet de la densité de plantation et de la génération des vitroplants sur le poids frais des minitubercules produits par m²

3.3.3.7.3- Effet de la densité de plantation et de la génération des vitroplants sur le nombre de minitubercules produits par m²

L'analyse de la variance a révélé la présence d'un effet significatif de la génération des vitroplants sur ce paramètre. Le nombre le plus élevé de minitubercules a été donné par la 4^{ème} génération. Ainsi, deux groupes homogènes sont obtenus. Le premier est constitué par la G4 et le deuxième groupe par la G5 (figure.3.54).

Pour l'effet densité de plantation sur le rendement en nombre de minitubercules des vitroplants par m² est très hautement significatif. Le nombre moyen de minitubercules le plus élevé a été enregistré par les plants de la d4 (144 plants/m²). Le teste de la PPDS a donné 04 groupes homogènes (figure3.54).

De même, l'analyse de la variance a montré un effet interaction génération* densité très hautement significatif et le test de la PPDS a mis en évidence huit groupes homogènes (Figure 3. 54).

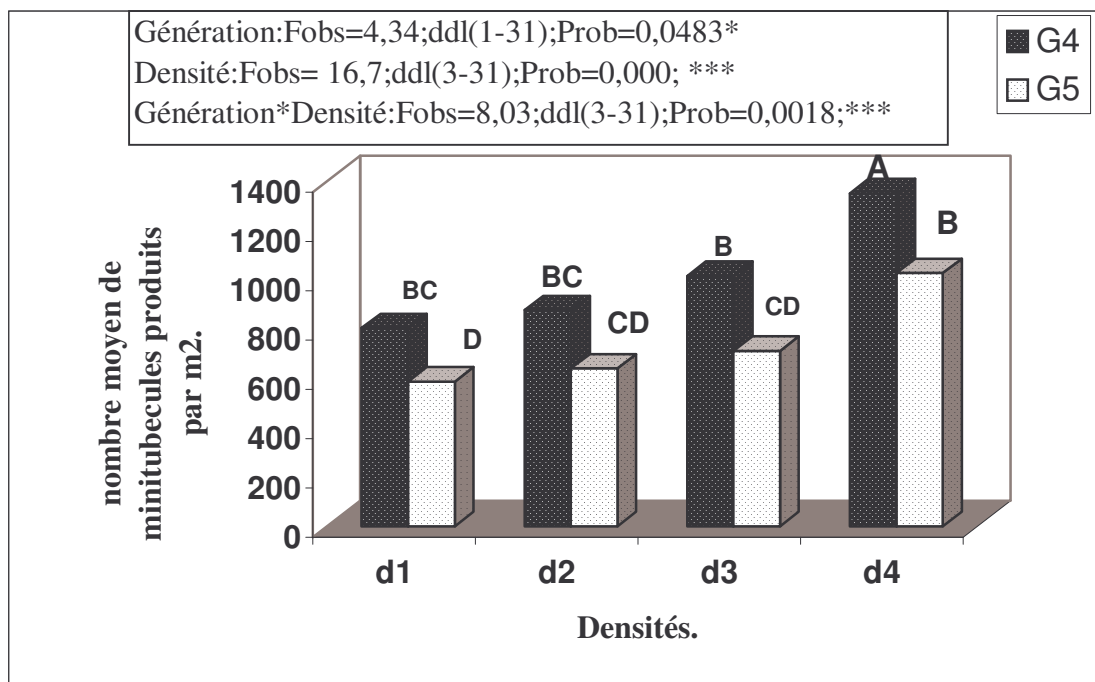


Figure3.54: Effet de la densité de plantation et de la génération des vitroplants sur le nombre des minitubercules produits par m²

3.3.3.3.7- Conclusion :

les résultats obtenus montrent qu'il y'a un effet significatif de la génération des vitroplants sur le rendement d'un plant aussi bien en poids frais de la biomasse végétative qu'en poids frais des minitubercules et surtout sur le nombre des minitubercules produits par m², et ce quelle que soit la densité de plantation.

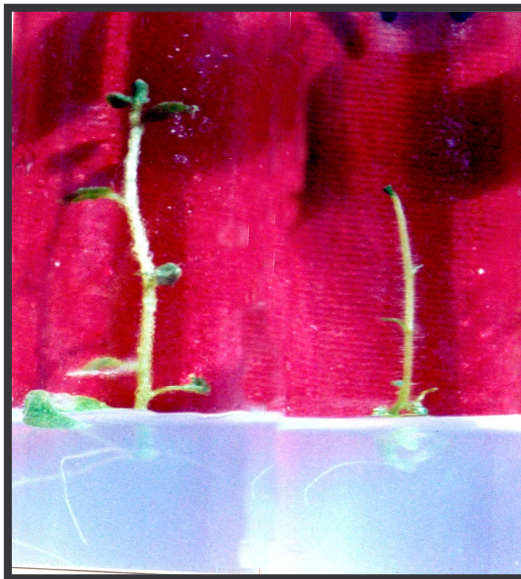
Les densités de plantation étudiées ont donné des poids de minitubercules fils sensiblement différent.

Cette différence est expliquée par le nombre de minitubercules produits par m^2 , Ainsi on remarque qu'à chaque fois que la densité par m^2 augmente le rendement d'un vitroplant tend à diminuer, mais le rendement par m^2 reste important.

D'une manière générale le substrat retenu lors de l'expérience précédente a donné également de bons résultats lors de cette expérience

Les densités de plantation étudiées et d'une manière générale n'ont pas eu de grandes différences ce qui nous conduit à dire qu'il faut exploiter au maximum la surface de la serre installée, c-à-d on peut opter pour la densité 144 plants / m^2 .

Par ailleurs, la densité de plantation a révélé également un effet significatif aussi bien sur le poids des minitubercules que sur leur nombre par unité de surface.



- A : Mériplants (1ere génération de la microproagation).
- B : Aspect des vitroplants développés dans une boîte magenta G2.
- C : Aspect des vitroplants développés dans des tubes à essai G2.
- D : Vitroplants de G4.
- E : Vitroplants de G5.
- F : droite : vitroplants chétif - gauche: vitroplants ordinaire.

Planche 2 : Effet de la génération sur l'aspect des vitroplants

3.4-Acclimatation en conditions contrôlées sous serre en verre:

3.4.1- Conditions d'acclimatation :

Cette étape consiste à transférer les vitroplants des conditions de l'*in vitro* vers un substrat qui permet leur développement en conditions semi naturelles (en serre). Les deux générations de multiplication *in vitro* utilisées G4 et G5 sont issues de méristèmes obtenus au cours des tests de l'optimisation de la meilleure balance hormonale en culture de méristème qui sont (0.02 mg/l de BAP plus 0.1mg/l AG3/L) et (0.05 mg/l de kinétine plus 0.1 mg/l GA3).

L'irrigation par aspersion (alimentation par feuillage) a été réalisée durant la première semaine de la culture car le système racinaire n'est pas suffisamment bien développé. Elle semble jouer un rôle important sur le taux de reprise des vitroplants en acclimatation, par la suite et tout au long du cycle elle a été faite par le système goutte à goutte.

Un premier apport de substrat à 21 jours avant d'apporter l'engrais (même substrat utilisé initialement pour chaque traitement (pasteurisé)) s'avère d'une grande importance pour l'émission des stolons et favorise les ramifications. Afin d'éviter le verdissement des minitubercules et augmenter leur nombre par plant un 2ème apport est réalisé à 42 jours et juste avant la fertilisation. L'utilisation ou non de la solution KNOP à 10% (habituellement utilisée par la SAGRODEV au début de l'acclimatation) ne semble présenter aucun effet sur la reprise des vitroplants.

Concernant la fertilisation, le 1^{er} apport d'engrais (50% des besoins de la plante avec l'ACTIVEG puissance 20 : N.P.K)) est effectué par irrigation à 21 jours de la plantation. Cet apport est bénéfique pour une bonne croissance végétative ainsi que pour l'émission des stolons. Un 2ème apport d'engrais est effectué par pulvérisation sur feuillage (50% des besoins restants) à 42 jours de culture. Ce deuxième apport est plutôt bénéfique pour le grossissement des minitubercules et leur maturité.

Les traitements phytosanitaires (fongicides et insecticides) ont été appliqués pour prévenir d'éventuelles attaques.

L'application de ces produits systémiques de contact se fait d'une manière alternée une fois tous les 15 jours. Parallèlement à tous les traitements culturaux, des échantillonnages sont effectués régulièrement

pour vérifier l'état sanitaire des clones en acclimatation. Les résultats de l'état sanitaire sont donnés au niveau du chapitre assainissement.

Durant la phase d'acclimatation deux expériences ont été réalisées : la première a porté sur l'étude de l'effet génération combiné avec quatre substrats différents, et la deuxième a porté sur l'étude de l'effet génération combiné avec quatre densités de plantation.

3.4.2-Effet du substrat :

Les quatre substrats utilisés sont : SN1 (1/2 Sable Noire +1/2 Tourbe) ; SN2 (1/3 Sable Noire +2/3Tourbe) ; SR1 (1/2 Sable Rouge+1/2 Tourbe) et SR2 (1/3 Sable Rouge +2/3Tourbe). Deux générations de vitroplants ont été également utilisées G4, G5.

Les conditions de culture dans la serre verre sont : Température journalière : $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$; Température nocturne : $18\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ et Photopériode naturelle (du début Novembre - Février).

3.4.2.1-Longueur des tiges :

Les résultats obtenus montrent qu'il existe surtout un effet substrat sur la longueur des vitroplants en acclimatation. Le test de la PPDS confirme l'existence de l'effet substrat en révélant deux groupes homogènes. Le premier est constitué par les substrats SR1, SN2 et SR2, sur lesquels nous n'avons observé aucun effet génération. Le deuxième groupe est constitué par le substrat SN1 qui donne des résultats inférieurs à ceux obtenus avec les substrats précédents. Par ailleurs nous n'avons relevé aucun effet d'interaction génération substrats, ce qui revient à dire que pour ce paramètre, les deux générations étudiées se comportent de la même façon quel que soit le substrat (Figure3.30)

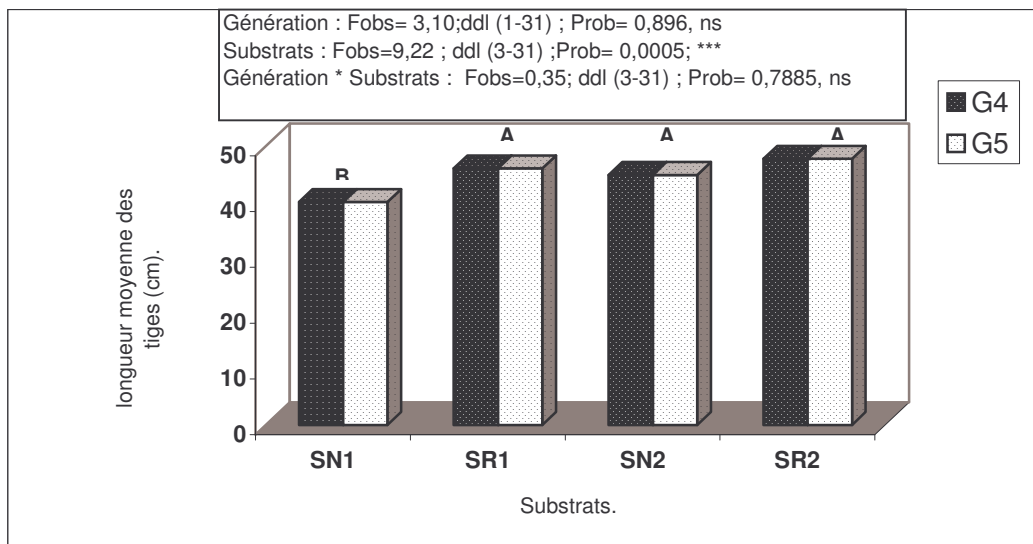


Figure 3.30 : Effet du substrat et de la génération sur la longueur des vitroplants après 42 jours.

3.4.2.2-Nombre de feuilles :

3.4.2.2.1- Feuilles simples :

Les vitroplants continuent de développer des feuilles simples durant les trois premières semaines de l'acclimatation. Ensuite un deuxième type de feuilles dites composées commencent à apparaître pour remplacer peu à peu les feuilles simples. Au 42^{ème} jour de culture les feuilles simples disparaissent complètement. Pour ce dernier type de feuilles aucun effet substrat, génération ou interaction n'a été observé.

3.4.2.2.2- Feuilles composées :

Globalement nous avons observé les mêmes résultats que pour la longueur des tiges, c'est à dire, un effet substrat significatif engendrant deux groupes homogènes. Le premier est constitué des substrats SR1, SN2 et SR2 et le deuxième par le substrat SR1. Aucun effet génération ni interaction génération * substrat n'a été observé (Figure 3.31).

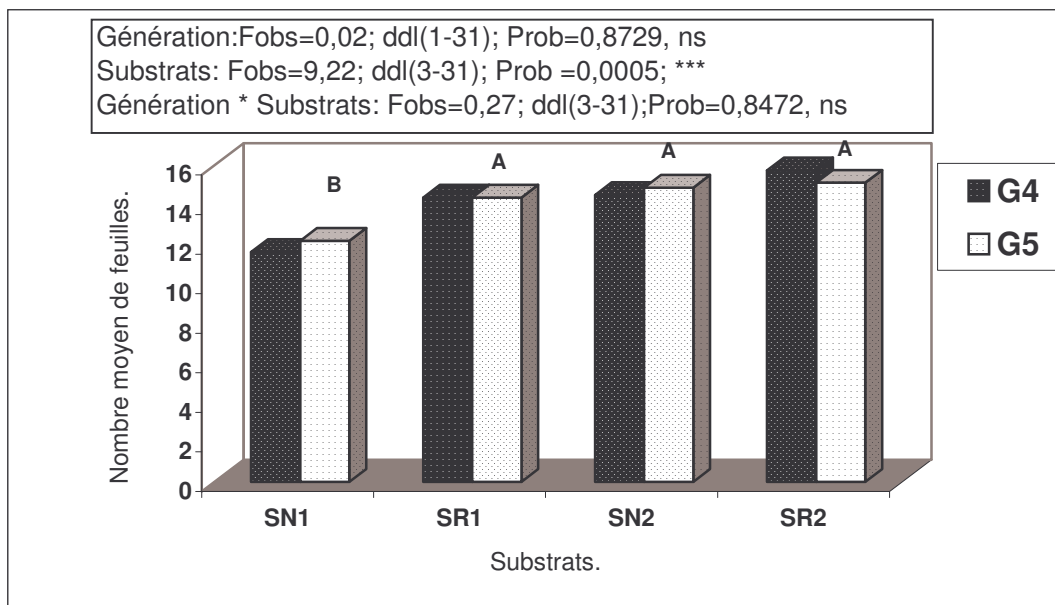


Figure 3.31: Effet du substrat et de la génération sur le nombre moyen de feuilles par vitroplant après 42 jours.

4.2.3-Ramifications :

L'apparition des ramifications est un signe d'un développement des plants dont la croissance signifie l'augmentation de la masse végétative. Cette dernière augmente la photosynthèse d'une part et constitue un élément très important pour le steem-cutting si nous voulons intensifier un clone donné pour palier au manque de vitroplants. Les premières ramifications apparaissent à la fin du premier mois de culture. Leur nombre et leur taille restent cependant faibles. Comme les deux paramètres précédents, l'analyse de la variance a montré un effet substrat très hautement significatif. La PPDS montre deux groupes homogènes, le premier est constitué des substrats SR2 et SN2, et le deuxième par les substrats SR1 et SN1. Aucun effet génération ni interaction génération * substrat n'a été observé (Figure3.32).

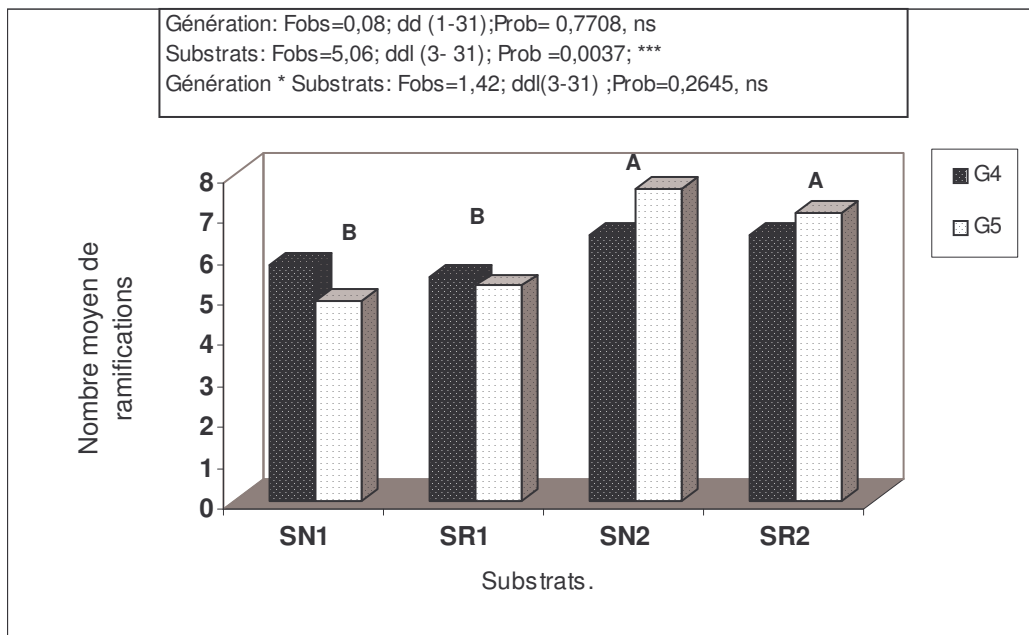


Figure 3.32 : Effet du substrat et de la génération sur le nombre moyen de ramifications par vitroplant après 42 jours.

3.4.2.4-Biomasse fraîche (poids frais à la récolte):

Les pesées ont été effectuées lors de la récolte (stade sénescence). A ce stade, le poids végétatif est trop faible car les vitroplants ont déjà perdu toutes leurs réserves et leurs contenus en eau ayant été mobilisés vers les minitubercules. L'analyse de la variance a mis en évidence l'existence d'un effet significatif de la génération, du substrat et d'une interaction génération * substrat sur la croissance de la biomasse végétative des vitroplants acclimatés. Les vitroplants de la 4^{ème} génération présentent une biomasse plus importante que ceux de la 5^{ème} génération et ce sur les substrats SR2 et SN2. Par contre sur les substrats SN1 et SR1 les vitroplants des deux générations ont développé une biomasse plus faible que celle obtenue sur les substrats SR2 et SN2. L'effet interaction génération * substrat a été significatif et le test de la PPDS montre 3 groupes homogènes. Le premier groupe est constitué de : SR2-G4 et SN2-G5. Le deuxième groupe est constitué de SR1*G4, SR1*G5, SN1*G4 et SN1*G5. Le troisième groupe est constitué de SN2*G5 et SR2*G5 (Figure3.33).

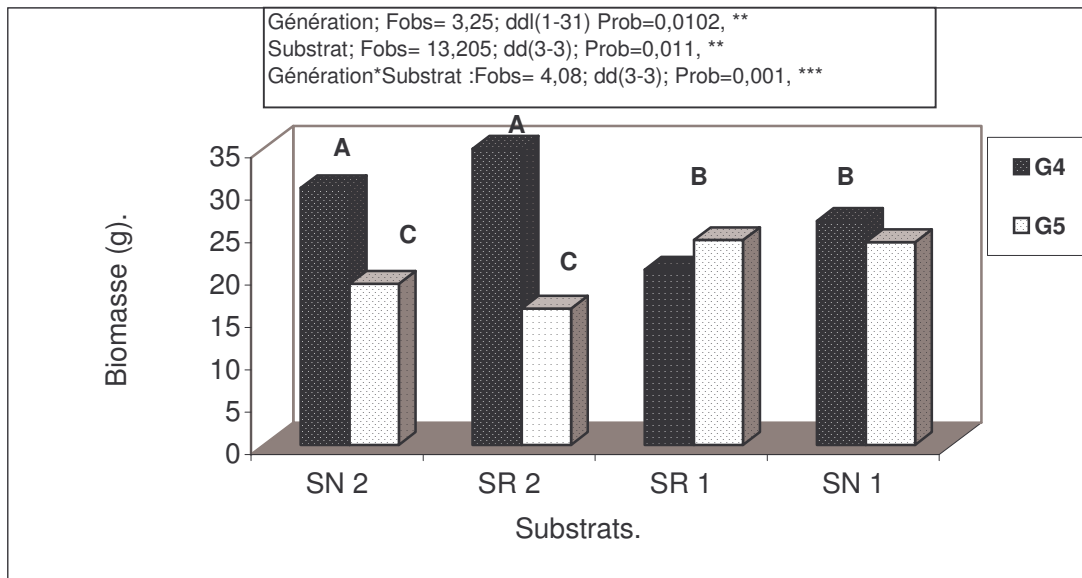


Figure 3.33 : Effet du substrat et la génération sur biomasse des vitroplants à la récolte.

3.4.2.5- Rendement en minitubercules :

L'objectif recherché à travers l'acclimatation est la production d'un nombre important de minitubercules d'un calibre approprié pour la culture de plein champ, d'où la classification des minitubercules selon les cinq classes de calibre de références : C1 (> 15 mm) ; C2 (15 à 28 mm) ; C3 : (28 à 35 mm) ; C4 (35 à 45mm) et C5 (> 45 m

3.4.2.5.1- Nombre total de minitubercules produits par plant :

L'analyse de la variance montre à la fois un effet génération et un effet substrat significatifs Les générations G4 et G5 donnent des résultats différents en terme de rendement total en minitubercules. La G4 donne un rendement total supérieur à celui obtenu avec la G5 et ce, quel que soit le substrat utilisé.- De même, les substrats donnent également des rendements totaux différents. La PPDS révèle deux groupes homogènes pour les deux générations: Pour les deux générations, SN2 et SN1 constituent le premier groupe et SR2 et SR1 constituent le deuxième groupe.

L'analyse de la variance révèle par ailleurs un effet significatif de l'interaction génération substrat, et le test de la PPDS montre ainsi trois groupes homogènes

Le premier groupe est constitué de SN2*G4 et SN1*G4, le deuxième par SR2*G4, SN2*G5 et SR1*G4 et le troisième groupe par SR2* G5, SR1*G5 et SN1*G5. Ceci nous permet de conclure que le substrat SN2 améliore les potentialités de la G5 pour donner un rendement en minitubercules équivalent à celui obtenu avec la G4 sur les substrats SR2 et SR1 (figure3. 34).

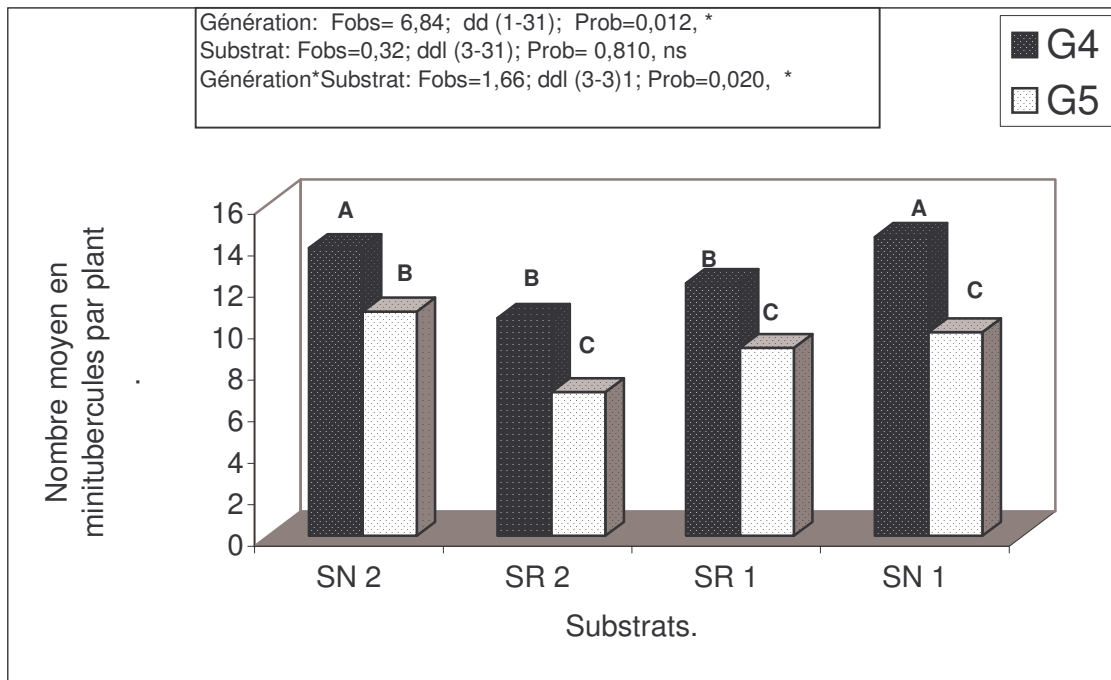


Figure 3.34 : Effet du substrat et de la génération sur le rendement moyen en minitubercules par plant.

3.4.2.5.2- Poids des minitubercules produits par plant :

L'analyse de la variance a montré l'existence d'un effet significatif de substrat ainsi qu'une interaction génération*substrat pour ce paramètre.

Ainsi, le poids le plus élevé a été obtenu avec les vitroplants plantés sur le substrat SN2. Le test de la PPDS a mis en évidence trois groupes homogènes : Le premier groupe est composé de SN2*G4 et SN2*G5, le deuxième par SN1*G4, SN1*G5 et le troisième groupe par SR2*G4 , SR2*G5 et SN1*G5.

Ceci nous permet de conclure que le facteur génération n'a pas d'effet sur le poids des minitubercules produits sur les différents substrats (Figure3.35).

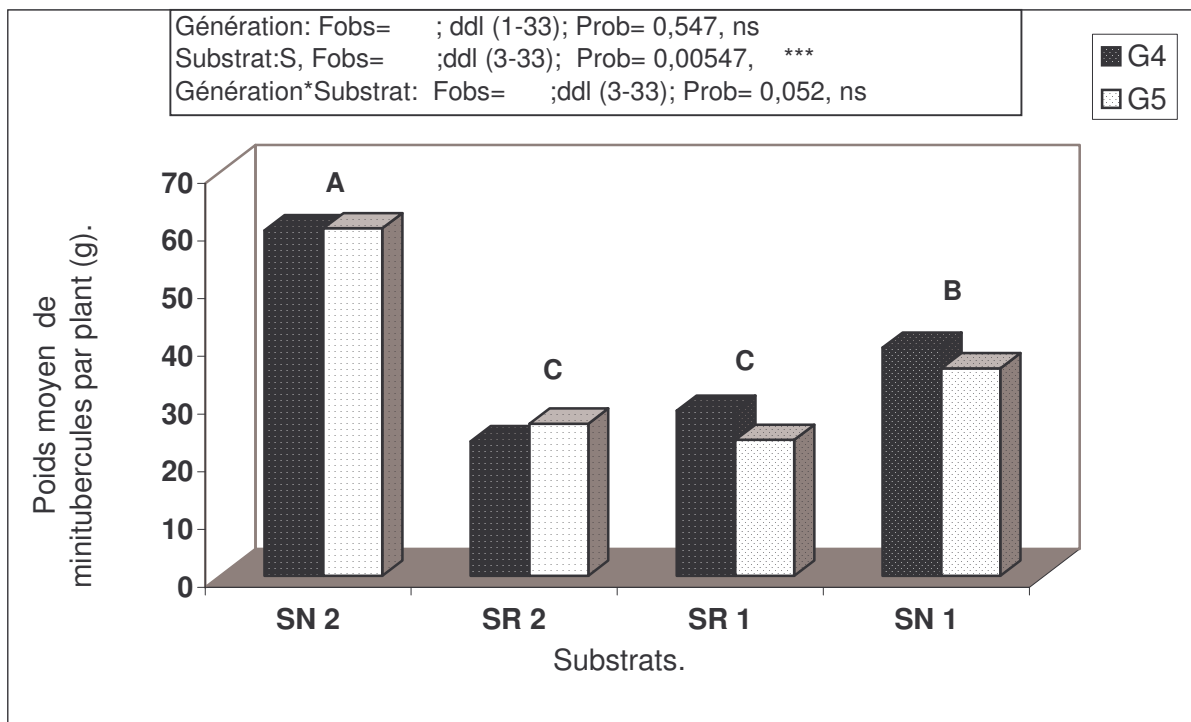


Figure 3.35 : Effet du substrats et de la génération sur le poids moyen des minitubercules produits par plant.

3.4.2.6- Nombre de minitubercules produits par plant et par calibre :

L'effet du substrat et de la génération sur le nombre de minitubercules a été traité calibre par calibre et par plant.

3.4.2.6.1-Calibre : C1 < 15mm :

L'analyse de la variance a révélé l'existence d'un effet significatif de la génération du vitroplant sur le nombre de minitubercules de ce calibre. Le test de la PPDS montre des différences significatives dues à l'effet génération. Ainsi deux groupes homogènes sont obtenus : G4 : A ; G5 : B. Par ailleurs, aucun effet substrat ou interaction génération*substrat n'a été obtenu (figure3.36).

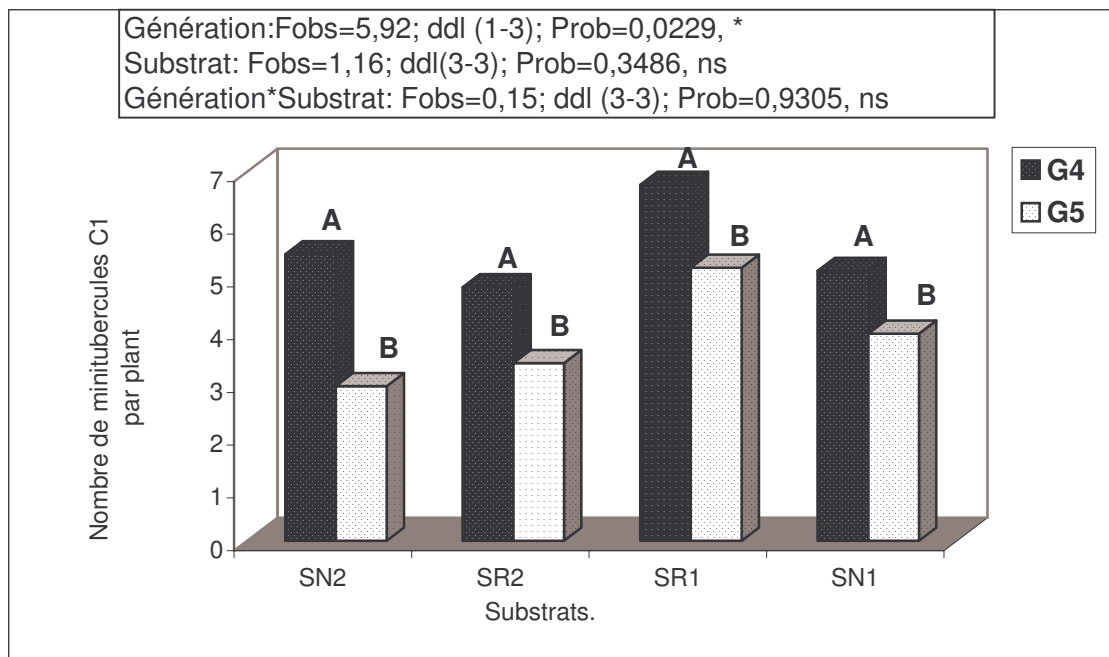


Figure3.36: Effet du substrat et de la génération du vitroplant sur le nombre des minitubercules du calibre C1 (< 15 mm) par plant.

3.4.2.6.2 -Calibre : C2 (15 à 28mm) :

L'analyse de la variance révèle l'existence d'un effet significatif de la générations du vitroplant où le nombre le plus élevé en C2 a été donné par la G4 (5.31 minitubercules/plant) sur le substrat SN2. Ainsi deux groupes homogènes sont mis en évidence, le premier groupe est constitué de G4 et le deuxième par la G5. Aucun effet substrat ou interaction génération*substrat n'a été soulevé (figure3.37).

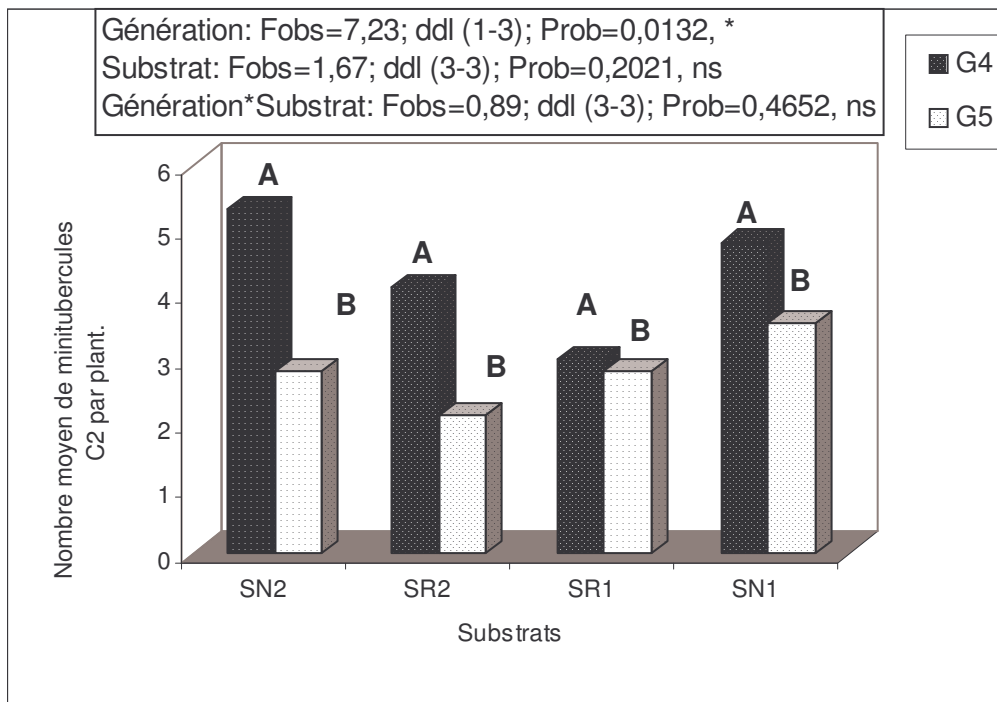


Figure3.37 : Effet du substrat et de la génération du vitroplants sur le nombre de minitubercules C2 (15à 28 mm) par plant.

3.4.2.6.3-Calibre : C3 (28 à 35 mm) :

L'analyse de la variance n'a révélé aucun effet génération du vitroplant sur ce calibre. Elle a cependant montré à la fois qu'il existe un effet significatif du substrat et une interaction génération*substrat sur le nombre de minitubercules de ce calibre. Ainsi, le nombre plus élevé a été enregistré avec le substrat SN2. Concernant l'interaction génération*substrat le nombre le plus élevé a été obtenu par la G4 sur le substrat SN1 (3.12 minitubercules) et par la G5 (3.06 minitubercules) sur le substrat SN2 (figure3.38).

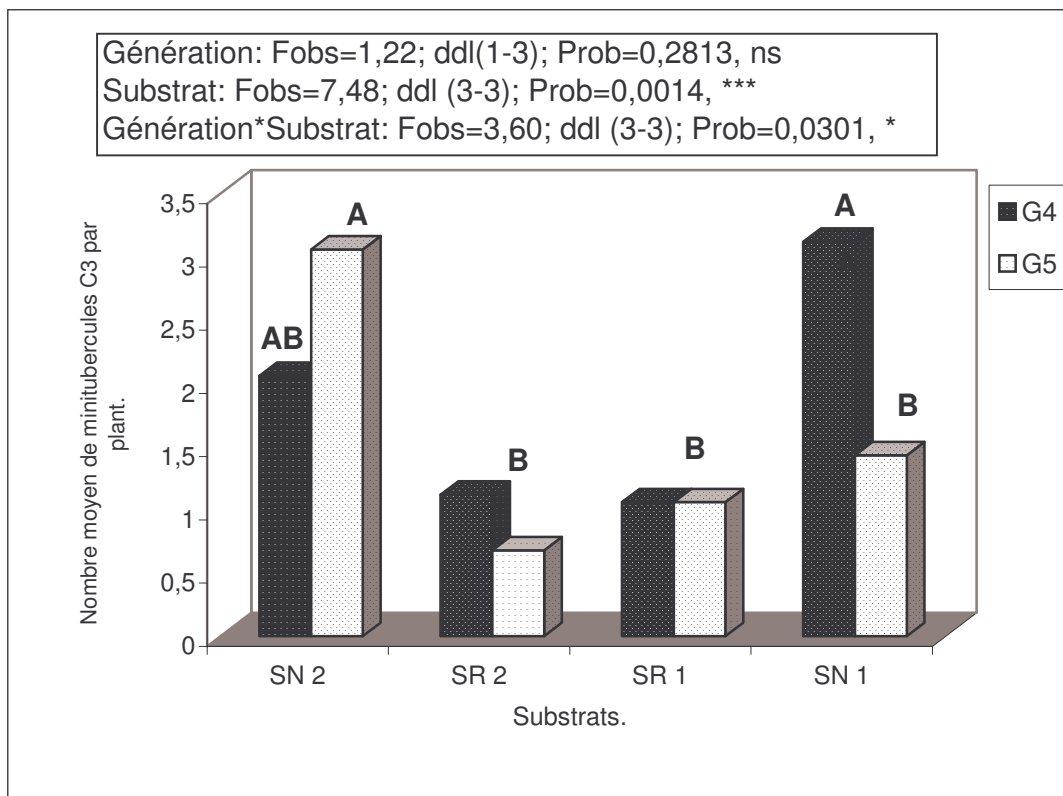


Figure 3.38 : Effet du substrat et de la génération du vitroplant sur le nombre de minitubercules du calibre C3 (28 à 35 mm) par plant.

3.4.2.6.4-Calibre : C4 (35 à 45 mm) :

L'analyse de la variance n'a révélé aucun effet significatif de la génération du vitroplant ni d'interaction génération*substrat sur le nombre de minitubercules de ce calibre. Cependant, elle a révélé l'existence d'un effet significatif du substrat, ainsi le nombre le plus élevé a été enregistré avec le substrat SN2 (1.68 minitubercules). Le test de la PPDS révèle l'existence de différences significatives entre les substrats testés. Deux groupes homogènes sont obtenus (figure3.39).

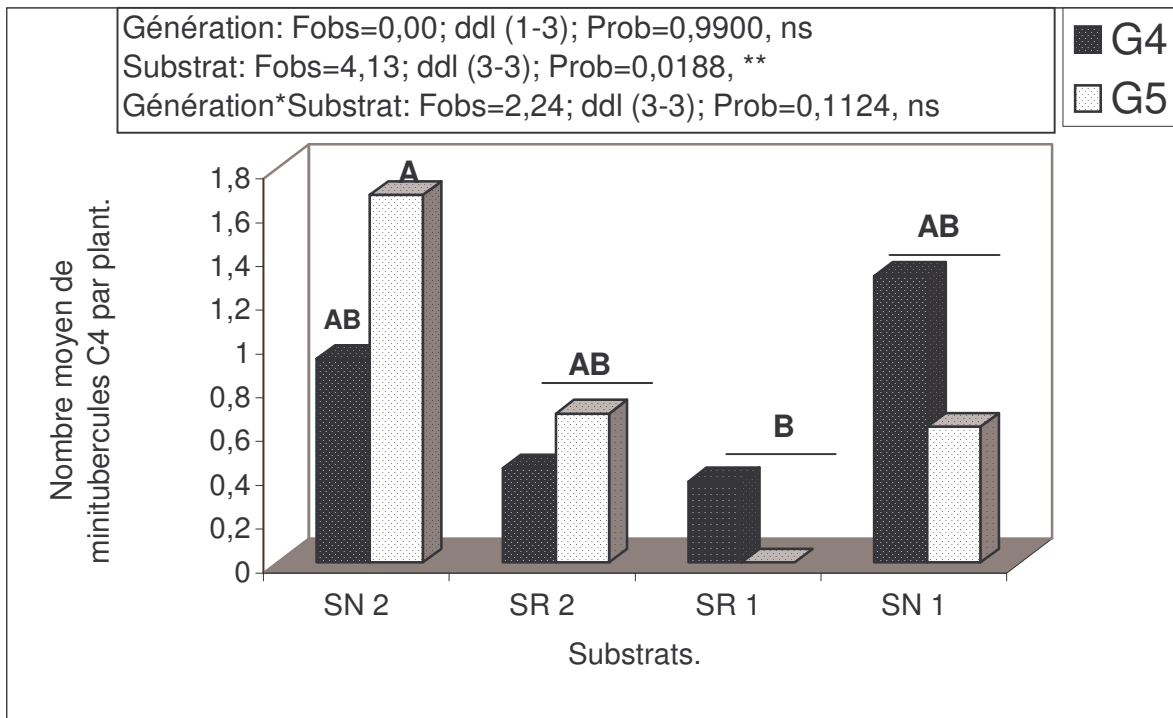


Figure3. 39 : Effet du substrat et de la génération du vitroplant sur le nombre de minitubercules du calibre C4 (35 à 45 mm) par plant.

3.4.2.6.5-Calibre : C5 > 45 mm :

L'analyse de la variance n'a révélé aucune différence significative entre les deux générations de vitroplant. Cependant, le substrat et l'interaction substrat*génération en exercent un effet significatif sur le nombre de minitubercules C5. Ainsi, le nombre le plus élevé a été enregistré avec le SN2 (5.25 minitubercules C5). Le test de la PPDS révèle l'existence de différences importantes entre les quatre substrats étudiés ainsi quatre groupes homogènes sont obtenus (Figure 3.40).

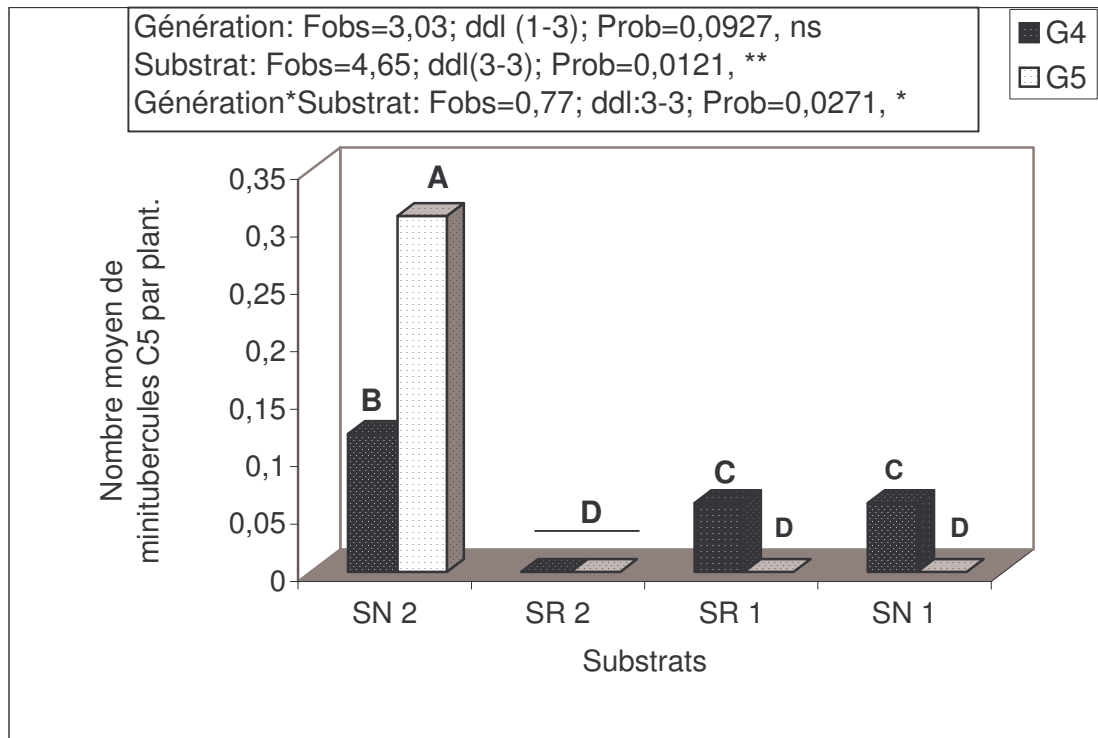


Figure3. 40 : Effet du substrat et de la génération du vitroplant sur le nombre de minitubercules du calibre C5 (> 45 mm) par plant.

3.4.2.7- Conclusion :

D'après les résultats précédents la G4 donne de meilleurs résultats que la G5, et le substrat SN2 (composé de 1/3 sable noir plus 2/3 tourbe) est le plus favorable à l'acclimatation et la production de minitubercules, aussi bien en nombre qu'en poids. Les potentialités de production d'un vitroplant dans ces conditions sont :

- Nombre de minitubercules par vitroplant = 13.87
- Nombre de minitubercules des calibres C2 et C3 (calibre idéal pour semences) = 5.36.
- Poids frais total des minitubercules = 59.86 g
- Poids frais de la biomasse = 30.31 g .



A : Vitroplants agés de 15 jours

B : Vitroplants agés de 28 jours (après l'ajout de substrat).

C : Vitroplants agés de 42 jours

D : Vitroplants agés de 60 jours

PLANCHE 3 : effet du substrat et de la génération sur le développement des Vitroplants en serre vert

3.4.3-Effet de la densité de plantation :

Deux générations de vitroplants (G4 et G5) associées à 4 densités de plantation ont été utilisées. Les conditions de la culture dans la serre sont les mêmes que pour l'essai précédent. Le substrat retenu pour ce test est le SN2 (composé de 1/3 sable noir plus 2/3 tourbe = meilleur substrat du test précédent). Cette expérience a été réalisée afin de définir et d'optimiser la densité de plantation qui assure le meilleur compromis entre le nombre de minitubercules produits et leur calibre idéal de produire une semence de pré-base de qualité. Les quatre densités de plantation réalisées sont : d1 (64 plants/m²) ; d2 (80 plants/m²) ; d3 (96 plants/m²) et d4 (144 plants/m²).

Une étude biométrique sur le développement des plants durant les 6 premières semaines de l'acclimatation sur les mêmes paramètres que l'expérience précédente à savoir : la longueur des tiges; nombre de feuilles simples et composées et le nombre de ramification.

3.4.3.1-La longueur des tiges :

L'analyse de la variance révèle l'existence d'un effet significatif de la génération et de l'interaction génération * densité de plantation du vitroplant sur la longueur des tiges. Quant au test de la PPDS il montre dans le premier cas deux groupes homogènes et dans le second 5 groupes homogènes. Par ailleurs, aucun effet densité n'a été observé sur ce paramètre, ce qui nous pousse à penser que les vitroplants se comportent de la même manière quelque soit la densité de plantation (Figure 3. 41).

3.5-Production en plein champ des générations G1 et G2 :

3.5.1- conditions générales de culture :

Les conditions de culture de la G1 et la G2 sont :

- rotation : Quatre (04) ans.
- précédent cultural : jachère
- cycle végétatif : 127 jours pour la G1 : (12/09/2002 au 19/01/2003) et 111 jours pour la G2 : (19/04/2003 au 05/08/2003)
- densité de plantation : (0.75 x 0.25) m soient 54000 plants/ha.
- Lieu de culture : Pour la G1 sous serre plastique (problème de froid et de gelées d'automne), et pour la G2 en plein champ (en saison : chaleur et vents de sirocco).

Conduite de la culture :

Le bon pilotage des irrigations et une fertilisation rationnelle sont très importants et à respecter pour la réussite de la culture dans un schéma de production de semences de pré-base (planche 6et7).

- Les traitements phytosanitaires préventifs avec des produits systémiques (fongicides et insecticides) et de contact, ont aussi une importance capitale pour garantir un état sanitaire satisfaisant des tubercules récoltés. Le suivi rigoureux et le respect des règles de la production de plants de pré-base ont conduit à la production de G1 et G2 saines.

- La fertilisation consiste en un apport d'engrais de fond composée de N P K (15- 15 -15) avec un complément en urée 43% et solipotasse 43%.
- Le défanage a eu lieu après les résultats du CNCC afin d'éviter l'installation des agents pathogènes.

3.5.2- comportement végétatif des plants G1 et G2 :

En plein champ, les plants issus de minitubercules (G0) montrent une grande homogénéité de levée et de développement végétatif mais accusent un retard sensible par rapport aux tubercules de sélection classique :

- Le retard du début de levée est de ± 5 jours et la levée générale de + 10 jours.
- La couverture du sol atteint 80 à 90 % après 90 jours pour les plants G0 contre environ 60 jours pour les plants G1.

Ce comportement peut être dû aussi aux conditions climatiques défavorables : basses températures et gelée sans oublier l'origine des plants (vitroplants) dans le cas de la G0.

Par contre, le comportement au champ des plants de la G1 (produisant la génération G2) est semblable à celui d'une culture ordinaire de pomme de terre (Planche7).

3.5.3- Production :

Dans ces conditions de culture, les productions de la G1 et G2 sont de 15 tonnes/ha et 10.5 tonnes/ha. Par ailleurs, il faut signaler que le schéma de production des minitubercules sous abri (serre en verre pour la génération « G0 », la récolte tardive, et par conséquent, la maturité insuffisante de ses derniers ont eu pour conséquence de limiter le tubercule dans l'expression de ses capacités de production en G1.

Par contre le faible rendement obtenu par la G2 explique l'effet néfaste des conditions climatiques qui ont caractérisé la saison (sirocco). En outre le retard dans le développement phénologique des plants issus des minitubercules peut être lié à leur caractère juvénile qui s'exprime par une dominance apicale du germe. Ce phénomène s'élimine lentement au cours des générations suivantes. Ce même phénomène serait la cause d'un faible nombre de tiges et par conséquent un rendement généralement faible en tubercules, d'où moins de tiges et un nombre de tubercules plus faible d'après une estimation par sondage suivant un plan diagonale sous la serre en plastique (tableau 3. 18).

Tableau 3.19 : Estimation de la production de la G1 sous serre en plastique à la récolte :

n° ech	nombre de tubercules	calibres (mm)		nombre moyen par plant	calibre moyen (mm)
		min	max		
1	6	30	43	5.2	20-53
2	6	20	42		
3	5	28	42		
4	6	25	46		
5	3	30	53		

Le nombre de tubercules obtenus est faible par rapport à ceux obtenus à partir d'un plant issu d'un tubercule de la multiplication classique. Cependant le calibre est conforme aux exigences de la production semencière.

3.5.4 -Conservation et pré germination :

L'entretien, le stockage (ou conservation), et la mise en germination des tubercules de la G1 ont une influence directe sur la production de la G2. Avant de stocker la récolte G1 à 4 °C, les tubercules ont subi un traitement fongicide (CURZATE) et la cicatrization des blessures des tubercules a été faite à 20°C pendant 15 jours avant le stockage. Le maintien de la température de la cellule de l'entrepôt frigorifique à 4°C permet l'inhibition de la germination des germes.

3.6- Tests sérologique attestant l'assainissement :

Les tests sérologiques ont été réalisés au niveau du laboratoire de contrôle phytosanitaire de la SAGRODEV puis certifiés par le centre national de contrôle et de certification (CNCC).

Les tests réalisés sont :

-Test Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay) pour les six virus de la pomme de terre homologues : PLRV, PVY, PVX, PVA, PVS et PVM.

-Test IFA pour les deux bactéries :

B1 : *Erwinia carotovora pv.atroseptica*

B2 : *Clavibacter michiganens sub sp Sepedonicum* (C m s)

- Dépistage des maladies bactériennes sur racines des mériplants après la 1^{ère} multiplication sur le milieu Levure Peptone Glucose Agar (LPGA).

3.6.1- Résultats sérologiques de la première génération de vitroplants « G1 » :

Les résultats des tests sérologiques ont montré la présence de virus : le PVA sur l'échantillon de clone 5 et le PLRV sur l'échantillon de clone 6 ce qui représente 17.5% de contamination pour chaque clone. Dans tout les cas de contamination les descendants des clones touchés sont éliminés (tableau 3.20). Ces résultats nous permettent de dire que la culture de méristème peut suffire à elle seul pou assainir efficacement les plants de la pomme de terre sans recours à la thérapie.

Par ailleurs, le test sur le milieu LPGA n'a révélé aucune contamination par les bactéries ciblées.

Tableau 3.20 : Résultats des tests sérologiques sur les vitroplants G1 *in vitro* :

N° des CLONES	Résultats : ELISA DAS					
	PLRV	PVY	PVX	PVA	PVS	PVM
01	-	-	-	-	-	-
02	-	-	-	-	-	-
03	-	-	-	-	-	-
04	-	-	-	-	-	-
05	-	-	-	+	-	-
06	-	+	-	-	-	-

 : clones éliminés (05et06).

3.6.2-Résultats sérologiques des vitroplants en serre en verre :

3.6.2.1-Tests réalisés sur les plants issus de l'étude de l'effet substrat et générations :

Au niveau de la serre en verre les plants ont subi deux types de tests sérologiques : le test Elisa DAS et le test I F A.

Le test Elisa DAS a révélé la présence d'un seul type de virus le PVS sur les clones (2 et 4), ce qui représente un taux de contamination égale à 50%. Ces contaminations n'ont pas été révélées au stade vitroplants (phase vitroplant) (Tableau3.21). Le test IFA n'a révélé aucune présence de bactéries ciblées (Tableau 3.21). Les plants et les minitubercules des clones contaminés ont été directement éliminés et détruits après les tests sérologiques Elisa et IFA

Tableau 3.21 : Résultats des tests Elisa-DAS et IFA sur les vitroplants en serre verre (expérience effet substrat et générations) :

N° des clones	PLRV	PVY	PVX	PVA	PVS	PVM	B1	B2
01	-	-	-	-	-	-	-	-
02	-	-	-	-	+	-	-	-
03	-	-	-	-	-	-	-	-
04	-	-	-	-	+	-	-	-

 : clones éliminés (02et04)

3.6.2.2-Tests réalisés sur les plants issus de l'étude de l'effet densités et générations) :

Les deuxièmes tests réalisés ont révélés les mêmes résultats que les premiers (**expérience effet substrat et générations**) de la serre en verre et les résultats sont illustrés dans le tableau 3.22. Comme précédemment les plants et les minitubercules des clones infectés ont été directement éliminés et détruits.

Tableau 3.22 : Résultats des tests Elisa-DAS et IFA sur les vitroplants en serre verre (expérience effet densités et générations) :

N° des CLONES	Résultats : ELISA DAS						IFA	
	PLRV	PVY	PVX	PVA	PVS	PVM	C	T
01	-	-	-	-	-	-	-	-
02	-	-	-	-	+	-	-	-
03	-	-	-	-	-	-	-	-
04	-	-	-	-	+	-	-	-

 : Les clones éliminés (02et04)

Les résultats obtenus lors de ces deux derniers tests ont été confirmés par les services du Centre National de control et de certificat (CNCC).

3.6.3- Résultats sérologiques des plants de la génération « G0 » de pré base sous serre en plastique :

Les résultats des tests sérologiques Elisa DAS réalisés sur les plants issus de la plantation des minitubercules G0 sont présentés dans (tableau 3.23). Ceux ci ne révèlent aucune présence de virus sur les deux clones restants. Par ailleurs, aucun symptôme de bactéries visible à l'œil n'a été relevé .Ceci nous amène à conclure que les plants G0 ne sont pas contaminés.

Le test IFA n'a été pas réalisé car les symptômes des bactéries pathogènes concernées deviennent visibles sur les plants au champ.

Tableau 3.23 : Résultats sérologiques des plants de la « G0» cultivés sous serre en plastique (2002-2003).

N° de Clone	ELISA DAS					
	PLRV	PVY	PVX	PVA	PVS	PVM
01	-	-	-	-	-	-
03	-	-	-	-	-	-

Les plants G0 ont été contrôlés et certifiés par le centre national de contrôle et de certification (CNCC), et ont été déclarés sains à 100 %.

3.6.4- Résultats sérologiques des plants de la génération « G1 » de pré base en plein champ :

Les tests sérologiques Elisa DAS n'ont révélé aucune présence de virus en G2 pour les deux clones restants, de même que les bactéries. Les services du CNCC ont confirmé une nouvelle fois les résultats obtenus (tableau 3. 24)

Tableau 3.24 : Résultats sérologiques des plants de la 1ère génération de prés base « G1» en plein champ (2003) :

N° de Clone	ELISA DAS					
	PLRV	PVY	PVX	PVA	PVS	PVM
01	-	-	-	-	-	-
03	-	-	-	-	-	-

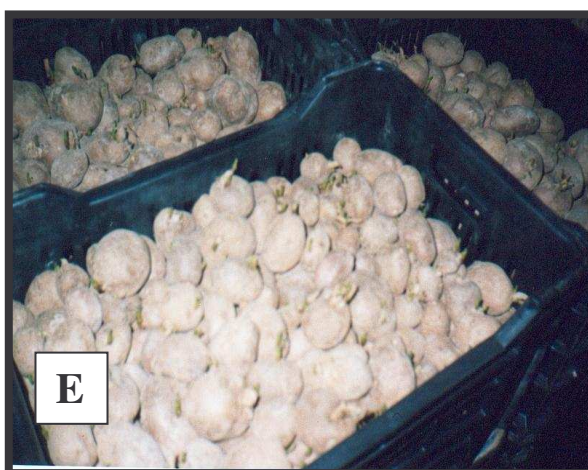
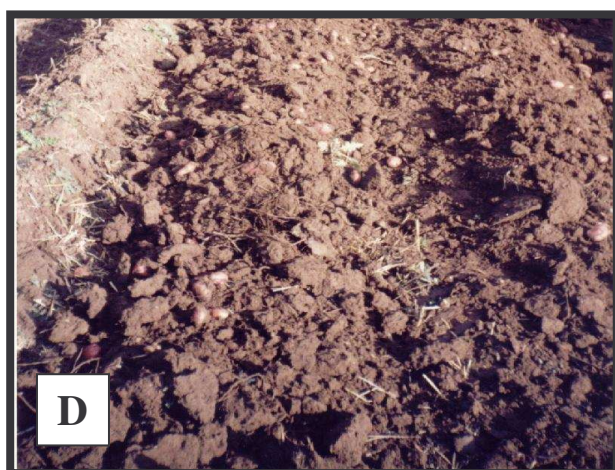
Conclusion :

La multiplication des vitroplants issus de la culture de méristèmes ne garantit pas à elle seule l'assainissement viral intégral, ce qui a été confirmé par les résultats des tests sérologiques réalisés et certifiés par le CNCC.

Le test Elisa-DAS révèle la présence de virus PVS sur les vitroplants en serre verre contrairement à la phase de culture *in vitro*. Ceci nous pousse à formuler deux hypothèses :

- Vitroplants déjà contaminés en phase *in vitro* par des quantités infimes de particules virales indétectables par le test Elisa-DAS, mais une fois transférés en serre où les conditions de température sont plus favorables et le matériel végétal plus développé, les virus deviennent plus faciles à détecter.

- Vitroplants réellement sains, et que la contamination serait produite en serre, dans ce cas il faudrait revoir l'étanchéité de celle-ci et/ou imposer des comportements plus stricts du personnel qui est autorisé à y accéder.



A : Plants âgés de 35 jours : après le 1^{er} buttage

B : Plants âgés 50 jours : après le 2^e buttage

C : Plants âgés de 2 mois

D : Récolte

E : Pré – germination de la G1

Planche 6 : Production de G1 sous serre en plastique, arrière saison.



- A : Stade levée.
- B : Irrigation par aspersion.
- C : Buttage.
- D : Stade plein floraison.
- E : Récolte de la « G2 ».

Planche 7: G1 en plein champ pour la production de la G2.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

L'objectif principal de ce travail consistait à maîtriser différentes phases de la production de semences de pré-base de pomme de terre à travers la maîtrise de :

- Culture de méristèmes et régénération de plantules,
- Micropropagation,
- Acclimatation et production de minitubercules de la G0,
- Production des premières générations G1 et G2 en plein champ.

4.1. Culture de méristèmes :

Le tableau 4.25 résume les différents paramètres étudiés pour la culture de méristèmes ainsi que les résultats obtenus :

L'efficacité relative des cytokinines varie en fonction de leur concentration et de leur nature. Les résultats obtenus par CUTTER (1992) montrent que la BAP et la kénitine sont les hormones les plus utilisées en cultures de méristèmes. Selon BOXUS (2000), la BAP agit à très faible dose pour induire un bon développement des méristèmes chez la plupart des espèces. Quant au pourcentage de réussite, il dépend de la taille du méristème lui-même et du cultivar. En général, on s'attend à plus de 50% de réussite avec des méristèmes d'un diamètre de l'ordre de 0,1 à 0,3 mm cultivés en présence de BAP[84].

C'est dans la perspective de définir la combinaison optimale pour la régénération de plantules à partir de méristèmes que nous avons étudié les combinaisons suivantes : Kinétine /GA3 et BAP/GA3, avec des concentrations variables. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 4.25.

Tableau 4.25 : Effet des différentes balances hormonales sur la réactivité des méristèmes et leur développement :

Balances hormonales	Meilleures combinaisons hormonales	Résultats statistiques
Variation de la KIN (mg/l) en présence de 0.1 mg/l de GA	KIN: 0.05mg/l + GA3 : 0.1mg	effet significatif des combinaisons étudiées
Variation de la BAP (mg/l) en présence de GA3.	BAP: 0.02 mg/l + GA3 : 0.1mg	effet significatif des combinaisons étudiées.
Variation de la GA3 (mg/l) en présence de 0.02mg/l de BAP	Aucune nouvelle concentration de GA3 n'a été retenue.	Pas d'effets significatifs
Variation de la GA3 (mg/l) en présence de 0.05 mg/l de BAP	Aucune nouvelle concentration de GA3 n'a été retenue.	effet significatif des combinaisons étudiées

La balance KIN/GA3 aux concentrations étudiées s'est avéré la plus favorable à la culture de méristèmes de la variété Désirée et ce, aux concentrations 0,03 ,0,04 et 0.05mg/l de kinétine additionnées de 0,1mg/l de GA3. La combinaison 0,05 mg/l KIN plus 0,1 mg/l GA3 favorise la réactivité des méristèmes (croissance et aspect morphologique ordinaire des vitroplants qui en dérivent). Cependant, la balance BAP/GA3 (notamment avec les concentrations de 0,02 mg/l BAP + 0,1 mg/l de GA3) s'est avéré la plus favorable à la culture de méristème avec un délai de reprise plus court, un aspect morphologique des vitroplants plus satisfaisant et surtout une homogénéité accrue des vitroplants qui en dérivent.

Les premières générations G1 et G2 de la micropropagation issues de la culture de méristèmes en présence de BAP (concentration optimale) donnent des vitroplants d'un aspect morphologique meilleur que ceux obtenus en présence de la KIN.

Les cytokinines utilisées lors de cette étude présentent des effets variables sur la reprise et le développement des méristèmes. Ceci serait dû à leur nature (KIN = cytokinines naturelle et BAP = cytokinines de synthèse).

Par ailleurs, la taille des méristèmes joue également un rôle déterminant dans leur développement ultérieur. Si le prélèvement touche également une partie des tissus adjacents au dôme méristématique, il y'aura développement d'un cal et si le prélèvement se limite au dôme méristématique, les primordia foliaires se développent pour donner un vitroplant[106]. WANG et CHARLEL (1991) recommandent pour la culture de méristèmes les bougeons en développement actif pour l'amélioration de leur potentialités de reprise et pour la réduction des risques de contamination par des pathogènes, notamment les virus.

4.2. Micropropagation :

Les mériplants issus des deux meilleures combinaisons hormonales étudiées (0.05 mg/l KIN plus 01 mg /l GA3 et 0.02 mg de BAP plus 0.01mg /l GA3) ont présenté une grande homogénéité au niveau des tubes à essai. Cependant la multiplication des vitroplants dans les boîtes « magenta » a présenté une grande hétérogénéité des vitroplants aussi bien à l'intérieur de la même boîte que dans des boîtes différentes. Cette hétérogénéité de croissance des vitroplants serait due d'une part aux phénomènes de compétition entre les vitroplants dans le même récipient, et d'autre part à l'effet rémanent des hormones de croissance additionnées au milieu initial destiné à la culture de méristèmes phénomènes déjà signalé aussi chez les espèces ligneuses [108].

Par ailleurs, la génération de multiplication *in vitro* exerce un effet significatif sur le développement des vitroplants se traduisant par une réduction de la taille des feuilles au fur et à mesure que nous avançons dans les générations. ROSSIGNOL-BANILHON *et al.* (1980) et NOZERAN *et al.* (1985) expliquent ce phénomène par un retour à l'état juvénile accompagné d'une miniaturisation des méristèmes de la plante due aux conditions écologiques tout à fait particulières dans le tube à essai (régime trophique de restriction).

L'utilisation de la 5^{ème} génération de la micropropagation paraît possible vue l'aspect des vitroplants obtenus (tiges filiforme, très petites feuilles) avec un coefficient de multiplication 5,52 en trois semaines de culture. Cependant, la 4^{ème} génération présente un coefficient de multiplication de 6.48 au bout de trois semaines avec des tiges ayant un aspect tout à fait ordinaire. En effet LEVY (1985) rapporte que pour la pomme de terre, un indice de multiplication compris entre 5 et 7 est possible sur le milieu MS sans hormones.

Il est à noter qu'une numérotation des clones est indispensable depuis la mise en culture des méristèmes, et doit se prolonger au cours de la micropropagation et ce, afin d'effectuer un suivi phytosanitaire rigoureux (notamment les opérations d'épuration virales) en serre (production de la G0) et en plein champ pour les générations suivantes.

4.3. Acclimatation :

La serre verre de la SAGRODEV (équipée d'un système de contrôle automatique de l'ensemble des paramètres climatiques) nous a énormément facilité la tâche d'acclimatation en éliminant toute la phase d'endurcissement susceptible d'engendrer des frais supplémentaires qui se répercutent défavorablement sur le prix de revient de la semence. Ce résultat a déjà été signalé par les travaux antérieurs [11,12]. En effet, les résultats obtenus, montrent qu'il est possible de transférer directement les vitroplants de l'éprouvette à la serre sans que cela ne porte aucun préjudice aux vitroplants. Cependant, une attention particulière doit être accordée à la nature du substrat, à la génération des vitroplants et à la densité de plantation qui jouent réellement un effet significatif sur la qualité et le rendement en minitubercules. En effet, l'utilisation d'un substrat composé d'un mélange de sable de rivières (1/3) et de tourbe (2/3) s'est avéré dans notre cas le plus favorable pour un meilleur développement de la partie aérienne (31 g/vitroplant pour la G4 et 19 g/vitroplant pour la G5), mais aussi le meilleur rendement en minitubercules par vitroplants (13.87 minitubercules avec un poids moyen de 59.86 g pour G4 et 10.81 minitubercules avec un poids moyen de 60.21 g pour la G5).

La plantation à une densité de 144 vitroplants/m² sur le substrat cité précédemment paraît être la meilleure vu la quantité et la qualité des minitubercules obtenus (plus de 7 minitubercules par plant comparé aux résultats obtenus dans d'autres pays comme le Maroc (5 minitubercules par plant)[110].

En outre FOURRAGE (1993) indique que la plantation à une densité de 200 vitroplants /m² donne un rendement et un calibre assez hétérogènes (2-6 minitubercules par plant de 10 à 25mm de diamètre, voire même 35 à 40mm, dont 90% inférieurs à 10mm et environ 10% entre 10 et 28mm). Dans notre cas les diamètres obtenus étaient plus homogènes.

La génération des vitroplants présente par ailleurs un effet significatif sur leurs potentialités de production en minitubercules. Les meilleurs résultats sont obtenus avec les vitroplants de la 4^{ème} génération comparés à ceux de la 5^{ème} génération. Cependant, il faut signaler que d'autres laboratoires (cas du Maroc toujours EL BOURA) de production de semences de pomme de terre utilisent des vitroplants allant jusqu'aux 7^e et 8^e générations, sans problème majeur [110]. Ce paramètre est certainement sous contrôle génétique et ne peut donc être extrapolé à toutes les variétés.

Aussi, il faut signaler que l'apport d'engrais et l'élévation du niveau du substrat par des apports successifs au niveau des bacs au moment opportun sont indispensables pour l'amélioration du rendement en minitubercules par plant. Cela a déjà été rapporté par d'autres producteurs de semences qui utilisent des substrats par apports successifs jusqu'à l'obtention d'une profondeur de 20 cm (travail réalisé par des techniciens canadiens à l'ENARP en 1999-2000).

4.4. Production des premières générations sur champ :

Une dominance apicale a été constatée suite à un retard d'induction de la germination. Ce retard peut être expliqué par l'acquisition par les vitroplants du caractère juvénile qui serait à l'origine de la dormance prolongée des minitubercules qui en dérivent. Un retard de levée de 5 à 6 jours a été observé au cours de la première génération sur champ. Ce retard a complètement disparu au cours de la 2^{ème} génération au champ. La faiblesse de production des minitubercules (G0) serait due à leur dominance apicale.

En effet, suite à un sondage effectué sur les plants de la G0, il a été remarqué que la majorité des minitubercules ne porte qu'une seule tige d'où le nombre limité de tubercules produit par minitubercule de départ. Ce phénomène a disparu au cours de la G1.

Par ailleurs, il faut signaler que les plants (G0) issus des minitubercules présentent une biomasse faible d'où une couverture de sol qui n'atteint 100% qu'après 90 jours, contrairement aux plants de la G1 qui atteignent ce niveau uniquement en 60 jours. Ce phénomène serait également lié au précédent (dominance apicale).

Selon SAUNDERS (1988), une plantation réalisée avec des plants très jeunes présente l'inconvénient d'une levée très lente, avec un feuillage qui a tendance à retarder et à prolonger la durée de végétation, alors qu'une plantation avec des plants plus âgés, il y'a risque de conduire à un échec. Par ailleurs, même si la culture réussit, les plants seront chétifs avec une masse foliaire faible. Ceci n'est pas sans conséquences défavorables sur le rendement final [31].

De nombreux auteurs, VANDER ZAAG (1983), PERENNEC (1985), GRIZON(1990) s'accordent sur le fait que le meilleur plant est celui qui a atteint la capacité maximale de germination autorisant une levée rapide, un développement de plusieurs tiges et de nombreux tubercules par tige et par conséquent un rendement élevé. Selon VANDER ZAAG (1983) la différence de production entre les plants à dominance apicale et les plants en phase maximale de germination peut facilement atteindre un indice de 5 tonnes/ha, si toutes les conditions de la culture sont réunies. Par ailleurs, PERENNEC (1985) préconise que la prégermination doit être conduite en fonction de l'objectif de la récolte. Pour la culture de plants, un nombre élevé de tubercules et une précocité sont souhaités afin que le rendement soit économiquement intéressant. Lorsque intervient le défanage, les plants devront donc être suffisamment vieux.

Vu les différences durée d'incubation entre les variétés et les conséquences qui en découlent en matière de choix de la date de plantation, MADEC et PERENNEC (1962) affirment qu'il est possible de ramener l'incubation des germes à la vitesse voulue au moment de la plantation.

Ce ci peut se réaliser en ralentissant par des températures basses l'incubation normalement rapide de certaines variétés, et l'accélération par des températures plus élevées l'incubation trop lente de certaines autres variétés.

MADEC et PERENNEC (1962) ont pu également établir que les conditions de températures et de photopériode subies par la végétation de la génération parentale influencent le comportement, la vigueur et la productivité des plants de la génération suivante. Celle-ci semble subir un certain post effet des conditions de végétation de la génération pré parentale.

Quant aux zones les favorables à la production de la 1^{ère} génération sous serre en plastique, MOLET (1988) pensent que le choix des régions océaniques ou montagneuses augmente considérablement le taux de multiplication lors de la première génération.

4.5. Assainissement viral :

Le contrôle de l'état phytosanitaire des semences repose sur le choix d'un matériel de départ sains (examen visuels, Tests Elisa et IFA) et sur sa multiplication à l'abri de tous les agents pathogènes. Ceci repose sur l'éloignement de toute source de contamination que représentent les cultures de pomme de terre de consommation ou les repousses ainsi que sur l'épuration des plantes malades et les traitements (insecticides, fongicides, huiles minérales) phytosanitaires[104,111].

La végétation des parcelles de production de semences de pomme de terre est systématiquement détruite avant sa maturité naturelle (défanage qui est le plus souvent opéré par voie chimique). Cette pratique permet de soustraire le feuillage aux vols de pucerons et d'empêcher la migration des virus vers les tubercules[112]. Les risques sanitaires augmentent avec le nombre de générations produites à partir d'un même matériel de départ. L'intégration de la culture in vitro dans le schéma de la production de plant augmente considérablement le taux de multiplication lors de la première génération cultivée à l'abri des contaminations sous abri [112].

Concernant nos résultats de l'assainissement, il s'est avéré qu'avec la culture de méristèmes seule sans recours à la thérapie, il était possible de produire des plants (semences) sains.

Ainsi, nous avons constaté 33 % et 50% de contamination virale au niveau de la serre en verre, alors qu'en plein champ, aucune contamination n'a été décelée en G1 et G2 (100% de plants sains). Tous ces résultats ont été confirmés par le Centre National de Contrôle et de Certification (CNCC).

En fin, le schéma (figure4.55) résume l'ensemble des expériences réalisées ainsi que les résultats les plus probants.

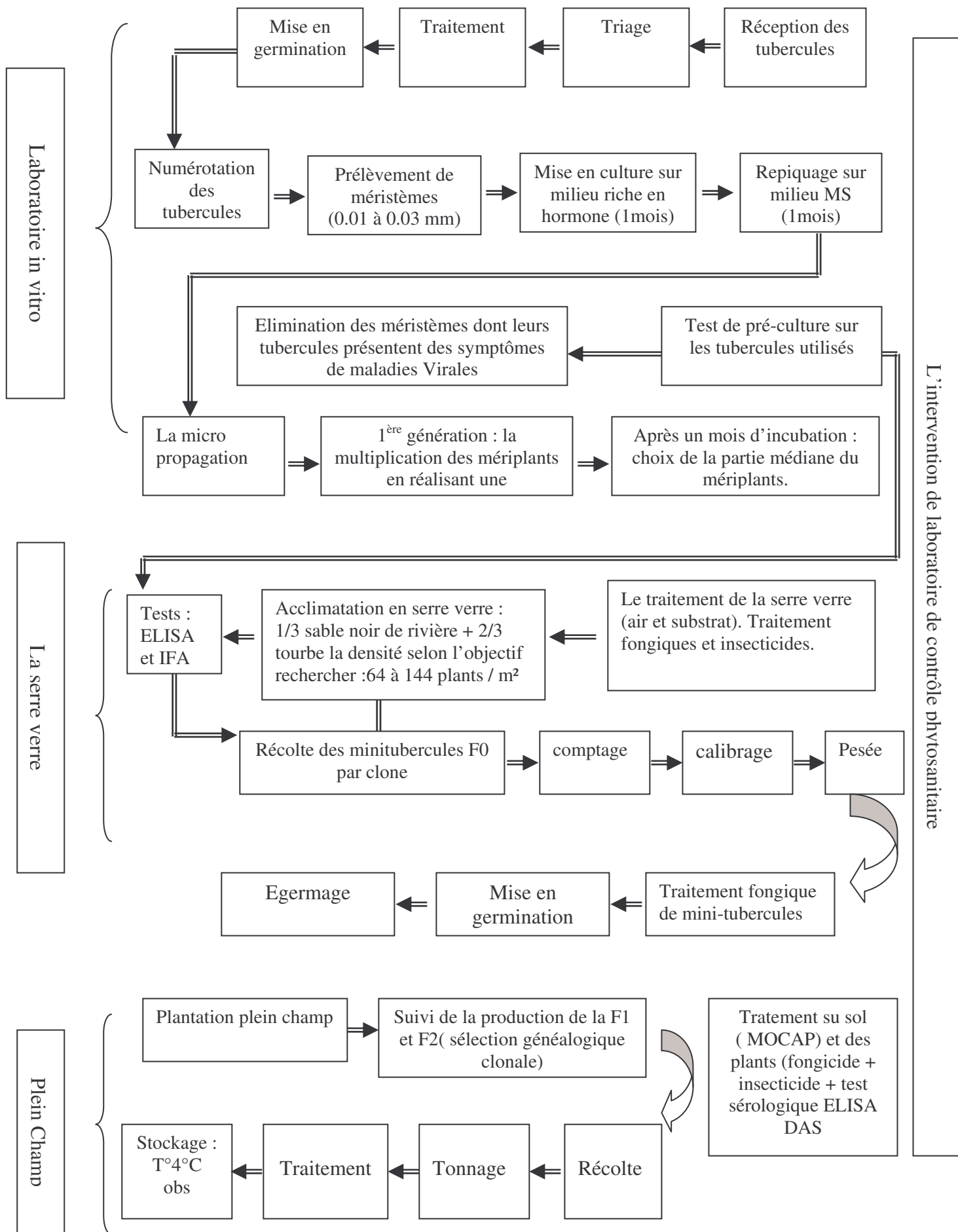


Fig. SCHEMA POURSUIVI DE LA PRODUCTION DES PLANTS DE POMME DE TERRE

CONCLUSION

La contribution à la mise au point d'un schéma de production de semences de pré-base : depuis le méristème jusqu'aux premières générations de plein champ par l'intégration de la culture « in vitro » présente de nombreux avantages aussi bien pour la production que pour l'assainissements.

La réussite de la culture de méristèmes dépend des facteurs suivants :

- milieu de culture.
- taille de méristème.
- méthode d'excision des méristèmes.

Le milieu de culture que nous proposons pour la culture de méristèmes de pomme de terre (variété désirée), est le milieu MS (1962) avec 6 g/l de gélose + 25g/l de saccharose et l'une des deux combinaisons hormonales suivantes : 0.05 mg/l de kinétine + 0.1 mg/l de GA3 ou 0.02 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de GA3.

La taille du méristème détermine le taux de réactivité et le développement des mériplants qui en dérivent. En effet, plus la taille du méristème est grande, plus le développement des vitroplants est important, et inversement pour les risque de transmission des virus. Nos résultats montrent que des méristèmes d'un diamètre de 0,1 à 0,3 mm permettent de débarrasser la plante de ses virus.

Les vitroplants issus de la culture de méristèmes présentent un coefficient de multiplication important (7 à 8) bougeons après 3 a 4 semaines de culture, et la composition de milieu de culture primaire présente une influence significative sur le développement des vitroplants au cours des générations de la micropropagation. Ces dernières ont également un effet significatif sur la multiplication des vitroplants.

Par ailleurs, le rendement des vitroplants en minitubercules (G0) est contrôlé par un mécanisme complexe dont les principaux éléments pourraient être :

- Substrat,
- Densité de plantation,
- Potentialité génétique de la variété,
- Nombre de tubercules produits/plant et /m2 ainsi que par calibre,
- Cycle végétatif (qui est également un caractère génétique).

Le substrat utilisé pour l'acclimatation est constitué d'un mélange de 2/3 tourbes humiques de 1/3 de sable noir de rivière qui présente l'avantage d'améliorer les qualités physiques du substrat. Sur ce substrat, nous avons enregistré un taux de reprise de 100%, un développement des vitroplants important correspondant à la meilleure production de minitubercules aussi bien en poids qu'en nombre moyen de minitubercules par unité de surface.

La densité de plantation varie de 64 à 144 plants /m² selon l'objectif recherché : plus la densité de plantation augmente :

- Plus le nombre total de tubercules et le rendement correspondant augmente par unité de surface.
- Plus le nombre de tubercules et les rendements moyens par plants diminuent.

Cependant pour produire de gros tubercules, vigoureux et productifs il faut planter à une densité faible (64 plant/m²). Pour produire de petit tubercules, nombreux, permettant de répondre à une forte demande, il faut au contraire planter à une forte densité (plus de 144 plants /m²).

Afin de mieux exploiter les potentialités de la serre en verre (coût de production), il serait préférable d'augmenter la densité de plantation. Concernant la répartition des calibres de la production, il apparaît d'après les résultats obtenus que la densité de plantation est susceptible de contrôler le calibre des minitubercules produits.

Par ailleurs, le cycle végétatif semble avoir un effet sur la grosseur des minitubercules G₀ produits sous serre en verre.

Les générations G₁ et G₂ doivent être particulièrement protégées pour être multipliées au champ. Elles doivent être indemnes de contaminations virales et bactériennes et faiblement touchées par les maladies cryptogamiques sans toutefois dépasser les seuils de (1% et 0.2%) respectivement pour le Rhizoctone et la verticilliose. En outre, les rendements diffèrent en fonction de la génération. Le rendement des vitroplants en minitubercules (G₀) est de 7 à 12 tubercules par plant.

Par ailleurs, et d'une manière plus générale, l'obtention d'un rendement élevé dépend aussi directement des décisions prises pour la production au moment opportun, et ce, en tenant compte de :

- Nature du sol.
- Caractéristiques génétiques de la variété utilisée.
- Connaissances du milieu environnant.

- Disponibilités du matériel d'exploitations (Travail du sol ; plantation ; irrigation et fertilisation.)
- Périodes de plantations.

L'exploitation rationnelle de chacun de ces facteurs de production permet de maîtriser aussi leurs effets directs que leurs interactions.

Ajoutant par ailleurs aussi, qu'il semble que l'origine (minitubercules, vitroplant et boutures classiques) le mode de production (sous serre ou en plein champ), l'âge physiologique et la dominance apicale des plants utilisés peuvent pour une grande part influencer la réponse du matériel végétal. Ceci a été confirmé par résultats enregistrés au cours de la production des 02 premières générations de plein champ (G1 et G2).

Les rendements moyens obtenus par les générations étudiées au cours de la réalisation de notre travail sont : pour la G1 : 150 qx/ha et pour la G2 : 105 qx/ha.

Les résultats de l'assainissement montrent qu'il est possible grâce à la seule culture de méristème (sans thermothérapie) d'assainir la variété étudiée (Désirée).

Perspectives :

Au terme de ce travail nous suggérons de poursuivre les recherches sur les aspects suivants :

- Améliorer et maîtriser les techniques et les potentialités de production de chaque variété (itéraire technique).
- Maîtriser la levée de la dormance : des microtubercules et des minitubercules.
- Maîtriser les calibres sur champ en fonction de la densité et la fertilisation et d'autres facteurs
- Maîtriser le cycle végétatif (surtout pour son raccourcissement) afin de pouvoir planter en arrière saison et éviter les périodes de pullulation aphidiène.
- Maîtriser la conformité génétique par les techniques nouvelles (Electrophorèse et la PCR et d'autres techniques).

- Maîtriser l'utilisation d'autres techniques de détection des agents pathogènes (PCR, RFLP,...).

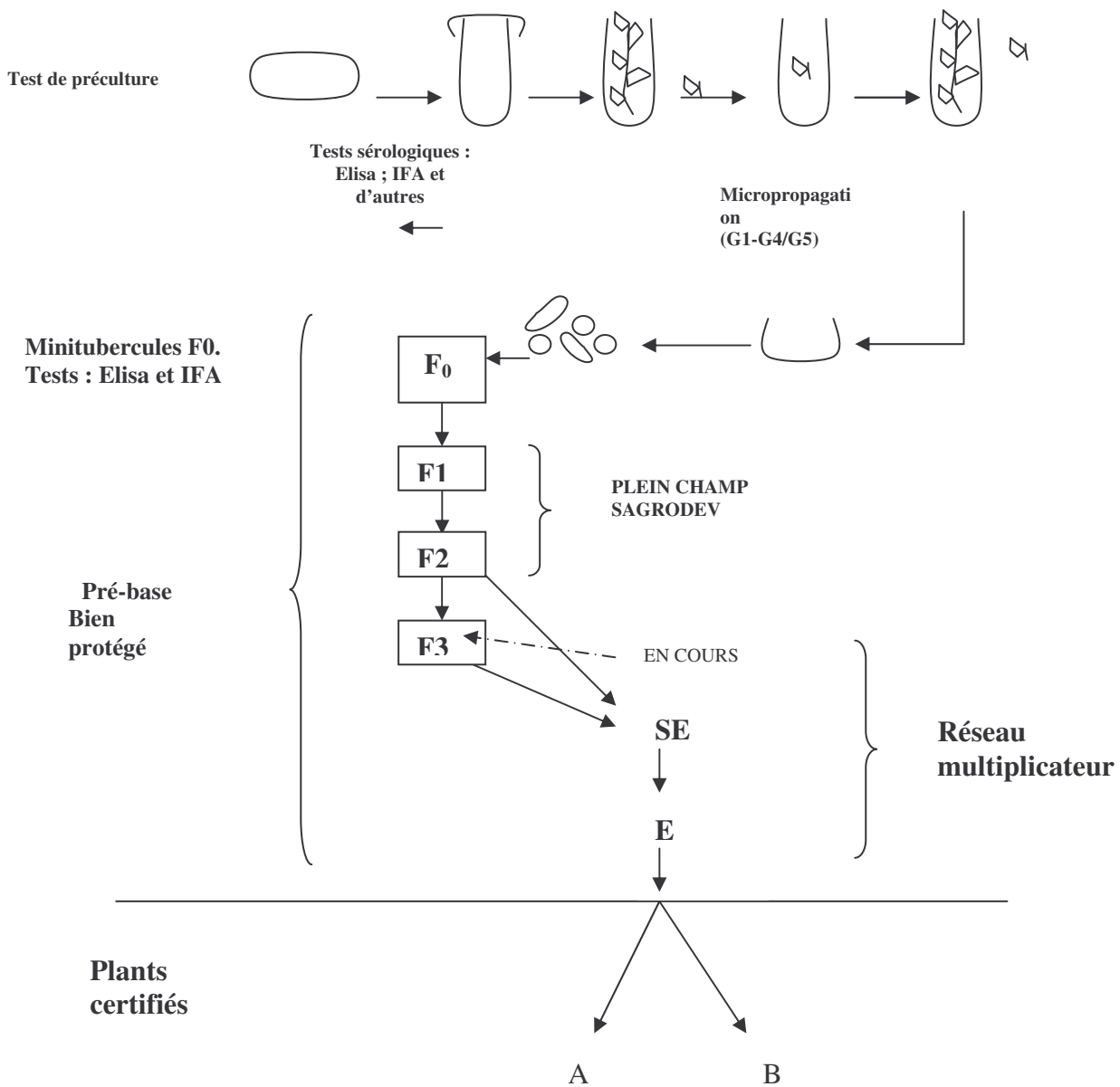


Figure 56. : Schéma de la production en masse de plants sains prototype de la chaîne de production de plants de pomme de terre réalisée à la SAGRODEV (GUELLAL- SETIF).

Annexe 1 :

Tableau n°1 composition du milieu MURASHIGE et SCOOG (1962)

Macro éléments	mg / l
NH₄ NO₃	1650
KNO₃	1900
Ca Cl₂ 2H₂O	440
Mg SO₄ 7H₂O	370
KH₂ PO₄	170
Macro éléments	mg / l
H₃ BO₃	6..20
KI	0.83
MnSO₄ 4H₂O	22.30
ZnSO₄ 7H₂O	8.60
Na₂MoO₄ 2H₂O	0.25
CuCO₄ 5H₂O	0.025
CoCl₂ 6H₂O	0.025
Na₂ EDTA	37.25
FeSO₄ 7H₂O	27.85

Annexe 2 :

Test Elisa DAS (Enzyme linked immunosorbent assay)

Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay) pour la détection des virus de la Pomme de Terre.

- **MATERIEL UTILISE :**

- Broyeur ou mortier avec pillons pour l'extraction.
- Bain marie pour l'incubation des plaques à 37° C. Micropipettes à différents volumes : 0 à 6 µl, 5-30 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1 et 5ml.
- Réfrigérateur à 4° C et un congélateur à -20°.
- Papier absorbant.
- Pissettes.
- Plaques Elisa.
- Bêchers, Eprouvettes, Tubes, Portoirs.
- Glaçons pour maintenir les réactifs au froid pendant la manipulation.
- Lecteur Elisa avec une imprimante (Titerdeck).
- Centrifugeuse.

- **REACTIFS ET PRODUITS :**

- **La trousse de diagnostic de (1000 tests) fournie contient :**

- 1- Anticorps de coating..... 2 fl. Capsule bleue.
- 2- Anticorps conjugués..... 2 fl. Capsule rouge.
- 3- Témoins positifs lyophilisés = extraits de plantes infectées..... 2 fl. Capsule blanche.
- 4- Témoins négatifs lyophilisés = extraits de plantes saines..... 2 fl. Capsule blanche.
- 5- Solution de fixation concentrée 5 fois (bleue)..... 1 fl. 60 ml.
- 6- Solution de conjugué concentrée 5 fois (rouge)..... 1 fl. 60 ml.
- 7- Solution de substrat concentrée 5 fois (incolore)..... 1 fl. 60 ml.
- 8- Solution de lavage concentrée 20 fois (incolore)..... 2 fl. 200 ml.
- 9- Solution de broyage concentrée 20 fois (incolore)..... 1 fl. 200 ml.
- 10- Substrat pNPP (Phosphate de p-Nitrophényle)..... 10 pastilles de 12 mg.
- 11- Plaques Elisa.....10 unités.
- 12- Film plastique adhésif..... 10 unités.

○ **Préparation des solutions :** en fonction des kits achetés, les solutions seront préparées comme suit :

➤ **Tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) 0.1 M, pH 7.4 :**

- Chlorure de sodium (Na Cl) 0.8 g.
- Phosphate monopotassique (KH₂PO₄)..... 0.02 g.
- Phosphate disodique (Na₂ HPO₄)..... 0.29 g.
- Chlorure de potassium (KCl)..... 0.02 g.
- Azide de sodium (NaN₃)..... 0.1 g.
- Eau distillée..... 1000 ml.

➤ **Tampon PBS Tween (Lavage) :**

- Tampon PBS..... 999.5 ml.
- Tween 20..... 0.5 ml.

➤ **Tampon Carbonate (Tampon de sensibilisation) 0.1 M, pH 9.5 :**

- Carbonate de sodium (Na₂CO₃)..... 5.6 g.
- Bicarbonate de sodium (NaHCO₃)..... 3.5 g.
- Eau distillée..... 1000 ml.

➤ **Tampon des anticorps conjugués :**

- PBS – T.
- 0.02 % d'ovalbumine.
- 2 % polyvinylpyrrolidone.
-

➤ **Tampon de substrat pH 9.8 :**

- Diéthanolamine..... 97 ml.
- Eau distillée..... 800 ml.
- Azide de sodium (NaN₃)..... 0.2 g.

➤ **Solution d'extraction des virus :**

- PBS –T.
- 2 % PVP (polyvinylpyrrolidone)

- **PROTOCOLE KIT DAS-ELISA**

Etape 1 : Fixation des anticorps

(Tampon fixation 60 ml, Anticorps 2 x 500 µl)

Diluer le tampon fixation au 1/5 dans de l'eau distillée.

Diluer les anticorps au 1/100 dans le tampon de fixation (flacon bleu).

Pour une 1 plaque diluer juste avant utilisation :

Tampon fixation (bleu) 6 ml

Anticorps (bouchon bleu) 60 µl

Incubation : 2 h à 37° C (les plaques doivent être couvertes avec un film plastique adhésif).

Lavage : 3 lavages avec du PBS – Tween.

Etape 2 : Dépôt des échantillons (Témoin sain 2 x 1 ml, Témoin positif 2 x 1 ml).

Préparation des extraits et témoins : Les échantillons de plantes convenablement choisis (1 g d'échantillon = 3 ml de la solution d'extraction) seront broyés dans la solution d'extraction à l'aide d'un broyeur à rouleaux, mortier ou homogénéisateur.

Les extraits obtenus pourront être clarifiés par décantation (quelques heures à + 4° C), par filtration ou par centrifugation à basse vitesse (5 à 10 mn à 1500-3000 tr/mn).

Les extraits seront conservés à + 4° C jusqu'au moment du dépôt, (pas plus de 12 h), une mauvaise conservation peut altérer les caractéristiques antigéniques du virus et diminuer la sensibilité du test.

Reconstituer les témoins lyophilisés par action de 1 ml d'eau distillée, puis agiter.

La dilution des témoins positifs est possible dans certains cas.

Après hydratation, les témoins doivent être conservés à 2 + 8° C et utilisés dans la journée.

Incubation : 1 nuit à + 2-8° C (les plaques doivent être couvertes avec un film plastique adhésif).

Lavage : 2 lavages avec du PBS – Tween puis lavages PBS – Tween avec 3 mn d'incubation du tampon de lavage.

Etape 3 : Dépôt des anticorps conjugués (Conjugués 60 ml, Anticorps conjugués 2 x 500 µl)

Diluer le tampon conjugué au 1/5 dans de l'eau distillée.

Diluer les anticorps conjugués au 1/100 dans le tampon conjugué (flacon rouge).

Pour une plaque diluer juste avant utilisation :

Tampon conjugué (rouge)	6 ml
Anticorps conjugué (bouchon rouge) 60 µl	

Bien mélanger avant utilisation.

Incubation : 2 h à 37° C (les plaques doivent être couvertes avec un film plastique adhésif).

Lavage : 3 lavages avec du PBS – Tween.

Etape 4 : Dépôt du substrat PNPP (Phosphate de p-Nitrophényle)

(Tampon substrat 60 ml, 10 pastilles de 12 mg).

Diluer le tampon substrat au 1/5 dans de l'eau distillée.

Dissoudre le PNPP juste avant utilisation dans le tampon de substrat (flacon incolore).

Pour une plaque diluer juste avant utilisation :

Tampon substrat (incolore) 10 ml
PNPP 10 mg
Attendre la dissolution totale avant utilisation.

Incubation : 15 mn à 37° C puis à température ambiante.

• **LECTURE ET INTERPRETATION :**

Les densités optiques (DO) sont lues avec un lecteur de plaque (Titertek) à la longueur d'onde de 405 nm.

1- Calcul des absorbances :

Les valeurs de DO des tampons, témoins et échantillons sont les valeurs brutes

Diminuer de la DO du substrat (=faire le blanc) :

DO échantillons = DO brute – Moyenne des DO des puits substrat.

2- Validation test Elisa :

Un test Elisa doit être interprété après que l'on ait vérifié les résultats suivants, après 1 h d'incubation du substrat :

- $0.06 < \text{Substrat} < 0.120$.

Indépendante du réactif utilisé, cette valeur varie en fonction de la quantité de réactif déposée dans chaque puits, 100 ou 200 μl .

- $\text{DO (TP)} < 0.150$; $\text{DO (T-)} < 0.150$; $\text{DO (T+)} / \text{DI(T-)} > 10$.

Si les bornes ci-dessus ne sont pas respectées, le test ne peut pas être interprété.

Les valeurs DO (T+), DO (TP) dépendent du kit utilisé. Les bornes proposées ci-dessus sont valables pour tous les kits.

3- Interprétation :

Pour une meilleure interprétation des résultats, nous conseillons de faire des lectures à 30 mn, 1 h et 2 h après dépôt de substrat. Les lectures plus tardives (3 à 4 h) permettent de détecter des échantillons faiblement contaminés.

L'interprétation du résultat peut se faire par le calcul d'un seuil de détection. Nous conseillons de le fixer à deux fois la moyenne des densités optiques des témoins sains. Un échantillon peut être déclaré contaminé si sa DO est nettement supérieure à ce seuil. Il doit être déclaré douteux si sa DO est proche du seuil.

- **QUELQUES RECOMMANDATIONS :**

- **A/ Plan de plaques :** Pour une bonne réalisation du test, il est recommandé :
 - ⇒ De ne pas utiliser les puits de bordures (« effet bordure ») ;
 - ⇒ De déposer chaque échantillon dans deux puits.

Exemple de plaque :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Substrat	TP	1	4	7	10	13	16	19	22	25	
C	Substrat	TP	1	4	7	10	13	16	19	22	25	
D	Substrat	T+	2	5	8	11	14	17	20	23	26	
E	Substrat	T+	2	5	8	11	14	17	20	23	26	
F	Substrat	T-	3	6	9	12	15	18	21	24	27	
G	Substrat	T-	3	6	9	12	15	18	21	24	27	
H												

TP : Tampon T+ : contrôle positif T- : Contrôle négatif 1 ; 2.échantillons.

Obtention des puits « substrat » pour le DAS-ELISA :

- 🚧 puits « substrat » : Coating = eau ; Echantillon = eau ; Conjugué = eau ; Substrat.
- 🚧 Puits « tampon » : Coating = Anticorps ; Echantillon = tampon broyage ; Conjugué ; Substrat.

- B/ Conservation des réactifs :

- ❖ Les réactifs glycérolés se conservent 12 mois à + 4° C.
- ❖ Les lyophilisats se conservent 18 mois à + 4°C, mais après réhydratation, les réactifs ont une courte durée de vie.

- C/ Utilisation des réactifs :

- ❖ Il est conseillé de laisser quelques minutes les réactifs s'équilibrés à température ambiante et d'agiter les flacons de réactifs avant utilisation.
- ❖ Les réactifs doivent être utilisés avec des quelques NUNC maxisorp certifiées.

- D/ Préparation des solutions :

Toutes les solutions doivent être conservées à + 4° C.

La durée de conservation a + 4° C est de 12 mois pour les solutions concentrées et de 1 mois pour les solutions diluées.

Pour les dilutions, utiliser de l'eau distillée ou ultrapure. Au besoin, placer les solutions concentrées quelques minutes au bain marie pour assurer une bonne homogénéisation.

Solution de fixation :

Diluer 1 volume de solution concentrée 5 fois dans 4 volumes d'eau distillée.

Solution de conjugué :

Diluer 1 volume de solution concentrée 5 fois dans 4 volumes d'eau distillée.

Solution de substrat :

Diluer 1 volume de solution concentrée 5 fois dans 4 volumes d'eau distillée.

Solution de lavage :

Diluer 1 volume de solution concentrée 20 fois dans 19 volumes d'eau distillée.

Solution de broyage :

Diluer 1 volume de solution concentrée 20 fois dans 19 volumes d'eau distillée.

- E/ Précochage des plaques :

Il est possible de conserver des plaques sur lesquelles la première couche d'anticorps est déjà absorbée. Pour cela, réaliser la fixation des anticorps comme indiquée par le protocole.

Après 2 heures d'incubation, vider les plaques par retournement, laver avec du tampon de lavage. Conserver les plaques sensibilisées et sèches à 4° C pendant quelques jours ou -20° C pendant plusieurs mois.

- F/ Précautions analytiques :

Ne pas utiliser les réactifs au delà de la date de péremption indiquée. Eviter toute contamination des réactifs.

Toute la verrerie devant être utilisée avec le kit doit être soigneusement nettoyée avec une solution acide avant utilisation, faire un rinçage abondant à l'eau distillée ou désinfection du matériel de virologie fait par la solution de 5 % de Na₃PO₄ (Trisodium phosphate).

• **LES PROBLEMES RENCONTRES ET LEURS CAUSES POSSIBLES**

Problèmes	Source d'erreur possible
Plaques de couleur uniforme	- Absorption défectueuse
Faible différence entre témoins	- Conjugué très concentré
Positifs et témoins négatifs	- Lavage insuffisant - Erreur de préparation des témoins négatifs
Plaque non contrôlée	- Conjugué trop dilué - Substrat peu concentré - Lavage excessif - Temps d'incubation trop court - Absence de témoin positif
Faible différence entre les positifs et les négatifs	- Réactions croisées - Conjugué trop concentré - Conjugué trop dilué - Substrat mal dilué - Temps d'incubation du substrat insuffisant - Réactifs périmés
Résultats non reproductibles	- Manipulation incorrecte - Préparation incorrecte des témoins - Immunosorbant défectueux - Lecture à une longueur d'onde non correcte - Appareil de lecture défectueux

ANNEXE3:

TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE – I F A

1/ Préparation de la lame :

- Dégraisser une lame à immunofluorescence avec une solution d'eau distillée contenant du tween 20 à 0.01% rincer abondamment avec de l'eau distillée, puis sécher sans frotter avec du papier filtre . Les lames de qualité (téflon) ne nécessitent aucun traitement préalable.

2/ Dépôt des échantillons :

- Déposer 20 µl de suspension bactérienne par puits sur la lame .laisser sécher à température ambiante ou au four à 50°C. Il est important que la dessiccation soit complète pour induire une parfaite adhérence de l'antigène sur le verre.

- fixer à l'éthanol 95°.

- laisser sécher et conserver à + 4°C (à l'abri de la lumière et de l'humidité)

3/ Dépôt du sérum :

- sérum lyophilisé : reconstituer le lyophilisat avec 1 ml d'eau distillée pour une conservation à +4°C (ou 0.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de glycérol pour une conservation à -20°C).

- diluer le sérum anti-bactérien à la dilution adéquate (cf. au verso) dans de l'eau physiologique tamponnée, puis déposer 20µl par puits .incuber pendant trente minutes à température ambiante en conditions d'humidité saturante.

- après dilution, la conservation des sérums est de courte durée .il est conseillé de préparer extemporanément la quantité de réactif nécessaire pour chaque test .les réactifs glycérolés non dilués se conservent à -20°C.

- rincer la lame délicatement à l'aide d'une pissette d'eau physiologique, puis laisser tremper deux fois dans de l'eau physiologique pendant 5 minutes.

- Assécher sans frotter.

4/ dépôt du conjugué :

- diluer le conjugué **GAR-FITC** au 1/100 dans de l'eau physiologique tamponnée.

Déposer 20µl de conjugué dans chaque puits .Incuber pendant 30 minutes à température ambiante en conditions d'humidité saturante et à l'obscurité.

- ajouter éventuellement du bleu d'Evans.
- Rincer la lame comme précédemment.
- Essuyer la lame (en dessous et au dessus à l'exclusion des puits).déposer de la glycérine tamponnée puis couvrir la lame avec une lamelle.
- Examiner la lame au microscope (sous U.V ., l'huile à immersion déposée sur la lamelle).

Les préparations ainsi obtenues peuvent être conservées à + 4° C et à l'obscurité pendant 72 heures.

<u>Eau physiologique :</u>	pour 100 ml	<u>Glycérine :</u>	pour 100 ml
Na Cl	8g	Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	3.2g
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	2.7g	Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	0.15g
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	0.4 g	Glycérol	50 ml
pH = 7.2		pH = 7.6	

SERUM BRUT (SB)

Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus

(*Corynebacterium sepedonicum*)

Sérum glycérolé –Dilution d'utilisation : 1/100

Sérum obtenu à partir d'un mélange de 3 souches bactériennes

Ce sérum est approprié pour des tests :

- d'identification de la bactérie en culture pure
- de détection en IF sur échantillon végétal (tubercules de pomme de terre)

Erwinia amylovora

Sérum lyophilisé – dilution d'utilisation : 1/1600

Souche bactérienne de référence CNBP N°1430. Plante hôte : crataegus sp.

Ce sérum est approprié pour des tests d'identification de la bactérie en culture pure.

Ralstonia solanacearum
(Pseudomonas solanacearum)

Sérum glycérolé – dilution d'utilisation : 1/50

Cet antisérum a été produit contre la souche CNBP N° 1065, isolée de tomate (*lycoperdon esculentum*), et permet la détection de toutes les races de *P.solanacearum* (races 1,2 et 3).

Ce sérum est approprié pour des tests de détection en immunofluorescence sur échantillon végétal (détection dans le sol exclue).

Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis
(Corynebacterium michiganensis)

Sérum glycérolé – dilution d'utilisation : 1/100

Souche bactérienne de référence CNBP N° 8321. Plante hôte : *lycopersicon esculentum*.

Ce sérum est approprié pour des tests :

-d'identification de la bactérie en culture pure

- de détection en immunofluorescence sur échantillon végétal (lots de semences de tomate).

Erwinia carotovora pv.atroseptica

Sérum glycérolé – dilution d'utilisation : 1/100

Souche bactérienne de référence CNBP N° 1526. Plante hôte : *lycopersicon esculentum*.

Ce sérum est approprié pour des tests :

- d'identification de la bactérie en culture pure

- de détection en immunofluorescence sur échantillon végétal

L'utilisation du sérum pour identification par la technique d'agglutination est déconseillée en raison de fréquents antigènes flagellaires communs avec *Erwinia carotovora pv. Carotovora*.

Pseudomonas syringae pv. phaseolicola

Sérum glycérolé – dilution d'utilisation : 1/100

Cet antisérum a été produit contre la souche CFBP N° 1360 de *P.syringae pv. phaseolicola* (*Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola*) . Ce sérum est approprié pour des tests de détection en immunofluorescence sur échantillon végétal (détection dans le sol exclue)

REFERENCES

1. FAOSTAT 2002 – Internet –
2. Rapport du CNCC –2003-.
3. DJENNANE S. et KHELIFATTI N., Etude de quelques facteurs influençant la tubérisation in vitro de quelques variétés de pomme de terre : Cardinal, Désirée et Elvira. Mémoire d'ingénieur, INA El-Harrach. Alger, (1996), 107p.
4. LOUGHREIB H. et MAHMOUDIA F., “Micropropagation et microtubérisation de 3 variétés de pomme de terre”. Mem. Ingénieur INA El-Harrach. Alger, (1997), 120p.
5. OULD RAMOUL, A., “Etude des possibilités de production de semences de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L. var. Désirée) à partir de minitubercules issus d'in vitro”. Mém de magister, INES de Blida (1997).
6. YAHIA-MESSAOUD, L. “Etude des possibilités de production de semences de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L. var. Nicolas) par microtubérisation après micropropagation” Mém de Magister, INA – El Harrach (1998), 92p.
7. TOUBAL, N., “Microtubérisation de 3 variétés de pomme de terre (Cardinal, Désirée et Elvire) : Etude de l'effet des facteurs de inducteurs de la tubérisation sur la dormance des microtubercules , Essais de levée expérimentale de la dormance”, Mem. Ingénieur INA El-Harrach. Alger (1997), 90p.

8. ALI BEN ALI, M.A. et AL AMIR, H., " Etude et Analyse de divers facteurs influençant la micropropagation et la microtubérisation de trois variétés de pomme de terre (Cardinal, Désirée et Elvira)" Mem. Ingénieur INA El Harrach Alger, (1998), 112 p.
9. KHELIFI-SLAOUI, M., KHELIFI, L., DJENNANE, S. et KHELIFATI, N., "Facteurs influençant la microtubérisation de trois variétés de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) : Cardinal, Désirée et Elvira." ; Annales de l'INA El-Harrach, Vol.21, N° 1et 2, ISSN 5432, (2000), 40 –50.
10. KHELIFI, L., KHELIFI-SLAOUI, M. ABDELGUERFI, A., MORSLI, A. et LAHMISSI, A., "Mise au point d'un procédé de production de semences de pomme de terre", Séminaire international, ATBiotech, sur les biotechnologies, Hammamet (tunisie), (du 15 au 18/12/2002)
11. KHELIFI, L., ABDELGUERFI, A., KHELIFI-SLAOUI, M., ABDELGUERFI LAOUAR, M., MORSLI, A., BELLAL, M., BOUZNAD, Z. et LOUANCHI, M. "Les biotechnologies végétales en Algérie ; Situation actuelle et perspectives", symposium régional , Hammamet (Tunisie), (du 12 au 15 septembre/2002).
12. LAHMISSI A., KHELIFI, L., et SLAOUI-KHELIFI, M., "Mise au point d'un procédé biotechnologique pour la production de semences de pomme de terre", 1er salon international des produits phytosanitaires et du matériel végétal (semences et plants). Aurassi, Alger - Mag-Vet, N° 47, (Novembre et Décembre 2003).
13. LAHMISSI A., "Mise au point d'un procédé biotechnologique pour la production de semences de pomme de terre". Magister, INA, (2004),122 p.
14. OUALHA ,D., "Micropropagation, Microtubérisation et Minitubérisation de cinq variétés de pomme de terre *Solanum tuberosum* L", Thèse Ing Ines agro BLIDA , (1999), 99p.
15. HAWKES T.G., "Biosystematics of the potato". in the potato crop, The scientific basis for improvement. (1982), 68p.
16. DUCREUX.G.ROSSIGNOL. L. et ROSSIGNOL .M., "la pomme de terre", la recherche N° 174; (1986), 193-203.
17. STAROSTIN, G., "la pomme de terre" Culture maraîchères spéciales INA, département de phytotechnie et agriculture générale laboratoire d'horticulture (1977)

18. VAN LOON, C.D., "Stage sur la production de pomme de terre", Staweli I.N. V.A.A lahaye, (1987).
19. ROSSIGNOL, L., "les grandes production végétales collection sciences et techniques agricoles" 16ème Ed, (1988), 239-243.
20. DARPOUX, R. et DE DELLEY M., "les plantes sarclées" ED.JB BAILLIERE et fils France collection enseignement agricole, (1967), 307 p.
21. AMIROUCHE, L., "Multiplication de la pomme de terre et la méthode "in vitro" " rev n° 6 Algérie vert ed MAP (1987), 22 -25
22. NOZERAN, R., "l'expression de la variable dans les cultures d'organes" Rev. Actualités botaniques N° 314, (1985), 17-21.
23. ANONYME ., "Rapport I.T.C.M.I Guellal ", Sétif (1990), 20.
24. PERENNEC P., "Plant de pomme de terre. Qu'est ce que l'âge physiologique ?" Revue : cultivar, N° 188, (1985), 67-69.
25. MADEC. Pet PERENNEC, P., "les relations entre l'induction de la tubérisation et la croissance chez la pomme de terre" .Ann. Physiol .vég.4 (1) (1962), 5-83.
26. CROSINIER, JC., GRISON, C., Le CORRE, p., "physiologie de la croissance et de la tubérisation" revue : Pomme de terre française N ° 393 (1979), 216-221.
27. VAN DER ZAAG, D.E., "Plant de pomme de terre sources d'approvisionnement et traitement". Institut consultatif Néerlandais sur la pomme de terre, (1983), 1-39.
28. GRISON, S., "la pomme de terre, caractéristique et qualité alimentaire" ITPT (1983), 13 – 41.
29. LANG, R.W., " Population de plante, nombre de tubercules calibre de la plante et taux de plantationaux cours de production des plantes de pomme de terre", école d'agriculture d'Ed in bourg. (1986).

30. SAUNDERS A., “Potato dormancy and physiological age in relation to potato production in northern Ireland dry green Mout”, College of agriculture and horticulture, (1988), 1-7.
31. BURTON, W., “ the potato a survey of its history and of factors influencing its yield. Nutritive value quality and storage” .ed. H.VEENMAN and ZONEN .Nwagningeu .HOLLAND, (1966), 126-139.
32. SMITH, M.L., “ La Physiologie fondamentale de la pomme de terre”, cours de production des plants de pomme de terre, école d'agriculture d'Editor, (1986).
33. VALAIN, M., “La production végétale”, Vol. 2, la maîtrise technique de la production de l’agriculture d’haujourd’hui, Ed, Tech et doc., Lavoisier, Paris, (1989), 361 p.
34. BRYAN, J. E ., “ Rupture de la dormance des tubercules de la pomme de terre ”guide de recherche C P (1990), 13-16.
35. ALLEN, E.J., “Plant density the potato crop, the scientific basis for improvement”, Ed. Harris, CHAPMAN and HALL, London, (1978), 358-391
36. LEVEIL, F., “la pomme de terre deux siècles d’évolution depuis Parmentier la dégénérescence le mildiou, la tubérisation, le rendement et l'amélioration génétique” CR. Acad. Agr de France (71) N° 10 (1985), 108p.
37. JOLIVET, E., “Physiologie de la tubérisation” An physiol veg , 11(3), (1969), 265-286 .
38. MOULE, C., “plantes sarclées et diverses”, coll. Techn. d'avenir. Ed la maison rustique .paris, (1982), 399 p.
39. SAPIN., “la pomme de terre”, Cours de culture maraîchères spéciales. INES BLIDA. (1977).
40. GRISON., “ La pomme de terre, caractéristiques et qualités alimentaires” I T P T,1983,13-41.

41. CHAUSSAT ,R et BIGOT ,C., La multiplication des plantes supérieures, Paris, (1980), 270p.
42. SOLTNER D., “les grandes production végétales” collection : Sciences et techniques 12ème édition, (1982), 242-278.
43. TRIGUEROS G., “Choix et préparation du plant” revue : pomme de terre française N ° 445, (1988), 93-96.
44. HARRISSON B.D., “Potato leaf roll virus”.CMI/AAB.Description de la pomme de terre .Ed I.T.P.T. (1984), 63-76.
45. PETERS P., “Potato Leaf roll virus”, CMI/ABB Description of plant viruses (1970).
46. DESPREZ, M., “Conservation de variétés” .Production de semences de plants de grandes cultures Ed. Florimond Despres. (1990), 80p
47. WETTER C., “Potato virus” ,S. C M I /AA .Description of plants virus, (1971), 60p.
48. CORNUET., “Elément de virologie végétale” Ed.LAVOISIER, (1987), 20-181.
49. DELGARDO. SANCHEZ et GROGGAN. R G., “Potato virus ”Y.CMI/AAB-Description of plant viruses. (1970).
50. JELIS et BULTON (1984) in BOXUS, Ph; TERZI, J.M ; “formations spécialisées aux techniques de micropropagation industrielle” projet ENARP – ILAP – CRA (mai 1994) ; ministère des cultures fruitières et maraîchères B -5030 GEMBLoux (Belgique)
51. MESSIAEN 1981) in BOXUS, PH; TERZI, J.M ; “formations spécialisées aux technique de micropropagation industrielle” projet ENARP – ILAP – CRA (mai 1994) ; ministère des cultures fruitiers et maraîchères B -5030 GEMBLoux
52. FAO STAT-2002 –INTRNET.
53. ANONYME ., “Rapport sur le fonctionnement de la SAGRODEV pour la production de plants de pre-base pomme de terre et coût de production ”(juin 2002) 13

54. RAJNCHAPEL, MESSAI J., “la pomme de terre fait peau neuve” *Bioculture* septembre (1987), 35 – 37.
55. AMIROUCHE ,L., Production de plants de base dans quelques pays étrangers et situation actuel en Algérie. *Sem. Int pomme de terre*, ITCMI, Staouali, Alger, T2. ,(mai 1979),22-25.
56. MOLET D.M., “culture sur la production des boutures, microtubercules minitubercules la pomme de terre” *CIP / CIHEM sarogosse Espagne*, (1990), 1-25.
57. YVES, T., “Technologie des légumes”. *Collection sciences et technique agroalimentaire .Ed : technologie et documentation – 11 rue Lavoisier F 75384 paris cedex 08*, (1999), 65-90.
58. FOURAGE, G., “ Evaluation et potentialité des minitubercules de pomme de terre produit par in vitro in amélioration des plantes par voies conventionnelles” *Partie I- quatrième journées scientifiques du réseau Bio technologie végétale de l’UREF Université des réseaux d’expression française Namur*, (18-21 octobre 1993), 205-209.
59. BEDOUET, J., “Aspect technique de la production de pomme de terre ”*Rev cultivar n° 91*, (1977).
60. OUDIN, Y., “Semence et / ou vitroplants .les cultures végétales in vitro”, *conférences colloque APRIA .(Mai 1982)*, 19p.
61. LAFON J. P., THARAUD –PRAYER et LEVY G., “Biologie des plantes cultivées”, Tom 2, *physiologie du développement génétique et amélioration. Coll C-E .R .L .A, ed A.R.P.E.P.S, angers*, (1987), 172 p .
62. ROUSSELLE, P et ROUSSELLE, F., “Nouvelles approches en matière d'amélioration génétique chez la pomme de terre” *n° 447*, (1988), 173-180.
63. HERVE, Y., “Biotechnologie et production végétales techniques agricoles” *N ° 2350 (2) (1987)*, 1 –15.
64. BOXUS, Ph; TERZI, J.M ; “formations spécialisées aux technique de micropropagation industrielle” *projet ENARP – ILAP – CRA (mai 1994) ; ministère des cultures fruitiers et maraîchères B -5030 GEMBLOUX (Belgiuime)*

65. LOO (1945)., Cours d'amélioration des plantes., INES, Agro, BLIDA.
66. BALL (1946)., Cours d'amélioration des plantes., INES, Agro, BLIDA
67. SMITH ET MURACHIGE 1970 IN BOXUS, Ph et TERZI, J.M ; "formations spécialisées aux technique de micropropagation industrielle" projet ENARP – ILAP – CRA (mai 1994) ; ministère des cultures fruitiers et maraîchères B -5030 GEMBLoux (Belgiuime)
68. MOREL ET MARTIN (1952-1955) , IN BOXUS, Ph; TERZI, J.M ; "formations spécialisées aux technique de micropropagation industrielle" projet ENARP – ILAP – CRA (mai 1994) ; ministère des cultures fruitiers et maraîchères B -5030 GEMBLoux (Belgiuime)
69. KARLIN, (1987), IN BOXUS, Ph; TERZI, J.M ; "formations spécialisées aux technique de micropropagation industrielle" projet ENARP – ILAP – CRA (mai 1994) ; ministère des cultures fruitiers et maraîchères B -5030 GEMBLoux (Belgiuime).
70. LE POIVRE , P et SEMAL, J., "La culture de tissus et phytopathologie végétale" .Ed Presses agronomiques Gembloux Belgique, (1989), 621p.
71. MELLOR .FC ., STACE –SMIH. R., "vows free potatoes by loisue culture in applied and fundamental aspects of plants cell , tissue and organ cultures" . Ed. by Reinst J and Bayed Y .P .S, Springer Verlag Berlin,(1977), 616-635.
72. NOZERAN, R., BANCILHON, ROSSIGNOL, L., " les cultures in vitro et la production de semence de pomme de terre" sem Int de la pomme de terre ITCMI Staouali tome 1, (1979), 133-146.
73. MARTIN. C., "la culture des plantes en éprouvette", la recherche N° 160 vol 15, (Nov. 1984), 1363 – 1971.
74. CHARBONNIER .CH ., CHAVPEAUX , DE SHAYESA , DOREC , DE VAIVLS, RD., GOACOU J., JOLYP, B., BERDRUZETE , PARADETA , ROUSSEL M , SAINT GESU , , "les biotechnologies

en service de la production végétale”, les dossiers de L'INRA.INRA édition .C.THAROUD-PRAYE et G. LEVY-ANGERS LIARPES (1988),171p.

75. ZRYD, J.P., GAZEAU, M., DERREDRE, J et MONNIER, M., “culture de cellules, tissus et organes végétaux”. Fondement théoriques et utilisations pratiques .Presse technique .Romandes, Lausanne, (1988) 308p.
76. GAZEAU, M, et DERAURDRE, J., “La culture de méristèmes” (1988), 13-30 in Culture de cellules, tissus et organes végétales ZRYD, J .P.Ed .Presse polytechnique Romandes Lausanne 308p.
77. KARP ,A., JONES ,M G K ,OOMS,G. ET BRIGHT, S.W.J., “Potato protoplasts and tissue culture in crop improvement”, biotechnologyof higher plants.Ed GORDONE RUSSEL , (1988), 240 p.
78. ESPINOSA N., ESTRADA R., TOUAR P., BRYAN J.et DODDS J H C, “culture de tissus : micropropagation, conservation et exportation du germoplasme de la pomme de terre ” CIP Guide 1 Pérou .(1986).
79. BOXUS, PH et DRUART, P., “Virus free, tree, through tissue culture. Biotechnology in agriculture and forestry ”1 trees I EY.P.SBAJAD, (1986), 24-50.
80. BOXUS, PH.,“culture de tissus et assainissements”. Extrait de compte rendu de la journée d'étude Belgium group I.S.H.S, (1987), 74-78.
81. MILLER, A., LIPSCHUTZ, L., “potato” In hand boock of plant cell culture crop speicis AMMIRATO P.V EVANS DA , SHAR PW R, et YAMADA.Y., Ed MACHILLAN Inc, NEW YORK (1984), 291-266.
82. NOZERAN, R., “l'expression de la variable dans les cultures d'organes”. Rev. Actualités botaniques N ° 314 (1985), 17-21.
83. ROSSIGNOL, BANILHON, NOZERAN R, GRAMANS, et VANUYEN., “la multiplication végétative conforme de la pomme de terre aspect fondamentaux et utilisation agronomique”. réunion européenne section légumes C N R A Versailles (1980(a)) 62-68.
84. WIERSMA S.G., “Comparative performance of three Small Reed tubers sizes and standardizes seed tubers planted at similar stem densities”. Potato research, vol 32, (1989), 81-89.

85. SANDERS A.R., "Controlling potato tubers size agriculture in northern Ireland", vole: 1, (1987), 10-11.
86. IRITANI, W. .M et WELLER, D.L., "The influence of physiological age stem number and fertility on yield and grade of rousset Burbank potatoes", American potato journal, vol 64 m , (1987), 291-299.
87. ROZTROPWICZ, S., "Interdépendance du calibre des plants de la densité de plantation et le nombre de stolons et le calibre des tubercules fils". Ed : Abstract of the 11th triennial conference of E.A.P.R Edinburgh U.K (July 1990), 232-233.
88. MACKERRON D.K.L " in seed time learn Potato news Dundee" conférence spécial, (April 1987).
89. ELLISSECHE, D., PERENNEC, P., "Densité de plantation et rendement en plants d'une culture de pomme de terre". Revue : pomme de terre française N° 439,(1987), 98 -103.
90. STRUIK P.C., HAVERKORT A.J., URENGDENHIL D., "La physiologie de la distribution des calibres des tubercules de pomme de terre". Ed: abstract of the 11th triennial conference of the E.A.P.R, Edinburgh U.K (8-13 July 1990), 382-383.
91. STOREY, T.S., BARRY, P.J., FOWLE, M., "Effet of population and set size of the yield of the main crop potato cultivar" clada Irish. Journal of agricultural research, vol 24 (1985), 213-219.
92. PENNAZIO, S., REDOLFI, "Potato virus X eradication in cultured potato meristem typs" potato rev, 17. (1974), 333-335.
93. QUARQ F., "Méristeme culture and virus -free plants in applied and fundamental aspects of plant cell tissues and organ culturere "ed by Reinst J.et Y.P.S Bajaj Springer verlag Berlin, (1977), 598-615.
94. PENNAZIO, S., VECCHIATI,M., "Potato virus eradication from potato meristem tips held at 30°C". Potato rev, 21, (1978), 19-22.
95. SOLTNER,D, Les grandes productions végétales 17ème Ed.collection sciences et techniques agricoles, (1990), 464p.

96. SKOOG F., "Aspect of growth inter actions in morphogenesis of tobacco tissue cultures", les cultures de tissus de plantes, Strasbourg, (Juillet, 1970), 115-137.
97. TRAN THANH VAN, M., et DRIDA, A., "Definition of a simple experimental system of direct organogenesis de nuevo : organ neof ormation from epidermal tissue of *Nautilocalyx lynché*". Colloques internationaux du CNRS N°193 Ed. CNRS. France paris, (1970), 169-176.
98. LAFON, J.P., "Biologie des plantes cultivées", T2 physiologie du développement génétique et amélioration, (1987), 171p.
99. AUGE, R, " Les phénomènes physiologique lies à la réalisation des cultures « in vitro »".Et ces applications horticoles. Ed.Lavoisier J.B baillière, (1989),17-24.
100. BEAUCHENESE., "l'histoire et les fondements". Ed. Lavoisier. J. B Bailliere, (1989) 11-14.
101. BIGOT C., "Apport de la culture in vitro dans le contrôle de la néoformation", cinquantième de la culture in vitro.24-25 oct.1989 Ed. INRA Paris (1989). 37-53.
102. BUCCON et GIBOD, J.,"les besoins nutritifs des tissus cultivés en condition. Aseptiques". La culture in vitro et ses application horticoles .Ed – Lavoisier J.B Bailliere (1989), 41-46.
103. WANG, P.J., CHARLEL A., "Micropropagation thong meristem". Culture- biotechnology in agriculture and forestry 17. High technology and micropropagation .Ed.Y.P.S.BAJAJ, (1991), 555p.
104. CUTTER .G E., "Structure and développement of the potato plant".The potato crop (the scientific basis for improvement) 2nd Ed. P. Harris, (1992), 909 p.
105. BOXUS: PH-(2000)-communication personnelle.
106. KHELIFI, L., "Chaine de production de semences de pomme de terre de l'in vitro à la serre insect proof" rapport d'expertise SAGRODEV , (1999), 20P.

107. LEVY, D., "Propagation of potato by direct transfer of in vitro proliferated shoot cutting into the field", scientio horticulture 26, (1985), 105-109.
108. www.com. Elboura 2002.-ITRNET-
109. FOURAGE, G., "la détection phytosanitaire de la pomme de terre " sem Int de la pomme de terre (Mai 1977)
110. ELLISSECHE ,D., "la pomme de terre" in technologie des légumes. Ed Tech et doc. -11-Rue Lavoisier F 75384, Paris cedex 08, (1999), 65-90.
111. MOLET, D., "Culture in vitro". Evolution des techniques bouture – microbouture - minitubercule. La pomme de terre française N°144 ,(1988), 43-47.