

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Constantine -1-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie Végétale

N° d'ordre:22/Ds/2018

Série: 03/Bio.E/2018

Thèse Présentée en Vue de l'Obtention de Diplôme de Doctorat en
Sciences

Filière : Biotechnologies végétales

Option : Biotechnologies végétales

Thème

Amélioration de l'aptitude à la callogenèse chez la pomme de terre
***Solanum tuberosm* L somatique de la pomme de terre par la**
sélection de meilleurs équilibres hormonaux

Présenté par : Chahredine Sadek

Soutenu le : 08-02-2018

Devant le jury d'évaluation :

Président : Mr DEHIMET Laid Prof Université de Mentouri- Constantine1

Encadreur : Mme YKHLEF Nadia Prof Université de Mentouri- Constantine1

Examineurs :

YAHIA Abdelouahab Prof Centre universitaire Adelhafid Boussouf-Mila

Mr BENDERRADJI Laid MCA Université Mohamed Boudiaf - M'Sila

Mme BOUATROUSSE Amina MCA Université Mohamed Khider- Biskra

Mme BOUSBA Ratiba MCA Université des frères Mentouri- Constantine1

Année universitaire 2017-2018

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Ma mère

Mon père

Ma femme et mes enfants

Et mes sœurs et mes frères

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement le professeur Nadia YKHLEF qui a dirigé et suivi ce travail avec patience, sa compréhension, son amabilité et ses conseils précieux.

Je le prie de bien vouloir trouver ici le témoignage de ma très vive gratitude, je tiens également à exprimer ma profonde gratitude au professeur DEHIMET Laid pour avoir accepté d'apprécier le travail et de présider le jury, par la même occasion, mes remerciements vont au professeur YAHIA Abdelouahab et aux docteurs :BENDERRADJI Laid, BOUSBAA Ratiba et *BOUATROUSSE Amina*. qui ont bien voulu honorer le jury par leur présence et pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes vifs remerciements sont adressés également à l'équipe du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (LGBBV) et à mes amis de la promotion: Kamel KELLOU, Lyas BOUAZZA, Karim BAAZIZ, Mouloud GADHBANE, Zahira BOUZIANE, Leila BENFREIDJA, Hanane KHALFALLAH , Ahlem GUETTOUCHI et l'ingénieur de laboratoire Nadir BELBEKRI Je remercie aussi le professeur Mohamed SIFOUR pour sans aide dans la correction du mémoire et la publication des articles.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la préparation de ce document.

Sadek CHAHREDINE

Liste des tableaux

Tableau	Page
Tableau 01 : Evolution de la production de pomme de terre en Algérie (1971-2014)	06
Tableau 02 : Les principales wilayas productrices de pomme de terre en Algérie	08
Tableau 03 : Les progrès réalisés dans la culture in vitro des différents tissus de la plante (Augé et <i>al.</i> , 1989)	11
Tableau 04 : Les Progrès de la fusion de protoplastes chez la pomme de terre entre (2004 à 2013) (Ellouz et <i>al.</i> , 1994)	16
Tableau 05 : Evolution de recherches effectuées sur la callogenèse (1938-2015).	20
Tableau 06 : La fiche d'identité de la pomme de terre <i>Spunta</i>	25
Tableau 07 : La fiche d'identité de la pomme de terre <i>kondor</i> .	25
Tableau08 : Concentration des hormones de croissance pour l'induction de la callogenèse avec (NAA/BAP)	28
Tableau09 : les concentrations hormonales des différents milieux utilisés pour la callogenèse avec BAP.	28
Tableau 10 : Les concentrations hormonales des différents milieux utilisés pour la callogenèse en présence de (2,4-D et 2,4-D/BAP) à la lumière.	29
Tableau 11 : les milieux de cultures utilisés pour l'induction de la callogenèse avec (2,4 D) à l'obscurité.	30
Tableau 12 : La concentration des hormones utilisées pour l'induction de la callogenèse avec les milieux (NAA et NAA/BAP).	30
Tableau 13 : La concentration des hormones utilisées pour l'induction de l'embryogenèse somatique avec (NAA / BAP et 2,4 D / BAP).	31
Table 14 : Effet de différentes concentrations de NAA et NAA-BAP sur la texture et la couleur après une semaine et deux mois de la formation des cals dans le cas d'explant de germes pour les deux variétés	35
Table 15 : Effet de différentes concentrations de NAA et NAA-BAP sur le pourcentage de callogenese après une semaine et deux mois de la formation des cals dans le cas d'explant de germes pour les deux variétés	36

Table 16: Effet des différentes concentrations de NAA et NAA-BAP sur le pourcentage de callogenèse après deux mois de la formation des cals dans le cas d'explants d'entre-nœuds pour les deux variétés.	37
Table 17: Effet des différentes concentrations de NAA et NAA-BAP sur la texture et la couleur après une semaine et deux mois de la formation des cals dans le cas d'explant d'entre-nœuds pour les deux variétés	38
Tableau 18 : Variation du poids frais des germes dans les différents milieux avec Spunta et Kondor après deux mois d'incubation sur les différents milieux en présence de (NAA et NAA/BAP).	39
Tableau 19 : Description des phases de développement après 7 jours d'incubation des deux variétés Spunta et Kondor sur les différents milieux.	51
Tableau 20: Description de la texture, couleur et degré de développement après deux mois d'incubation des deux variétés Spunta et Kondor sur les différents milieux (MS+NAA et NAA/BAP).	52
Tableau 21 : Poids frais et taux de callogenèse des cals obtenu pour les germes des deux variétés après deux mois d'incubation sur les milieux (MS+NAA et NAA/BAP).	55
Tableau 22 : Développement des explants de germes avec BAP seul après une semaine d'incubation.	57
Tableau 23: Développement des explants de germes avec BAP seul après deux semaines et deux mois d'incubation.	58
Tableau 24: Texture et couleur des cal après une semaine d'incubation sur milieux (MS+ 2,4-D et 2,4-D/BAP).	61
Tableau 25: Texture et couleur des cal après deux mois d'incubation sur milieux (MS+ 2,4-D et 2,4-D/BAP).	62
Tableau 26 : Poids frais des cals de germes obtenu après deux mois de culture sur milieux (MS+ 2,4-D et 2,4-D/BAP).	63
Tableau 27: Description de la texture et la couleur après une semaine et deux mois d'incubation de Spunta et Kondor sur les différents milieux (MS+2,4-D et 2,4-D/BAP).	68
Tableau 28: poids frais moyen des cals des différents milieux, % et temps callogenèse sur milieu (MS+2,4D).	69
Tableau 29: poids frais moyen des cals obtenus dans les milieux M1, M2 et M3 à l'obscurité	71

Tableau 30: couleur et croissance des cals après 15 puis trois mois d'incubation sur les milieux embryogènes (NAA/BAP).	76
Tableau 31: Nombres de bourgeons et racines et taux de callogenèse après trois mois d'incubation sur les milieu embryogènes (NAA/BAP).	78
Tableau 32: caractéristiques des cals après trois mois d'incubation dans les milieux embryogènes (NAA/BAP).	79
Tableau 33 : Notation du nombre de bourgeons et de racines et taux de callogenèse après trois mois d'incubation sur les milieux embryogènes (MS+2,4-D et 2,4-D/BAP).	80
Tableau 34: Comparaison entre les différentes hormones sur la callogenèse	86
Tableau 35 : Différences des réponses de la variété Spunta face aux rapports différents (NAA/BAP et 2,4-D/BAP)	87

Liste des figures

Figure	Page
Figure 01 : L'appareil végétatif de la pomme de terre	05
Figure 02 : L'évolution de la production de pomme de terre en Algérie (1970-2014)	07
Figure 03 : Types d'organogénèse contrôlée par des concentrations d'auxines et de cytokinines	12
Figure 04 : Morphologie des tubercules des variétés Spunta et Kondor	26
Figure 05 : Variation du taux de callogénèse après trois mois d'incubation sur les milieux NAA/BAP pour les explants de germes de Spunta et Kondor.	34
Figure 06 : Variation du taux de callogénèse après trois mois d'incubation sur les milieux NAA/BAP pour les explants de tige de Spunta et Kondor.	38
Figure 07 : Variation du poids frais des germes dans les différents milieux avec Spunta et Kondor après deux mois d'incubation sur les différents milieux en présence de (MS+NAA et NAA/BAP).	39
Figure 08 : Effet de l'auxine et cytokinine rapport sur l'induction de cals pour des explants de pommes de terre (entre-nœuds et germes) cultivés in vitro.	40
Figure 09 . Etude histologique des cals de Spunta. A: Coupe transversale des entre-nœuds de pommes de terre	42
Figure 10 : Influence de l'orientation de l'explant sur la callogénèse	44
Figure 11 : Formation de microtubercules sur les cals obtenues de milieux différents.	45
Figure 12 : Variation du taux de callogénèse des germes dans les différents milieux avec Spunta et Kondor après deux mois d'incubation sur les différents milieux en présence de (AA et NAA/BAP) à l'obscurité	50
Figure 13 : Poids frais des cals obtenu après deux mois de culture à l'obscurité sur milieux (NAA et NAA/BAP).	53
Figure 14 : Callogénèse in vitro de deux variétés de pomme de terre Spunta et Kondor à l'obscurité en présence de NAA et BAP	54
Figure 15 : Variation du taux de callogénèse des cals obtenu après deux mois de culture à l'obscurité sur milieux (NAA et NAA/BAP).	55

Figure 16: Croissance des germes de Kondor et Spunta en présence de BAP.	60
Figure 17: Variation du taux de callogenèse des germes de Kondor et Spunta sur les milieux 2,4-D/BAP après deux mois d'incubation.	62
Figure 18: Poids frais des cals obtenu après deux mois de culture sur milieux (MS+ 2,4-D et 2,4-D/BAP).	64
Figure19: Influence des différents milieux (MS+ 2,4-D et 2,4-D/BAP) sur la callogenèse des germes après deux semaines de culture	66
Figure 20 : Influence des différents milieux (MS+ 2,4-D et 2,4-D/BAP) sur la callogenèse des germes après deux semaines et deux mois de culture	66
Figure 21: Callogenèse à l'obscurité de deux variétés de pomme de terre (Spunta et Kondor) en présence de 2,4-D.	70
Figure 22: Variation du taux de callogenèse après trois mois d'incubation sur les milieux 2,4-D/BAP pour Spunta et Kondor	71
Figure 23: Variation du Poids frais après trois mois d'incubation sur les milieux 2,4-D/BAP pour Spunta et Kondor.	74
Figure24: développement des cals obtenu avec NAA/BAP sur milieu embrogène après trois mois d'incubation	77
Figure 25: Variation du taux de callogenèse après trois mois d'incubation sur les milieux NAA/BAP pour Spunta et Kondor	80
Figure 26: développement des cals obtenu avec 2,4-D sur milieu embrogène après trois mois d'incubation	81
Figure27 : Variation du taux de callogenèse après trois mois d'incubation sur les milieux 2,4-D/BAP pour Spunta et Kondor.	83

Liste des annexes

Annexe 1 : Développement des germes de Spunta et Kondor respectivement après une semaine d'incubation.

Annexe 2 : Influence des différents milieux (MS+ 2,4-D et 2,4-D/BAP) sur la callogenèse des germes après deux semaines de culture.

Annexe 3 : Influence des différents milieux (MS+ 2,4-D et 2,4-D/BAP) sur la callogenèse des germes après deux semaines et deux mois de culture.

Annexe 4-1: taux de contamination, de brunissement et de réussite pour les deux variétés *Spunta* et *Kondor* sur les différents milieux en présence de (MS+2,4-D).

Annexe 4-2-taux de contamination, de brunissement et de réussite pour les deux variétés *Spunta* et *Kondor* sur les différents milieux en présence de (MS+ NAA/BAP).

Annexe 5 : Types de régulateurs de croissance et leur solubilité.

Annexe 6 : Protocole de dilution d'une solution mère.

Annexe 7 : Composition du milieu MS.

Liste des abréviations

2,4-D : acide 2,4-dichlorophenoxyacétique.

ANA (NAA) : acide naphthalèneacétique.

BAP : 6-benzylaminopurine

K : Kondor.

S : Spunta.

M1 :NAA/BAP (0.5/1 mg/l) .

M2 : NAA/BAP (1/0.5 mg/l).

M3 : NAA/BAP (2/2 mg/l).

M4 : NAA/BAP (0.5mg/l).

M5 : NAA/BAP (1 mg/l).

M6 : NAA/BAP (2mg/l).

H1 : 2,4-D/BAP (0.5 mg/l).

H2 : 2,4-D/BAP (1 mg/l).

H3 : 2,4-D/BAP (2 mg/l).

H4 : 2,4-D/BAP (0.5/1 mg/l).

H5 : 2,4-D/BAP (1/0.5 mg/l).

H6 : 2,4-D/BAP (2/2 mg/l).

H7 : 2,4-D/BAP(0.2/1 mg/l) .

FAO : **F**ood and **A**griculture **O**rganization

CNCC: Centre National de Contrôle & Certification des *Semences* & Plants

Résumé

L'objectif principal de cette mémoire est de d'étudier la réponse des différents explants de pomme de terre Spunta et Kondor à la callogenèse et l'embryogenèse somatique en présence des combinaisons avec NAA/BAP et 2,4-D/BAP. Nous avons opté dès le départ pour les bourgeons et les entrenœuds comme explants. La couleur et la texture des cals varient selon la nature des régulateurs de croissance et la présence ou l'absence de lumière. Avec la combinaison NAA/BAP la variété Spunta développe la meilleur callogénèse dans tous les milieux par rapport à la variété Kondor en fonction de la concentration des hormones, il existe une gamme de variations de jours nécessaires pour cals initiation, le pourcentage des explants qui ont développé des cals, la texture, la couleur et le degré de sa formation. Pour la combinaison 2,4-D/BAP les résultats indiquent qu'après trois semaine de culture, que les cals sont d'apparence humide, molle et friable de couleurs vert et vert blanchâtre et blanc avec la combinaison NAA/BAP, et de couleur de couleur vert, vert-clair et brun pour les deux explant avec tous les milieux avec la combinaison 2,4-D/BAP .La croissance des cals varie selon les conditions de culture à savoir la lumière et la température, les cals incubé à l'obscurité donnent des couleurs brun et une structure friable à compacte, tandis que les cals incubé à la lumière présentent des couleurs variable (vert, vert-clair ,blanc et brun) qui sont due à l'action de la lumière sur les pigments photosynthétiques. Le taux de callogenèse et le poids frais des cals sont corrélation positivement avec la concentration des de l'auxine. L'étude histologique de cal obtenu à partir d'explants internodale après 3 et 60 jours montre que la division cellulaire est produite dans l'épiderme seulement après trois jours de culture puis s'étendue à la première couche du cortex. Pendant l'embryogenèse somatique les cals des différents explants développent avec tous les milieux (1-2) bourgeons et des racines denses. Dépassant trois mois d'incubation les cals sont plus volumineux et commencent à brunir et perd la couleur verte après dégradation de la chlorophylle. Une observation surprenante dans notre étude qui est la formation de microtubercules à partir des cals des germes de tubercules sur milieu M1 et M2 après 37 à 60 jours d'incubation. Cette recherche a permis de mettre en évidence les conditions nécessaires à la callogenèse et l'embryogenèse somatique. En fin il est recommandé d'essayer d'induire l'embryogenèse somatique en appliquant un stress (osmotique, avec des ions, ABA..), avec l'ajout de source de nitrogènes organique et minérale pour une période dépassant trois mois.

Mots clés : NAA/BAP, embryons somatiques, 2,4-D/BAP, Callus, *Solanum tuberosum L.*

Abstract

The main objective of this investigation is to study the response of different potato explants Spunta and Kondor to callogenesis and somatic embryogenesis in the presence of combinations with NAA / BAP and 2,4-D / BAP. We opted from the start for the buds and internodes as explants. The color and texture of the calli vary according to the nature of the growth regulators and the presence or absence of light. With the NAA / BAP combination the Spunta variety develops the best callogenesis in all environments compared to the Kondor variety depending on the concentration of hormones, there is a range of variations of days required for callus initiation, the percentage of explants that have developed calluses, texture, color and degree of its formation. For the combination 2,4-D / BAP the results indicate that after three weeks of culture, the calli are moist, soft and friable in green and whitish-green and white with the NAA / BAP combination, and green, light green and brown color for both explant with all media with of 2,4-D / BAP combination. Callus growth varies according to culture conditions like light and temperature, callus incubated in the dark give brown colors and a friable to compact structure, while the calluses incubated in light show varying colors (green, light green, white and brown) that are due to the action of light on the photosynthetic pigments. The rate of callogenesis and fresh weight of calli are positively correlated with the concentration of auxin. The histological study of callus obtained from internodal explants after 3 and 60 days shows that cell division is produced in the epidermis only after three days of culture and then spread to the first layer of the cortex. During somatic embryogenesis the calluses of different explants develop with all media (1-2) buds and dense roots. Exceeding three months of incubation the calli are larger and begin to brown and lose the green color after degradation of chlorophyll. A surprising observation in our study which is the formation of microtubers from the callus of tubercle germs on M1 and M2 medium after 37 to 60 days of incubation. This research has made it possible to highlight the conditions necessary for callogenesis and somatic embryogenesis. In the end it is recommended to try to induce somatic embryogenesis by applying stress (osmotic, with ions, ABA ...), with the addition of organic and mineral nitrogen source for a period exceeding three months.

Key words : NAA/BAP,somatic embryos, 2,4-D/BAP,Callus, *Solanum tuberosum L.*

ملخص

إن الهدف الرئيسي من هذه الأطروحة هو دراسة استجابة مستزرعات البطاطس-البراعم وقطع الساق لكل من Spunta و Kondor لتشكيل الكالس و الأجنة الجسدية في وجود تركيبات هرمونية مختلفة من NAA/BAP و 4-D BAP, 2. اللون وبنية الكالس تتغير حسب طبيعة منظمات النمو و وجود او عدم وجود الضوء مع التوفيقية NAA/BAP النوع Spunta احدث أفضل تطور للكالس في كل الاوساط مقارنة بـ Kondor حسب تغير التراكيز, تتواجد اختلافات في عدد الأيام الضرورية لاستجابة الكالس, نسبة تشكل الكالس, البنية اللون ونسبة تشكله, بالنسبة للتوفيقية 2,4-D/BAP تبين النتائج بعد ثلاث أسابيع بان الكالس لديه مظهر رطب و هش بلون اخضر, احضر فاتح, ابيض و بني و هش بلون اخضر, احضر ابيض, ابيض مع التوفيقية NAA/BAP. نمو الكالس يتغير حسب ظروف الزراعة مثل الحرارة و الضوء, فالكالس المزروع في الظلام يعطي لون بني وبنية هشة الى متماسكة, بينما الكالس المزروع في الضوء يعطي ألوان مختلفة مثل الأخضر و الأخضر الفاتح و البني, و التي تعود الى تأثير الضوء على الاصبغة اليخضورية. لوحظ إن نسبة الكالس المتشكل و الوزن الرطب متناسب طرديا مع تراكيز الهرمونات المستعملة. الدراسة النسيجية للكالس بعد ثلاثة أيام و ستون يوما من الزراعة تؤكد أن بداية الانقسام الخلوي كانت على مستوى البشرة ثم انتقلت إلى الطبقات الأولى للقشرة بعد مدة. خلال تشكل الأجنة الجسدية الكالس المتشكل أعطى براعم من 1 الى 2 و جذور كثيفة. و بعد تجوز ثلاث أشهر من الزراعة الكالس يصبح اكبر حجما و يبدأ في اكتساب اللون البني. الملاحظة المدهشة في دراستنا للكالس هو تشكل الدرناات انطلاقا من البراعم الدرنية على الوسط (M1 و M2) خلال 37 إلى 60 يوم من الزراعة. هذا البحث مكن من تسليط الضوء على الشروط اللازمة لتشكيل الكالس والأجنة الجسدية وأخيرا من المستحسن للحث على توليد الجنين الجسدية تطبيق الإجهاد (الاسموزي، مع الأيونات، ABA ..)، مع إضافة المصادر العضوية والمعدنية لمدة تفوق ثلاثة أشهر.

الكلمات المفتاحية: NAA/BAP , 4-D/BAP, الكالس, الأجنة الجسمية, *Solanum tuberosum L*

Sommaire

Introduction générale	1
-----------------------------	---

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1.Histoire de la pomme de terre	22
I.2.Description générale	22
I.3. Rendement et principales wilayas productrices de la pomme de terre en Algérie	23
I.4.Les Principales variétés cultivées en Algérie.....	26
I.5. Méthodes nouvelles de l'induction de la variabilité génétique.....	27
1.5.1 L'hybridation somatique	27
1.5.2 La transgénèse	27
1.5.3 La sélection sanitaire	27
1.6. La culture <i>in vitro</i> et amélioration de production de la pomme de terre	28
1.6.1. Historique	28
1.6.2. B.L'équilibre Auxine-Cytokinine	30
1.6.3. Transmission du signal des auxines dans la plante et contrôle de la division cellulaire	31
I.7. Les techniques de culture <i>in vitro</i> appliquées à la pomme de terre	32
1.7.1. Culture de méristème et la reproduction conforme	32
1.7. 2 La fusion de protoplastes et changement du niveau de ploïdie.....	32
1.7.3. La Microtubérisation	35
1.7.4 La callogenèse	35
I.7.5 La production de plants par embryogenèse somatique	41

Chapitre II : Matériels et méthodes

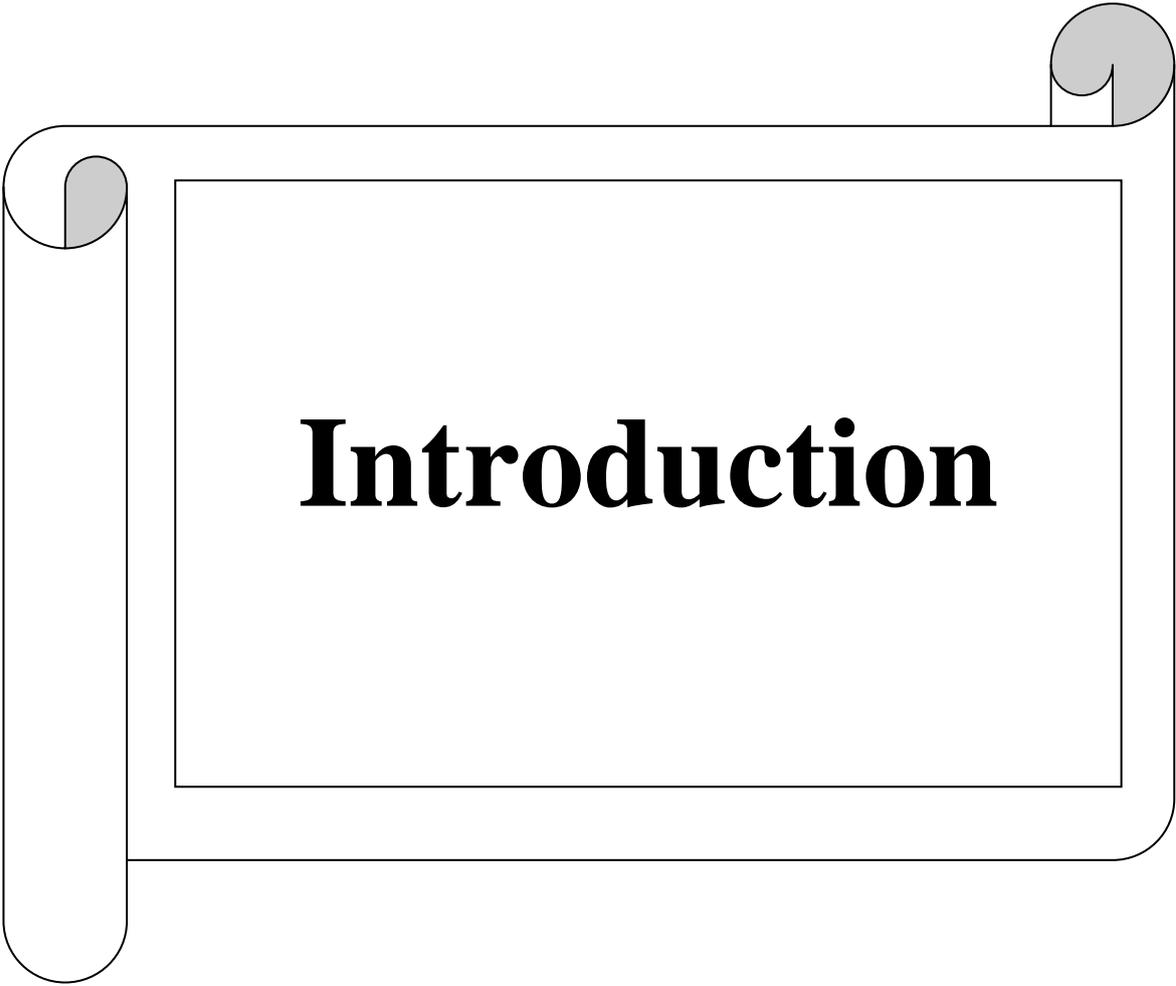
II.1. Matériel végétal	44
II.2 Plan expérimental	45
II.2. 1 Préparation des milieux de culture	45
2 .1.1 Préparation du milieu MS	45
2.1.2 Préparation des solutions mères de 2,4D, NAA et BAP.	46

2.2 La stérilisation du milieu de culture et des explants	46
2.3 Essais réalisés	46
2.3.1. Essai 1 et 2 : Effet du NAA et du BAP à la lumière et à l'obscurité	46
2.3.2 Essai 3 : Etude de l'effet du BAP sur l'aptitude à la callogénèse	47
2.3.3 Essai 4 et 5 : Etude de la réponse à la callogénèse en présence de rapports auxine /cytokinine (2,4-D/BAP) différents à la lumière et à l'obscurité	47
2.3.4 Essai 6 et 7: Etude de la réponse à l'embryonèse somatique en présence de rapports auxine /cytokinine (NAA/-BAP) et (2,4-D/BAP) différents à la lumière	49
2.3.4.1. Première étape (Calogénèse)	49
2.3.4.2 Deuxième étape (Embryogénèse).....	49
2.4 Paramètres et mesures	50
2.4.1 Taux de brunissement et de contamination	50
2.4.2 Estimation du poids frais.....	50
2.4.3 Taux de callogénèse : Nombre de cal obtenus pour chaque milieu.	50
2.4.4 Description des phases de développement des explants	51
2.4.6 Description de l'effet de la position de l'explant sur le milieu de culture	51
2.5 Traitement du résultat.....	51

Chapitre III : Résultats et discussion

III. Résultats et discussion.....	53
III.1 .Partie I : induction de la callogénèse avec les hormones NAA et BAP	54
1. 1 Essai 1 : Etude de l'effet de la combinaison (BAP - NAA) à la lumière	54
1.1.1 Le taux de callogénèse	54
1.1.1. A Les explants de germes.....	54
1.1.3 Etude de la structure anatomique de certains cals	60
1.1.4 Effet de l'orientation de l'explant sur la callogénèse.....	62
1.1.5 Obtention de microtubercules sur les cals	64
I.1.6 Conclusion	69
1.2 Essai 2 : Etude de la réponse à la callogénèse en présence de concentrations différentes de l'hormone (NAA /BAP) à l'obscurité.	70
1.2.1. Etude de l'effet de l'obscurité sur les callogénèse après une semaine d'incubation.....	70
1.2.3 Conclusion.....	76
I.3 Essai 3: Etude de la réponse à la callogénèse en présence du BAP seul	76
1.3.2 Conclusion.....	80

Partie 2 : induction de la callogenèse avec les hormones 2,4-D et BAP.....	81
2.1 Essai 1 : Etude de la réponse à la callogenèse en présence de rapports auxine /cytokinine (2,4-D/BAP) différents à la lumière	81
2.1.1 Le poids frais des cals	83
2.1.2 Conclusion.....	87
III.2. 2 Essai 2 : Etude de la réponse à la callogenèse en présence de concentrations différentes de l'hormone (2,4-D) à l'obscurité.....	87
2. 2 .1 Description des phases du développement des cals	87
2.2 .1. A-Milieu 1	70
2. 2 .1.B Milieu 2.....	88
2.2.2 Conclusion.....	94
III.3 Partie 3 : Influence hormonale sur l'induction d'embryon somatique.....	95
3.1 Essai 1: Etude de la réponse à l'embryonèse somatique en présence du rapports auxine /cytokinine (NAA/-BAP) différents à la lumière	95
3.2 Essai 2 : Etude de la réponse à l'embryonèse somatique en présence de rapports auxine /cytokinine (2,4-D/BAP) différents à la lumière	98
3.3 Conclusion.....	104
III.4 Discussion générale.....	105
Conclusion générale.....	88
Références bibliographiques.....	92
Annexes	



Introduction

Introduction générale

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L) est une plante vivrière qui présente une grande importance économique dans le monde, en Algérie la production de pomme de terre à augmenté considérablement de 1207690 tonne en 2000 à 4673516 tonne en 2014 (FAO, 2016), en 2016 est arrivé à combler les besoins des citoyens et ouvrir la porte vers le marché extérieur.

L'Algérie reste dépendante de l'importation en matière de semence de pomme de terre, le ministère de l'agriculture vise progressivement réduire, chaque année, de 30 pour cent, ces importations, à partir de la saison agricole 2016-2017. L'objectif est de mettre fin à ces importations de semences de pomme de terre, à l'horizon 2019 par l'application des techniques de culture *in vitro* dans l'obtention des semences de base. La micropropagation a en outre apporté plus de souplesse et de rapidité dans les processus de production de plants (Ebad et al., 2015). Les produits de la micropropagation que sont les vitroplants, vitrotubercules ou minitubercules sont donc aujourd'hui souvent associés aux programmes de production de plants de pommes de terre, et sont destinés plus particulièrement à la production des premières générations de plants de pré-base (Jean-Louis et al, 2002).

L'application des biotechnologies pour l'amélioration de cette plante a permis l'obtention de variétés résistantes aux maladies virales avec un rendement important par l'introduction de gène par hybridation somatique (Kwang-Soo et Tae-Ho, 2014). Les techniques de culture *in vitro* à savoir la callogenèse est appliquée pour la pomme de terre comme phase transitoire avant le passage à l'embryogenèse somatique, la fusion de protoplastes ou la production de métabolites secondaires.

Le succès dans la régénération des plantes *in vitro* a été réalisé à partir d'explants de différents organes et tissus de la pomme de terre comme les feuilles, la tige (Haque et al., 1996), disques de tubercules (Mozafri et al., 1997); (Esna -Ashari& Villiers, 1998) et d'embryons zygotiques immatures (Pretova et Dedicova, 1992). La formation de cal dépend de la source d'explants, la composition nutritionnelle des milieux et les facteurs environnementaux (Arora et Chawla, 2005).

La découverte révolutionnaire du siècle est que les cals peuvent être générés artificiellement *in vitro* et que l'équilibre entre deux hormones végétales, auxine et cytokinine, détermine l'état de la différenciation et la dédifférenciation (Skoog et Miller, 1957).

Le 2,4-D est auxine largement utilisé pour l'induction de la callogenèse pour différents espèces (Kumar et *al.*, 2014) seul ou en combinaison avec le (BAP, la Kinétine ,TDZ ou BA)(Jayanthi et *al.*, 2011). L'équilibre entre l'application d'auxine et de cytokinine est nécessaire pour la formation de cals (Rout, 2004).

L'embryogenèse somatique été obtenu pour la pomme de terre par différents sources d'explants, à partir de feuilles (Chandra et *al.*, 1983), disque de microtubercules (Bragdo.Aas, 1977), morceau de tiges issus de vitroplants (Garica et Martinez, 1995), embryon zygotiques (Pretova et Dedicova, 1990).

La culture des cals peut être utilisée aussi pour étudier la physiologie du stress et l'amélioration génétique de pommes de terre au niveau cellulaire et aussi pour sélectionner les mutants *in vitro*. Cela permettrait de sélectionner de nouveaux cultivars de pommes de terre avec une meilleure tolérance au stress dans un programme de sélection (Ahmet et *al.*, 2015). Théoriquement, il a été postulé que des quantités égales d'auxine et de cytokinine favorise l'induction du cal; cependant, en pratique, cela diffère dans une large mesure, en raison des variations des niveaux endogènes des phytohormones dans les plantes individuelles.

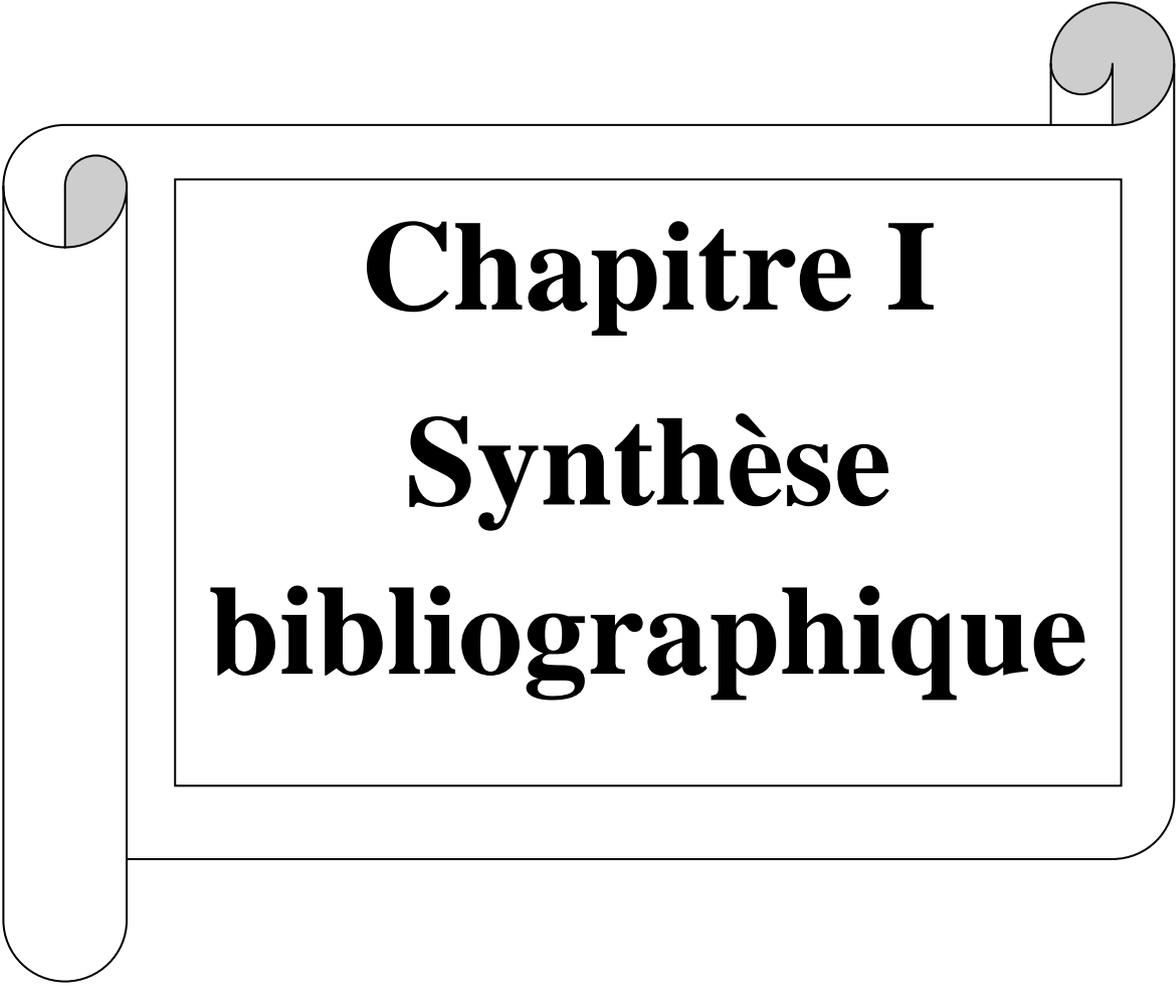
La microtuberisation de pomme de terre est un processus de développement très complexe régi par les régulateurs de croissance des plantes (Nistor et *al.*, 2012), le travail de (Aryakia et Hamidoghli, 2010) montre que le BAP est meilleur pour la microtuberisation par rapport aux autres hormones par ce qu'il augmente le poids et le volume des microtubercules.

Les cals sont très diversifiées et peuvent être classés en sous-groupes en fonction de leurs caractéristiques macroscopiques et selon les organes qu'ils génèrent. Il y a les cals sans régénération organique apparente sont généralement appelé cals friable ou compact. D'autres cals qui affichent certains degrés de régénération organique sont appelés racinaires, et les cals embryonnaire (Frank et *al.*, 2000).

Le succès des essais de callogenèse et d'embryogenèse somatique dépend de la maîtrise des conditions d'incubations du milieu de culture et les combinaisons hormonales appropriés. La présente étude visait à déceler les meilleurs conditions de réussite de la production de semence artificiel de pomme de terre, en étudiant l'effet du génotype de la lumière et du type d'explant sur la callogenèse et l'embryogenèse pour cela nous avons établie des combinaisons appropriées pour promouvoir l'induction de cals à partir des explants de germes et de tiges de deux cultivars de pommes de terre Spunta et Kondor en présence des équilibres hormonales différents: BAP / 2,4-D à la lumière et à l'obscurité,

NAA/BAP à la lumière et à l'obscurité et BAP seul à la lumière. La thèse est axée sur trois chapitres : La synthèse bibliographique, matériel et méthodes et résultats et discussion

Le chapitre résultat et discussion de cette thèse est structurée en trois parties, la première partie intitulé induction de la callogenèse avec les hormones NAA et BAP contient trois essais, La deuxième partie intitulé induction de la callogenèse avec les hormones 2,4-D et BAP. La troisième partie intitulé Influence hormonale sur l'induction d'embryon somatique, en présence de rapports auxine /cytokinine (2,4-D/BAP) et (NAA/BAP) différents à la lumière.



Chapitre I
Synthèse
bibliographique

I. Revue bibliographique

I.1.Histoire de la pomme de terre

Selon Rousselle et *al.* (1996), les espagnols, après la découverte du nouveau monde, dans les caraïbes et en Amérique centrale. A partir des bases établies dans cette zone, ils entreprirent leurs expéditions en Amérique du sud, vers 1530, il est probable que, lors de ces explorations, les conquistadores espagnols découvraient la pomme de terre, depuis l'Espagne cette plante est diffusée dans les jardins européens, et ce n'est qu'entre 1564 et 1573 que la culture de la pomme de terre a commencé réellement, ensuite il est ramenée en France puis en Algérie pendant la période coloniale.

I.2.Description générale

La pomme de terre est une plante herbacée vivace qui se propage par multiplication végétative et qui est cultivée comme espèces annuelles, Les tiges peuvent être presque glabres à densément pubescentes et être vertes, violettes ou marbrées de vert et de violet. Les feuilles sont composées-pennées et comportent une seule foliole terminale et trois ou quatre paires de grandes folioles latérales ovées séparées par des folioles plus petites. Les inflorescences terminales, qui se trouvent généralement dans la moitié distale de la plante, sont des cymes. Chaque inflorescence est habituellement peut comporter jusqu'à 25 fleurs (souvent male stériles). La corolle est blanche, rose, lilas, bleue, violette ou violet-rouge (Figure 01).

Le fruit est une baie sphérique à ovoïde Il est vert ou teinté de vert et présente des taches ou des bandes blanches ou violettes à maturité Le fruit peut être dépourvu de graines ou en contenir jusqu'à plusieurs centaines. Le tubercule pousse à l'extrémité de stolons souterrains et ils ont la structure d'une tige ; La chair des tubercules varie de blanche à jaune ou bleue, et la peau varie de blanche à jaune, havane, rouge ou bleue. À la surface du tubercule se trouvent des bourgeons axillaires comportant des cicatrices de feuilles en écaille; ces bourgeons sont les « yeux » du tubercule (Gallais et Bannerot, 1992).



Figure 01 : L'appareil végétatif de la pomme de terre(<http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=2448>)

I.3. Rendement et principales wilayas productrices de la pomme de terre en Algérie

La superficie occupée par les cultures maraîchères varie chaque année entre 380.000 et 400.000 ha, dont 100.000 à 130.000 ha emblavés en pommes de terre, soit 26% de la superficie maraîchère totale (Tableau 02, Figure 02) (Omari, 2009).

Il est à relever aussi que l'on assiste, depuis quelques années, à l'augmentation de cette culture par l'occupation de nouvelles zones où elle était pratiquement inconnue : cas de Sedrata, de Djelfa, du Sud et d'Ain-Defla. Donc, les zones de production sont réparties selon quatre zones géographiques : Littoral, sublittoral, atlas tellien et hautes plaines.

- **Primeur** : Boumerdes, Tipaza, Skikda, Alger, Mostaganem, Tlemcen.
- **Saison** : Ain-defla, Mascara, Mila, Souk ahras, Boumerdes, Mostaganem, Sétif, Tiziouzou, Tiaret, M'sila, Tlemcen, Batna, Chlef, Bouira, El-oued.
- **Arrière saison** : Ain-defla, Mascara, Guelma, Chlef, El oued, Tlemcen, Mostaganem, Djelfa... (Omari, 2009).

Avec une production moyenne annuelle de 4,5 millions de tonnes (mt), l'Algérie commence à devenir un véritable gros producteur de pommes de terre. Le surplus enregistré dans la production de pomme de terre hors saison dépassant les 900.000 tonnes, réalisée sur une superficie de 3.623 has soit un rendement variant entre 230 et 250 quintaux par hectare.

Après avoir largement satisfait les besoins du marché local, la filière de la pomme de terre offre, désormais, des opportunités aux opérateurs pour se lancer dans l'industrie de transformation et gagner des marchés à l'exportation. Les prévisions du secteur tablent sur une augmentation de la production de ce tubercule de 2 mt d'ici à 2019 (Tableau 01, Figure 02).

Tableau 01 : Evolution de la production de pomme de terre en Algérie (1971-2014)

Production de pomme de terre (Tonnes)	Années
273647	1971
575068	1975
590600	1980
814700	1985
808541	1990
1200000	1995
1207690	2000
2155550	2005
3300312	2010
4673516	2014

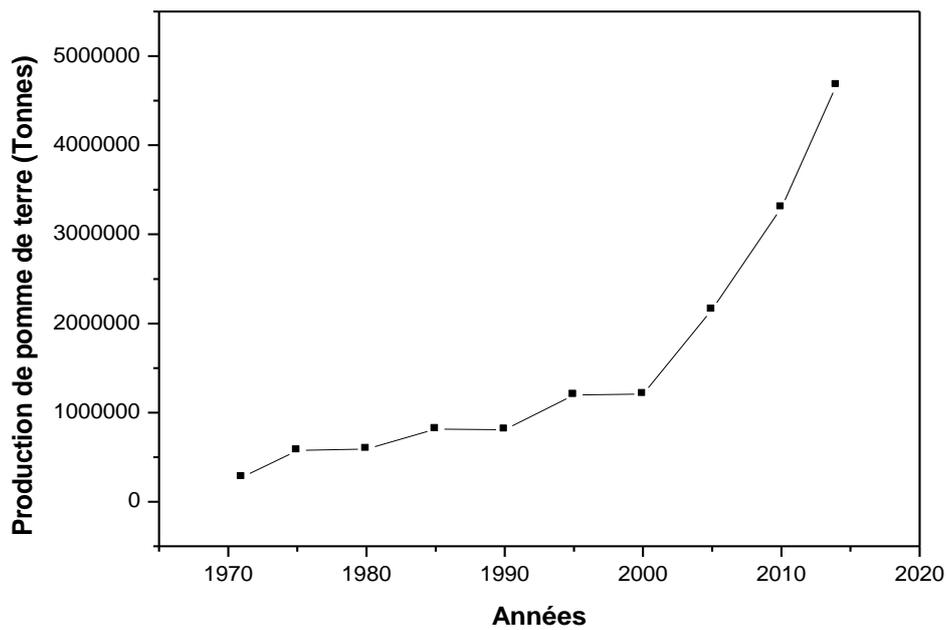


Figure 02: L'évolution de la production de pomme de terre en Algérie (1970-2014)

L'Algérie occupe la deuxième place, après l'Égypte, dans la production de la pomme de terre en Afrique pour l'année 2010, selon un rapport de la FAO. Les chiffres présentés dans le rapport indiquent que la production nationale a dépassé le seuil de trois millions de tonnes durant l'année 2010. Elle est cultivée sur une superficie estimée à 126 milles hectares. La moyenne à hectare a atteint 26 tonnes.

Sur le plan mondial L'Asie et l'Europe sont les deux principaux continents producteurs de la pomme de terre du monde. Ils ont fourni plus de 80% de la production mondiale en 2007. Bien que les latins soient nettement inférieurs, s'elles ont atteint leurs niveaux record. C'est l'Amérique du Nord qui obtient de loin les rendements les plus élevés avec plus de 36 tonnes/ha.

Tableau 02 : Les principales wilayas productrices de pomme de terre en Algérie

Wilaya	Surface (hectares)	Production (quintaux)
Ain Defla	15 230	320 000
Mascara	9 050	208 700
Tlemcen	7 505	197 900
El Oued	7 392	181 800
Mostaganem	6 668	159 500
Chlef	4 015	115 200
Boumerdes	3 600	93 200
Skikda	3 212	57 100
S/Total	66 672	1 333 408
T/ Algérie	98 825	2 180 900

La wilaya de Aïn Defla, wilaya qui assure 30% de la production nationale (Tableau 03), ainsi El Oued (Tableau 02), une région produisant environ 40% de la production nationale de cette tubercule, une surface de 35.000 hectares, soit 41% de la surface agricole exploitée estimée à 80.000 hectares et ne cesse de gagner du terrain d'une saison à l'autre avec une extension annuelle de 1 à 5% (Tableau 02) (<http://www.maghrebemergent.com/actualite/breves/fil-maghreb/62758-algerie-.html>).

I.4. Les Principales variétés cultivées en Algérie

Cent vingt variétés sont inscrites au catalogue algérien des espèces et variétés cultivées. Cette inscription est obligatoire pour leur commercialisation. Elle est précédée de deux ans au cours desquels sont évalués les caractères d'utilisation, le rendement, le comportement vis-à-vis des parasites par le service de Contrôle et certification des semences et plants CNCC. Les principales variétés cultivées en Algérie sont : *Spunta* (à chair blanche), *Désirée* (à chair jaune), *Bartina*, *Lisita*.

I.5. Méthodes nouvelles de l'induction de la variabilité génétique

Pour l'induction de variabilité génétique chez la pomme de terre, plusieurs méthodes ont été utilisées à savoir la mutagenèse qui a été utilisée avec succès pour modifier la couleur de la peau (Desital, Konkei) et pour améliorer le rendement (Marline 2) ainsi pour introduire la résistance au mildiou avec *S andeginum Juz* et *S stoloniferum schrdl*.

1.5.1 L'hybridation somatique

L'hybridation somatique entre la pomme de terre et la tomate d'intérêt académique uniquement réalisé dans les années 1970, ainsi des hybrides somatiques avec *S brevidens* Phill apporte la résistance au virus de l'enroulement foliaire de la pomme de terre et la résistance aux pourritures molles causées par (*Pectobacterium carotovorum* (Erwinia) (Kwang-Soo et Tae-Ho, 2014).

1.5.2 La transgénèse

La technique de transgénèse a été utilisée pour la première fois chez la pomme de terre dans les années 1980 pour introduire la résistance aux insectes (teignes et dorphyre), aux maladies (virus X et Y, mildiou ainsi que la teneur en féculose (pomme de terre sans amylose) ou sans alcaloïdes et en sucres réducteurs, selon Dunwell (2000) la pomme de terre est en deuxième position après le maïs en Amérique en matière de transgénèse.

Les marqueurs moléculaires RFLP (Tek et *al.*, 2004, Przetakiewicz et *al.*, 2007) AFLP (Tek et *al.*, 2004, Ahn& Park , 2013) SSR et ISSR (Cai et *al.*, 2004; Yu et *al.*, 2013) aussi ont été utilisés pour identifier les variétés, des cartes génétiques, des gènes ont été clonés, notamment le gène R1 de résistance au mildiou le gène H1 de résistance aux nématodes à Kyste (*Globodera pallida*).

1.5.3 La sélection sanitaire

La sélection sanitaire a été pratiquée dans tous les stades du schéma du plan officiel de production de plan certifiés par l'association de la thermothérapie et la culture de méristèmes pour régénérer des variétés non infectés par les virus (Doré et Varoquaux, 2006).

1.6. La culture *in vitro* et amélioration de production de la pomme de terre

La culture *in vitro* est basée sur la mise en culture d'explant en milieu artificiel contrôlé, à l'abri de toutes contaminations (en axénie). Le but de la culture *in vitro* est de permettre la régénération de la plante entière autonome et fertile à partir de la propriété des cellules végétales : la totipotence.

La totipotence est l'habilité d'une cellule à se différencier puis après de se développer un nouvel organisme à part. Les techniques de culture *in vitro* sont des outils qui permettent d'améliorer les plantes mais aussi d'assainir les variétés ou bien de réduire les coûts de productions

1.6.1. Historique

Les premiers tentatives de culture *in vitro* pour maintenir en survie des organes vivant isolés datent de plus de 130 ans ; il s'agit alors de conserver vivants des fragments de queue de têtards de grenouilles (Tableau 04).

Les premier pas de culture *in vitro* proprement dite sont dus à un Allemand, G.Haberlandt (1902), il obtenu sur un milieu Knop amélioré la survie durant plusieurs mois de petits amas cellulaires (poils staminaux ou glanduleux ou des fragments d'épiderme), mais il y avait pas de multiplication cellulaire.

Il fallut attendre 1922 pour que de nouveaux espoirs apparaissent pour la culture de tissus végétaux ; W. Roblins aux états unis et W. Kott en Allemagne s'adressant aux pointes de racines réussissent à les maintenir en survie près de six mois et à obtenir des fragments qui ont passé de quelques millimètres à 5-6 centimètres de long.

J.P. White en 1932 a obtenu pour la première fois la culture indéfinie de racines, en prélevant des extrémités de racines de tomate dans un milieu de culture contenant des sels minéraux, extrait de levure et du sucre.

En 1939 Gautheret à Paris, a obtenu des proliférations de tissus de quelques mois, à partir de tissus cambiaux, à la même année Nobecourt à Lyon sur les tissus de carotte et White aux - Unis sur des tissus de tabac tumoral ont publiés des résultats similaires (Augés et al, 1989).

D'ailleurs , et à partir de la découverte des régulateurs de croissance et des le rôle de l'équilibre Auxine/Cytokinine dans l'orientation du développement accompagné de mise au point de milieux de et la culture pouvant être considérés comme standards ainsi que la

maitrise de la manipulation génétique, la culture *in vitro* a connu des progrès considérables dans la maitrise de l'incubation et de régénération de plantes entières à partir des différents tissus, arrivant jusqu'à l'hybridation somatique en 1972 et la tentative de transgènèse par trois équipes américaine et européen à partir de 1983 sur les plantes (Tourtes et *al*, 2002).

Tableau 03 : Les progrès réalisés dans la culture *in vitro* des différents tissus de la plante
(Augé et *al*, 1989)

Découvertes	Référence
Premiers pas de culture <i>in vitro</i> sur milieu Knop	Haberlandt (1902)
Réussissent à faire grandir quelques petites racines pendant quelques mois	Robbins (USA), Kotte(Allemagne) (1922),.
cultivé et obtenu une multiplication de cellules de saule à l'aide d'auxines	Gautheret (France) (1934)
Culture indéfinie de tissus de carotte et de tabac	Nobecourt, White (USA) (1939)
réussit une culture <i>in vitro</i> de fruits	Nitsch (1949)
obtient une culture <i>in vitro</i> de cellules isolées à partir de cals	Muir (1954)
les cytokines (hormones) provoquent la division cellulaire.	Miller (1955)
découvrent l'influence qu'ont l'auxine et la cytokine sur les cellules cultivées.	Skoog et Miller(1957)
l'obtention d'embryons somatiques de carottes à partir de culture de racines.	Stewart et Reinert (1958)
régénération un plant de tabac grâce à une cellule isolée	Vasil (1965)
Le premier hybride somatique	1972
plantes haploïdes de tomates.	Carlson (1972)
première culture <i>in vitro</i> d'ovaires d'orge non fécondés.	San Noem (1976)
Electroporation (c'est une technique qui consiste à créer des pores dans les membranes cellulaires par plusieurs chocs électriques)	(1984)
Le canon à particules	(1987)
La variété de tomates FlarSavr OGM est commercialisée pour la première fois par CALGENE.	(1994)
Les USA commercialisent les premiers maïs transgéniques	(1996)

1.6.2. B.L'équilibre Auxine-Cytokinine

A l'échelle cellulaire, la micropropagation correspond à une organogénèse, qui pour réussir doit concerner autant la caulogénèse (édification de la tige et des feuilles), ou la rhizogénèse (développement de l'appareil racinaire). La formation des racines et la phase la plus délicate et se trouve à l'origine de bien des échecs, un enracinement correct nécessite souvent un déplacement de l'équilibre Auxine/Cytokinine en faveur des auxines, à l'opposé on dispose de milieux qui favorisent la néoformation de bourgeons (Rapport auxine/cytokinine faible (Figure 03).

Par ailleurs, il est important de dire, en se basant sur la diversité des réponses obtenues dans ce domaine, qu'il n'existe pas de règle générale, concernant l'efficacité des différentes auxines et cytokinines sur la caulogénèse ou sur la rhizogénèse. Les effets paraissent varier essentiellement avec le matériel végétal employé (Tourtes et *al*, 2002).

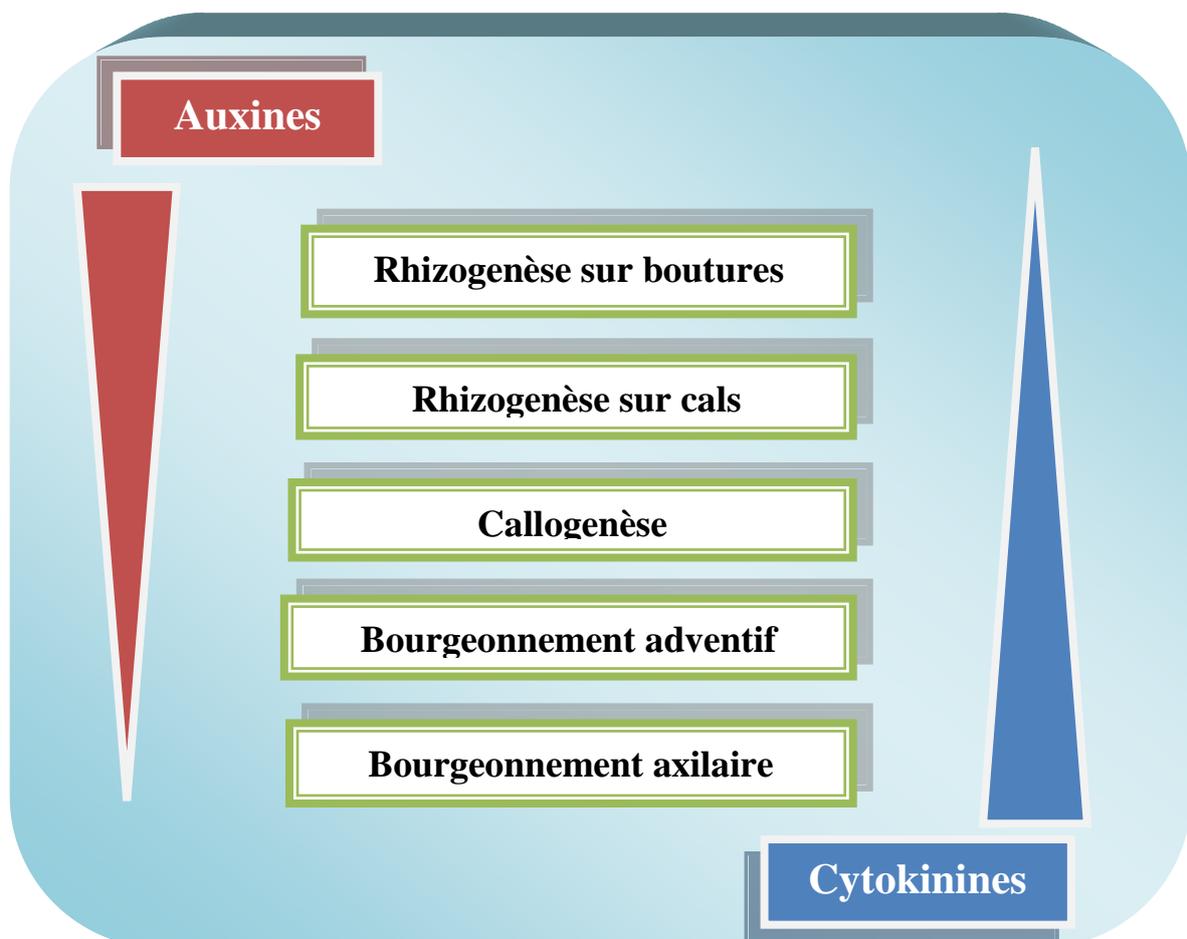


Figure 03: Types d'organogénèse contrôlée par des concentrations d'auxines et de cytokinines (<http://www.biotech-ecolo.net/micropropagation-culture-in-vitro.html>).

1.6.3. Transmission du signal des auxines dans la plante et contrôle de la division cellulaire

Comme aucun système nerveux n'est présent, les signalisations principales sont les hormones. L'auxine est une hormone végétale essentielle pour la croissance, le développement, et les réponses aux facteurs environnementaux au cours de la germination et la croissance ultérieure, une plante doit être en mesure d'adapter à une gamme de conditions de l'environnement afin de développer et de se reproduire avec succès (Ljung, 2002).

Les plantes peuvent réagir rapidement aux changements dans l'environnement des facteurs tels que la température, l'intensité lumineuse et l'apport de nutriments. Les signaux écologique induisent des réponses dans divers groupes de cellules et de tissus via un signal spécifique intrinsèque les voies de transduction du signal qui influencent la division cellulaire, l'expansion des cellules et des processus de différenciation, et donc adapter les modèles de croissance et de développement, un groupe de petites molécules organiques de très faibles concentrations qui affectent les processus physiologiques (Davies, 1995; Leyser, 1998) in (Ljung, 2002).

Le rapport Auxine/cytokinine représente un signal important dans la formation de phénotype cellulaire et aussi dans le déclenchement et le maintien du procédé de la division cellulaire (Stickens et al, 1996 in George et al, 2008). Par analogie avec les systèmes animaux chaque végétale a une cellule cible est présumé posséder des récepteurs qui sont capables pour détecter des signaux hormonaux et ensuite d'ouvrir la chaîne d'événements moléculaires conduisant à la réponse physiologique final.

Les protéines susceptible de lier à l'auxine (ABP, Auxin Binding Protein) ont d'abord été recherché dans deux types de tissus qui répondent à l'auxine qui sont les culture de moelle de tabac et le coléoptile de maïs, trois classe de protéines fixant l'auxine ont été identifiés à partir de cal de tabac, deux était associés à des fractions membranaires, l'autre étant trouvé dans des fractions cytoplasmiques et nucléaires. L'affinité pour l'auxine des protéines isolées des fractions cytoplasmiques et nucléaires est nettement plus forte que les protéines présentent dans les fractions membranaires (lebenga et menne, 1987 in Hopkins, 2003).

Chez le maïs seules des protéines membranaire fixant l'auxine ont été décelés l'une d'entre elle appelé ABP1 qui intervient dans l'élongation cellulaire (Leyser, 2002).

I.7. Les techniques de culture in vitro appliquées à la pomme de terre

1.7.1. Culture de méristème et la reproduction conforme

Depuis les travaux de Morel et Martin (1955), la culture de méristèmes, souvent associée à la thermothérapie, a permis de guérir des variétés virosées. La micro-propagation in vitro est plus au moins utilisée pour la production de plants pour les premières générations de multiplication.

A partir des germes de tubercules sains ou de culture de méristèmes, les variétés sont multipliées in vitro par bouturage d'entre-nœuds sur le milieu de Murashige et Skoog (1962), sans hormones avec une photopériode de 16 heures et une température de 18-20 °C le jour et de 14-16 °C la nuit.

On peut obtenir des boutures nouvelles toutes les six semaines, les boutures sont serrées sous abri pour la production de tubercule. Dans certains cas, le bouturage est complété par la production de micro-tubercules. La technique de maintien par bouturage in vitro est utilisée généralement pour la conservation de banque de gènes sous forme de clones (Westcott, 1981 ; Mix, 1985).

1.7.2 La fusion de protoplastes et changement du niveau de ploïdie

Les techniques de culture in vitro et de génie génétique utilisant les protoplastes offrent des perspectives prometteuses (Ellouz et al., 1994) Tableau 05 :

La possibilité d'induire une variation somaclonale importante par régénération *in vitro* à partir d'explant y compris de protoplastes. Cette variation peut toucher des caractères quantitatifs obéissant à des facteurs polygéniques. La production d'hybrides somatiques par fusion intra-spécifique entre des clones dihaploïdes de pomme de terre ou interspécifiques avec des espèces sauvages diploïdes compatibles, susceptibles d'apporter des caractères intéressants, notamment de résistance;

L'introduction de caractères mono ou oligogène (en particulier la résistance à une maladie, à un prédateur) par transfert d'ADN dans des protoplastes ou dans des explants à l'aide d'agrobactéries. Des procédures d'isolation de culture et de régénération de plantes à partir d'un grand nombre de protoplastes issus de suspension cellulaires de *Solanum tuberosum* L. ont été développées (Tavazza et al., 1988).

La première application de fusion de protoplastes chez la pomme de terre a conduit à l'obtention d'un hybride somatique avec la tomate par Melchers et al. (1978): la pomate. Cette

nouvelle espèce n'a pas eu d'avenir en raison de sa stérilité. Plusieurs autres équipes ont obtenus des hybrides mais ils étaient tous trop anormal pour être intéressants (Ross, 1986). Austin et *al.* (1985) ont été les premiers à utiliser des hybrides dans un programme de sélection entre *S. tuberosum* et *S. brevidens*, cette dernière a été utilisée pour sa résistance au virus de l'enroulement. La même équipe est également la première à avoir réussi la fusion entre deux diploïdes de l'espèce *tuberosum* (Austin et *al.*, 1985). Des plantes de pomme de terre régénérées ont été obtenues à partir de cals provenant de la culture de protoplastes (Ellouz et *al.*, 1994).

Tableau 04 : Les Progrès de la fusion de protoplastes chez la pomme de terre entre (2004 à 2013) (Ellouz et *al.*, 1994).

Espèces	Objectif	Références
<i>S. acaule</i>	aglycone glycoalcaloïde	Rokka et al. (2005)
<i>S. berthaultii</i>	Tolerance à la salinité	Bidani et al. (2007)
<i>S. brevidens</i>	La résistance à la pourriture molle, brûlure hâtive et PLRV (Virus de l'enroulement)	Tek et al. (2004)
<i>S. brevidens</i>	Résistance à la gale commune	Ahn& Park (2013)
<i>S. bulbocastanum</i>	Résistance au mildiou	Boltowicz et al. (2005)
<i>S. bulbocastanum</i>	Résistance au mildiou, pourriture molle, le nématode, la chaleur et la sécheresse	Greplova et al. (2008)
<i>S. bulbocastanum</i> , <i>S. cardiophyllum</i> , <i>S. chacoense</i> , <i>S. pinnatisectum</i>	Résistance au mildiou, doryphore	Chen et al. (2008)
<i>S. cardiophyllum</i>	Résistance au mildiou	Shi et al. (2006)
<i>S. chacoense</i>	Résistance au flétrissement bactérien	Cai et al. (2004)
<i>S. circaefolium</i>	Résistance au mildiou	Espejo et al. (2008)
<i>S. commersonnii</i>	Résistance au flétrissement bactérien	Kim-Lee et al. (2005)
<i>S. etuberosum</i>	Resistance au PVY (Virus Y)	Tiwari et al. (2010)
<i>S. melongena</i>	Résistance au flétrissement bactérien	Yu et al. (2013)
<i>S. michoacanum</i>	Résistance au mildiou	Szczerbakowa et al. (2010)
<i>S. pinnatisectum</i>	Résistance au mildiou	Polzerova et al. (2011)
<i>S. stenotomum</i>	Résistance au flétrissement bactérien	Fock et al. (2007)
<i>S. tuberosum</i>	Resistance au PVY et <i>Pythiumaphani dermatum</i>	Nouri-Ellouz et al. (2006)
<i>S. villosum</i>	Résistance au mildiou	Tarwacka et al. (2013)
<i>S. vernei</i>	Résistance au mildiou	Trabelsi et al. (2005)

1.7.3. La Microtubérisation

La microtubérisation *in vitro* est une des méthodes qui permettent le développement de la pomme de terre *in vitro* (Nistor *et al.*, 2012). Elle dépend principalement de la source du génotype, ainsi que d'autres facteurs externes comme la lumière, l'obscurité, la température, les éléments minéraux, le saccharose étudiés par (Mes et Menge, 1954 ; Palmer et Smith, 1969 ; Lo *et al.*, 1972 ; Wang et Hu, 1982; Hussey et Stacy, 1984 ; Chandra *et al.*, 1988; Akita et Takayama, 1994 ; Gopal *et al.*, 2004 ; Dragecevic *et al.*, 2008).

Le saccharose est le stimulus le plus critique pour induire des microtubercules à forte concentration (Saha *et al.*, 2013; Fufa and Diro, 2014). Ce processus est régulé par différents régulateurs de croissance comme le BAP (6 Benzylaminopurine), 2-chloroethyl trimethyl ammonium chloride (CCC) et la kinetine, (Hoque, 2010; Liljana *et al.*, 2012)

Les microtubercules sont le produit final alternatif à la micropropagation *in vitro* de plantules, qui se développent sous des conditions favorisant la tubérisation, Ils sont caractérisés par leurs tailles petites, ce qui permet leur conservation, distribution, et transport facile (Warren *et al.*, 2001).

Afin d'augmenter le nombre et la qualité des microtubercules, différentes méthodes peuvent être utilisées comme la modification des composants du milieu de culture ; l'augmentation de la concentration du saccharose en milieu de culture ; l'addition des hormones de croissance (Warren *et al.*, 2001).

1.7.4 La callogenèse

Le cal est un tissu indifférencié issu de cellules parenchymateuse, il peut être obtenu à partir des différents organes des différents espèces .l'aptitude à la callogenèse est influencée par différents facteurs comme la nutrition minérale les hormones de croissance et les facteurs environnementaux.

L'obtention de cal chez la pomme de terre peut être obtenue en incubant les explants dans les milieux contenant les auxines et les cytokinines ou des auxines seules (Tableau 06).

La callogenèse se traduit par la néoformation d'un tissu (cal) produit par l'explant initial (issu des différents organes) sous certaines conditions de croissance (Margara, 1989).

L'histoire de la callogenèse selon (Humera, 2006) remonte à 1938 par Nobecourt qui a réussi des cal sur les disques de tubercule .en 1951 Capelin reporte le premier succès à partir du parenchyme de tubercules sur milieu contenant l'eau de noix de coco et le 2,4-D.

Le premier succès de callogenèse chez la pomme de terre a été réalisé par (Stewart et Caplin (1951). Chapman (1955) a obtenu des résultats similaires, Skoog et Miller (1957) montre le contrôle hormonal de la différenciation qui permettra la propagation clonale à travers la culture de tissus de pomme de terre.

Puis les travaux de (Lingappa, 1957; Bajaj et Dionne, 1967; Anstie et Northcote, 1973; Skirvin et al., 1975; Lam, 1975; Mechlers, 1978). Par la suite le type d'explant utilisé a beaucoup varié, Gavinlerttana et Li (1980), ont obtenu des cals à partir des segments de feuilles de *Solanum tuberosum* et *solanum acaule*, dans un milieu de culture contenant 3mg/l 2,4 D et 0,3mg/l Kinétine.

Certains auteurs ajoutent certaines substances pour activer le développement et la croissance des cals comme l'extrait de levure (Garcia et Martinez, 1995), la biotine et l'acide folique (Jelenie et al., 2001).

Puis Ahloowalia (1982), a pu induire des cals nodulaire en 30 jours à partir des fragments de tiges de 1-2mm sur un milieu $\frac{1}{2}$ MS avec 3,2mg/l IAA, 1 mg/l Kinétine et

0, 5mg/l 2,4-D, d'autre chercheur jouent sur la concentration des éléments minérales par exemple $\frac{1}{2}$ MS (Ahloowalia, 1982).

Ensuite plus loin, en (1994) Friere et al., ont initié des cals à partir des feuilles et des nœud de tiges dans un milieu MS additionnés de 1-3mg/l 2,4D, en donnant des cals friables avec un pourcentage de régénération de 72-100%.

En 1995 Garcia et Martinez, ont induits des cals à partir des segments de nœuds de tiges sur un milieu MS avec 0,5 mg/l extrait de levure, 25mg/l saccharose et (0,5-1-2-4 mg/l 2,4-D), les explants ont été incubés dans une température de 23°C avec une photopériode de 16h et une intensité lumineuse de 50 micromole par m² par seconde.

Wersuhn et Dathe (1998), ont obtenu des cals à partir des segments de tige de pomme de terre, sur un milieu contenant 1micromole Kinétine, 1micromole GA3, 6 micromole IAA et 0,8 % agar.

Dobranszki et al. (1999) ont induits la formation de cals sur cinq variétés de pomme de terre d'origine génétique à partir des feuilles différentes sur cinq milieux différents, ils ont montré que l'initiation de callogenèse et son taux étaient très influencés par le génotype, et le milieu 0,25 mg/l Kinétine et 5 mg/l 2,4-D.

En 2003 Nasrin et *al*, ont induit des cals à partir des ségmentsneouds et des entre nœuds pour deux variétés Muta et Dimant, puis une régénération sur milieu MS semi-solide avec différentes concentrations de 2,4-D, NAA, BAP seul et la combinaison de NAA avec BAP, le taux le plus élevé de callogenèse été observé sur milieu MS avec 2,5mg/l 2,4-D, suivi de 5mg/l BAP.

Bragdo-Aas (2004), ont étudiés la formation des cals à partir des tubercules, sur un milieu MS pour la partie inorganique et le milieu NN pour la partie organique avec les concentrations hormonales, 0,4 mg/l IAA, 0,8mg/l Kinétine, 0,4 mg/l BAP et 0,4mg/l GA3, puis ils été transférés vers un milieu de régénération sans hormone suivi d'une acclimatation dans le sol.

Tableau 05 : Evolution de recherches effectuées sur la callogenèse (1938-2015).

Auteurs	Explant	Hormones	resultats
Nobecourt, 1938	disques de tubercule	Agar sans auxine	cal
Capelin, 1951	parenchyme de tubercules	noix de coco + 2,4-D	cal
Chapman, 1955 ;	Neouds de germes	10 pour cent de lait de coco + 7 mg / l de 2,4-D	cal
Lam, 1975	disques de tubercules	0,4 ppm de 6-benzylaminopurine	des cals et des corps embryoides
Laroza et al,1984 Van der Plas and Wagner,1984	tige	Kinéline+2,4-D	cal
Ahloowalia, 1982	tige	(3.2mg/l)IAA+(1mg/l) Kinéline+(0.5mg/l) 2,4-D+1/2 MS	Cal nodulaire en 30 jours
Friere et al, 1994	Segment de tie et feuilles	(1-3 mg/l) 2,4-D+	Cals friables
Garcia et Martinez, 1995	Nœud de tige	(0.5mg/l) extrait de levure, 2,4-D (0.5-1-2-4mg/l)	Friable cal vert-brun dans 1 mois
Esna-Ashari and Villiers, 1998	Disque de tubercules	(1mg/l) BAP+ 0.5mg/l 2.4-D	Cal et racines+tige en absence de 2.4-D
Dobranszki et al, 1999	feuilles	(5mg/) 2.4-D, +(0.25mg/l) Kinéline	Cal friable,
Jelenie et al, 2001	Entre-noeud	0.05 D-Biotine+ (0.5mg/l) acide folique+4.4 M BAP+5.7 M IAA+28.9 GA ₃	cal
Nasrin et al, 2003	Nœud et entre-noeud	1 mg/l NAA+1mg/l BAP et 1 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP	Cal puis développement de tiges
Bragdo-Aas, 2004	Explant de tubercule	MS+NN partie organique+(0.4mg/l) IAA+(0.8mg/l) Kin+(0.4mg/l) BAP+(0.4mg/l) GA ₃	Cal puis développement des tiges
Shirin et al, 2007	Feuilles et entre-neoud	MS+1mg/l NAA+1mg/l BA et 2,4-D 3 mg/l	Meilleur développement de cal
Chakravarty et Wang-Pruski, 2010	Entre nœuds	MS+ 0.05% de 2-N-morpholinoethane sulphonicacid (MES) et 0.05% de polyvinylpyrrolidone	Cal pour transformation
Kumar et al, 2014	feuilles	MS+ 3 mg/l 2,4-D+1mg/l Kin	Cal friable jaune clair dans 10 jours puis regeneration
Iqbal et al, 2014	Entre-nœud	MS+5 BA mg/l+ 4 NAA mg/l	Cal brun
Ashrafzadeh et Leung, 2015	Feuilles	MS+4.43 µM 6-benzyladenine (BA) et 5.37 µM 1-naphthaleneacetic acide (NAA).	Cal puis microtubercule sur cal (10%)

La taille du fragment mis en culture présente une grande importance ; en effet, plus l'explant est grand, plus les équilibres endogènes seront déterminants. De ce fait, le milieu n'aura qu'une influence limitée, par contre un explant de petite taille sera plus facilement orienté par les substances contenues dans le milieu.

Les explants différenciés ont en moyenne une taille variant de 5 à 10 mm qui correspond aux moyens de manipulation, c'est-à-dire : facilité de prélèvement de coupe et de mise en culture dans les récipients. Une expérience a partir de pétioles de *Saintpaulia* coupé en rondelle de 1,5mm, 3mm, 5mm et 7mm placé sur un milieu semblable (milieu de multiplication) ; seul les fragment de 3mm est plus ont donner normalement des jeunes plants, ceux de 1,5mm ont donné deux types de résultats : une moitié d'entre eux s'est desséchée, l'autre n'a former que des racines sans doute, a partir de cette taille, l'auxine présente dans le milieu joue un rôle plus important, alors que pour les taille plus grandes elle entre en interaction avec les composés endogènes (Beauchesne, 1998).

Les explants différenciés ont en moyenne une taille variant de 5 à 10mm qui correspond aux moyens de manipulation, c'est-à-dire : facilité de prélèvement de coupe et de mise en culture dans les récipients. une expérience a partir de pétioles de *Saintpaulia* coupé en rondelle de 1,5mm, 3mm, 5mm et 7mm placé sur un milieu semblable (milieu de multiplication) ; seul les fragment de 3mm est plus ont donner normalement des jeunes plants, ceux de 1,5mm ont donné deux types de résultats : une moitié d'entre eux s'est desséchée, l'autre n'a former que des racines sans doute, a partir de cette taille, l'auxine présente dans le milieu joue un rôle plus important, alors que pour les taille plus grandes elle entre en interaction avec les composés endogènes (Beauchesne, 1998).

Pour réaliser des cultures *in vitro*, on part généralement de fragments d'organes (morceaux de tige, feuille, bourgeon) ; ici deux cas à considérer selon le type d'organisation du fragment qui sera mis en culture :

A. Les explants qui présentent une structure ébauchée ou organisée, tels les bourgeons, les apex ou bien les méristèmes ainsi que les capitules floraux. Ce sont les fragments les plus employés, car les plus réactifs, et qui posent moins de problèmes du fait de l'existence d'une structure organisée qu'il suffira de révéler par un milieu approprié. Si le milieu ne convient pas, il pourra perturber le fonctionnement et conduire, par exemple, à une prolifération cellulaire de type cal.

L'utilisation de ce type d'explant correspond à un micro-bouturage et c'est le plus souvent la technique utilisée pour obtenir une multiplication végétative en nombre. Il convient

ici de rappeler que quelquefois, les parties mises en culture gardent en « mémoire » l'orientation de la croissance ; ce phénomène est bien connu à propos des boutures ligneux (c'est aussi vrai pour quelque herbacées). Chez un certains nombres d'espèces où les corrélations de croissance sont fortes, le bouturage à partir de rameaux obliques donnera des plants racinés mais à port prostré et non à port dressé. Quelques essais ont montré que cette mémoire siégerait dans les tous premiers entre-nœuds proches du méristème.

B. Les explants constitués de tissus différenciés, tels que les fragments de tige, de feuilles, de racines, etc. ou la mise en culture devra provoquer un retour en arrière complet pour donner aux cellules la capacité d'entrer d'abord en division, puis, ensuite, de retrouver un pouvoir organogène.

Pour ces explants, et selon les espèces, ils ont pu montrer que toutes les parties d'une plante étaient susceptibles de suivre le processus de dédifférenciation suivi d'une nouvelle organisation. Mais ici, la différence entre espèces est grandes depuis des espèces qui, comme le *Saintpaulia* est capable de régénérer par toutes les parties de la plante (pétiole, limbe, racines, pétales, étamines, pollen, ovules), des espèces moins faciles comme l'*Actinidia sinensis* ou les tiges ont donné des meilleurs résultats que les pétioles ou les limbes, des espèces qui ne présentent que peu ou pas de réactions et dont quelques résultats ont été obtenus à partir de cotylédons (quelque Conifères).

D'une manière générale, ce sont les feuilles qui présentent les meilleures réactions ainsi que les tiges jeunes (Beauchesne, 2002).

L'initiation de la callogenèse nécessite une faible intensité lumineuse avec 12 à 16 heures de photopériodes car cette dernière n'est pas nécessaire aux cellules puisque l'énergie est fournie par les sucres contenus dans le milieu. La callogenèse est plus faible (38%) à l'obscurité, moyenne (54%) en éclairage continu et plus élevée (63%) en photopériode (Emmanuel et *al.*, 2001). Concernant la température la plupart des auteurs utilisent pour favoriser la croissance des cals des températures de 25 ± 2 °C et la température des chambres de culture est habituellement réglée de façon constante à 22 ± 25 °C.

I.7.5 La production de plants par embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique a d'abord été démontrée il ya 50 ans par Steward et *al.* (1958) et Reinert (1958) chez la carotte. Ce processus est défini par le développement d'une structure bipolaire à partir de n'importe quelle partie de la plante en passant par les mêmes étapes clés du développement d'un embryon zygotique (Sharma et Steve Millam, 2004).

L'embryogenèse précoce à partir d'un seul zygote cellulaire passe par division cellulaire rapide et de la morphogenèse, et est morphologiquement caractérisée par étapes de pré-globulaire, globulaires, cardiaques, lance-torpilles et cotylédons. Ce développement progressif est sous la stricte réglementation d'un réseau moléculaire complexe (Kurdyukov et *al.*, 2015).

Plusieurs sont les chercheurs dans le monde qui ont essayé de déceler les conditions de l'embryogenèse somatique chez la pomme de terre à partir des différents explants malgré les difficultés rencontrées dans les années 80 (Lam, 1975; Bragdo-Aes, 1977; Pretova et Dedicova, 1992; Garcia et Martinez, 1995; JayaSree et *al.*, 2001; Seabrook et Douglass, 2001 ; Sharma et Millam, 2004; Vargas et *al.*, 2005; Sharma et *al.*, 2007).

L'embryogenèse somatique constitue une nouvelle éventuelle méthode pour l'amélioration de la qualité de la pomme de terre (Sharma et Steve Millam, 2004). C'est une méthode appropriée pour la micropropagation et qui a le potentiel pour la propagation en masse (Rahman et *al.*, 2004). Elle consiste en l'obtention d'embryons di ou polyploïdes à partir de callos ou de suspensions cellulaires qui ensuite sont capables de régénérer en plantes fertiles caryologiquement stables (Dubois, 1989). La formation d'embryons somatiques a été obtenue chez de nombreuses espèces, cependant les systèmes sont encore au stade expérimental chez la pomme de terre (Sharma et Steve Millam, 2004).

Durant ces deux dernières décennies, de grands efforts scientifiques ont été consacrés à l'obtention d'embryons somatiques à partir d'une série de génotypes et de différents tissus de pomme de terre, parmi lesquels: les anthères (Sopory et *al.*, 1978), les embryons zygotiques immatures (Petrova et Dedicova, 1992), les tiges (De Garcia et Martinez, 1995; Seabrook et Douglass, 2001; Seabrook et *al.*, 2001), les sections de tubercules et les feuilles (JayaSree et *al.*, 2001; Seabrook et Douglass, 2001), et les racines (Seabrook and Douglass, 2001) (Teresa E. Vargas et *al.*, 2005).

Enfin, La capacité de produire des embryons morphologiquement normaux qui donneront des plantes entières à partir de cellules somatiques indifférenciées à travers le processus d'embryogenèse somatique est uniquement rencontrée dans le règne végétal (Zimmerman, 1993).

Les hormones endogènes et exogènes (Malgorzata, 2004) et le stress induisent collectivement la dédifférenciation cellulaire et initier un programme embryogène chez les plantes avec un génotype réactif (Fehe'r et coll 2003; Ikeda-Iwai et *al.*, 2003; Rose et Nolan 2006). L'embryogenèse somatique est influencée par le génotype (Kielly et Bowley, 1992 in Malgorzata, 2004), et peut être induite par différents explants (Sharma et Millam, 2004) et déclenché à partir des cellules du cal semblables au parenchyme près de l'épiderme, tandis que d'autres proviennent du tissu pro-vasculaire ou pro-cambial, reflétant celui observé dans l'hypocotyles de la carotte, ou à la périphérie des cals dans une diversité d'espèces telles que l'herbe guinée (Lu et Vasil, 1985), le pois (Loiseau et *al.*, 1998), le pois chiche (Sagare et *al.*, 1995) et la pomme de terre (Sharma et Millam, 2004).

D'autre part les sources de nitrogènes minérale (KNO_3 et NH_4Cl) et organique (Hydrolysa de caséine et acides aminés, proline-serine/threonine) affectent significativement l'embryogenèse somatiques des plantes (Dantu et Tomar, 2010).

A decorative graphic of a scroll with a black outline and grey shading on the rolled-up ends. The text is centered within a white rectangular frame inside the scroll.

Chapitre II
Matériels
et
méthodes

. Matériels et méthodes

II.1. Matériel végétal

Le matériel végétal de départ est constitué de deux variétés de pomme de terre : Spunta et Kondor (Figure 04), dont l'origine et les caractéristiques sont détaillés dans les tableaux (Tableau 06 et 07).

Tableau 06: La fiche d'identité de la pomme de terre Spunta

Origine	Bea X USDA.96, 56
Année d'obtention	1967 Pays-Bas
Utilisation	Toutes utilisations
Rendement	Excellent
Peau	Jaune
Chair	Jaune claire
Couleur de la base de germe	bleu
Forme de tubercule	longue
Précocité	Demi-précoce
sensibilité	Moyennement sensible

Tableau 07: La fiche d'identité de la pomme de terre kondor.

Origine	61333 X Wilja
Année d'obtention	1981 Pays-Bas
Utilisation	Toutes utilisations
Rendement	Très bon
Peau	Rouge
Chair	Jaune pâle
Couleur de la base de germe	rose
Forme de tubercule	Oval-long
Précocité	Demi-précoce
sensibilité	Peu sensible

Les tubercules de ces deux variétés ont été nettoyés à l'eau de javel et mis à l'obscurité à une température ambiante entre 23 à 25°C pour favoriser la germination pour avoir les explants de germes, puis certains tubercules sont ensemencés dans des pots (sable) pour induire le développement des tiges afin d'avoir une source d'explants de tiges après un mois d'incubation à la lumière ambiante.

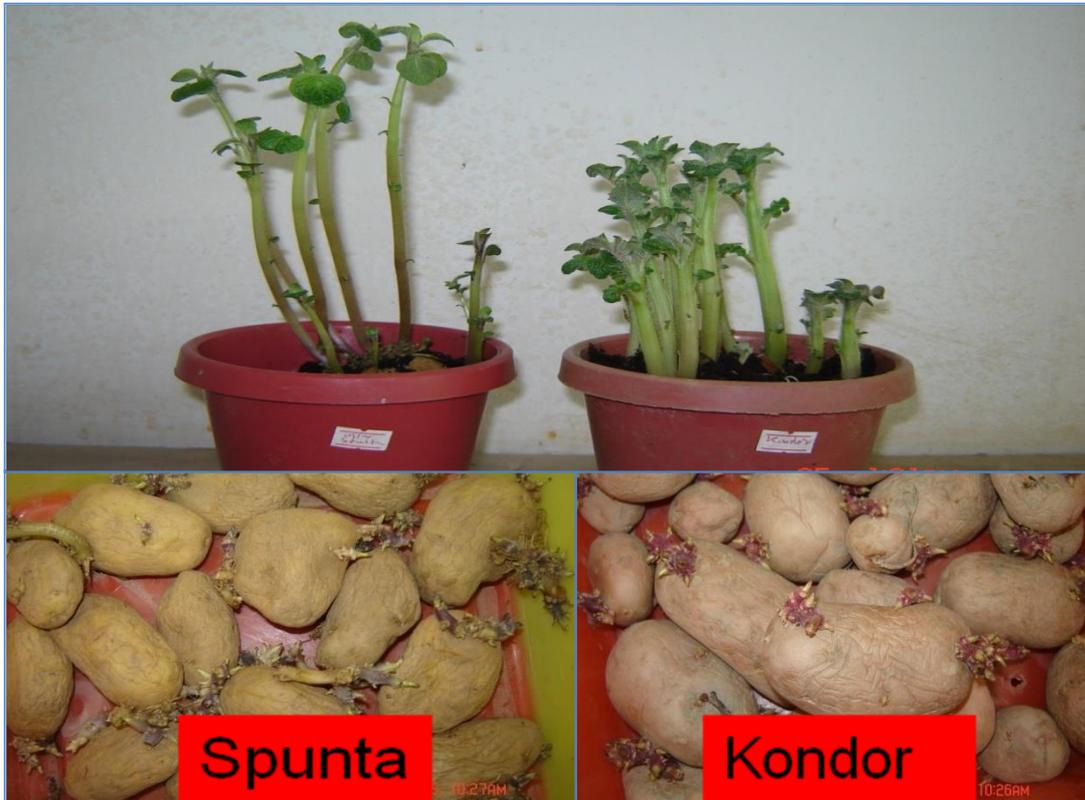


Figure 04 : Morphologie des tubercules des variétés Spunta et Kondor.

II.2 Plan expérimental

II.2. 1 Préparation des milieux de culture

2 .1.1 Préparation du milieu MS

Le présent travail a été réalisé dans le laboratoire de génétique, biochimie et biotechnologie des plantes de Constantine.

Le milieu de culture utilisé au cours de ces expérimentations, est le milieu MS (Murashing et Scoog, 1962), il est préparé préalablement sous forme de solution mère (solution mère des macroéléments, solution mère de micro-éléments, solution mère de fer et la solution mère de vitamines et d'acides aminés, puis on prélève de chaque solution mère le volume nécessaire pour avoir un litre de la solution finale selon l'annexe 07.

2.1.2 Préparation des solutions mères de 2,4D, NAA et BAP.

Nous avons préparés des solutions mères de l'ordre de 10X, après dissolution des hormones dans l'éthanol ou NaOH selon le tableau de l'annexe 5, ensuite on a préparé à partir des solutions mères les différentes combinaisons utilisées dans notre essai puis ils sont stockés au réfrigérateur.

2.2 La stérilisation du milieu de culture et des explants

Le milieu de culture de 1l préparé à partir des solutions mères suivant les volumes indiquées dans l'annexe 07. Le pH du milieu est ensuite ajusté à 5,7 avant de compléter la quantité à 1L par l'ajout d'eau distillée. Le milieu ainsi préparé est enfin versé dans des tubes autoclavables de 50X75mm à raison d'environ 10ml par tube qui seront fermés avec du coton et du papier aluminium. Le milieu est enfin stérilisation à la vapeur dans un autoclave pour une durée en général 15 minutes à 121°C (pression de vapeur env. 2 bar)

Pour tous les essais réalisés, les explants (segments d'entre-nœuds de la tige après culture sur sol pendant un mois et germes à partir de tubercules âgés aussi d'un mois), environ 0,5 cm de long ont été stérilisés en surface par immersion dans l'éthanol à 70% pendant 1 minute puis à les rincer dans une solution NaOCl à 0,5% pendant 15 min, puis lavées à l'eau distillée trois à cinq fois pour éliminer les traces de NaOCl.

2.3 Essais réalisés

2.3.1. Essai 1 et 2 : Effet du NAA et du BAP à la lumière et à l'obscurité

Deux cultivars de pomme de terre (Spunta et Kondor) ont été obtenus à partir des collections du ministère de l'agriculture. Les explants stérilisés ont été transférés au milieu de MS enrichis de NAA en combinaison avec BAP (NAA / BAP: M1 (0, 5/1 mg / l), M2 (1 / 0,5 mg / l) et M3 (2/2 mg / l) et NAA M4 seul (0,5 mg / l), M5 (1,0 mg / l) et M6 (2,0 mg / l) Tableau 08. Les cultures ont été incubées à 23 à 25°C en **période sombre (24h)** et dans un cycle rythmique de **16 heures de lumière** suivie de huit heures d'obscurité a été donnée aux cultures, la lumière a été fournie par un 2000 -. 3000 lux en maintenant 60 à 70% d'humidité.

Tableau08: Concentration des hormones de croissance pour l'induction de la callogenèse avec (NAA/BAP)

Milieux	NAA(mg/l)	BAP (mg/l)
M1	1	0.5
M2	0.5	1
M3	2	2
M4	0.5	0
M5	1	0
M6	2	0

2.3.2 Essai 3 : Etude de l'effet du BAP sur l'aptitude à la callogenèse

Ce travail a été mené afin de tester la possibilité d'induction de la callogenèse en présence de BAP seul, réalisée par les concentrations indiquées dans le tableau 09.

Tableau09 : les concentrations hormonales des différents milieux utilisés pour la callogenèse avec BAP.

Callogenèse avec BAP (mg/l)		
	Auxines	BAP
B1	0	0,5
B 2	0	1
B3	0	2

Le matériel végétal est entretenu par culture de germes de tubercules, à deux mois d'intervalle dans des boîtes pétries contenant le milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962), additionné avec BAP seules, 30 g/L de saccharose, et solidifié avec 10 g/l d'agar. Les boîtes pétries sont incubées en salle de culture à $23 \pm 2^\circ \text{C}$ sous 16h de lumière à l'intensité de $60 \mu\text{Mm}^{-2} \text{s}^{-1}$. Les paramètres de suivi de l'essai sont la couleur et la texture des cals obtenus des différents milieux pour les deux variétés ainsi que le taux de callogenèse.

2.3.3 Essai 4 et 5 : Etude de la réponse à la callogenèse en présence de rapports auxine /cytokinine (2,4-D/BAP) différents à la lumière et à l'obscurité

L'induction de cal a été réalisée par les concentrations 0, 5, 1 et 2 mg / l, 2,4-D (M 1, M 2, M 3, et en combinaison avec BAP M4 (0,5/1), M5 (1/0,5), M6 (2/2) respectivement) tableau 10 et tableau 11.

Les explants de germes sont stérilisés d'abord avec l'éthanol à 70% puis avec hypochlorite de sodium 2%, laver puis trois fois trois minutes chacune avec de l'eau stérile. Chaque tube à essai contient 15 ml de milieu MS basale (Murashige et Skoog, 1962) avec 3% de saccharose, solidifié avec 10 g tube à essai agar. Incubation dans à 2000-3000 lux et température de 25 ± 1 °C en **période sombre (24h)** et en **photopériode** dans un cycle rythmique de **16 heures de lumière** suivie de huit heures d'obscurité). L'expérience est réalisée avec un plan factoriel avec randomisation totale, les données de fréquence de la formation de cals, la couleur et la compacité ont été enregistrées chaque semaine jusqu'à la fin de l'incubation.

Ce travail a été mené avec deux cultivars de pomme de terre à savoir Spunta et Kondor pour l'induction de la callogenèse est réalisée par les concentrations indiquées dans le tableau 16.

Le matériel végétal est entretenu par culture de germes tubercules et de tiges, pendant huit semaines d'intervalle dans des tubes (25 x 300 mm) et des boîtes pétries contenant le milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962), additionné avec 2,4-D seules et en combinaison avec BAP (Tableau 16) 30 g/l de saccharose, et solidifié avec 10 g/l d'agar. Les tubes sont incubés en salle de culture à 23 ± 2 ° C sous 16h de lumière à l'intensité de $60 \mu\text{Mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Les paramètres de suivie de l'essai sont la couleur et la texture des cals obtenus des différents milieux pour les deux variétés ainsi que le taux de callogenèse et le poids frais de ces cals.

Tableau 10 : Les concentrations hormonales des différents milieux utilisés pour la callogenèse en présence de (2,4-D et 2,4-D/BAP) à la lumière.

Callogenèse avec 2,4 D et BAP (mg/l)		
	2,4-D	BAP
H1	0,5	0
H 2	1	0
H 3	2	0
H4	0,5	1
H5	1	0.5
H6	2	2

Tableau 11 : les milieux de cultures utilisés pour l'induction de la callogenèse avec (2,4 D) à l'obscurité.

Callogenèse avec 2,4-D (mg/l)	
Milieu 1	0,5
Milieu 2	1
Milieu 3	2

2.3.4 Essai 6 et 7: Etude de la réponse à l'embryonèse somatique en présence de rapports auxine /cytokinine (NAA/-BAP) et (2,4-D/BAP) différents à la lumière

2.3.4.1. Première étape (Callogenèse)

L'induction de la callogenèse est réalisée par les concentrations indiquées dans le tableau 12, en présence de deux hormones NAA et 2,4-D seules et en combinaison avec BAP.

Tableau 12: La concentration des hormones utilisées pour l'induction de la callogenèse avec les milieux (NAA et NAA/BAP).

Callogenèse avec 2,4 D et BAP (mg/l)			Callogenèse avec NAA et BAP (mg/l)		
	2,4-D	BAP		NAA	BAP
H1	0.5	0	M1	0.5	1
H 2	1	0	M 2	1	0.5
H 3	2	0	M3	2	2
H4	0,,5	1	M 4	0.5	0
H5	1	0.5	M 5	1	0
H6	2	2	M 6	2	0

2.3.4.2 Deuxième étape (Embryogenèse)

Après l'obtention des cal à partir de différentes concentrations de 2, 4-D et NAA seules et en combinaison avec BAP (Tableau 13), ils sont transférés après trois semaines vers un milieu embryogène et maintenues à 23 à 25°C sous une lumière continue d'intensité égale à 60 $\mu\text{Mol}/\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ avec une photopériode de 16h/24h avec culture répétée sur le même milieu (subculture) surtout en cas de contamination, avec les milieux dont les concentrations indiquées dans le tableau. Pour le suivi de la croissance nous avons utilisés des paramètres

morphologiques (la couleur et la texture des tissus néoformés), et description de la production de pousses ou de racines.

Tableau 13: La concentration des hormones utilisées pour l'induction de l'embryogenèse somatique avec (NAA / BAP et 2,4 D / BAP).

Embryogenèse avec 2,4 D et BAP (mg/l)			Embryogenèse avec NAA et BAP (mg/l)		
Milieux	2,4-D	BAP	Milieux	NAA	BAP
H1	0.5	0	M1	0.5	1
H2	1	0	M2	1	0.5
H3	2	0	M3	2	2
H4	0,µ5	1	M4	0.5	0
H5	1	0.5	M5	1	0
H6	2	2	M6	2	0
(H1, H2, H3) transférés vers H7	1	0.2			

2.4 Paramètres et mesures

2.4.1 Taux de brunissement et de contamination

Lors de cet essai, nous avons testé l'effet que peut avoir l'apport seul puis combiné des auxines ou des cytokinines, sur l'aptitude à la callogenèse chez les deux génotypes de pomme de terre choisis, en se servant des explants de germes et d'entre-nœuds. Les cultures sont conduites sur milieu de base MS contenant différentes combinaisons hormonales. Estimés par comptage des explants contaminés ou devenu bruns après certain temps d'incubation.

Le suivi de la callogenèse porte à la fois sur les paramètres qui ont été mis en évidence selon chaque milieu utilisé au cours de cette étude sont les suivants:

2.4.2 Estimation du poids frais

Le poids frais de chaque cal formé est exprimé en g par le calcul de la moyenne correspondante à chaque milieu, par la différence entre le poids des tubes de culture au début et à la fin d'incubation avec une balance sensible.

2.4.3 Taux de callogenèse : Nombre de cal obtenus pour chaque milieu.

La fréquence d'induction de cal a été calculée selon la formule suivante: fréquence d'induction de cal % = N (explants de cal produit) / N (explants cultivés) × 100.

2.4.4 Description des phases de développement des explants

La description des stades de développements des cals a été réalisée par la notation de la durée de callogenèse, description de la forme, la couleur et la texture des cals, comptage du nombre de jour pour le début de la callogenèse et estimation du degré de développement des cals par rapport aux différents milieux utilisés après 7, 15 et 60 jours d'incubation respectivement.

2.4.5. Etude histologique

L'étude histologique a été réalisée pour reconnaître les des cellules et / ou tissus d'origine qui ont produit les cals à partir d'entre-neuds de germes et de feuilles. Les cals ont été prélevés au stade initiation puis après deux mois de culture.

Les échantillons ont ensuite été fixe dans la solution de la FAA (formol : acide acétique glacial :50 % d'éthanol, 5 : 5 : 90 (v / v / v)) pendant 48 h et déshydraté dans l'éthanol (30 , 50, 75 , 95, 100 % (v/v)) deux fois pour 30 minute dans chaque déshydratation puis les explants étaient immergé dans xylene : paraffine dans différents ratios (75 : 25 ,50 : 50 , 25 : 75 , 0 : 100).

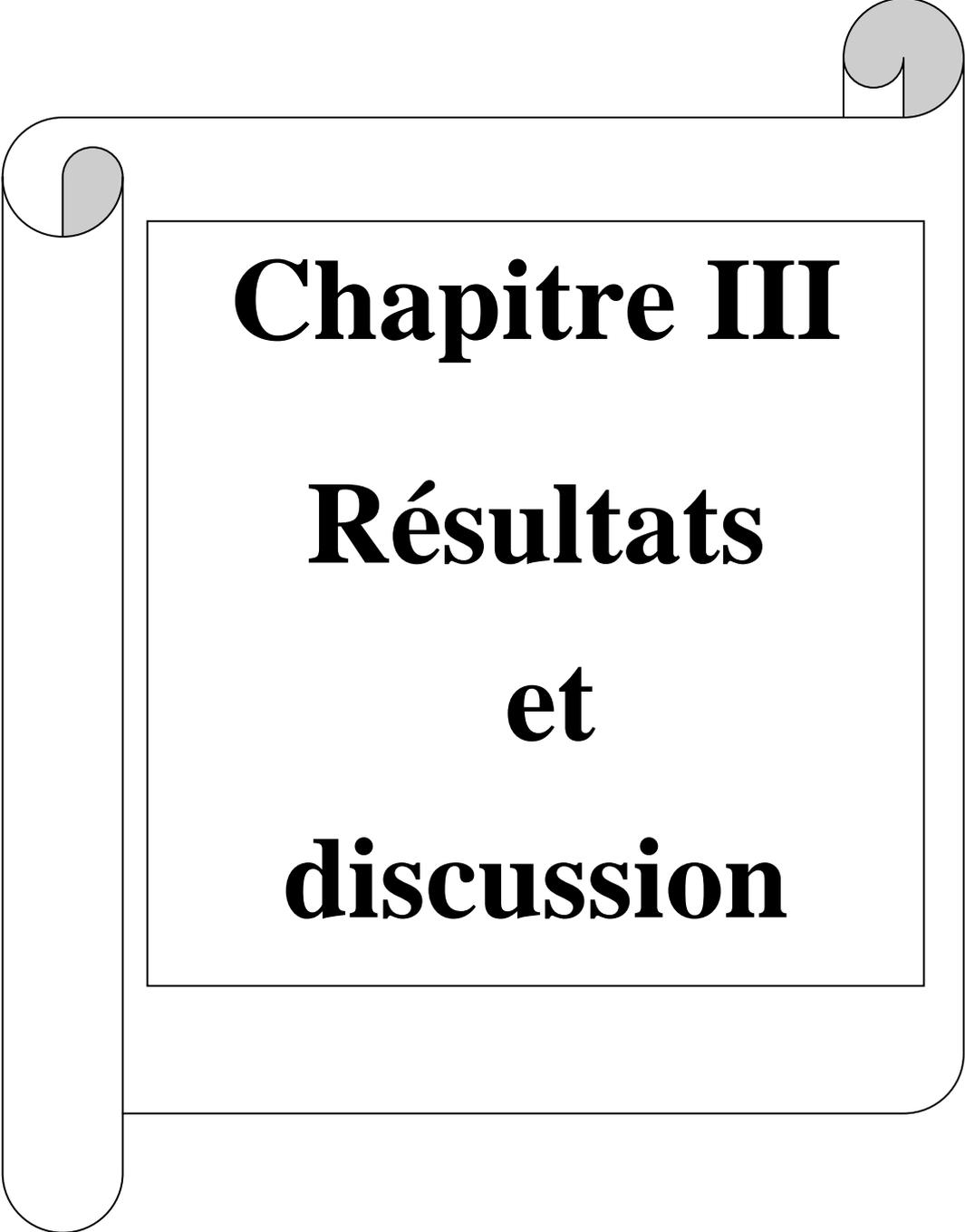
Des coupes en série (10-15 µm) ont été faites avec un modèle de microtome rotatif 820 Spencer les pièces de sections des échantillons ont été montés avec 10 % de albumine glycérine sur verre objectif. Les spécimens ont été à double colorées avec 1% d'acide - fuchsine et 0,05 % bleu de toluidine ou safranine et le vert rapide. Enfin, les échantillons ont été montés et observées au microscope et photographié à l'aide d'une camera microscope à notre ordinateur (Winarto et *al.*, 2008).

2.4.6 Description de l'effet de la position de l'explant sur le milieu de culture

Avec ce paramètre nous avons essayé de voir l'influence de la position de l'explant (Horizontale ou verticale) sur le milieu de culture, sur le déclenchement de la callogenèse

2.5 Traitement du résultat

Les données ont été recueillies en comptant le nombre de cal induits après huit semaines d'incubation. Le dispositif expérimental était un bloc plan factoriel randomisé avec trois répétitions, et les données ont été analysées par ordinateur en utilisant un logiciel statistique (programme STATISTICA et Excel).



Chapitre III

Résultats

et

discussion

III. Résultats et discussion

Taux de réussite et de contamination des essais

Malgré la stérilisation préalable du milieu de culture et des explants le brunissement due aux composés phénoliques (Onuoha et *al.*, 2011) et la contamination par les bactéries et les champignons (José et *al.*, 2003), restent les déficits majeurs des cultures de tissus. Pour notre essai les taux de contamination, de brunissement et de réussite des essais pour les deux variétés Spunta et Kondor dans les milieux 1, 2 et 3 sont représentés dans l'annexe 4.

Pour l'essai avec 2,4- D, le taux de réussite varie de (28,57-77,78%) pour Kondor sur les milieux M3 et M2 respectivement, et de (22,22-71,43%) pour les milieux (M1 et M2) respectivement pour Spunta. Le taux de brunissement le plus élevé (37,04%) a été enregistré pour Spunta avec le milieu M1, d'autre part le milieu M3 ne présente pas de brunissement (Annexe 4-1). La contamination a influencé beaucoup plus le milieu M1 (77,5%) avec Kondor. Les résultats de la contamination et de brunissement ont une corrélation significative avec le taux de réussite pour les deux variétés et pour tous les milieux étudiés.

Par contre pour l'essai avec NAA à lumière, le taux de contamination varie de 0 à 60 pour Spunta avec les milieux M3 et M5 respectivement, à 20 et 66,66 pour Kondor avec les milieux M4 et M6 (annexe 4-2). Ces infections bactériennes ou fongiques peuvent avoir lieu suite à des erreurs de manipulation ou encore à cause du temps insuffisant de la stérilisation des explants, ainsi que le transfert d'un milieu à l'autre (Helaly et *al.*, 2014). Cependant, le taux de contamination a nettement diminué au fur et à mesure des essais et les erreurs de manipulations ont été largement limitées.

III.1 .Partie I : induction de la callogénèse avec les hormones NAA et BAP

1. 1 Essai 1 : Etude de l'effet de la combinaison (BAP - NAA) à la lumière

1.1.1 Le taux de callogénèse

1.1.1. A Les explants de germes

Selon la concentration des hormones, il y a des variations dans le nombre de jours à l'initiation des cals, le pourcentage des explants développant des cals; la texture des cals et leur couleur ainsi que le degré de leur formation (Tableau 16 et 17, Figure 05).

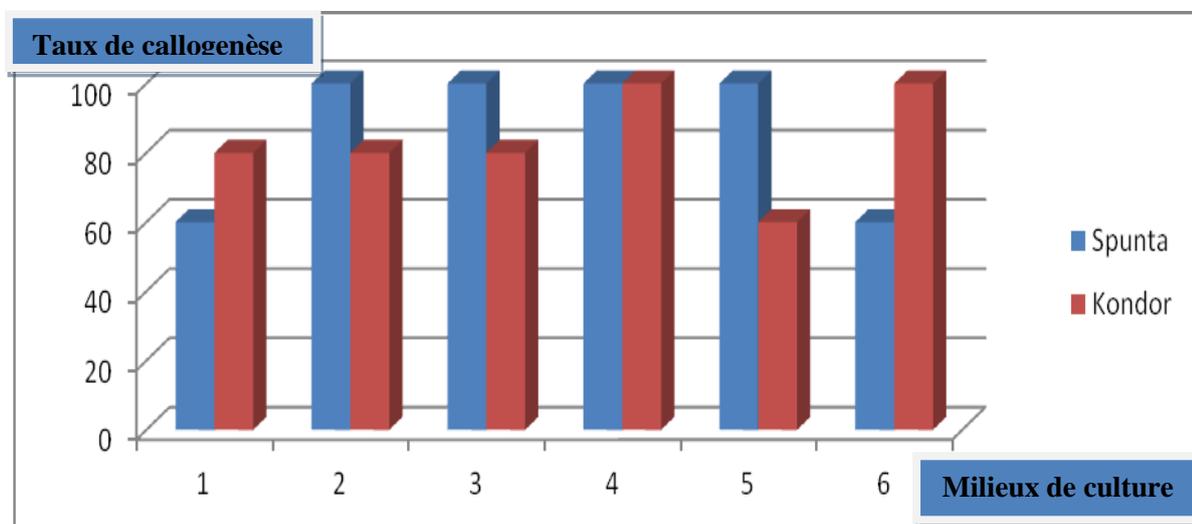


Figure 05: Variation du taux de callogénèse après trois mois d'incubation sur les milieux NAA/BAP pour les explants de germes de Spunta et Kondor.

La callogénèse est initiée après trois à cinq jours de culture pour les deux variétés. Il est toujours précédé d'un cal blanc friable dans les deux variétés, pour les deux types d'explants et pour tous les milieux. Les explants perdent leurs caractéristiques d'origine. Nous avons constaté que l'élargissement de la cellule et la division cellulaire prédomine pour former une masse inorganisée des cellules. En conséquence, les explants subissent un des changements irréversibles dans sa forme et la taille, et est suivie par l'apparition de petites masses cellulaires irrégulières autour ou sur les bords coupés ou sur les surface cassée et face supérieure, puis le cal devient plus important au-delà du septième jour de la culture.

Le taux de callogenèse varie de 60 à 100% pour les deux variétés pour les milieux M1 et M4 avec Spunta et M5 et M4 avec Kondor. Mutasim et *al.* (2010) ont produit des cals dans la variété de pomme de terre dans les 7-17 jours, 100% des explants ont été formés jaune et cals aqueux et a enregistré le plus haut degré pour la formation de cals.

Des résultats similaires ont été rapportés par Shirin et *al.* (2007) et Nistor et *al.* (2009), après le 20e jour, les cals de bourgeons et entre nœuds ont présenté une structure compacte avec des couleurs différentes: vert, brun, blanc. Cals à partir d'explants de bourgeons de Kondor développé organes (tiges, racines et laisse même sur les milieux (M1, M2, M3 et M4) et Spunta dans les milieux (M3, M4 et M6). Après deux mois, les cals à partir d'explants de bourgeons produits des microtubercules dans les milieux (M2, M3 et M4) pour Kondor. D'autre part les entre-nœuds peuvent proliférer indéfiniment et à peu ou pas d'organogénèse sauf pour la variété Spunta dans les milieux M1 dans lequel elle a développé de petites racines.

Table 14 : Effet de différentes concentrations de NAA et NAA-BAP sur la texture et la couleur après une semaine et deux mois de la formation des cals dans le cas d'explant de germes pour les deux variétés

Hormones mg/l			Texture et couleur après une semaine		Texture et couleur après deux mois	
			Spunta	Kondor	Spunta	Kondor
M1	NAA	0.5	Friable-Blanc	Friable-Blanc	Vert- Clair	Vert-Jaune
	BAP	1				
M2	NAA	1	Friable-Blanc	Friable-Blanc	Vert- Clair	Brun-Vert
	BAP	0.5				
M3	NAA	2	Friable-Blanc	Friable-Blanc	Brun	Vert
	BAP	2				
M4	NAA	0.5	Friable-Blanc	Friable-Blanc	Vert- Clair	Vert-Jaune
M5	NAA	1	Friable-Blanc	Friable-Blanc	Vert- Clair	Brun-Vert
M6	NAA	2	Friable-Blanc	Friable-Blanc	Vert-Jaune	Vert-Jaune

Table 15: Effet de différentes concentrations de NAA et NAA-BAP sur le pourcentage de callogenèse après une semaine et deux mois de la formation des cals dans le cas d'explant de germes pour les deux variétés

	Hormone mg/l		Taux de callogenèse (%)		Jours à l'initiation de cals	
			Spunta	Kondor	Spunta	Kondor
M1	NAA	0.5	75	80	Trois à cinq jours	
	BAP	1				
M2	NAA	1	75	30		
	BAP	0.5				
M3	NAA	2	75	50		
	BAP	2				
M4	NAA	0.5	75	70		
M5	NAA	1	66.66	70		
M6	NAA	2	100	90		
Moyenne			77.77	65		
Ecart-type			11.38*	21.67*		

* ANOVA
(p=0.05)
non
significativ
e

1. 1.1 B les explants de tiges

Pour les explants de tiges le nombre de jours à l'initiation des cals varie de 3-5 jours pour les deux variétés, à l'instar des germes, il est toujours précédé d'un blanc friables pour tous les milieux (figure 06), ensuite par l'apparition de petites masses cellulaires irrégulières autour des bords coupés ou sur les bords de coupe ou de la surface cassée et face supérieure, puis, le cal devient plus grand au-delà du septième jour de la culture.

Table 16: Effet des différentes concentrations de NAA et NAA-BAP sur le pourcentage de callogenèse après deux mois de la formation des cals dans le cas d'explants d'entre-nœuds pour les deux variétés.

	Hormonales mg/l		Taux de callogenèse (%)		Jours à l'initiation de cals	
			Spunta	Kondor	Spunta	Kondor
M1	NAA	0.5	60	80	Cinq jours	
	BAP	1				
M2	NAA	1	100	80		
	BAP	0.5				
M3	NAA	2	100	80		
	BAP	2				
M4	NAA	0.5	100	100		
M5	NAA	1	100	60		
M6	2 NAA		60	100		
Moyenne			100*	84*		
Ecart-type			0	07.48		

*ANOVA (p=0.05) non significative

Après deux mois de culture les cals sont compactes et prennent des couleurs vert clair, vert-jaune et vert pour les deux variétés suivant le milieu de culture. Le taux de callogenèse varie de 30-90% avec Kondor pour les milieux M2 et M6 respectivement, et de 66,66 -100 avec la variété Spunta pour les milieux M5 et M6 respectivement (Tableau 18 et 19, Figure 06).

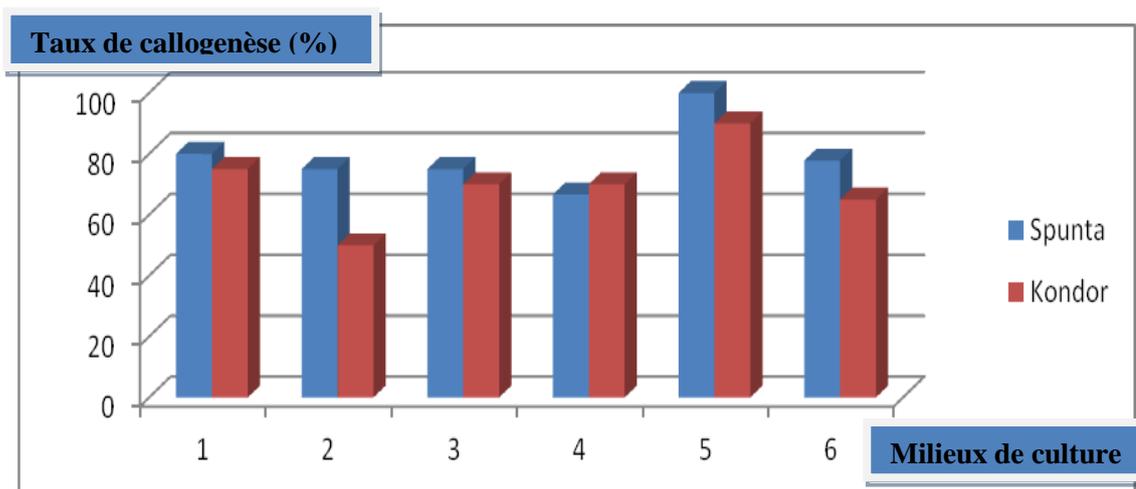


Figure 06: Variation du taux de callogenèse après trois mois d'incubation sur les milieux NAA/BAP pour les explants de tige de Spunta et Kondor.

Table 17: Effet des différents concentrations de NAA et NAA-BAP sur la texture et la couleur après une semaine et deux mois de la formation des cals dans le cas d'explant d'entre-nœuds pour les deux variétés

Hormones mg/l			Texture et couleur des cals après une semaine		Texture et couleur des cals après deux mois	
			Spunta	Kondor	Spunta	Kondor
M1	NAA	0.5	Blanc-friable	Blanc-friable	Vert-Claire	Vert- Claire
	BAP	1				
M2	NAA	1	Blanc-friable	Blanc-friable	Vert-Claire	Vert- Claire
	BAP	0.5				
M3	NAA	2	Blanc-friable	Blanc-friable	Vert-Claire	vert-jaune
	BAP	2				
M4	NAA	0.5	Blanc-friable	Blanc-friable	Vert-Claire	Vert
M5	NAA	1	Blanc-friable	Blanc-friable	vert-jaune	Vert- Claire
M6	NAA	2	Blanc-friable	Blanc-friable	vert-jaune	vert-jaune

1. 1.2 Le poids frais

Le poids frais des cals de germes après deux mois de culture varie de 0.13 à 0.77g pour M6 et M2 avec Spunta et de 0.18 à 0.40 g pour M4 et M5 avec Kondor (Tableau 20, Figure 07).

Tableau 18 : Variation du poids frais des germes dans les différents milieux avec Spunta et Kondor après deux mois d'incubation sur les différents milieux en présence de (NAA et NAA/BAP).

Milieux	Poids frais (g)	
	Spunta	Kondor
M1	0.40	0.28
M2	0.77	0.18
M3	0.50	0.38
M4	0.24	0.15
M5	0.46	0.40
M6	0.13	0.22
Moyenne	0.41	0.26
Ecart-type	0.20	0.20

P=0,169, ANOVA non significative

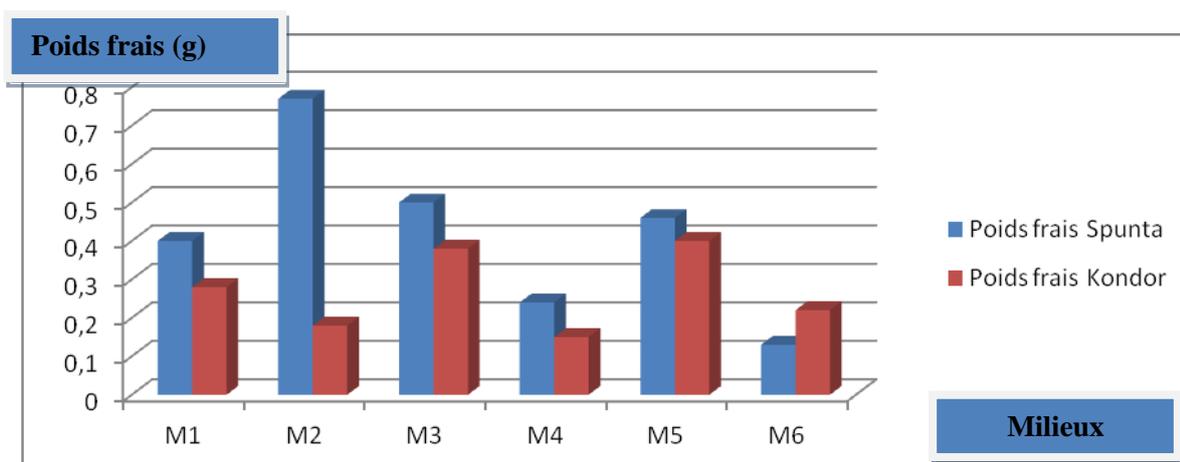


Figure07 : Variation du poids frais des germes dans les différents milieux avec Spunta et Kondor après deux mois d'incubation sur les différents milieux en présence de (MS+NAA et NAA/BAP).

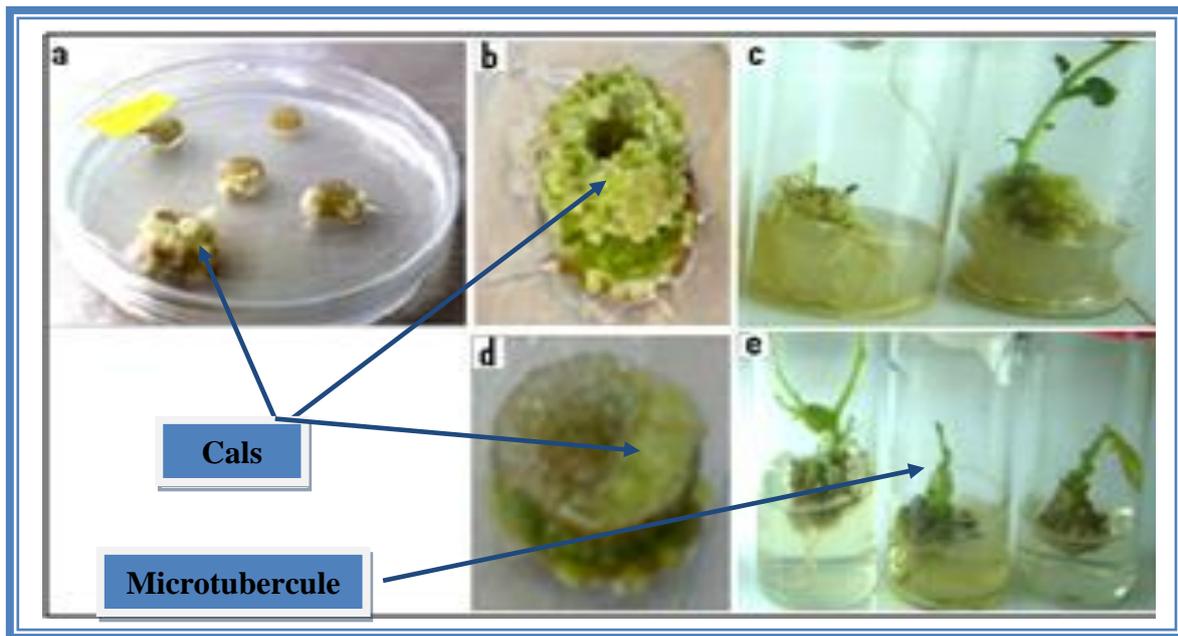


Figure 08 : Effet de l'auxine et cytokinine rapport sur l'induction de cals pour des explants de pommes de terre (entre-nœuds et germes) cultivés *in vitro*.

a: L'initiation des cals blancs après une semaine dans le milieu M3 3 (0.2/0.2 mg / l) avec Spunta. **b**: cals vert Compact dans toute la surface de entre-nœuds des explants de Kondor en milieu 3 (2/2 mg / l) après 40 jours. **c**: développement des racine et des tiges sur le Cal de Spunta des germes cultivés en milieu 5 (2 mg / l) après 40 jours. **d**: Cals vert à la surface des explants de' entre-nœuds de Kondor en milieu 5 (1 mg / l) après 20 jours. **e**: Formation de microtubercules sur les cals de Kondor dans le milieu de 1 (0,5 / 1 mg / l) après 40 jours.

1.1.3 Etude de la structure anatomique de certains cals

La découverte révolutionnaire du siècle est que les cals peuvent être générés artificiellement *in vitro* (Gautheret 1939; Nobécourt 1939) et que l'équilibre entre deux hormones végétales, auxine et cytokinine, détermine l'état de la différenciation et la dédifférenciation (Skoog et Miller, 1957).

Un cal se compose d'une masse amorphe de cellules parenchymateuses lâchement disposées provenant des cellules proliférantes du tissu d'origine. Fréquemment, à la suite d'une blessure, un cal se forme naturellement à l'extrémité d'une tige ou d'une racine coupée.

Selon les travaux de Kibler et al., (1980) sur le *Datura* à partir d'explant d'anthères, les cultures de cals obtenus sont principalement constituées de deux types de cellules, c'est-à-dire de petites cellules méristématiques avec une forte activité de division cellulaire, et des cellules

du parenchyme non différenciées avec des taux de division cellulaire faible qui relient entre les zones méristématiques l'un à l'autre, dont la taille varie selon la concentration en kinétine. D'autre part, Bonnel et al (1983) in: Buffard-Morel. (1992), ont montré qu'il y a une diversité des tissus d'origine des cals obtenu de canne à sucre à savoir : l'épiderme, la gaine perivasculaire, fibres sous épidermique et tissus vasculaire.

L'étude histologique des cals obtenu à partir d'explants internodale après 3 et 60 jours montre que la division cellulaire est produite dans l'épiderme seulement après trois jours de culture (figure 09 D), la division cellulaire étendue à la première couche du cortex, les petites protubérances avec des cellules allongées (figures 09 C-D) sont constitué par des cellules formées en tant que résultat de la division et deviennent visible sur l'épiderme et sur les surfaces de coupe, les cellules de cette région sont relativement indifférenciées et méristématique (figure 09F), densément protoplasmique et avec de grands noyaux et tous subissent une division cellulaire active (Figure 09 E).

La taille de cal augmenté et deviens compact après deux mois (figure 09 b) après la prolifération des cal superficielles friables, selon Juan et *al.* (2012), il y avait de larges espaces intercellulaires entre les cellules de cellules non embryogènes et les cellules ont une très faible capacité de division.

Branka et Marija (2001) en étudiant la calogenese avec des combinaisons de 2,4-D et de BAP différentes montrent que l'analyse histologique des tissus de cals cultivés sur tous les milieux testés a montré qu'il est principalement composé de cellules parenchymateuses. Les amas de cellules parenchymateuses étaient entourés de régions méristématiques. La formation de régions méristématiques est vigoureuse pour les cals cultivés sur des milieux contenant des concentrations plus élevées de kinétine.

Cependant, il a également été reconnu que les cals sont très diverses et peuvent être classés en sous-groupes en fonction de leurs caractéristiques macroscopiques. Par exemple, les cals sans régénération d'organes apparents sont appelés généralement cals friables ou compact (figure 09A), autres cals qui affichent des degrés de régénération d'organes sont appelés racinaires, caulinaires ou cals embryonnaires, selon les organes qu'ils génèrent (Zimmerman, 1993; Frank et *al.*, 2000. Momoko et *al.*, 2013). Ainsi la couleur et la texture des cals varient selon la nature des régulateurs de croissance (Soumahoro et *al.*, 2015).

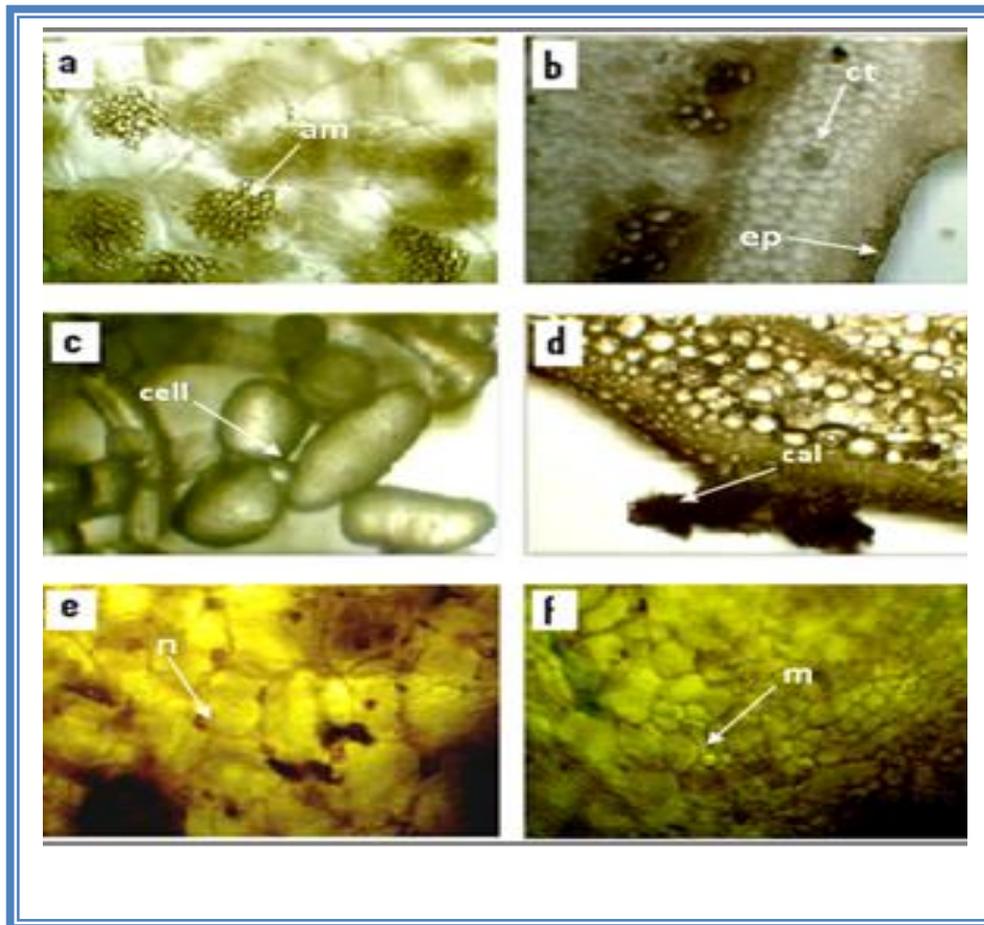


Figure 09. Etude histologique des cals de Spunta. A: Coupe transversale des entre-nœuds de pommes de terre (ct: Cortex, ep: l'épiderme). B: tissus de la tige (am: amyloplaste). C: initiation de cal à partir des cellules de l'épiderme et du cortex. D: Forme des cellules de cal obtenu dans la figure C (cal : prolifération de l'épiderme). E: Les cellules de la culture de cal après deux mois N: noyau). F: développement de cal après 60 jours (cal compact vert, m: cellules méristématiques).

1.1.4 Effet de l'orientation de l'explant sur la callogenèse

L'initiation de la callogenèse varie selon la position des surfaces de l'explant sur le milieu de culture, les explant de tiges placé verticalement sur le milieu M4(0.5 mg/l)NAA avec Kondor après deux mois de culture ont donné des cals sur la surface supérieur de l'explant et autour de la base inférieur en contact du milieu(figure 09 a). Les cals commencent sous forme de tissus blancs dispersé puis enveloppe tout l'explant après deux mois de culture, par contre lorsqu'il sont placés horizontalement sur le milieu M5 (1 mg/l de NAA) l'initiation de la callogenèse a commencé sur la surface de l'épiderme en contact du milieu de culture (Figure 09 d) et aux extrémités des entre-nœuds sur milieuM6 (2mg/l NAA) avec Kondor après un mois de culture (figure 09b). Cependant pour les explants de germes (sur milieu M6 (2mg/l) avec Kondor après deux mois de culture) , la callogenèse commence à la base des

explants après gonflement sous forme de tissus blanc puis prendra la couleur vert après deux semaines d'incubation (figure 10 c).

La masse de matière fraîche des cals dépend du milieu de callogenèse et de la position de l'explant sur tous les milieux de culture, ce paramètre augmente en allant de la position apicale à la basale et à la médiane de l'origine des explants (Haouala et *al.*, 2010).

Le nombre de bourgeons formés est plus élevé à l'extrémité apicale qu'à l'extrémité basale des explants. Le nombre de bourgeons et de tiges formés est plus élevé lorsque les explants sont placés verticalement que lorsqu'ils se trouvent à la surface du milieu (Figure 10). Pour l'extrémité apicale, ce nombre est plus élevé dans les explants placés horizontalement que lorsqu'ils sont insérés en position inversée verticalement sur le milieu de culture (Garcia-luis et *al.*, 1999).

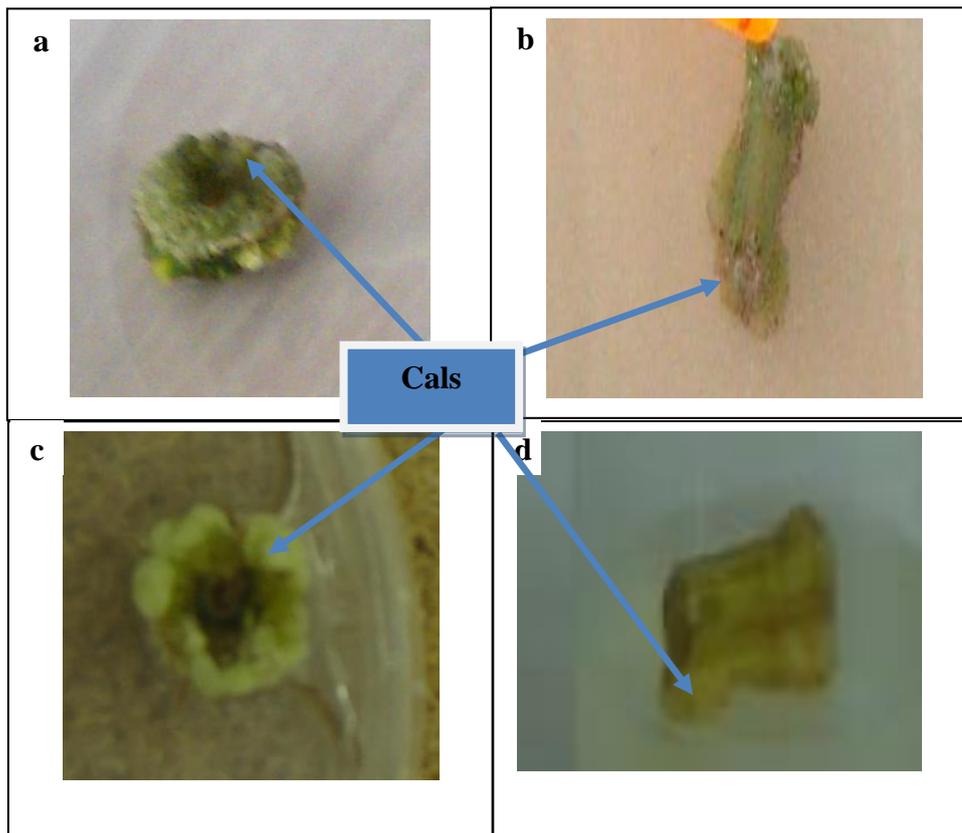


Figure 10 : Influence de l'orientation de l'explant sur la callogenèse.

a : Cal avec entre-nœuds posé verticalement sur milieu M4(0.5 mg/l)NAA avec Kondor après deux mois de culture. **b** : Début de callogenèse sur les extrémités des entre-nœuds de Kondor déposé horizontalement sur milieu M6(2mg NAA) après un mois de culture. **c** : Début de callogenèse sur la base des germes sur milieu M6 (2mg/l) avec Kondor après deux mois de culture. **d** : Explant de tige placés horizontalement sur le milieu M5 (1 mg/l de NAA) l'initiation de la callogenèse a commencé sur la surface de l'épiderme en contact du milieu de culture après 40 jour.

1.1.5 Obtention de microtubercules sur les cals

Les microtubercules de pomme de terre (*S. tuberosum* L.) produits *in vitro* sont actuellement utilisés dans de nombreux secteurs de l'agriculture comme matériel pour la recherche (Coleman et *al.*, 2001 ; Ranalli et *al.*, 1994), la conservation des ressources génétiques et la distribution internationale de génotypes cultivés (Estrada et *al.*, 1986), ainsi que pour les systèmes de certification (Slimmon et *al.*, 1989). Les facteurs qui affectent la production de microtubercules *in vitro* comprennent les régulateurs de croissance, le cultivar,

la photopériode, la qualité de la lumière, les concentrations de saccharose et la température (Gopal *et al.*, 2004).

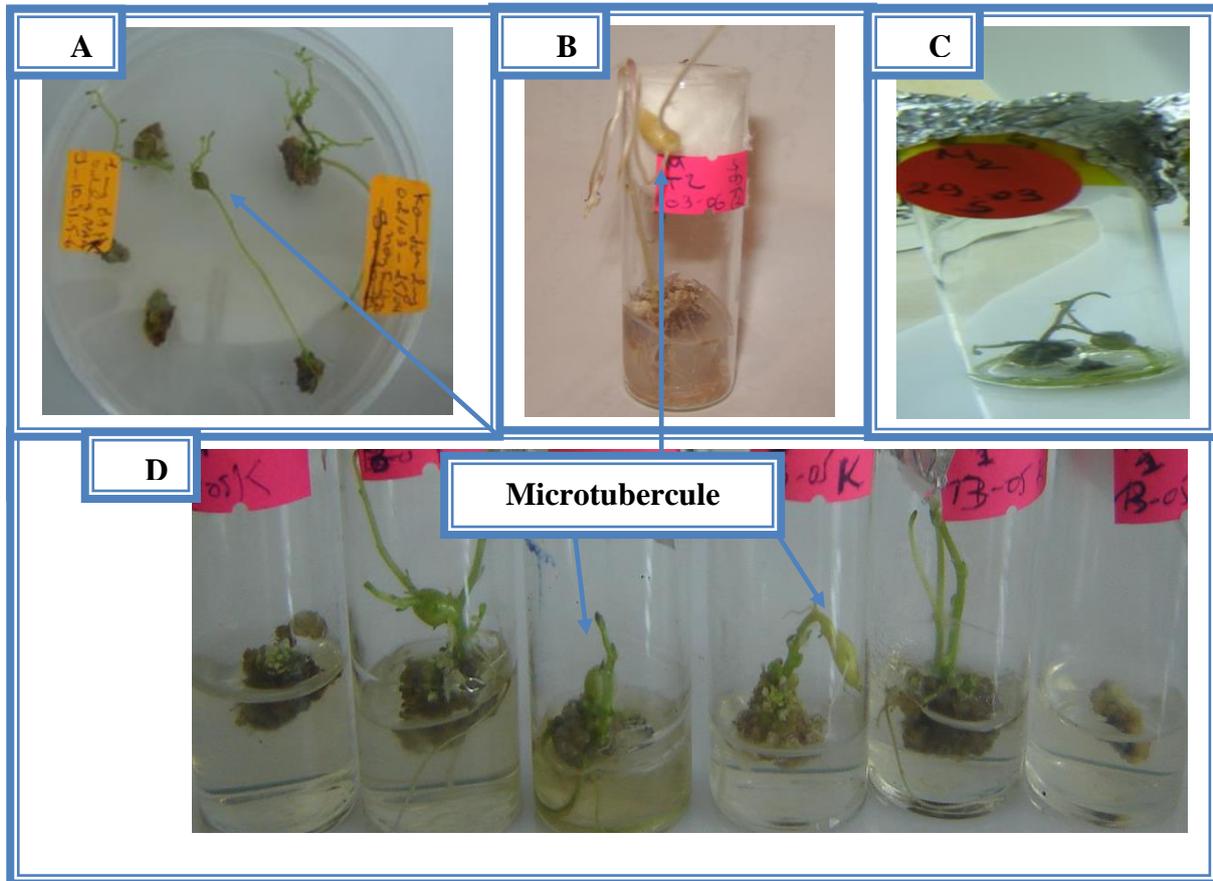


Figure 11: Formation de microtubercules sur les cals obtenues de milieux différents.

A : Formation de microtubercule sur milieu embryogène (NAA/BAP=0,2/1 mg/l) à partir des cals issus de 2mg/l NAA après trois mois d'incubation des explants de germes de la variété Kondor. **B :** Formation de microtubercule sur milieu embryogène M2 (NAA/BAP=1/0,5 mg/l) après deux mois d'incubation des explants de germes de la variété Spunta. **C :** Formation de microtubercule sur milieu embryogène M2 (NAA/BAP=1/0,5 mg/l) après deux mois d'incubation des explants de germes de la variété Spunta. **D :** Taux de microtuberisation élevé sur milieux M1 (0.5/1 mg/l de NAA/BAP) après deux mois d'incubation.

La tubérisation *in vitro* est rendue possible en cultivant des mini-boutures sur un milieu minéral de base MS (Công-Linh, 1995), enrichi de benzyladenine (2,5-5,0 mg/l) et de 8% de saccharose. Al-Safadi *et al.* (2000) ont utilisé le milieu MS supplémenté avec 0,8% d'Agar, 6 mg/l de BA, 4 mg/l de kinétine et 60 g/l de saccharose, pour la production de microtubercules *in vitro* qui a pris six semaines pour former des microtubercules. Les cals de pomme de terre a été montré pour être capable de développer des organes, a savoir les bourgeons les tiges et des racines et des micro-tubercules selon le milieu de culture et la combinaison hormonale (figure 11 et 08).

Une observation rare surprenante dans notre étude de cals de la pomme de terre est la formation de microtubercules, à partir des germes de tubercules sur milieu M1 (0.5/1 mg/l) avec Kondor et M2 (1/0.5 mg/l) avec Spunta, pendant 37 à 60 jours d'incubation pour 10% des explants incubés, ainsi qu'en présence de (1mg/l BAP -0.2 mg/l 2,4-D) avec Kondor (Figure 11).

Seyedardalan et David. (2015) ont trouvé des résultats similaires à partir de 10% des explants de feuilles sur un milieu additionné d'auxine et de cytokinine après cinq semaines d'incubation. D'autre part Novak et *al.* (1980) en étudiant l'effet des régulateurs de croissances sur la multiplication de pomme de terre par les méristèmes terminales a montré que les concentrations élevées de BAP induit la formation des cals sur les bases des méristèmes terminales.

Yoesef et *al.* (1997) en travaillant sur la microtuberisation de Spunta a signalé la formation de cal sur milieu MS avec 2 mg/l BAP et des concentrations de NAA variant de (0.5-2) mg/l. L'induction de la microtuberisation a été induite aussi avec le 2,4-D (2,26 μ M) et BAP (22,19 μ M) en augmentant le nombre, le diamètre et le poids des microtubercules (Ghavidel et *al.*, 2012).

Les auxines influent sur la rhizogenèse et la formation de cals également sur le même phénomène dans toutes les espèces. Dans cette étude, on a observé que l'auxine lorsqu'il est utilisé seul (M4, M5 et M6) produit des cals blancs friables dans une période plus courte (une semaine) pour les deux variétés (figure 10A), et est devenu au bout de huit semaines compact, vert clair ou vert jaune (figures 10 B.C). Khadiga et *al.* (2009) ont produit des cals friables vert dans une semaine à partir de pommes de terre cultivar en utilisant différentes concentrations de 2, 4-D. Le plus haut degré pour Spunta (80% avec M1 et 100%, avec M2 et M3) avec les explants de germes et entrenœuds ont été enregistrés consécutivement.

L'utilisation de la NAA seule pour callogénèse (Tableau 18), a révélé que quel que soit le génotype ou le type d'explants utilisé, le taux de formation de cals d'explants de bourgeons se situe entre 60% et 100% dans les milieux (M1, M2 et M3) pour Spunta et 80% pour Kondor pour tous les milieux. Cependant, pour les explants d'entre-nœuds, le taux de formation de cals est de 75% pour tous les milieux dans le cas de Kondor et varie de 30% à 100% pour Spunta. Ces résultats sont similaires à ceux de Shirin et *al.*, (2007) qui ont utilisé le 2, 4-D pour l'induction de cals à partir d'explants foliaires et internodales et ont obtenues à partir de quatre variétés de pommes de terre, y compris Diamant, et il a été constaté également que,

parmi toutes les concentrations et combinaisons le 2,4-D à 3,0 mg / l est la plus efficace a concentration d'auxine pour l'induction de cals pour tous les explants.

Action de la combinaison (auxine- cytokinine)

Les cytokinines favorisent la multiplication et la différenciation des cellules et des tissus in vitro. Comme l'auxine et les gibbérellines, qui peut aussi induire un l'allongement des cellules. Les résultats représentés dans (Tableau 18) montrent l'influence de la concentration des régulateurs de croissance sur la formation de cals dans la pomme de terre. Le taux le plus élevé de cals (100%) a été obtenu avec les combinaisons (NAA / BAP) (1 / 0,5 mg / l, milieu M2) et (2/2 mg / l, milieu M3) avec des explants de germes de Kondor. Dans le milieu M1 (0,5 / 1 mg / l), M2 et M3) avec des explants de germes de Spunta, le taux de callogenèse 80% a été notée. Par ailleurs les taux de callogenèse les plus élevés, 90% pour Kondor et 100% pour Spunta en milieu M6 ont été enregistrés avec les explants d'entre-nœuds (tableau 19).

Shirin et al. (2007) ont montré que la combinaison BAP- NAA avec des concentrations de 5 et 4 mg / l, respectivement, a produit un maximum de cals à partir d'explants nodaux des cultivars de pomme de terre. Selon (Majid et al. 2014), NAA en combinaison avec BAP (1,0 mg / l pour chacun) mènent au meilleur degré de formation de cals avec des explants de pommes de terre après 21 jours d'incubation. D'un autre côté Héra et al. (2014) ont obtenu le taux de croissance de la biomasse et l'accumulation maximale pour *Nigellasativa* avec la combinaison BAP (2 mg / l) + (NAA 1 mg / l).

Ighilhariz et al. (2008) ont rapporté que l'utilisation de la combinaison hormonale AIA / kinétine avec différentes concentrations testées (0,5 / 0,5 mg / l, 1/1 mg / l et 1,5 / 1,5 mg / l) induit la formation de cals à partir d'explants de tiges et des feuilles des espèces *Atriplex canescens* et *A. halimus*, avec différentes quantités de formation de cals en fonction des variétés.

Plusieurs études ont montré que l'utilisation de l'auxine et des cytokinine assure l'initiation ou induction de cals dans un grand nombre d'espèces: deux plantes médicinales à savoir *AdhatodaVasica* et *Ageratum conyzoides* (Renu et Nidhi, 2011); *Sauropus androgyne* (Udhaya et al., 2012).; *Atriplex*; *Dianthus caryophyllus* L.(Mohamed et al., 2014).

D'autre part (Manel et *al.*, 2014) ont été obtenus le taux le plus élevé de la formation de cals (100%) sur milieu MS additionné de la combinaison (NAA / KI = 1 / 1,93 mg / l), pour plante la médicinale *Calligonum comosum* L. Les interactions des hormonales entre BAP et NAA étaient le facteur le plus efficace pour l'induction et la production de cals. La production de cals la plus élevée a été obtenue à partir de 5 jours, pour les plants de *Brassica napus* dans un milieu MS avec BAP (0,5 / 1 mg / l) et NAA (0,5 / 1 mg / l) (Borjian et Arak, 2013).

B-Effet de l'explant

On a constaté que la formation de cals a été déclenchée sur toutes les explants testées, quel que soit leur type était (entrenœuds / bourgeons) ou le génotype (Kondor / Spunta). Nos résultats montrent que la formation de cals dépend du type d'explants. Les explants de germes ont la meilleure réponse à la formation de cals, la quantité de cals est comprise entre 60% et 90% pour Kondor et de 60% à 100% pour Spunta.

Nous avons également constaté que les explants de germes ont une forte inclination pour l'organogénèse tandis que les tiges induisent des cals embryogènes. Les conclusions de Qamar et *al.* (2001) sur le kiwi (*Actinidia chinensis*), a montré que le taux de cals varie en fonction du type de explants; 97,5% pour les pétioles, 94,5% pour les entre-noeuds, 88% pour les feuilles et 71% pour les méristèmes.

Les variations de l'aptitude des cals à la formation des différents types d'explants ont été rapportées dans de nombreuses autres plantes (Ishii et *al.*, 2004). En étudiant les différents génotypes et les tissus de pomme de terre, y compris: des anthères, des embryons immatures zygotique, tiges sections tubercules, feuilles et racines, Thérèse et *al.* (2005) ont trouvé des taux différents de cals indiquant que le type d'explants influence la callogénèse significativement. D'autre part Mohammad et *al.* (2014) montrent que la spécificité de la callogénèse selon le type d'explant serait expliquée par leur réactivité différentielle aux composants des milieux.

C-Effet du génotype

La réponse des tissus en culture est fortement dépendante du génotype. Des différences génotypiques significatives en matière de réponse à l'initiation de cal ont été observées chez les deux génotypes de pommes de terre étudiés. La variété Spunta développe la meilleure callogénèse dans tous les milieux par rapport à la variété Kondor, les travaux de

Gabriele et al. (2003) sur six variétés de *Primula* montrent que le taux d'induction de cals a varié entre 24% et 95%, ce qui confirme que le génotype est un facteur limitant dans la formation de cals. En outre Koutoua et al. (2007), a travaillé sur sept variétés de blé dur (*Triticum durum*) et a prouvé que callogénèse dépend du génotype de la variété.

I.1.6 Conclusion

L'induction de cals a été obtenue sur un milieu MS additionné de NAA seul et en combinaison avec la BAP. Cependant, la meilleure quantité de formation de cals, 90% pour Kondor et 100% pour Spunta en milieu M6 a été enregistré avec des explants d'entre-neuds. D'autre part, la variété Spunta développe la meilleur callogénèse dans tous les milieux par rapport à la variété Kondor. Nos résultats indiquent que les cals dépendent du type explants. Les explants de bourgeons ont la meilleure réponse à la formation de cals, la quantité de cals est comprise entre 60% et 90% pour Kondor et de 60% à 100% pour Spunta. Les cals de germe sont développés des pousses et des racines dans tous les milieux, et des micro-tubercules dans le milieu (M1 et M2).

L'étude histologique montre que l'initiation de la callogenèse commence à partir des tissus superficiels des explants à savoir les premiers assises du parenchyme cortical la forme des cellules du cal obtenu ressemble au tubercules de pomme de terre, se sont des cellules méristématiques avec un rapport nucléo- cytoplasmique élevé.

L'orientation des explants de tige sur le milieu de culture influence sur la réponse à la callogenèse, les explant de tiges placé verticalement sur le milieu a donné des cals sur la surface supérieur de l'explant et autour de la base inférieur en contact du milieu de culture un cal blanc dispersé puis le cals enveloppe tout l'explant après deux mois de culture, par contre lorsqu'il sont placés horizontalement sur le milieu l'initiation de la callogenèse a commencé sur la surface de l'épiderme en contact du milieu de culture à l'opposé pour les explants de germes la callogenèse commence à la base des explants après gonflement sous forme de tissus blanc puis prendra la couleur vert après deux semaines d'incubation.

Une découverte surprenante dans notre étude de cals de la pomme de terre (*Solanum tuberosum L*) à partir des germes de tubercules sur milieu M1(0.5/1 mg/l) avec Kondor et M2(1/0.5 mg/l) avec Spunta, pendant 37 à 60 jours d'incubation pour 10% des explants incubés, ainsi qu'en présence de (1mg/l BAP -0.2mg/l 2,4-D) avec Kondor.

1.2 Essai 2 : Etude de la réponse à la callogenèse en présence de concentrations différentes de l'hormone (NAA /BAP) à l'obscurité.

1.2.1. Etude de l'effet de l'obscurité sur les callogenese après une semaine d'incubation

La réponse à la callogenèse des explants incubés à l'obscurité varie d'un milieu à l'autre, elle est précoce pour les milieu M2, M5 et M6, après une semaine d'incubation les cals obtenues sont de couleur blanc pour (M6 et M1), Brun pour (M2,M3 et M4) de structure friable et deviennent blanches avec émission des racines à la base des explants après quinze jours(Figure 12 A, Tableau 21), pour tous les explants testés avec les deux variétés.

Selon Moitreyee et *al.* (2013) La texture et le type de cals a été influencée par le type de régulateurs de croissance et explants utilisés, quatre types distincts de cals ont été obtenus à partir des explants de *Aquilaria Lam.* blanc, crème jaunatre, noirâtre blanc et brun jaunâtre, des cals blanc friable et fragile a été obtenue lorsque les milieux MS sont supplémenté avec des concentrations élevées de 2,4-D et de faibles concentrations de Kinétine ont été utilisés et placés dans l'obscurité. Il est passé au vert dans les 2-3 semaines après le transfert à des conditions de lumière, d'autre part il a obtenu à l'obscurité avec le milieu MS complété par des concentrations élevées de NAA et faible de BAP, des cals jaune blanc à crème et des cals compacts.

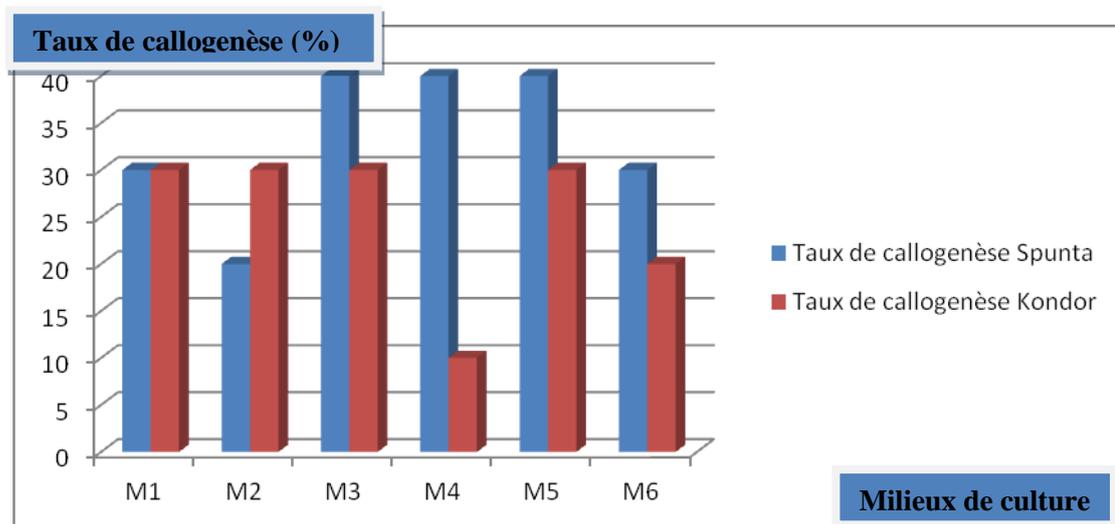


Figure12: Variation du taux de callogenèse des germes dans les différents milieux avec Spunta et Kondor après deux mois d'incubation sur les différents milieux en présence de (AA et NAA/BAP) à l'obscurité.

Tableau 19 : Description des phases de développement après 7 jours d'incubation des deux variétés Spunta et Kondor sur les différents milieux.

Milieux	Variétés	Après 7 jours	15 jours
M1(NAA/BAP) (0.5/1) mg/l	Spunta	Pas de réponse	Cals blancs et émission de racines sur toutes les explants
	Kondor	- 33% des explants : Cal blanc jaune , - 66% des explants : Pas de cal et émission de racines	
M2 (NAA/BAP) (1 / 0.5)mg/l	Spunta	cal brun	
	Kondor	cal brun	
M3(NAA/BAP) (2/2) mg/l	Spunta	Gonflement des cals bruns	
	Kondor	Cal brun	
M4(NAA/BAP) (0.5/0) mg/l	Spunta	cal brun	
	Kondor	Début de cal brun	
M5(NAA/BAP) (1/0) mg/l	Spunta	cal brun	
	Kondor	cal brun	
M6(NAA/BAP) (2/0)mg/l	Spunta	Cal blanc	
	Kondor	Cal blanc	

Selon Lozzi et *al.* (2015) le transfert des cals obtenus au milieu dépourvu d'auxine chez le caroubier a permis le développement des structures embryonnaires globulaires, avec un maximum de 100% dans le cas d'initiation en présence de 10 μ M de 2,4-D. L'effet inhibiteur de l'auxine sur le développement des embryons somatiques a été rapporté par plusieurs auteurs (Von Arnold et *al.*, 2002; Machakova et *al.*, 2008).

1.2.2. Etude de l'effet de l'obscurité sur les callogenèse après deux mois d'incubation

Après deux mois d'incubation les cals prennent une structure compacte de couleur brun-blanc pour les deux variétés (Figure 14 CD, Tableau 21) avec un taux de callogenèse de (20- 40%) avec kondor pour les milieux M2 et (M3, M4, M5) respectivement et de (10-30%)

pour M4 et (M1, M2, M3) pour Spunta respectivement, le développement meilleur a été noté chez Spunta avec les milieux (M2, M3, M6) (Figure 15).

Tableau 20: Description de la texture, couleur et degré de développement après deux mois d'incubation des deux variétés Spunta et Kondor sur les différents milieux (MS+NAA et NAA/BAP).

Milieux	Structure des cals		Couleur des cals		Degré de développement des cals	
	S	K	S	K	Spunta	Kondor
M1	Compacte		Brun blanc		++++	+++
M2	Compacte		Brun blanc		++++	+++
M3	Compacte		Brun blanc		++++	+++
M4	Compacte		Brun blanc		++	++
M5	Compacte		Brun blanc		+++	+++
M6	Compacte		Brun blanc		++++	++++

Des résultats similaires de (Rahayu *et al.*, 2016 ;Martin, 2004 et Elaleem *et al.*, 2009), montrent que la morphologie des cals ainsi que leurs couleurs et texture sont fortement influencés par la concentration et le type d'auxine utilisés dans le milieu de culture.

Le poids frais moyen (0.38 g) des explants a été meilleur avec Spunta avec les milieux (M1, M2 et M5) (Figure 13 ,Tableau 22), selon (Can *et al.*, 2016) L'induction de la callogenèse , les taux de formation de bourgeons et le poids de cals ont également été significativement influencés par le type d'auxine et la concentrations des hormones de croissance

Selon (Afshari & Kalantari, 2011) les auxines sont largement utilisées pour l'induction de cals. Les Auxines sont impliquées dans la division cellulaire, l'allongement des cellules, différenciation des tissus vasculaires, la rhizogenèse, la formation des racines, l'embryogenèse

et l'inhibition de croissance axillaire de pousses. D'autre part la lumière contrôle la croissance des plantes et développement principalement de deux façons: la photosynthèse et la photomorphogénèse (Ascencio-Cabral et *al.*, 2008)

La lumière avait un effet significatif sur la croissance des cals et leur morphogénèse, l'inhibition de la prolifération des pousses axillaires et l'induction de l'activité enzymatique spécifique qui concerne la formation de certains produits secondaires à base de glycoside flavonoïde (George et *al.*, 2008).

Les résultats de Jabbar Taha et Mutasher (2017). sur *Citrullus colocynthis L.* ont montré une augmentation de la concentration de certains métabolites secondaires dans les extraits de cals, par traitement physique (lumières) et éliciteurs chimiques (ABA, CuSOR4R.5HR2RO).

Les explants développent après plus de deux mois d'incubation pour les deux variétés étudiées des cals volumineux avec une touffe de raines minces blanches et longues, ainsi que des bourgeons qui se développent en tiges allongés avec de petites feuilles.

La cytokinine influence le transport d'auxine cellulaire en cellule par modification de l'expression de plusieurs composants de transport d'auxine et module ainsi la distribution d'auxine importante pour la régulation de l'activité et la taille du méristème racinaire (Ružićka et *al.*, 2009).

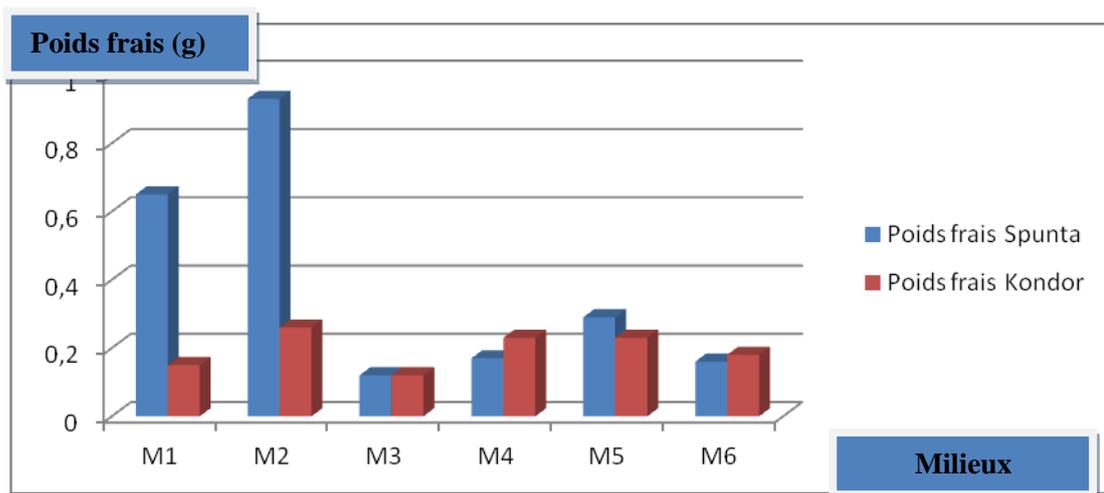


Figure13 : Poids frais des cals obtenu après deux mois de culture à l'obscurité sur milieux (NAA et NAA/BAP).

Elfriede et *al.* (1972) ont étudiés l'influence des différents types d'auxine sur la callogenèse des explants de maïs et ont montré que les faible taux de cytokinine / auxine de

0,004 et 0,02 la croissance des cals est seulement favorisée ou produit rarement de petites racines, des taux supérieurs de cytokinine / auxine de 0,1 à 5 en général donne amélioré la formation de racine . Au plus haut taux de cytokinine/auxine testé (5), les racines étaient extrêmement longues.

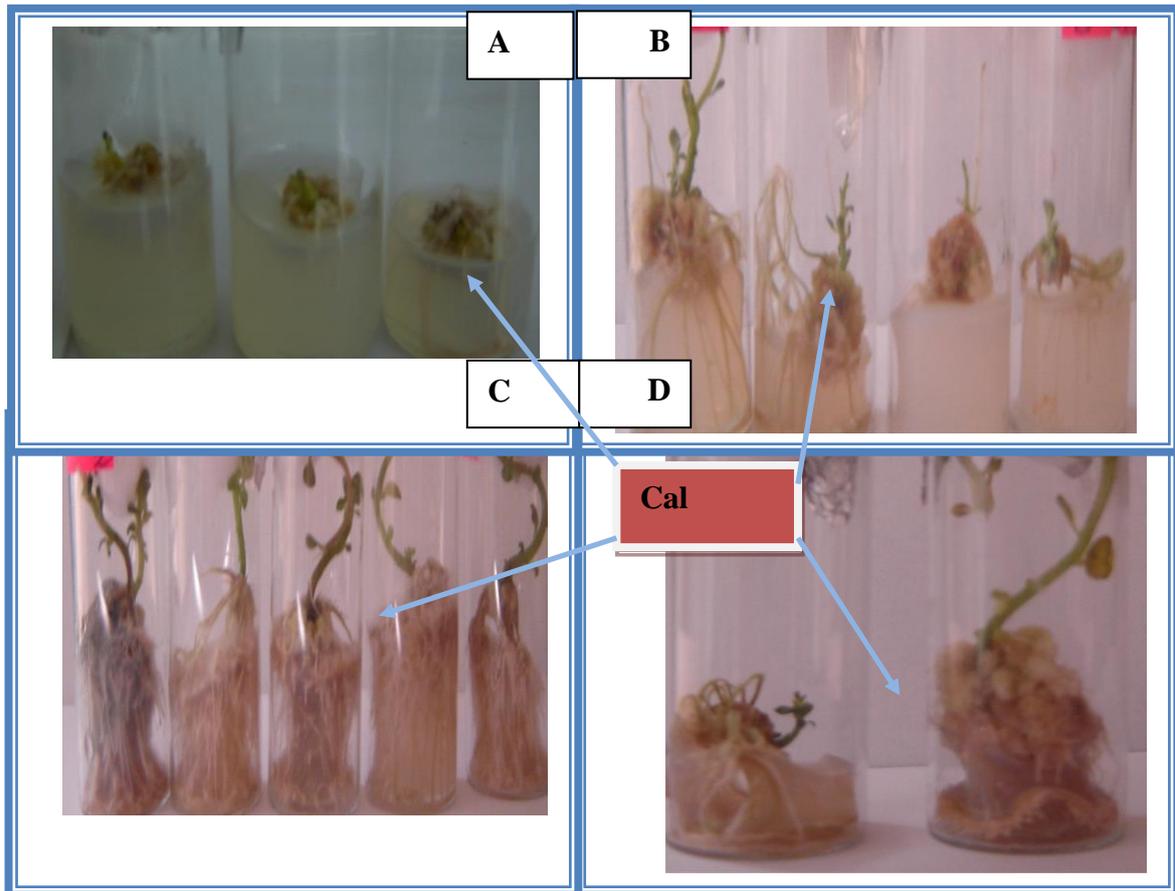


Figure 14: Callogenèse in vitro de deux variétés de pomme de terre Spunta et Kondor à l'obscurité en présence de NAA et BAP. **A** : Cal s blanc après 20 jours d'incubation avec Spunta sur milieu M2 NAA/BAP (1/0.5mg/l). **B** : cals brun avec Kondor (formation de bourgeon et de racines) après 1 mois d'incubation sur milieu M5 (NAA :1mg/l). **C** et **D** :Cals bruns avec Spunta sur milieu M5 et M6 après deux mois d'incubation, avec des tiges allongées et des racines denses.

Tableau 21 : Poids frais et taux de callogénèse des cals obtenu pour les germes des deux variétés après deux mois d'incubation sur les milieux (MS+NAA et NAA/BAP).

	Kondor		Spunta	
	Pois frais (g)	Taux de callogénèse	Pois frais (g)	Taux de callogénèse
M1	0.15	30	0.65	30
M2	0.26	20	0.93	30
M3	0.12	40	0.12	30
M4	0.23	40	0.17	10
M5	0.23	40	0.29	30
M6	0.18	30	0.16	20
Moyenne	0.19	0.38	33.33	25
Ecart-type	0.32	0.05	8.16	8.36
ANOVA	P=0.190		P=0.111	

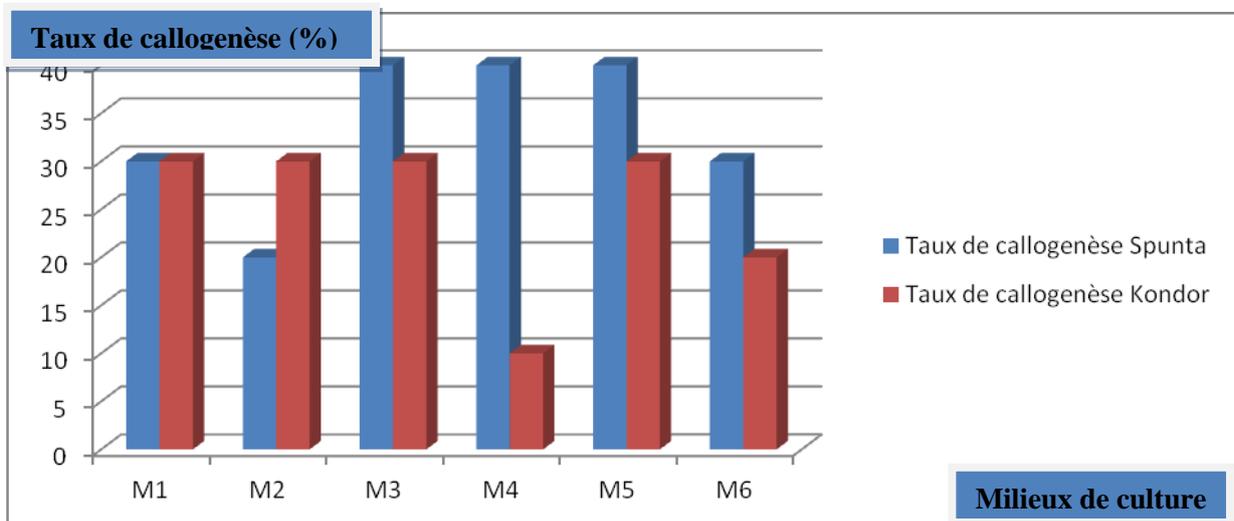


Figure15 : Variation du taux de callogénèse des cals obtenu après deux mois de culture à l'obscurité sur milieux (NAA et NAA/BAP).

1.2.3 Conclusion

La composition du milieu de culture et les facteurs physiques tels que la lumière, la température et l'humidité peut grandement affecter la voie de développement des cellules cultivées et la morphogénèse. Après une semaine d'incubation, les cals sont de couleur blanche pour (M6 et M1), Brun pour (M2, M3 et M4) de structure friable et deviennent blancs avec émission de racines à la base des explants après 15 jours. Après deux mois d'incubation, les cals prennent une structure compacte brun-blanc pour les deux variétés, le résultat de l'étude a montré que le niveau d'induction du cal et le poids du cal étaient significativement affectés par les concentrations d'auxine et, le taux d'induction du calus le plus élevé à partir du milieu (M3, M4 et M5, le poids de cal avec les milieux (M1 et M2) et développement des racines meilleur a été obtenu à partir du cultivar Spunta.

I.3 Essai 3: Etude de la réponse à la callogenèse en présence du BAP seul

Nous avons réalisé un essai de callogenèse avec BAP seul en utilisant les concentrations (0,5-1 et 2 mg/l) pour les deux variétés avec les explants de germes et on a enregistré le suivi de la croissance dans le tableau suivant :

Tableau 22 : Développement des explants de germes avec BAP seul après une semaine d'incubation.

BAP (mg/l)	Après 6 jours	
	Spunta	Kondor
0,5	<ul style="list-style-type: none"> - Chez 40% des explants de germes formation de racine sur les explants, - Chez 40% début d'émission des racines 	<ul style="list-style-type: none"> - 60% verdissement, - 20% début faible de bourgeonnement
1	<ul style="list-style-type: none"> - Chez 60% des explants verdissement, - Chez 20% formation des racines 	<ul style="list-style-type: none"> - Chez 80 % des explants renflement et verdissement - Chez 40% des explants, début d'émission des racines
2	<ul style="list-style-type: none"> - Chez 100% des explants verdissement développement des feuilles des bourgeons de germes 	<ul style="list-style-type: none"> - Chez 100% des explants, verdissement et développement meilleur des bourgeons - Chez 20% des explants, émission des racines

Tableau 23: Développement des explants de germes avec BAP seul après deux semaines et deux mois d'incubation.

BAP mg/l	Après 15 jours		Après deux mois
0,5	Spunta	Chez 40% des explants de germes début d'émission des racines sur les explants,	Pas de callogenèse pour tous les milieux et pour les deux variétés, avec allongement des tiges et des racines et développement important des feuilles
	Kondor	60% verdissement, 20% début faible de bourgeonnement	
1	Spunta	Chez 60% des explants verdissement, -Chez 20% formation des racines	
	Kondor	Chez 80 % des explants renflement et verdissement Chez 40% des explants, début d'émission des racines	
2	Spunta	Chez 100% des explants verdissement développement des feuilles des bourgeons de germes	
	Kondor	Chez 100% des explants, verdissement et développement meilleur des bourgeons Chez 20% des explants, émission des racines	

Nous avons effectué un essai avec les concentration de BAP (0.5, 1 et 2 mg/l) pour vérifier la réponse à la callogenèse , en utilisant les germes de tubercules comme explant ,

Chez 20-40% des explants début d'émission des racines dans les milieux (B1, B2 et B3) pour Spunta et Kondor (Annexe 01 A et B), la réponse des explants à ce milieu commence par verdissement et gonflement pour la plupart des explant pour les deux variétés dans la première semaine , après deux mois d'incubation sur ces milieux (Figure15 E F, Annexe 1, C D), pas de callogenèse pour tous les milieux et pour les deux variétés, l'allongement des tiges et des racines continu avec développement important des feuilles

beaucoup plus en faveur de la variété Kondor. Le milieu B3 (2 mg/l BAP) donne Chez 100% des explants, verdissement et développement meilleur des bourgeons pour les deux variétés (Tableau 24).

Le BAP n'est pas suffisant pour induire la callogenèse et nécessite un apport en auxine, cette association fait penser à un effet synergique et/ou complémentaire des auxines et des cytokinines sur l'organogenèse en général et la callogenèse en particulier.

Moitreyee et al . (2013) in (Moitreyee et al., 2013) ont trouvé que le milieu MS est plus approprié pour l'induction et l'entretien des cals lors qu'elle est complétée avec des hormones de croissance à haute auxine et un faible taux de cytokine. Selon sarker et Mustafa la présence du BAP améliore la réponse des explants en matière du nombre et longueur de tige par explant et nombre de feuilles.

Chaudhry et al (2014) en étudiant l'effet de BAP ou Kin seul et en combinaison avec NAA sur l'espèce *Nigellasativa.L*, montrent que le BAP ou la Kin seuls ne donnent aucune réponse à la callogenèse, et uniquement la combinaison avec l'auxine qui donne lieu à des cals. D'autre part Halmagyi et al. (2002) confirment que les cytokinines in vitro favorisent la différenciation et la multiplication des cellules et des tissus, ils induisent des processus de callogénèse, ayant une action antagoniste contre l'auxine.

Néanmoins certains chercheurs ont observé la formation de cal avec les cytokinine : Zéatine ,Adénine, Diphénylurée et TDZ ,Pour les bourgeons de chaîne liège (El Kbiach et al , 2002) et avec BAP pour le blé tendre (Mzour et Amssa ,2002)

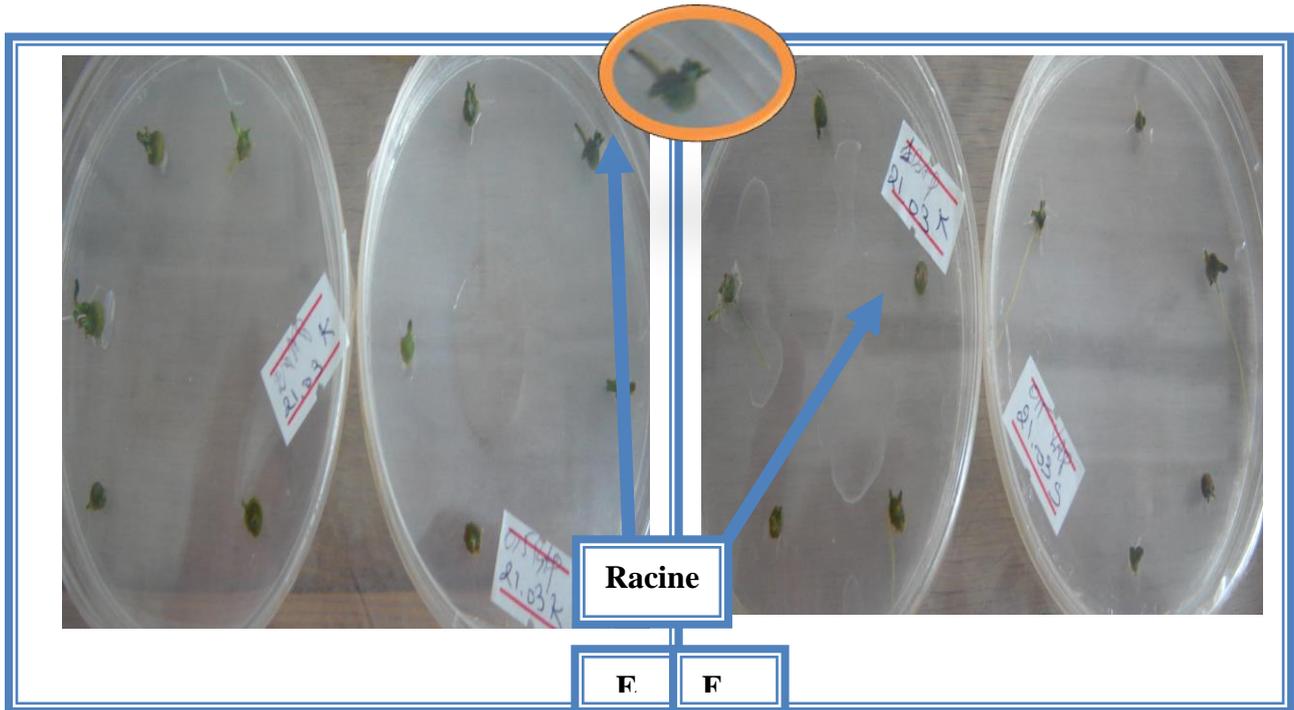


Figure 16: Croissance des germes de Kondor et Spunta en présence de BAP.

E,F : Croissance des explants après un mois d'incubation, verdissement et début de développement des racines (**E** : 2mg/ et 0,5mg/l avec Kondor, **F** : 1mg/l BAP avec Kondor et Spunta).

1.3.2 Conclusion

Les cytokinines in vitro favorisent la différenciation et la multiplication des cellules et des tissus ils permettent le développement des bourgeons et l'allongement des tiges. Le mode d'action des cytokinines est régulé par la présence des auxines, par l'orientation vers la callogenèse l'embryogenèse ou l'organogenèse. Pour la pomme de terre le BAP seul n'est pas suffisant pour l'induction de la callogenèse et nécessite la présence des auxines en concentration plus importante que les cytokinines .

Partie 2 : induction de la callogenèse avec les hormones 2,4-D et BAP

2.1 Essai 1 : Etude de la réponse à la callogenèse en présence de rapports auxine /cytokinine (2,4-D/BAP) différents à la lumière

La plupart des explants de germes ont répondu aux milieux d'induction de callogenèse, la callogenèse est initiée après 3-5 jours, le taux de callogenèse varie de (20- 86%) (Tableau 26, Figure 17) pour Spunta avec les milieux H1 et H2 , et (25-100 %) pour Kondor avec les milieux H3 et H1, la croissance meilleurs des cals a été enregistré dans le milieu MS additionné de 2 mg-1 de 2,4-D avec Kondor; suivie par le milieu MS additionné de 1 mg-1 de 2,4-D avec Spunta, .

Tableau 24: Texture et couleur des cal après une semaine d'incubation sur milieux (MS+ 2,4-D et 2,4-D/BAP).

Texture et couleur des cals après une semaine				
Concentration des hormones(mg/l)			Spunta	Kondor
H1	2,4-D	0.5	Blanc-friable	Blanc-friable
H2	2,4-D	1	Blanc-friable	Blanc-friable
H3	2,4-D	2	Blanc-friable	Blanc-friable
H4	2,4-D BAP	1 0.5	Blanc-friable	Blanc-friable
H5	2,4-D BAP	0.5 1	Blanc-friable	Blanc-friable
H6	2,4-D BAP	2 2	Blanc-friable	Blanc-friable

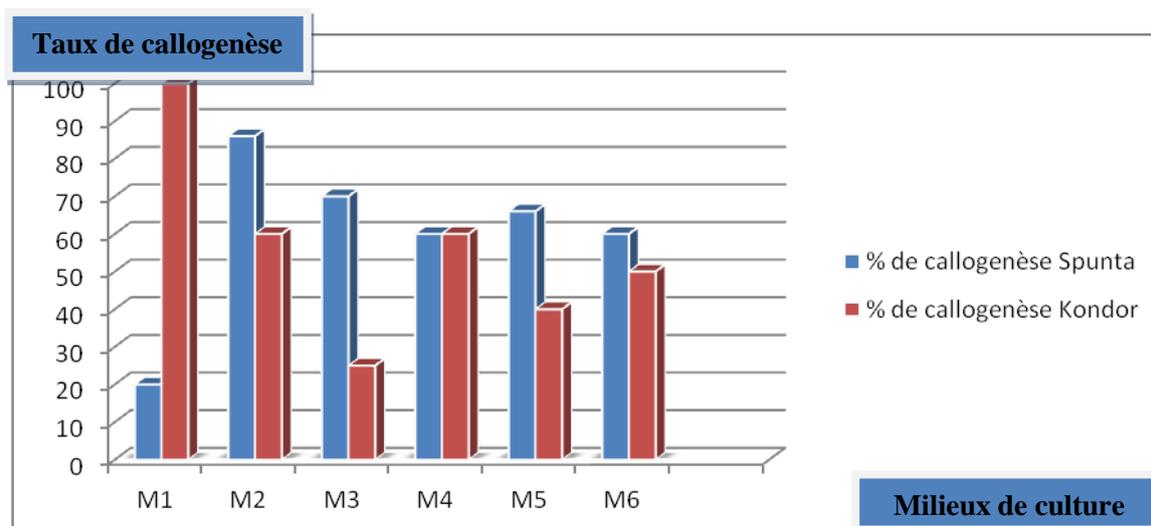


Figure 17: Variation du taux de callogénèse des germes de Kondor et Spunta sur les milieux 2,4-D/BAP après deux mois d'incubation.

Tableau 25: Texture et couleur des cal après deux mois d'incubation sur milieux (MS+ 2,4-D et 2,4-D/BAP).

Milieux	Temps à la callogénèse	% de callogénèse		Poids frais (mg)	
		Spunta	Kondor	Spunta	Kondor
H1	3 -5 jours	20	100	0.40	0.34
H2		86	60	0.66	0.44
H3		70	25	0.29	0.44
H4		60	60	0.58	0.92
H5		66	40	0.46	0.40
H6		60	50	0.35	0.17
Moyenne		60.33	55.83	0.45	0.45
Ecart-type		21.96	25.38	0.14	0.25
ANOVA (P=0,05)		P=0.749 (ANOVA non significative)		P=0.749 (ANOVA non significative)	

La couleur des cals verte, vert-clair, blanc et brune selon les milieux pour les deux variétés étudiés (Tableau 27, Figure 12 et 13). L'analyse de variance ne montre pas de différences significatives entre les deux variétés pour le taux de callogenèse.

2.1.1 Le poids frais des cals

Le poids frais des cals varie de (0.29-0.66) pour Spunta avec les milieux H3 et H2 respectivement et (0.17-0.92) pour Kondor avec les milieux H6 et H4 respectivement (Tableau 28, Figure 18). L'analyse de variance ne montre pas de différences significatives entre les deux variétés.

Tableau 26 : Poids frais des cals de germes obtenu après deux mois de culture sur milieux (MS+ 2,4-D et 2,4-D/BAP).

Texture et couleur des cals après deux mois d'incubation				
Milieux	Spunta		Kondor	
	Couleur	Degré de développement	Couleur	Degré de développement
H1	Vert- Clair	+	Vert	++
H2	Vert- Clair	++	Vert- Clair	+
H3	Vert- Clair	+	Vert- Claire	+++
H4	Brun	+	Vert- Clair	++
H5	Brun	++	Vert- Clair	++
H6	Brun	+	Vert- Clair	+

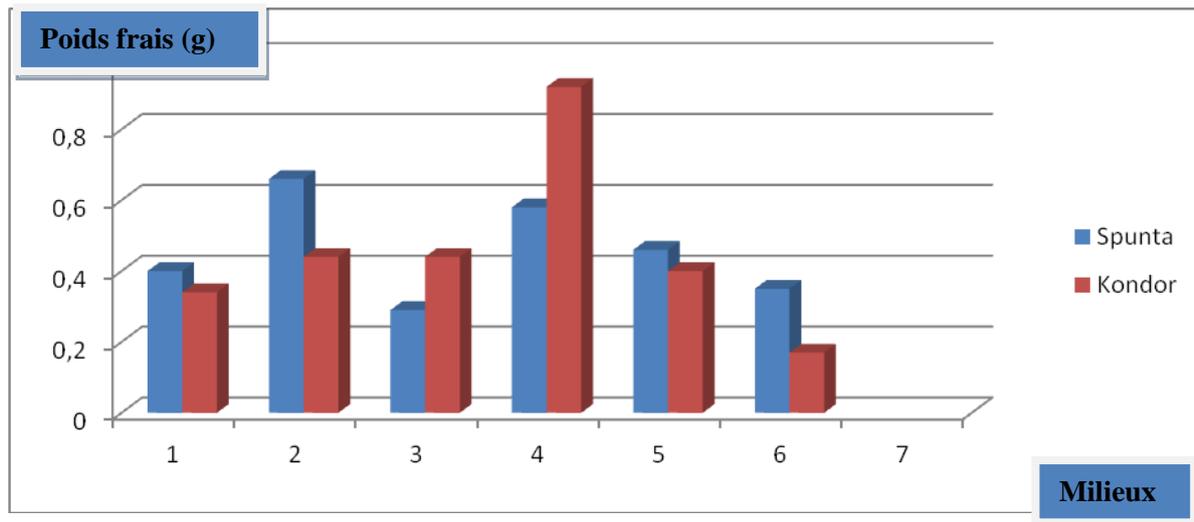


Figure 18: Poids frais des cals obtenu après deux mois de culture sur milieux (MS+ 2,4-D et 2,4-D/BAP).

La callogenèse chez Spunta et Kondor varient en fonction de la nature et/ou de la concentration des phytohormones utilisées. La doctrine de Skoog et Miller (1957) a déclaré que l'auxine et la cytokinine sont nécessaires pour l'induction régressive du cal. L'induction de est cals toujours précédée d'un gonflement de l'explant. L'induction de cals a également été jugée dépendante des hormones, les meilleurs pourcentages de callogenèse (86 % et 100 %) pour Spunta et Kondor respectivement sont obtenus avec les combinaisons BAP/2,4-D de (0,5 et 1mg/l).

Des constatations similaires ont été rapportés (Tan et al, 2010; Kumar et *al.*, 2015). Le résultat de Alam et al (2010) ont montré que, lorsque les milieux MS ont été complétés par les concentrations les plus élevées (2,0-5,0 mg/l) de 2,4-D, 100% des explants d'arachide ont donné des cals jaunes aqueux.

Des cals vert compact ont été induits lorsque de faibles concentrations de 1,0 et 2,0 mg L-1 de 2,4-D ont été utilisées, par contre avec plus de 2.0 mg /l 2,4-D, seul le des cals jaune friable ont été formés (Jeyakumar et *al.*, 2015).

Selon Karim et al. (2014) Le pourcentage le plus élevé d'induction de cals chez S. hortensias était de 96,67% pour les explants d'hypocotyls dans le milieu consistant en 2 mg de L-1KIN+ 1 mg/l de 2,4-D, suivis de 70% sur le milieu ayant 1 mg /l de KIN + 1 mg /l de 2,4-D.

Alam et *al.* (2010) a trouvé aussi que le régulateur de croissance NAA et 2,4-D était également bon pour l'induction du cal. La meilleure croissance du cal est obtenue quand

Hoque et *al.* (1992) ont utilisé 2 mg / l de 2, 4-D et 0,5 mg / l de kinétine dans le milieu). La supériorité de 2, 4-D pour l'induction du calcaire régénératif a été rapportée chez différentes espèces de plantes médicinales (Tomar et Tiwari, 2006), le 2,4-D est le meilleur auxine pour l'induction de cals chez les monocotylédones et les dicotylédones (Khatum et *al.*, 2003).

Le traitement des feuilles de (*Ricinus communis* L) avec NAA donne de faible callogenèse (2,7 %) par rapport au 2,4-D, le milieu (MS+2,5 mg/l 2,4-D) donne un taux meilleur de callogenèse de 40% avec les explants de feuilles(Khadiga et *al.*, 2015). le pourcentage de callogenèse est positivement corrélé avec le poids frais qui représente la masse de cellule produisent , selon Zouzou et *al.* (2008) le poids à sec qui représente la masse de cellules produites pourrait être considérée comme bonne indice de callogenèse du coton.

Ramadan et *al.* (2014) montre que le 2, 4-D en combinaison avec BAP est l'un des meilleures combinaisons pour l'induction et le développement des cals, cette association suggère une synergie et / ou complémentaire de l'auxine et de la cytokinine, cette dernière Stimule la sensibilité tissulaire, en particulier les cellules compétentes pendant la phase de callogenèse.

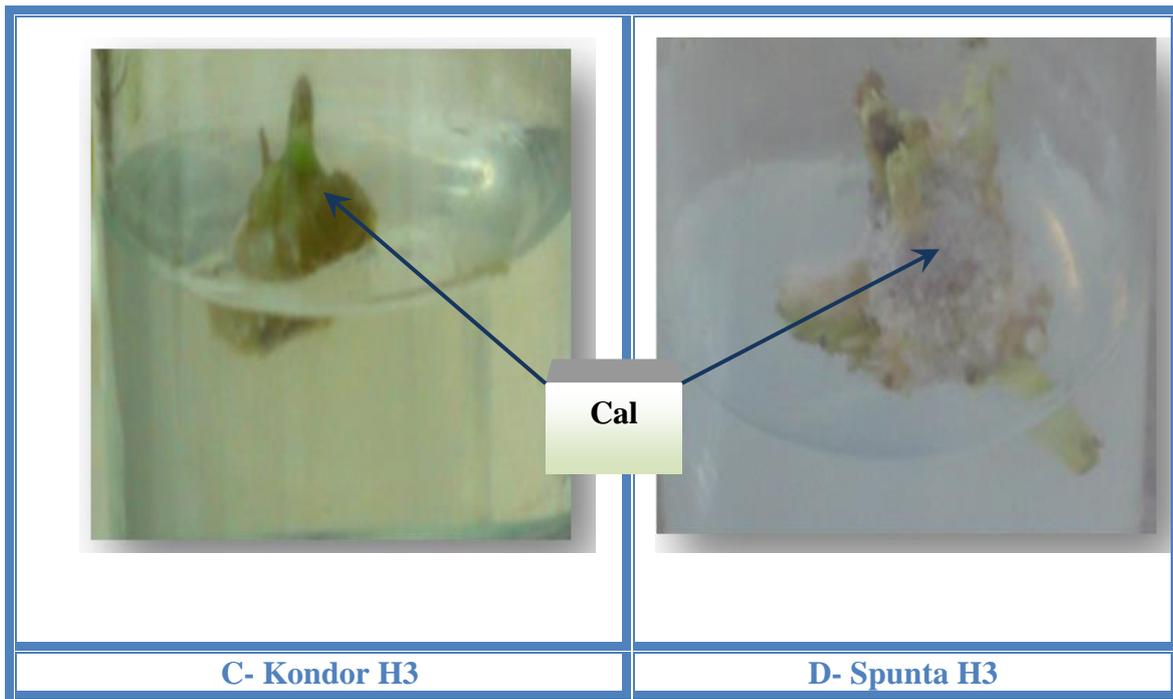


Figure19: Influence des différents milieux (MS+ 2,4-D et 2,4-D/BAP) sur la callogenèse des germes après deux semaines de culture. Les cales de Kondor et Spunta (C, D) après deux semaine d'incubation sur milieux(H3) (Gonflement et verdissement des explants et début de formation de cals blancs)

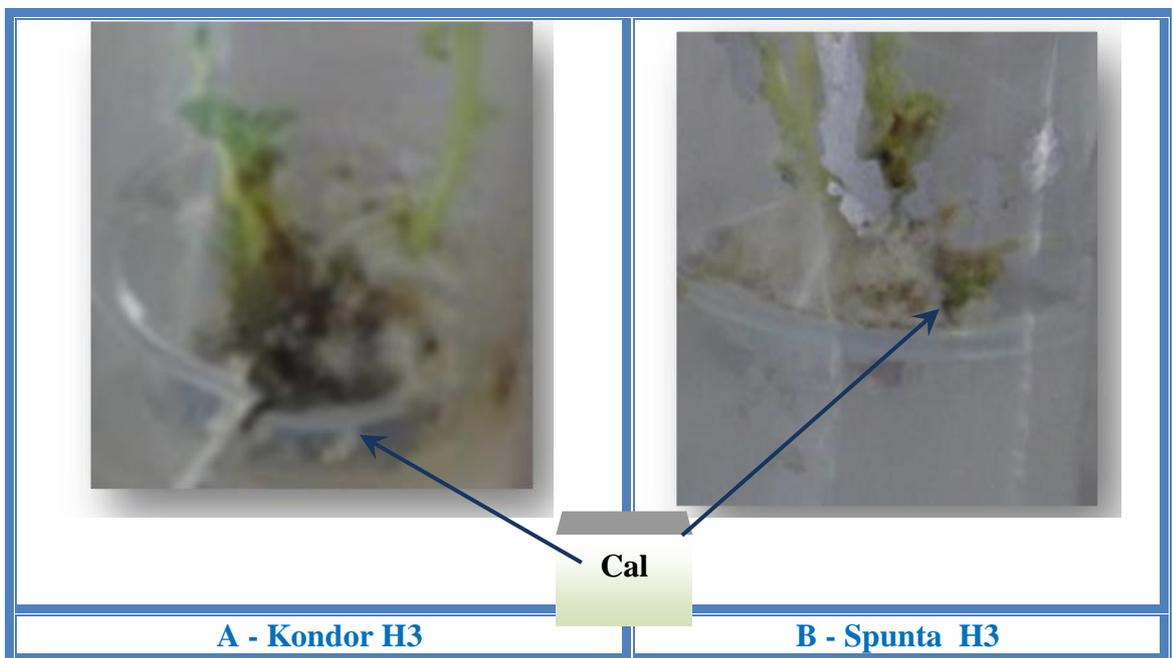


Figure 20 : Influence des différents milieux (MS+ 2,4-D et 2,4-D/BAP) sur la callogenèse des germes après deux semaines et deux mois de culture. Les cales de Kondor et Spunta (A ,B) après deux mois d'incubation sur les milieux (H3), Les cals prennent des couleurs vert, vert clairs et brun, ainsi formation de bourgeons sur les explants de germes et émission de racine.

2.1.2 Conclusion

Notre premier objectif, dans ce travail, était de maîtriser les différentes étapes de la callogenèse pour deux variétés de pomme de terre en présence de 2,4-D seul et en combinaison avec BAP, nous avons opté dès le départ pour les bourgeons comme explant initial. Des d'explants de germes appartenant à Spunta et Kondor ont ainsi été ensemencés sur différents milieux de culture afin de déterminer les conditions de culture optimales pour l'obtention de cals. A part le génotype, deux autres facteurs se sont montrés déterminants. Il s'agit tout d'abord du type d'auxine, le 2,4-D est le plus efficace pour favoriser l'induction des cals. Le résultat optimal au niveau de l'induction de cals a donc été obtenu pour les variétés Kondor sur un milieu comprenant 1 mg/l de 2,4-D et ainsi que pour le poids frais sur le milieu 4 (0,5/1mg/l de 2,4-D/BAP).

III.2. 2 Essai 2 : Etude de la réponse à la callogenèse en présence de concentrations différentes de l'hormone (2,4-D) à l'obscurité

2. 2 .1 Description des phases du développement des cals

2. 2 .1. A-Milieu 1 : Après 5 jours de mise en culture (Figure 21A), un tissu blanc commence à apparaître sur certains explants de la variété Spunta *et* Kondor. Les autres explants qui se sont développés chez la même variété correspondent à des germes qui ont donnés des racines uniquement. Au bout de 9 jours, on remarque une augmentation dans le nombre de cals chez la variété Spunta. Ceci s'explique par le développement tardif des explants qui étaient sans développement et dont certains ont développés des racines. D'autres germes ont donnés chez la même variété des racines uniquement. Chez la variété Kondor, le nombre de cals a diminué à cause des contaminations et les explants qui se sont développés ont tous donnés des cals uniquement. Après un mois jours de développement, le nombre de cals a baissé chez la variété Spunta à cause des contaminations, Au bout de deux mois (figure 21 D), les cals ont une apparence compacte et une couleur jaune pâle chez Spunta, et Kondor.

Tableau 27: Description de la texture et la couleur après une semaine et deux mois d'incubation de Spunta et Kondor sur les différents milieux (MS+2,4-D et 2,4-D/BAP).

Concentration des hormones mg/l			Texture et couleur des cals après une semaine		Texture et couleur des cals après deux mois	
			Spunta	Kondor	Spunta	Kondor
H1	2,4-D	0.5	Blanc-friable	Blanc-friable	Blanc et Jaune-pale	Blanc et Jaune-pale
H 2	2,4-D	1	Blanc-friable	Blanc-friable	Blanc et Jaune - pale	Blanc et Jaune-pale
H 3	2,4-D	2	Blanc-friable	Blanc-friable	Blanc et Jaune- pale	Blanc et Jaune-pale

2. 2 .1.B Milieu 2

Après 7 jours de mise en culture, un certain nombre, de la variété Kondor, évoluent en cals qui apparaissent sous la forme de tissus blancs sur les germes. Les autres explants de la même variété ont développés des racines uniquement.

Au bout de 30 jours, le nombre de cals augmente respectivement chez la variété Kondor et Spunta. Une partie des explants de la variété Spunta qui ont développés des racines ont donné des cals. Et enfin une dernière partie correspondant uniquement à la formation de racines bien développés.

Après deux mois de mise en culture, les cals sont de couleur jaune pâle et ont une structure compacte pour la majorité des milieux. Chez la variété Kondor, tous les explants développés ont donné des cals sauf deux pour lesquels il y a eu formation de racines uniquement. Les cals sont blancs et peu charnu.

Tableau 38: poids frais moyen des cals des différents milieux, % et temps callogenèse sur milieu (MS+2,4D).

Hormones mg/l		Taux de callogenèse (%)		Jours à la callogenèse	
		Spunta	Kondor	Spunta	Kondor
H1	MS+(0.5) 2,4-D	18.51	05.00	Trois à cinq jours	
H2	MS+(1) 2,4-D	71.42	66.66		
H3	MS+(2) 2,4-D	66.66	28.57		
Statistiques	Moyenne	52.19	33.41		
	Ecart-type	29.27	31.11		

2. 2 .1. C Milieu 03

Au bout de 10 jours, tous les explants qui se sont développés ont donnés des cals qui apparaissent sous la forme de tissus blancs sur les germes des deux variétés. Aucun développement de racines n'a été observé pendant cette durée, et ce pour les deux variétés

Au bout de 38 jours de développement, un grand nombre de cals obtenus de la variété Spunta n'ont pas développés des racines et des tiges. Pour le reste de cals, les racines sont relativement petites et il y a peu de cals qui ont développés des tiges.

Chez la variété Kondor, la majorité des cals formés ont donnés des racines peu développés et des tiges moyennes. Tous les cals (Spunta et Kondor) ont une consistance compacte pour la plupart et sont tous de couleur blanche. Chez Spunta sont jaunes pâles, pour la variété Kondor, les cals sont toujours blanc.

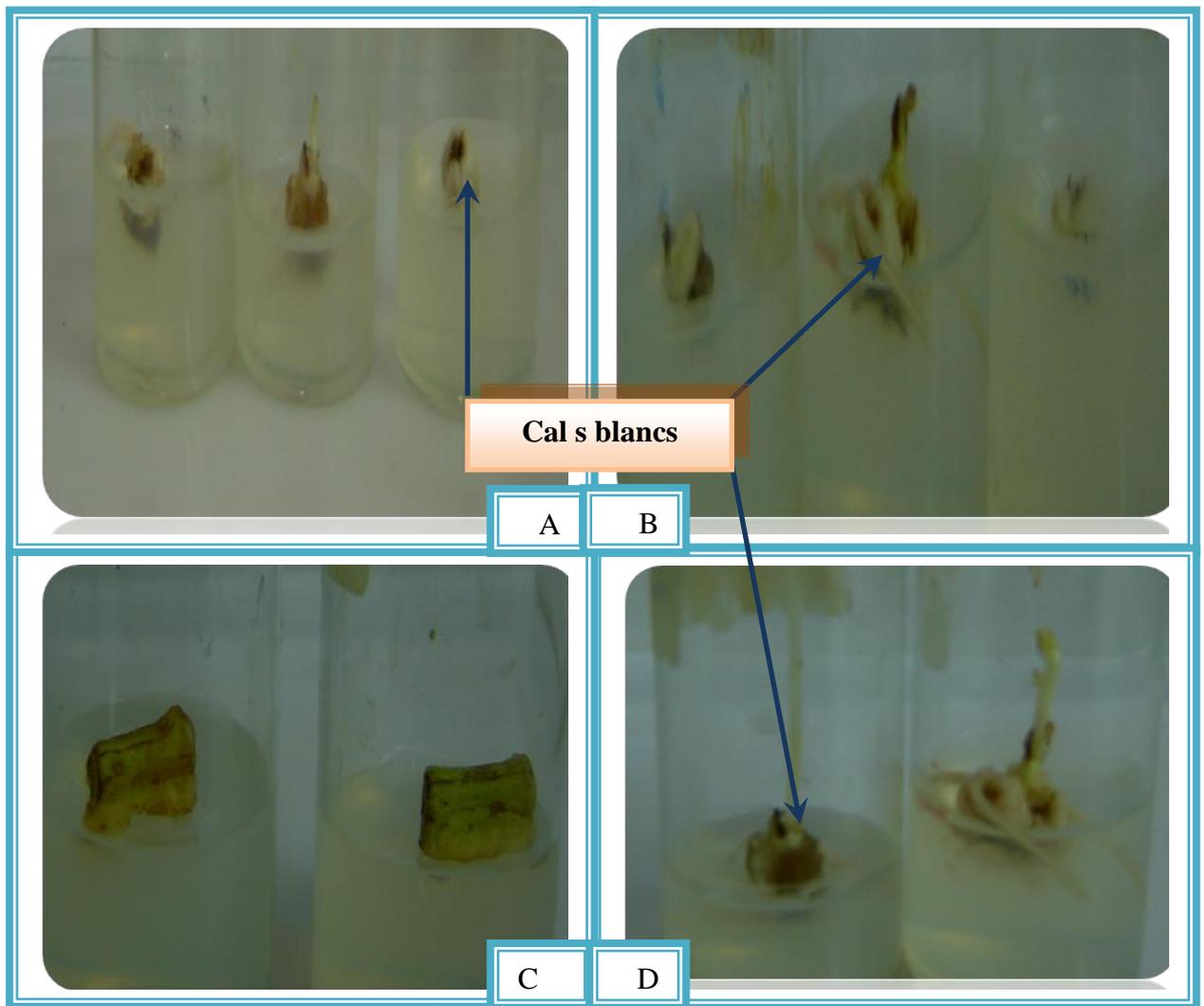


Figure 21: Callogénèse à l'obscurité de deux variétés de pomme de terre (Spunta et Kondor) en présence de 2,4-D.

A : Cals blancs friables sur les germes obtenu après une semaine d'incubation avec Spunta sur milieu M3 (2mg/l). **B:** Cals blancs friable sur les germes obtenu après 20 jours d'incubation avec Kondor sur milieu M3(2mg/l). **C:** Cals obtenu sur les entre neuds après 20 jours d'incubation sur milieu M3(2mg/l). **D:** Cals jaunes pales compact sur les germes obtenu après deux mois d'incubation avec Kondor et Spunta sur milieu M3 (2mg/l), avec développement de tige jaunes pales et blancs et peu de racines.

Le poids frais des cals

Le poids frais moyen des cals estimé après 52 jours de culture dans les milieux 1, 2, et 3 pour les variétés Spunta et Kondor est respectivement représenté dans le tableau 31, figure 21.

Après 52 jours de culture, on a enregistré pour les cals qui ont évolués dans le milieu 2 le plus grand poids frais moyen (0,4 g) chez la variété Spunta. Chez la variété Kondor, ce sont

les cals cultivés dans le milieu 3 qui enregistrent le poids frais moyen le plus élevé (0,27g). A ce niveau de culture ce sont les cals de la variété Spunta qui présentent le poids frais le plus élevé dans les trois milieux avec une moyenne de 0,34 g par rapport aux cals de la variété Kondor présentant une moyenne qui s'évalue seulement à 0,20 g (Figure 23). Cette différence entre les deux variétés montre que le génotype est un facteur limitant qui influence la croissance des cals. Ceci est conforme à des résultats trouvés par plusieurs auteurs chez d'autres espèces végétales (la canne à sucre, le riz, le blé dur, le blé tendre) ou l'effet considérable du génotype sur la capacité de croissance des cals a été observé (Gandonou et *al.*, 2005).

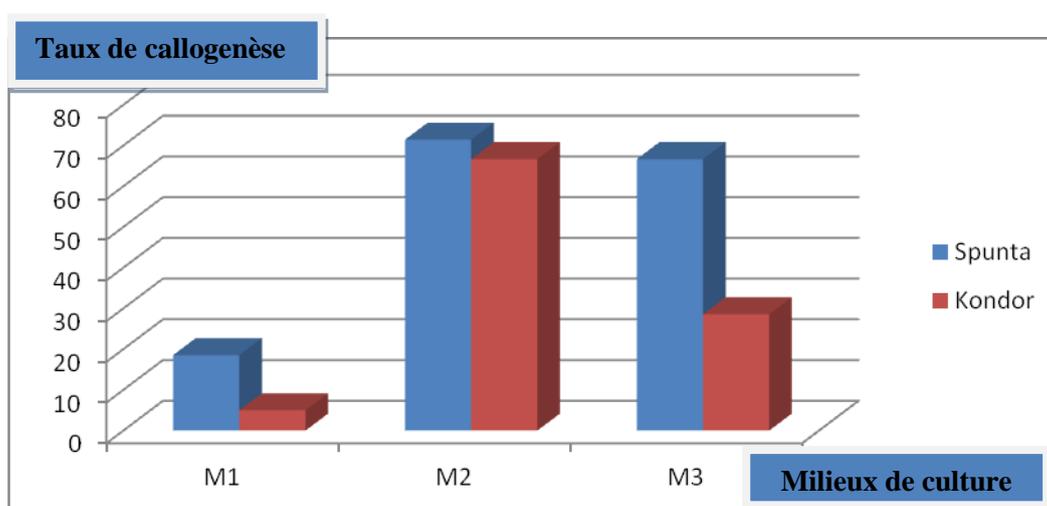


Figure 22: Variation du taux de callogenèse après trois mois d'incubation sur les milieux 2,4-D/BAP pour Spunta et Kondor

Tableau 29: poids frais moyen des cals obtenus dans les milieux M1, M2 et M3 à l'obscurité.

Poids frais moyen (g)	Spunta	Kondor
0.5 mg/l	0.35	0.14
1 mg/l	0.40	0.20
2 mg/l	0.27	0.27
Moyenne	0.34	0.20
Ecart-type	0.065	0.065

Le 2,4-D additionné au milieu MS en différentes concentrations a montré certaines variations dans l'induction de la callogenèse sur les germes des deux variétés de pomme de terre. Chez la pomme de terre, les explants des deux variétés requièrent peu de temps (5 jours) pour l'initiation de la callogenèse dans le milieu 1 par rapport aux explants cultivés dans le milieu 2 et 3 qui nécessitent un peu plus de temps (7 et 12 jours dans le milieu 2 et 10 jours dans le milieu 3) pour le début de la callogenèse.

Le temps d'induction de cals à partir des entre-nœuds de tiges de pomme de terre est beaucoup plus lent (15 jours) dans une concentration plus élevée de 2,4-D (4 mg) (Vargas et *al.*, 2005) . Au début de leurs formations, tous les cals apparaissent sous la forme de tissus blancs sur les germes des deux variétés quelque soit le milieu. Dans le milieu 1, chez la variété Kondor, l'initiation des cals se manifeste par l'apparition de points blancs qui formeront un tissu blanc par la suite.

Chaudary et *al.* (2001) ont montrés dans leurs travaux sur la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) que le taux d'induction le plus faible est retrouvé en utilisant les concentrations 0,5 mg/l et 1 mg/l de 2,4-D.

A la fin du développement, la majorité des cals obtenues dans le milieu 1 et 2, des deux variétés (sauf Kondor dans le milieu 1), portent des racines et des tiges. Les racines sont très développées dans le milieu 2 pour les deux variétés et moins développées dans le milieu 1. Les tiges sont moyennes dans les deux milieux. Dans le milieu 3, les cals ont développés des racines relativement petites et des tiges moyennes et grandes chez les deux variétés.

Une plantule qui se développe à l'obscurité est étiolée : dépourvue de chlorophylle, ses feuilles sont petites et sa tigelle longue et mince avec des entrenœuds très allongés. Ce type de morphogénèse est appelé skotomorphogénèse. (Park et *al.*, 1995).

Dans le milieu 3, les calus les racines développées étaient les tiges relativement petites et moyennes et grandes dans deux variétés. Le calus produit dans l'obscurité était au commencement jaunâtre en couleurs par rapport à la lumière où le calus verdâtre a été formé, Humera (2006) a étudié la callogenèse chez la pomme de terre pour Deseree et Diamant et a constaté que le cal produit dans l'obscurité était jaunâtre en couleurs par rapport à la lumière où des cal verdâtre ont été formé.

Quelque soit le milieu, la nature des cals formés varie selon la variété. Chez la variété Spunta, tous les cals ont une consistance compacte pour la majorité et une couleur blanchâtre à jaune pâle. Les cals de la variété Kondor ont une consistance compacte pour la plupart et

une couleur blanche à brunâtre (milieu 1). Ainsi, les cals sont induits à toutes les concentrations testés de 2,4-D (0,5 mg – 1 mg/l et 2 mg/l) sur les variétés Spunta et Kondor, Ayolié et *al.* (2007) ont obtenus chez le blé dur un meilleur taux de callogenèse à 3,5 et 4 mg/l de 2,4-D. Dans d'autres travaux réalisés par d'autres auteurs, des cals ont été obtenus à des concentrations plus faibles de 2,4-D (1 mg/l chez le Blé tendre; 1,5 ou 2 mg/l chez le Blé dur) ou beaucoup plus élevées (6 et 8 mg/l).

D'autres auteurs (Rahman et *al.*, 2004) ont obtenus chez le Galanga camphré (*Kaempferia galanga* L.) le taux d'induction de cal le plus élevé dans le milieu MS supplémenté de la combinaison hormonale suivante: 1,5 mg/l 2, 4-D et 1 mg/l BA.

Quelque soit le milieu, la nature des cals formés varie selon la variété. Chez la variété *Spunta*, tous les cals ont une consistance compacte pour la majorité et une couleur blanchâtre à jaune pâle. Les cals de la variété *Kondor* ont une consistance compacte pour la plupart et une couleur blanche à brunâtre (milieu 1).

Dans d'autres travaux réalisés par d'autres auteurs, des cals ont été obtenus à des concentrations plus faibles de 2,4-D (1 mg/l chez le Blé tendre; 1,5 ou 2 mg/l chez le Blé dur) ou beaucoup plus élevées (6 et 8 mg/l).

D'autres auteurs (Rahman et *al.*, 2004) ont obtenus chez le Galanga camphré (*Kaempferia galanga* L.) le taux d'induction de cal le plus élevé dans le milieu MS supplémenté de la combinaison hormonale suivante: 1,5 mg/l 2, 4-D et 1 mg/l BA.

Pour le poids frais est très influencé par le génotype, Gandonou et *al.*(2005) ont trouvé des résultats conforme avec d'autre espèces (la canne à sucre, blé dur et blé tendre).

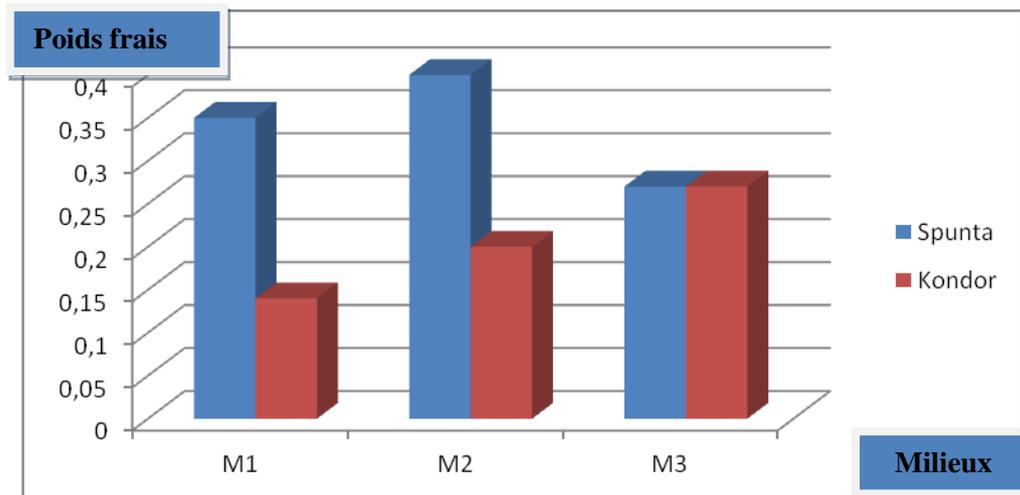


Figure 23: Variation du Poids frais après trois mois d'incubation sur les milieux 2,4-D/BAP pour Spunta et Kondor.

2.2.2 Conclusion

Le cal varie en fonction des concentrations de 2,4-D présents dans l'environnement, toutes les concentrations testées (0.5, 1 et 2 mg/l induit la formation de cal, cependant, avec quelques différences. En effet, les explants développés dans le milieu 1 (avec 0,5 mg/l de 2,4-D) ont été précocement en comparaison à ceux développés dans l'autre fois les moyens, qu'ils ont une réaction plus lente. Le cal dépend aussi du génotype, parce que la nature et croissance des cals obtenus varie selon la variété, les cals de Spunta sont compacts et ont une couleur jaune pâle à blanchâtre, pour Kondor ils sont compacts et ont une couleur blanche à brunâtre. Les plantes qui tolèrent l'ombrage axent leur stratégie sur la conservation et l'utilisation des ressources. Elles ont généralement une croissance faible. Elles présentent à l'ombrage des modifications au niveau foliaire qui tendent à optimiser l'assimilation photosynthétique du carbone.

III.3 Partie 3 : Influence hormonale sur l'induction d'embryon somatique

3.1 Essai 1: Etude de la réponse à l'embryon somatique en présence du rapports auxine /cytokinine (NAA/-BAP) différents à la lumière

L'incubation des explants de germes et de tiges des deux variétés Spunta et Kondor dans le milieu de callogenèse (NAA-BAP= M1 à M6) donne au préalable de petits cals blanchâtres apparaissent au niveau des sections des explants après trois à cinq jours, ces cals prolifèrent et envahissent le centre des explants. Après trois semaines de culture, les cals sont d'apparence humide, molle et friable de couleurs vert et vert blanchâtre et blanc, la croissance meilleure des cals a été enregistrée pour la variété Spunta pour tous les milieux étudiés.

Après deux mois d'incubation les cals des différents explants développent avec tous les milieux (1-2) bourgeons et des racines denses surtout avec Spunta sur les milieux M2, M4 et M5, dépassant trois mois d'incubation les cals sont plus volumineux et commencent à brunir et perd la couleur verte après dégradation de la chlorophylle, par contre les tiges à partir des bourgeons développés ont devenu plus long avec beaucoup de feuilles (Figure 24).

Le taux de callogenèse varie de (30-50 %) pour Spunta avec les milieux (M2, M6-M2), et varie de (20-80 %) pour Kondor avec les milieux (M6 - M4, M5), le développement des racines est plus important sur le milieu M5 avec Spunta et M4, M5 avec Kondor (Tableau 32, Figure 25).

Tableau 30: couleur et croissance des cals après 15 puis trois mois d'incubation sur les milieux embryogènes (NAA/BAP).

Couleur et degré de développement des cals après trois semaines				Couleur et degré redéveloppement des cals après trois mois		
	Couleurs		Degré de développement		Couleurs	Degré de développement
	K	S	S	K	K	S
M1	Vert blanchâtre		+++	++	- Allongement de tiges feuillées - Brunissement et nécrose des cals volumineux	
M2	vert blanchâtre		+++	++		
M3	vert blanchâtre		+++	++		
M4	Blanc		+++	++		
M5	Blanc		+++	++		
M6	vert blanchâtre		+++	++		

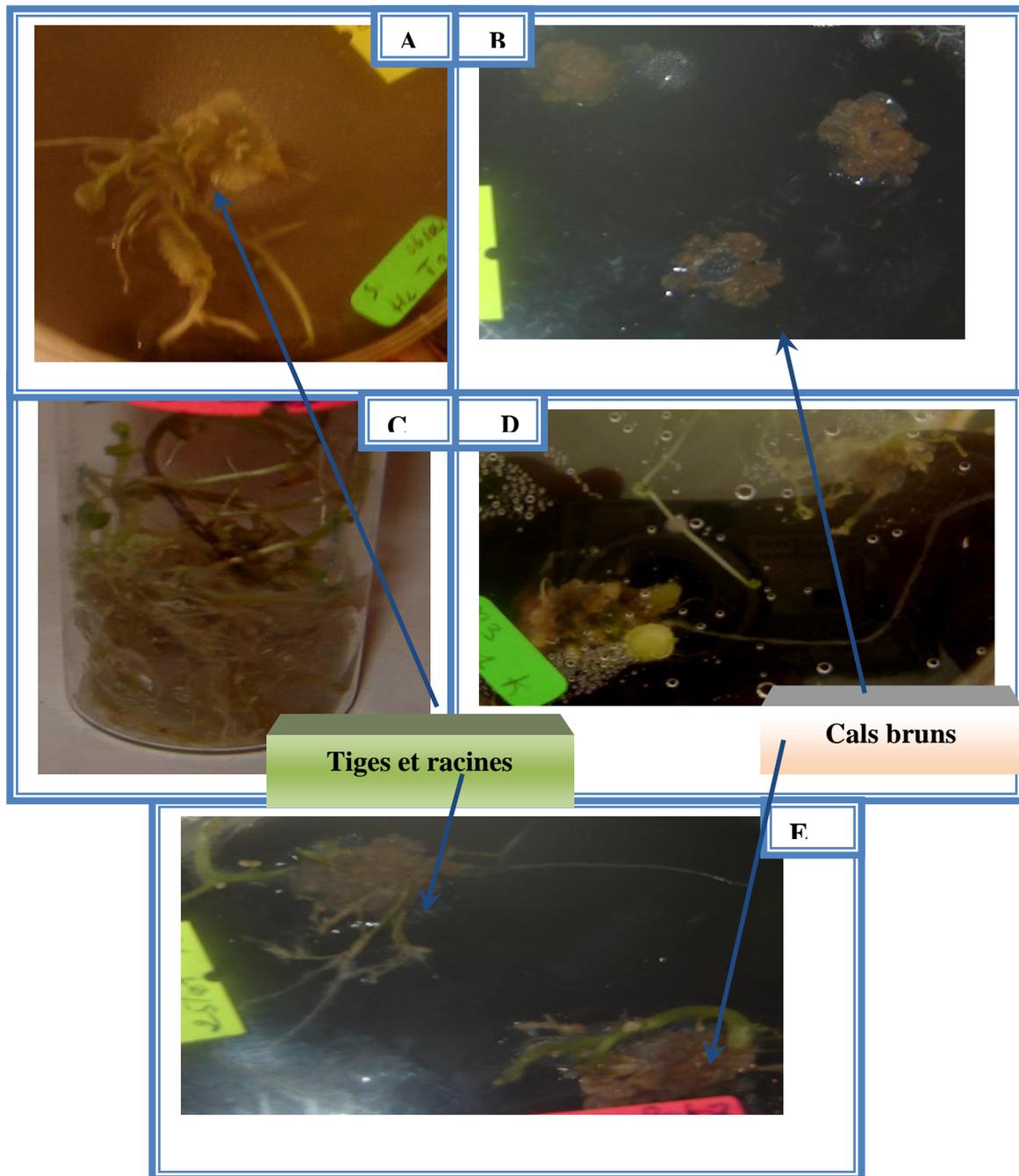


Figure 24: développement des cals obtenu avec NAA/BAP sur milieu embryogène après trois

mois d'incubation: **A** : Cals bruns deux bourgeons avec des racines de Spunta sur milieu embryogène M1(0.5/1 mg/l de NAA / BAP) des cals obtenu après trois mois d'incubation **B**: Cals bruns avec des racines avec un à bourgeons de Spunta sur milieu embryogène M2(1/0,5 mg/l de NAA/ BAP) après trois mois d'incubation sur le même milieu .**C** : Cals bruns sans racines et sans bourgeons de Kondor sur milieu embryogène M5 (1mg/l de NAA) après trois mois d'incubation sur le même milieu. **D** :Cals brun avec un bourgeon avec racines pour Kondor sur milieu embryogèneM1 (0.5/1 mg/l de NAA /BAP) après trois mois d'incubation sur le même milieu. **E** :Cals brun de Kondor avec un à deux bourgeons avec racines après trois mois d'incubation sur le même milieu embryogène M3 (2/2 mg/l de BAP/NAA).

Tableau 31: Nombres de bourgeons et racines et taux de callogenèse après trois mois d'incubation sur les milieu embryogènes (NAA/BAP).

Milieux de culture	Nombres de bourgeons et racines après trois mois				Taux de callogenèse après trois mois	
	Spunta		Kondor		Spunta	Kondor
	bourgeon	Racines	bourgeon	Racines		
M1	1	++	1	+	40	50
M2	1	++	1	+	50	30
M3	1	++	2	+	30	30
M4	1	++	1	+++	40	80
M5	1	+++	1	++	40	80
M6	1	++	1	+	30	20
Moyenne					38.33	48.33
Ecart-type					7.52	26.39
P= 0.39312275, ANOVA non significative						

3.2 Essai 2 : Etude de la réponse à l'embryonèse somatique en présence de rapports auxine /cytokinine (2,4-D/BAP) différents à la lumière

A l'instar des milieux (NAA-BAP= **M1 à M6**) l'incubation des explants de germes et de tiges des deux variétés Spunta et Kondor dans le milieu de callogenèse (2,4-D-BAP= **M1 à M6**) donne au préalable de petits cals blanchâtres apparaissent au niveau des sections des explants après trois à cinq jours ,après un mois d'incubation les cals sont de couleur vert, vert-clair et brun pour les deux explant avec tous les milieux, le taux de callogenèse varie de (40-60%) pour Spunta avec les milieux (H1,H4-H3,H7) et de (20-80%) pour Kondor avec les milieux (H1-H4,H5), la meilleur croissance des cals pour Spunta était enregistré avec les milieux H2 et H5 et pour Kondor avec les milieux (H3,H4 et H5), le nombre de bourgeons développés sur les cals varie de 1 pour les milieux (H1,H3,H4 et H6) à 2 pour le milieu H3 et H7 avec Spunta et H3 avec Kondor, le développement le plus marqué des racines était noté avec les milieux (H2,H5 et H7) pour Spunta et (H3,H5) pur Kondor (Tableau 32, Figure 27)

L'incubation des cals obtenu des milieux H1, H2, H3 dans le milieu embryogène (0,2/1mg/l) (2,4D/BAP) montre qu'après 4 jours de leur transfert sur le milieu 7, les cals qui ont évolués dans les milieux 2 et 3 des deux variétés Spunta et Kondor sont devenus verts clair. On a observé 20 à 25 jours après le transfert sur le milieu 7, sur le plan morphologique, à l'œil nu, des cals de couleur verte claire, qui ont augmenté de taille (cals volumineux) et présentant un aspect rugueux correspondant à des cals embryogènes et ceci pour les deux variétés. Après deux mois d'incubations les cals développent des bourgeons qui donnent des

tiges et des raines avec un allongement important puis commençait à brunir à la fin d'incubation (Figure 24). Selon Ashrafi et al. (2010) l'un des problèmes de la culture du cal est le brunissement des explants surtout pendant les deux premières semaines de culture. Ce processus est le résultat de production et oxydation de composés phénoliques par les explants.

Tableau 32: caractéristiques des cals après trois mois d'incubation dans les milieux embryogènes (NAA/BAP).

Milieux (mg/l)			Texture et couleur et degré de développement des cals après un mois				Texture et couleur et degré de développement des Cals après trois mois	
			Spunta		Kondor		Spunta	Kondor
			Couleur	Degree de delopp		Degree de delopp		
H1	2,4-D	0.5	Vert-Clair	+	Vert	++	- Allongement de tiges feuillées - Brunissement et nécrose des cals volumineux	
H 2	2,4-D	1	Vert-Clair	++	Vert-Clair	+		
H 3	2,4-D	2	Vert-Clair	+	vert-clair	+++		
H 4	2,4-D BAP	1 0.5	Brun	+	Vert-clair	++		
H 5	2,4-D BAP	0.5 1	Brun	++	Vert-clair	++		
H 6	2,4-D BAP	2 2	Brun	+	vert-clair	+		
H7	2,4-D BAP	1 0.2	Vert- clair	++	Vert-clair	++		

Tableau 33 : Notation du nombre de bourgeons et de racines et taux de callogenèse après trois mois d'incubation sur les milieux embryogènes (MS+2,4-D et 2,4-D/BAP).

Milieux	Nombres de bourgeons et racines après trois mois				Taux de succès cals après trois mois	
	Spunta		Kondor		Spunta	Kondor
	bourgeon	Racines	Bourgeon	Racines		
H1	1	+	1	+	40	20
H 2	1	++	1	++	50	30
H 3	1	+	1-2 Microtub	+++	60	50
H 4	1	+	1	++	40	80
H 5	1	++	1	+++		80
H 6	1	+	1	++	30	20
H7	1-2	+	1	+	60	20
Moyenne					45.71	42.85
Ecart-type					11.33	27.51
P= 0.80379532 , ANOVA non significative						

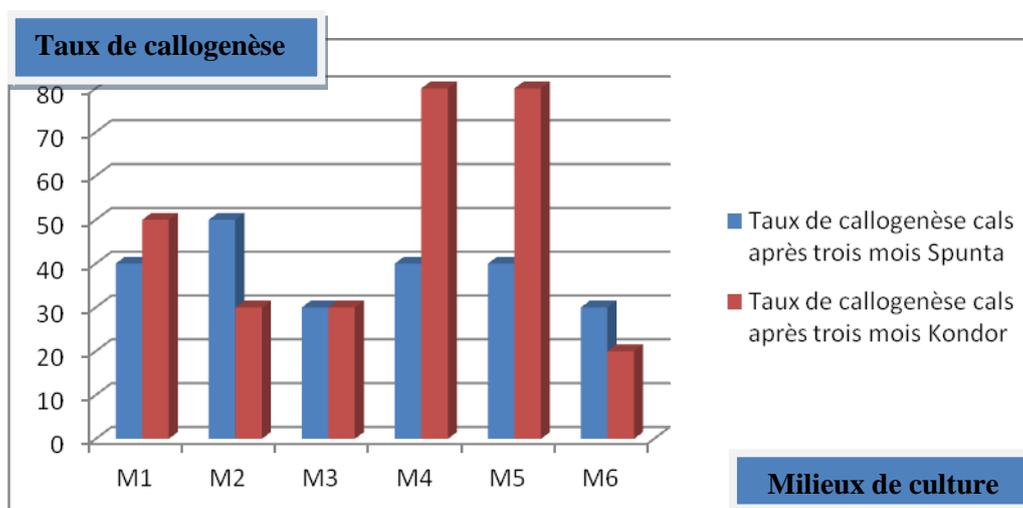


Figure 25: Variation du taux de callogenèse après trois mois d'incubation sur les milieux NAA/BAP pour Spunta et Kondor

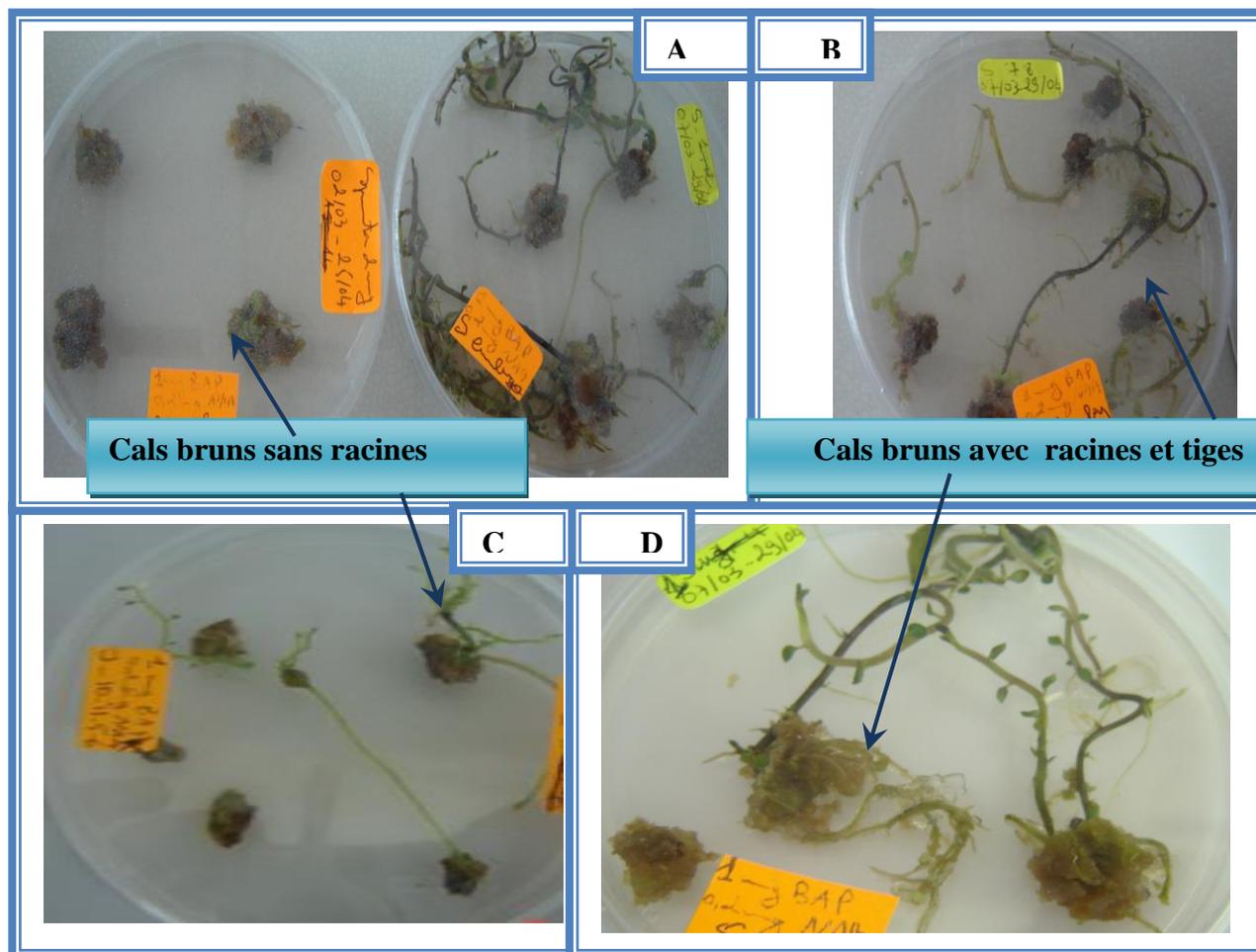


Figure 26: développement des cals obtenu avec 2,4-D sur milieu embryogène après trois mois d'incubation

A : Cals bruns sans bourgeons sans racines de Spunta sur milieu embryogène (1/0,2 mg/l de BAP/NAA) des cals obtenu de (H3, 2mg/l 2,4-D) après trois mois d'incubation.**B :** Cals bruns avec des racines avec un à deux bourgeons de Spunta sur milieu embryogène (1/0,2 mg/l de BAP/NAA) obtenu de (H3, 2mg/l 2,4-D) après trois mois d'incubation.**C :** Cals bruns avec et sans racines avec un à deux bourgeons de Spunta sur milieu embryogène (1/0,2 mg/l de BAP/NAA) obtenu de (H3, 2mg/l 2,4-D) après trois mois d'incubation **D:** Cals brun avec un bourgeon sans racines avec formation de microtubercules pour Kondor sur milieu embryogène (1/0,2 mg/l de BAP/NAA) des cals obtenu de (H3, 2mg/l 2,4-D) après trois mois d'incubation.

L'embryogenèse somatique donc consister à remplacer le schéma existant d'expression des gènes dans le tissu d'explant pour un nouveau programme d'expression génique embryogène (Chugh et Khurana, 2002; Zeng et *al.*, 2007 in Zavattieri, 2010). Ceci n'est possible que si les cellules sont à la fois compétentes et reçoivent les inducteurs appropriés. L'embryogenèse somatique est régie par plusieurs facteurs, y compris les phytohormones, les protéines, les facteurs de transcription et ainsi que des substances apparentées à différents

stades de développement (Joshi et Kumar, 2013). Les facteurs affectant l'embryogenèse somatique varient d'une espèce à l'autre, Chez *Arabidopsis*, un membre de la famille de la moutarde, le stress était le facteur le plus important pour contrôler l'induction des embryons somatiques. Les ions osmotiques, les ions de métaux lourds et les contraintes de déshydratation ont induit la formation d'embryons somatiques (Ikeda-Iwai et *al.*, 2003).

Selon (Kikuchi et *al.*, 2006), le stress est un facteur important pour l'induction de l'embryogenèse somatique, des études sur l'embryogenèse de la carotte ont suggéré que l'acide abscissique (ABA) est impliqué dans l'embryogenèse somatique. Une relation entre l'ABA endogène et l'induction de l'embryogenèse somatique a été démontrée en utilisant un système d'embryons somatiques induit par le stress. Les gènes embryonnaires spécifiques C-ABI3 et les protéines cellulaires embryogéniques (PCE) ont été exprimés pendant le traitement de stress avant la formation d'embryons somatiques. Le système d'induction du stress pour l'embryogenèse s'est clairement distingué par deux phases: l'acquisition de la compétence embryogène et la formation d'un embryon somatique

L'embryogenèse somatique chez la carotte qui est une plante modèle pour l'embryogenèse somatique est un processus en deux étapes. Les cellules de carotte se développent tout d'abord en un tissu de cals dans le milieu contenant l'auxine, à savoir 2, 4-D (0,5-1 mg/l). et quand un tel tissu de cals est transféré sur le même milieu avec un très faible niveau d'auxine ou pas d'auxine, les embryoïdes sont formés. Si le tissu de cals est maintenu en continu dans le milieu contenant 2, 4-D, les embryoïdes ne se formeraient pas (Nissen et Minocha, 1993).

La formation des tiges et des racines sur les cals dépend du pouvoir morphogénique de ces cal, influencé par des concentrations élevées des combinaisons auxine-cytokinine ceci est confirmé par Branka et Marija (2001) qui montrent que le tissu de cals cultivés sur des milieux contenant 1,0, 2,5 et 5,0 pM de 2,4-D et 1,0, 5,0 et 25,0 pM kinétine prolifèrent mieux que les cals cultivés sur des milieux contenant de plus faibles concentrations de 2,4-D (0,02, 0,05 et 24:01) et kinétine (0,02, 0,1 et 12 :05), l'absence de 2,4-D ou les faibles concentrations de cette auxine réduisent la prolifération et diminuent le poids frais des cals.

En revanche, Jayanthi et *al.* (2001) ont montré que chez *Tylophora indica*, le 2,4-D utilisé seul inhibe la formation des embryons somatiques sur cals, mais lorsqu'il est associé à la BAP ou à la kinétine (0,5 à 3 mg l⁻¹), on obtient jusqu'à 70 % de cals qui forment les embryons avec en moyenne 61 ± 3 embryons par cal.

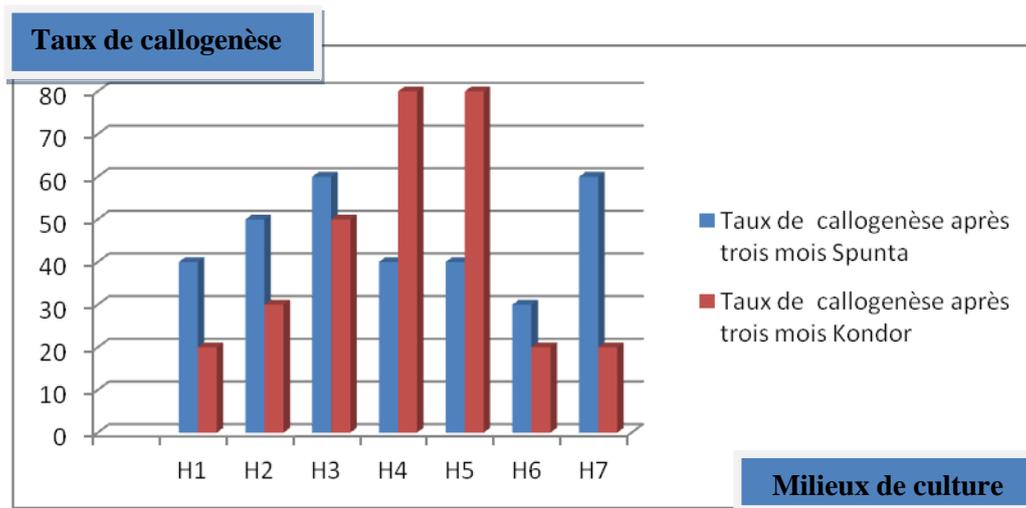


Figure27 : Variation du taux de callogenèse après trois mois d'incubation sur les milieux 2,4-D/BAP pour Spunta et Kondor.

Conformément aux résultats de Hong et Debergh (1995) et Castillo et *al.* (1998), dans le même temps, le 2,4-D a un effet inhibiteur sur la régénération des pousses (Dunstan et Short 1978, Philips et Luteyn, 1983, Shahin et Kaneko, 1986, Silvertand et *al.*, 1996), probablement en raison de l'abaissement du niveau de la cytokinine. La diminution du niveau de cytokine par auxines peut se produire soit par inhibition de la biosynthèse de la cytokinine ou par la promotion de la cytokinine inactivation métabolique. La présence de 2,4D inhibe la différenciation des nodules embryonnaire en embryon somatique, l'effet inhibiteur de l'auxine peut être surmonté par l'addition de la kinétine (Kami'nek et *al.*, 1997). In (Branka et Marija 2001). Selon Nissen et Minocha (1993) le 2,4-D inhibe l'embryogenèse somatique en stimulant la production d'éthylène qui à son tour supprime l'embryogenèse.

Les auxines représentent un facteur important dans l'induction de l'embryogenèse somatique, Parmi ceux-ci, le 2, 4-D est l'un des régulateurs de croissance les plus couramment utilisés pour des cals embryogènes dans les céréales à des concentrations Entre 0,1 et 10 uM (Meneses et *al.*, 2005 ; Dalilhia et *al.*, 2015). Les plus des monocotylédones tolèrent des doses élevées de l'auxine comme le 2,4-D et ne montrent aucun symptôme de toxicité et mutagénicité (Pedrosa et Vasil, 1996).

3.3 Conclusion

L'embryogenèse somatique est un processus de développement remarquable, les cellules végétales non zygotes, y compris les cellules haploïdes, peut former des embryons et, finalement, une plantes fertiles. Ce processus asexué implique une expression de totipotence, la dédifférenciation d'une cellule nonzygotique et une redifférenciation subséquente.

Il est influencé par plusieurs facteurs à savoir les régulateurs de croissance le génotype et le stress (osmotique, ou les ions).

Dans notre essai l'obtention d'embryon somatique été une étape délicate à cause de la difficulté d'induire d'embryon somatique en variant uniquement la concentration des hormones (NAA et 2,4-D en combinaison avec le BAP).

On a commencé essayé d'effectué une embryogenèse somatique indirect en passant par une phase de calogénèse à partir des concentrations différentes de NAA et 2,4-D seul et en combinaison avec le BAP, les résultats obtenu montrent que la calogénèse commence toujours après 3-5 jours pour les différentes concentrations testées , le cal formé est de couleur blanche et de structure friable .Après trois mois d'incubation les cals sont molle et friable de couleurs vert et vert blanchâtre et blanc avec la combinaison NAA/BAP, et de couleur de couleur vert, vert-clair et brun pour les deux explant avec tous les milieux avec la combinaison 2,4-D/BAP.

Avec (NAA/BAP) le taux de calogénèse varie de (30-50%) pour Spunta avec les milieux (M2, M6-M2), et varie de (20-80%) pour Kondor avec les milieux (M6 - M4, M5), le développement des racines est plus important sur le milieu M5 avec Spunta et M4, M5 avec Kondor.

Avec (2,4-D/BAP) le taux de calogénèse varie de (40-60%) pour Spunta avec les milieux (H1,H4-H3,H7) et de (20-80%) pour Kondor avec les milieux (H1-H4, H5), la meilleur croissance des cals pour Spunta était enregistré avec les milieux H2 et H5 et pour Kondor avec les milieux (H3,H4 et H5). Le nombre de bourgeons développés sur les cals varie de 1 pour les milieux (H1, H3, H4 et H6) à 2 pour le milieu H3 et H7 avec Spunta et H3 avec Kondor. On a enregistré après incubation continu sur le milieu embryogène (1/0,2 mg/l de BAP/NAA) des cals obtenu de (H3, 2 mg/l de 2,4-D) la formation de microtubercules, sur les explants de germes pour Kondor.

Dépassant trois d'incubation les cals sont plus volumineux et commencent à brunir et perdent la couleur verte après dégradation de la chlorophylle, par contre les tiges à partir des bourgeons développés ont devenu plus long avec beaucoup de feuilles.

III.4 Discussion générale

Dans cette étude, on a essayé de déterminer l'effet des régulateurs de croissance sur l'aptitude à la callogenèse et l'embryogenèse somatique à la lumière et à l'obscurité avec certaine concentration en auxine (NAA et 2,4-D) seul et en combinaison avec le BAP.

La callogenèse a commencé après trois à cinq jours pour tous les essais réalisés, avec une couleur blanche et une structure friable. Le déclenchement de la callogenèse varie selon la position de l'explant sur le milieu de culture (sur les surfaces des coupes, sur la base des explants. L'ajout d'auxines (2,4-D ou NAA) aussi bien seules que combinées semble produire un taux de cals variable d'un essai à l'autre.

Les résultats de nos expériences, nous ont révélé que la callogenèse dépendait de la concentration des hormones de croissance, influencé aussi par le génotype car la variété Spunta montre les meilleurs taux de callogenèse pour tous les essais pour certains concentrations hormonales, ce taux est variable selon la concentration des hormones utilisées, des taux élevés sont corrélés positivement avec la concentration des hormones (NAA ou 2,4-D) pour les deux variétés étudiés.

Tableau 34: Comparaison entre les différentes hormones sur la callogenèse

	NAA-BAP	BAP	2,4-D-BAP	Obscurité
Jours à la callogenèse	3-5 jours	0	3-5 jours	5 jours-7jours
Taux de callogenèse	60-90% pour Kondor et (60- 100%) pour Spunta		Le taux plus élevé de cals est de 100% avec Kondor	Avec NAA (20- 40% avec kondor et (10-30%) pour Spunta). 2,4-D (71.43 % pour Spunta et 77,78% pour kondor)
Couleurs des cals	jaune vert ou vert clair pour les deux variétés	0	vert, vert-clair et brun pour les deux variétés	jaune pale et brun
Texture des cals	Friable et compact	0	Friable et compact	Friable puis compact
Microtuberisation	1-0,5 et 0,5-1 mg/l	0	1-0,2 mg/l	1

On a noté par ailleurs, que la croissance des cals varie selon les conditions de culture à savoir la lumière et la température, les cals incubé à l'obscurité donnent des couleurs brun et une structure friable à compacte, tandis que les cals incubé à la lumière présentent des couleurs variable (vert, vert-clair et brun) qui sont due à l'action de la lumière sur les pigments photosynthétiques.

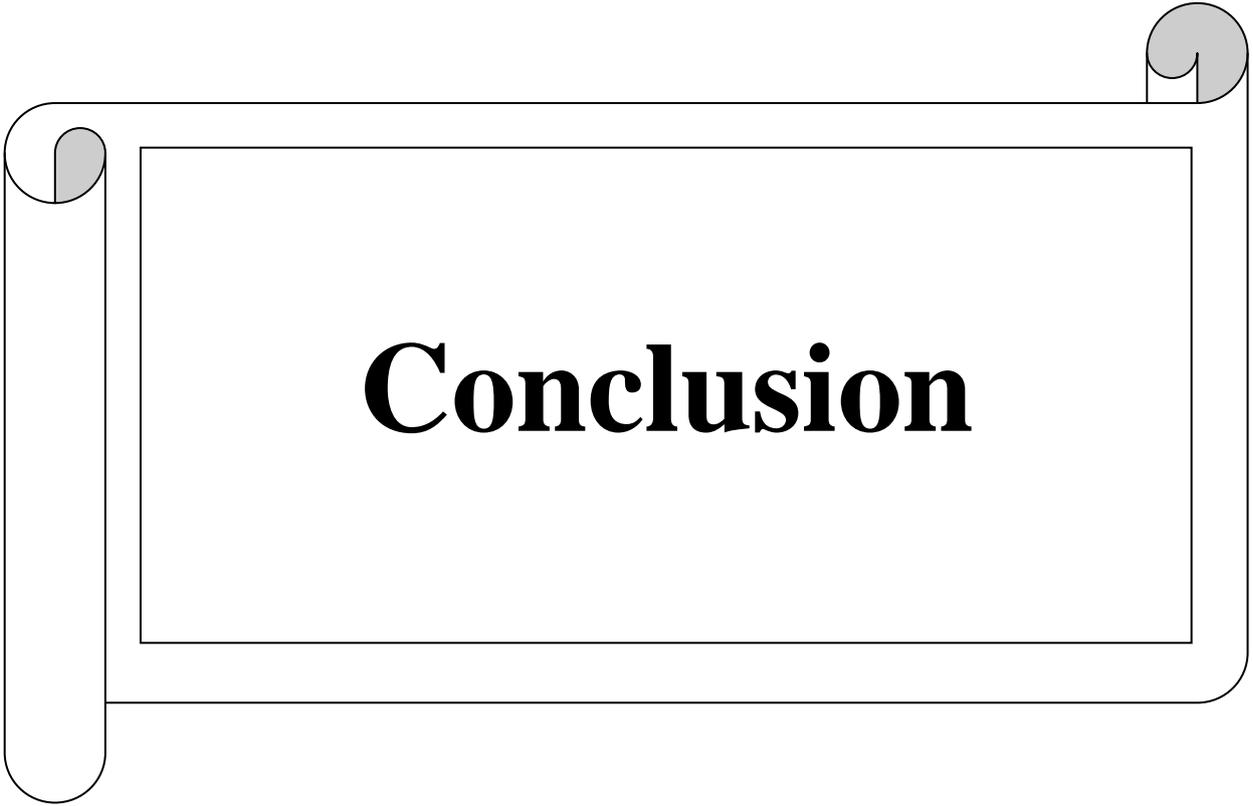
Un autre nouveau point considéré original a été soulevé dans cette étude, c'est le rôle des combinaisons auxine-cytokinine (NAA-BAP et 2,4-D-BAP) dans l'induction de microtubercules à partir des cals après une durée plus au moins longue d'incubation sur le même milieu 1-0,5 et 0,5-1 mg/l (NAA-BAP) et 1-0,2 mg/l (2,4-D-BAP).

Après deux moi de culture, les cals augmentent de volume et changent la couleur (vert, vert-clair, puis fini par le brunissement) , ainsi la structure devienne plus au moins compact surtout dans la lumière , par contre à l'obscurité les cals forment plusieurs racines blanches sur des cals volumineux . Nous avons montré que l'embryogenèse somatique passe indirectement par un stade cal avant d'arriver à l'embryon somatique ou à l'organogenèse (caulogenèse et rhisogenèse) , plusieurs milieux avec des hormones différents (une auxine-une cytokinine, une auxine-deux cytokinines, deux auxines une cytokinines ou deux auxines

et deux cytokinines et gibbérellines....) ont été utilisés par différents chercheurs sur des explants différents de pomme de terre à savoir (les disque de microtubercules, les feuilles et les tiges) , concernant la texture, elle commence toujours friable pour tous les rapports et dans tous les conditions et avec les deux hormones , puis après plus de deux mois d'incubation la structure devienne généralement compact(Tableau 34). Pour la différence entre les différents rapports (NAA/BAP et 2,4-D/BAP) les résultats obtenues montrent également que le degré de développement, le poids frais la couleur, et le taux de callogénèse sont corrélé positivement avec le rapport auxine/cytokinine, (c'est-à-dire des concentrations d'auxine supérieures à celle des cytokinine). D'autre part le rapport NAA/BAP semble relativement meilleur par rapport au rapport 2,4-D/BAP avec la variété Spunta pour certains paramètres comme le taux de callogénèse, le poids frais et le degré de développement et variable d'une variété à une autre, par contre pour les couleurs ils sont généralement bruns à vert clair selon les conditions d'incubation (lumière ou obscurité) pour tous les rapports et avec les deux hormones (Tableau 35).

Tableau 35 : Différences des réponses de la variété Spunta face aux rapports différents (NAA/BAP et 2,4-D/BAP)

Rapports		Degré de développement	Taux de callogénèse	Poids frais	Couleur
NAA/BAP	0,5	++ à +++	10-60	0.17-0,65	Vert,Vert- Claire
	1	+++ à +++	30-100	0.12-0.29	Vert-clair , vert-jaune
	2	+++ à ++++	20-100	0.16-0.93	Vert- Claire,vert-jaune
Avec 2,4-D/BAP	0,5	+	60	0.58	Brun , vert et Vert-Claire
	1	+	66	0.40	Brun à vert-claire
	2	++	86	0.66	Vert- Claire



Conclusion

Conclusion générale

Les résultats obtenus concluent que la callogenèse chez la pomme de terre est un phénomène complexe et variable selon les conditions de culture, le taux de callogenèse, le nombre de bourgeon et de racines et sont corrélés positivement avec la concentration des hormones (auxines). L'embryogenèse somatique, qui est une voie prometteuse chez la pomme de terre, a besoin d'être améliorée incessamment en apportant d'autres éléments originaux au milieu de culture, dans notre essai on pas détecté les fameuses étapes de l'embryogenèse (Globulaire, cordiformes ...). Notre premier objectif, dans ce travail, était de maîtriser les différentes étapes de la callogenèse et l'embryogenèse somatique pour deux variétés de pomme de terre. Nous avons opté dès le départ pour les bourgeons comme explant initial. Des explants appartenant à Spunta et Kondor ont ainsi été ensemencés sur différents milieux de culture afin de déterminer les conditions de culture optimales pour l'obtention de cal. La réponse de la culture des tissus est fortement dépendante du génotype, des différences génotypiques significatives dans la réponse d'initiation de cal ont été observées chez les deux génotypes de pomme de terre étudiés. La variété Spunta développe la meilleur callogenèse dans tous les milieux par rapport à la variété Kondor en fonction de la concentration des hormones, il existe une gamme de variations de jours nécessaires pour cals initiation, le pourcentage des explants qui ont développé des cals, la texture, la couleur et le degré de sa formation.

La couleur et la texture des cals varient selon la nature des régulateurs de croissance et la présence ou l'absence de lumière. Ainsi, on constate par exemple que les cals induits sur les milieux où la dose de cytokinine est supérieure à celle de l'auxine (quelle que soit sa nature), sont généralement de couleur vert claire et de texture friable. Sur le reste des combinaisons, les cals prennent souvent un aspect chlorophyllien et une texture compacte. L'étude histologique de cal obtenu à partir d'explants internodale après 3 et 60 jours montre que la division cellulaire est produite dans l'épiderme seulement après trois jours de culture, la division cellulaire étendue à la première couche du cortex ,les petites protubérances avec des cellules allongées, sont constitués par des cellules formées en tant que résultat de division et deviennent visible sur l'épiderme et sur les surfaces de coupe, les cellules de cette région sont relativement indifférenciées et méristématique. Nous avons essayé de réaliser un essai de callogenèse avec NAA/BAP, les explants de germes répondent le mieux à la formation de cals. Le taux de callogenèse est compris entre 60% et 90% pour Kondor et de 60% à 100% pour Spunta. La couleur des cals après huit semaines était jaune vert ou vert clair pour les

deux variétés. Le taux le plus élevés cals 100% a été obtenue avec la combinaison (NAA x BAP) (0,5 / 1 mg / l, le milieu M2) et (02/02 mg / l, le milieu M3) avec Kondor pour les explants de germes. Nous avons tenté aussi la callogenèse avec 2,4-D/BAP, le taux plus élevé de cals est de 100% avec Kondor dans le milieu 1 (H1) et 80% dans le milieu 2 (H2) avec Kondor. La meilleure croissance des cals été dans le milieu MS additionné de 2 mg-1 de 2,4-D avec Kondor; suivie par le milieu MS additionné de 1 mg/l-1 de 2,4-D avec Spunta, le plus haut poids frais a été observée avec Kondor en milieu 4 (H4) et Spunta en milieu2, donc la concentration hormonale présente une influence évidente sur la croissance des cals in vitro.

Afin de tester l'aptitude à la callogenèse des explants de germes des deux variétés de pomme de terre à l'obscurité, *Spunta* et *Kondor* ont été cultivés à l'obscurité sur le milieu MS supplémenté de trois concentrations différentes (0,5 mg/l; 1 mg/l et 2 mg/l) de 2,4-D (respectivement milieu 1, milieu 2 et milieu 3) et NAA (0.5.1et 2mg/l : M4, M5 et M6) et NAA-BAP :(M1, M2 et M3 (1/0.5-0.5/1 et 2/2 mg/l). La callogenèse dépend essentiellement de deux facteurs: le génotype et la concentration hormonale présente dans le milieu. Toutes les concentrations testées ont induit la formation de cals chez les deux variétés avec certaines différences. Les cals friable développés à l'obscurité sont de couleur blanche au départ puis deviennent compactent et prennent différentes couleur (jaune pâle et brun) à la fin de l'incubation avec NAA ou 2,4-D. Avec 2,4-D l'initiation de la callogenèse commence après cinq jours d'incubation pour les deux variétés. Le poids frais moyen le plus important a été enregistré avec Spunta(0.34 g) dans le milieu 2(1mg/l 2,4-D) (0.27 g) chez Spunta et dans le milieu 3 (2 mg/l 2,4-D) chez Kondor. Les meilleurs taux de callogenèse sont 71.43% pour Spunta et 77,78% pour kondor. Avec NAA, La callogenèse commence après 7 jours d'incubation pour tous les milieux étudiés ,après deux mois d'incubation, le développement meilleure des cals a été noté chez Spunta avec les milieu (M1, M2, M3, M6), les cals prennent une structure compacte de couleur brun-blanc pour les deux variétés avec un taux de callogenèse de 20- 40% avec kondor pour les milieux M2 et (M3, M4, M5) respectivement et de (10-30%) pour M4 et (M1, M2, M3) pour Spunta respectivement.

Nous avons effectué un essai avec les concentration de BAP (0.5,1 et 2 mg/l) pour vérifier la réponse à la callogenèse , en utilisant les germes de tubercules comme explant de deux variétés de pomme de terre Spunta et Kondor, la réponse des explants à ce milieu commence par verdissement et gonflement pour la plupart des explant pour les deux variétés dans la première semaine , après deux mois d'incubation sur ces milieux ,pas de callogenèse pour tous les milieux et pour les deux variétés, ceci montre que le BAP seul n'est pas suffisant pour induire la callogenèse et necessite la presence des auxines.

D'autre part nous avons aussi réalisé une expérience sur l'effet du 2,4-D (0,5, 1 et 2 mg / l) et NAA (0,5, 1 et 2 mg / l) seul et en combinaison avec la BAP, NAA / BAP (0,5 / 1, 1 / 0,5 et 2/2 mg / l) 2,4- D / BAP (0,5 / 1, 1 / 0,5, 2/2 et 0,2 / 1mg / l) sur l'induction d'embryons somatiques directe (Annexe 07-01). Les explants étaient les germes de tubercules et les entre-nœuds, de deux cultivars de pomme de terre Spunta et Kondor. Les résultats indiquent qu'après trois semaines de culture, les cals sont d'apparence humide, molle et friable de couleurs vert et vert blanchâtre et blanc avec la combinaison NAA/BAP, et de couleur de couleur vert, vert-clair et brun pour les deux explants avec tous les milieux avec la combinaison 2,4-D/BAP. Le taux de callogenèse pour la combinaison NAA/BAP le plus élevé 50% est pour Spunta avec les milieux (M6-M2), et de 80% pour Kondor avec les milieux (M4, M5). Pour la combinaison 2,4-D/BAP le taux le plus élevé (60%) pour Spunta avec les milieux (H3 et 7) et de (80%) pour Kondor avec le milieu (H5). Les cals des différents explants développent avec tous les milieux (1-2) bourgeons et des racines denses surtout avec Spunta sur les milieux M2, M4 et M5. D'autre part le nombre de bourgeons développés sur les cals varie de 1 pour les milieux (H1, H3, H4 et H6) à 2 pour le milieu H3 et H7 avec Spunta et H3 avec Kondor. Dépassant trois mois d'incubation les cals sont plus volumineux et commencent à brunir et perd la couleur verte après dégradation de la chlorophylle (Annexe 07-02).

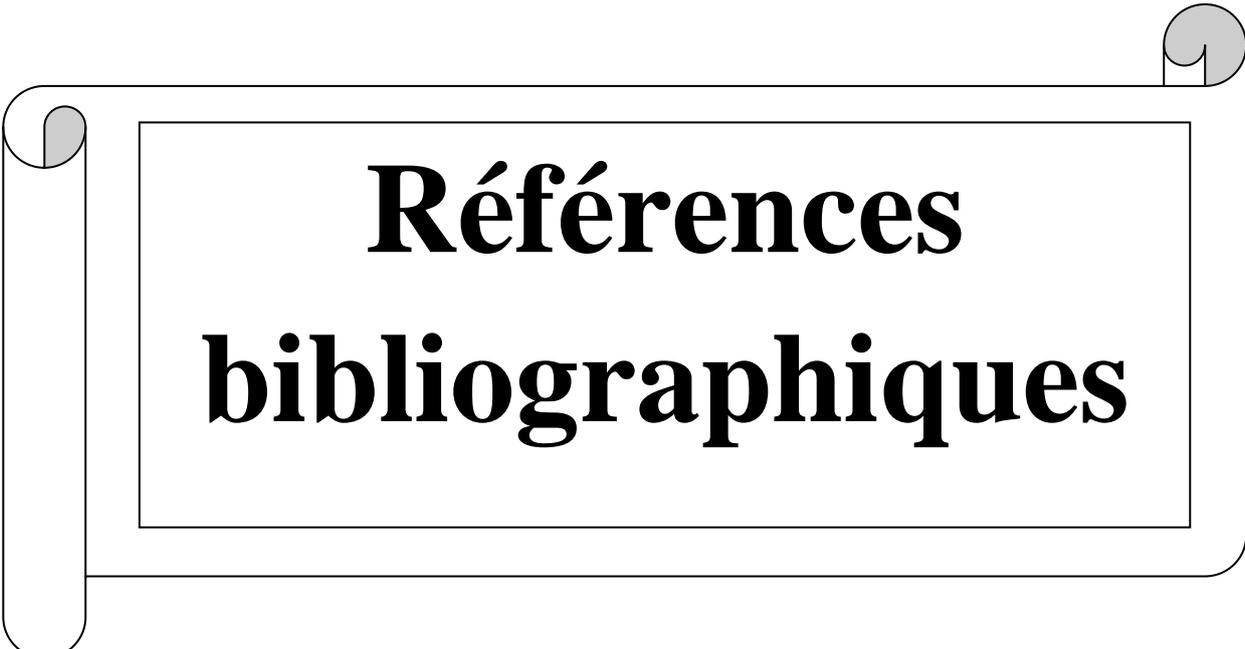
Une observation surprenante dans notre étude , qui est la formation de microtubercule sur les cals à partir des germes de tubercules sur milieu M1 (0.5/1 mg/l) avec Kondor et M2(1/0.5 mg/l) avec Spunta, pendant 37 à 60 jours d'incubation pour 10% des explants incubés , ainsi qu'en présence de (1mg/l BAP -0.2mg/l 2,4-D) avec Kondor.

Perspective

La callogenèse avec les explants de pomme n'est pas une étape difficile, par contre l'initiation d'embryon somatique à partir des cals et le maintien des explants pour une longue période été pour nous une étape difficile au début de notre travail.

En perspective ce résultat est très prometteur et ouvre la voie à la régénération par embryogenèse somatique avec des explants différents de pomme de terre (cellules différenciées et non différenciées) en utilisant d'autres concentrations en variant l'équilibre hormonale ainsi que la maîtrise des conditions de l'environnement stables pour une période dépassant trois mois.

En fin essayer d'induire l'embryogenèse somatique en appliquant un stress (osmotique, avec des ions ...), avec l'ajout de source de nitrogènes organique et minérale.

A decorative graphic of a scroll with a black outline and grey shading on the rolled-up ends. The text is centered within a white rectangular frame inside the scroll.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Addae-Frimpomaah, F., Arkorful, E & Tenge, T.K (2014).** The effect of 2,4-D on callus induction using leaf lobe of sweet potato as a source of explant. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 5(1): 16-22.
- Ahloowalia, B.S (1982).** Plant regeneration from callus culture in potato. *Euphytica*. 3: 1755-759.
- Ahn, YK., Park, T-H (2013).** Resistance to common scab developed by somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum*. *Acta Agriculturae Scandinavica B*. 63:595–603.
- Akira K., Nobuya S., Katsumi H., Tomokazu K. & Kamada H.I (2006).** Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta*. 223(4): 637–645.
- Akita, M & Takayama, S (1994).** Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semi continuous liquid medium surface level control. *plant cell reports*. 13: 184–187.
- Alam, A.K.M.M. & Khaleque' M.A (2010).** In vitro response of different explants on callus development and plant regeneration in groundnut (*Arachis hypogaeae* L.) *International journal of experimental agriculture*. 1(1):1-4.
- Al-Safadi, B., Ayyoubi, Z. & Jawdat, D (2000).** The Effect of Gamma Irradiation on Potato Microtuber Production in Vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 61, 183-187.
- Anstis, P.J.P. & Northcote, D.H. (1973).** The initiation, growth and characteristics of a tissue culture from potato tubers. *Journal of Experimental Botany* 24:425-441.
- Archana, C & Khurana, P (2002).** Gene expression during somatic embryogenesis - recent advances. *Current Science*. 83 (6) : 715-739.
- Arora, A & Chawla, H. S. (2005).** Organogenic plant regeneration via callus induction in Chickpea (*Cicer arietinum* L) Role of genotypes, growth regulators and explants. *Ind. J. Biotech*. 4: 251-256.

Aryakia, E & Y. Hamidoghli (2010). Comparison of kinetin and 6-banzyl amino purine effect on *in vitro* microtuberization of two cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.). *American-Eurasian Journal Of Agricultural & Environmental Sciences*. 8(6):710-714.

Ascencio-Cabral, A., Gutierrez-Pulido, H., Rodriguez-Garay, B., Gutierrez-Mora, A (2008). Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. *Scientia Horticulturae*. 118: 155-160.

Ashrafi, S, M. R. Mofid, M. Otroshi, M. Ebrahimi., & M. Khosroshahli (2010). Effects of plant growth regulators on the callogenesis and taxol production cell suspensiob of *Taxus baccata* L. *Trakia Journal of Sciences*, Vol. 8 (2): 36-43.

Augé, R., Beauchesne, G., Boccon-Gibod, J., Decourtye, L., Digat, B., Jalouzet, R., Minier,R., Morand, J., Reynoird, J.P., Strullu, D.G. & Vidalie, H (1989). La culture in vitro et ses applications horticoles. Ed Tec & Doc-Lavoisier Paris, 225 pp.

Austin S., Baer M., & Helgeson J.P (1985). Transfer of resistance to potato leafroll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. *plant science*. 39, 75-82.

Ayolié, K ., El Yakoubi, H., & Rochdi, A (2007). Influence du 2,4-D et de l'explant embryonnaire sur la callogénèse du blé dur. *Bulletin de la Societe de pharmacie de Bordeaux*. 146: 97-112.

Bajaj, Y.P.S. & Dionne, L.A (1967). Growth and development of potato callus in suspension culture *Canadian Journal of Botany*. 45(11): 1927-1931, <https://doi.org/10.1139/b67-210>.

Bajaj Y.P.S., Sopory S.K (1986). Biotechnology of potato improvement. *Biotechnology in agriculture and forestry* 2: 429-454.

Behbahani, M., hanehsazzadeh, M. S., & Javad Hessami, M (2011). Optimization of callus and cell suspension cultures of *Barringtonia racemosa* (Lecythidaceae family) for lycopene production. *Scientia Agricola. (Piracicaba, Braz.)*.68(1): 69-76.

Biotechnologies. <http://www.biotech-ecolo.net/micropropagation-culture-invitro.html>. consulté le 25-10-2017.

Boissot, N., aldez, M. V., & Guiderdoni, E (1990). Plant regeneration from leaf and seed-derived calli and suspension cultures of the African perennial wild rice, *Oryza longistaminata*. *Plant Cell Reports*. **9**: 447-450.

Borjian, L., & Arak, H (2013). A Study on the Effect of Different Concentration of plant hormones (BAP, NAA, 2, 4-D, and Kinetin) on callus induction in *Brassica Napus*. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*. 5: 519-521.

- Branka, P-K & Marija, P (2001).** Differentiation and morphogenetic potential of *Allium commutatum* Guss. callus tissue. *Acta botanica Croatica* . 60 (2): 169-175.
- Bragdo.Aas, M (1977).** Regeneration of plant from callus of potato tubers. *Acta Horticulturae*. 78:133-137.
- Bufard-More, J., Verdeil, JL & Pannetier, C (1992).** Embryogenkse somatique du cocotier (*Cocos nucifra* L.) A partir de tissus foliaires: étude histologique. *Can J Bot* 70:735-741.
- Cai, XK., Liu, J., & Xie, CH. (2004)** Mesophyll protoplast fusion of *Solanum tuberosum* and *Solanum chacoense* and their somatic hybrid analysis. *condes) Acta Horticulturae Sinica*. 31:623–626.
- Can E., Celiktaş N., & Hatipoğlu, R (2008).** Effect of auxin type and concentrations in different media on the callus induction and shoot formation of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* (L.) Gaertn). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 22 (3): 782-786.
- Castillo, A. M., Egana, B., & Cistue, L (1998).** Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. *Plant Cell Rep*. 17: 902-906.
- Champman,H.W(1958).** Tubérisation in the potato plant .*Plant physiol.plant*.11:215-224. in : Yasunori Koda et Yozo Okazawa.1983.Influences of environmental,hormonal and nutritional factors on potato tuberization in vitro. *Japanese Journal of Crop Science* .52(4) :582-591.
- Chandra, S., Raisada, M. & Gaur, A. K. S (1983).** Pathological variability in *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*. *Indian Phytopathology*. 36 (1): 36-40.
- Chandra R, JH Dodds, P Tovar (1988).** *In vitro* tuberization in potato. *Newslet. Intl Assoc Plant Tissue Cult* 55: 10-12.
- Chaudary, Z., Imran F., Ahmed, W., Rashid, H., Mirza B., & Quraishi, A (2001).** varietal response of *Lypopersicone sculentum* L. to callogenesis and regeneration. *Online Journal of Biological Sciences*. 1 (12): 1138- 1140..
- Chaudhry, H., Nida, F & Iffat, Z. A (2014).** Establishment of callus and cell suspension cultures of *Nigellasativa*.L for thymol production. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(1) : 788-794.
- ChoryJ., M. Chatterjee., R. K. Cook., T. Eligh., C. Fankhauser. J. Li., P. Nagpal., M. Neff., A. Pepper., D. Poole., J. Reed., & V. Vitart (1996).** From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. 93: 12066-12071. Cie. éd. Paris, 863 p.

- Doré ,C & Fabrice, V(2006).** Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées Inra 812 p.
- Coleman, M., Waugh, R., & Powell, W (1990).** Genetic analysis of in vitro cell and tissue culture response in potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 23:181-186
- Coleman KW, Danielle JD & Coleman SE (2001)** Potato microtuber as research tools: A Review. *American Journal of Potato Research.* 78: 47-55.
- Công-Linh L (1995).** Applications de la microtubérisation in vitro chez différentes variétés de Pomme de terre, *Acta Botanica Gallica*, 142 (4) :389-389 DOI:10.1080/12538078.1995.10515259.
- Dalilha, N. dos Santos., Claudinéia, F .N., Joyce, D R S, Eduardo. A., Cláudia, R. G L., Moacir, P & Leila, A. Salles Pio (2015).** Ultrastructural and cytochemical analysis of physic nut callus tissue in response to different combinations of growth regulators. *Maringá.* 37(3) : 355-359.
- Dantu, K.P et tomar, K.U. (2010).** Cellular and Biochemical Science, Edition: First, Chapter: Somatic Embryogenesis, Publisher: I.K. International House Pvt Ltd New Delhi, Editors: G. Tripathi : 892-908.
- Davies RT., Goetz DH., Lasswell J., Anderson MN, & Bartel B. 1999.** IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from Arabidopsis. *The Plant Cell* 11: 365–376.
- Dick. V, John. B,Christiane. G, Francine. G, Donald K.L., Mackerron, M. A.T & Heather A.R (2007)** .Potato biology and biotechnology . Advence and perspective.Elsevier, Amsterdam, Netherlands.pp : 823.
- Dobrzenski, J H.A. Takacs, T.K. Magyar & A.Ferenczy (1999).** Effect of medium on the callus forming capacity of different potato genotypes.*Acta Agronomica Hungarica.*47: 59-61
- Dragicevic, I., Konjevic, R., Vinterhalter, B., Vinterhalter, D. & Neskovic, M. (2008).** The effects of IAA and tetcyclacis on tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot cultures in vitro. *Plant Growth Regulation.*54(3) :189-193.
- Dubois, J. (1973).** Action de la lumière sur la croissance et la teneur en pigments plastidaux des tissus isolés de carotte. *Bulletin de la Société botanique de France.*120: 3-26.
- Dunstan, D. I & Short, K. C. (1978).** Shoot production from onion callus tissue cultures. *Scientia Horticulturae.* 9: 99-110.
- Dunwell, J.M., and N. Sunderland. (1973).** Anther culture of *Solanum tuberosum* L. *Euphytica* 22: 317-323.

- Ebad, F A, Marwa E.S Abd EL-sadek & EL-Kazzaz A.A. (2015).** Micropropagation of four potato cultivars *in vitro* Academia Journal of Agricultural Research 3(9): 184-188.
- Ehsanpour, A.A., Madani S., & Hoseini, M (2007).** detection of somaclonal variation in potato callus induced by UV-C radiation. *General and Applied Plant Physiology*. 33 (1-2): 3-11.
- Elaleem, KGA., Modawi, RS., & Khalafalla, MM (2009).** Effect of plant growth regulators on callus induction in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. *African journal of biotechnology*. 8 (11): 2529-2534.
- Elfriede, M., Linsmaier-Bednar & Thomas W. Bednar (1972).** Light and hormonal control of root formation in *Zea Mays* callus cultures. *Development, Growth & Differentiation* .14(2).
- Elouz .,Lakhoua, L &Gargouri,A (1994).** Polymorphisme de l'AND total chez les plantes régénérée à partir de protoplaste de pomme de terre. quel avenir pour l'amélioration des plantes .Ed AUPELF-UREF, Paris.
- El-Sharabasy, S.F., El-Sharnouby, M.E. & Zahran, A.A (2012).** Effect of potassium and sucrose concentrations on the production of potato microtubers through tissue culture. *Journal - Arab Journal of Nuclear Sciences and Applications*, 45 (2), 561-567.
- Eng, Fanchang; Zhang, Xianglong; Cheng, Lei; Hu, Lisong; Zhu, Longfu; Cao, Jinglin and Guouo, Xiaoping (2007).** A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics*. 90 (5) : 620-628.
- Estrada, R., P. Trovar & J.H. Dodds (1986).** Induction of *In vitro* tubers in a broad range of potato genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 7: 3-10.
- Esna –Ashari, M., & T. A. Villiers (1998).** Plant regeneration from tuber disc of potato (*Solanum tuberosum* L.) using 6- benzylaminopurine (6-BAP). *Potato Res.* 41: 371-382.
- FAO, 2016.** <http://www.fao.org/statistics/fr/>
- Feher, A., Pasternak, T.P., & Dudits, D (2003).** Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74b: 201-228.
- Fitri, A & Iriawati (2014). Induction of Somatic Embryos from Leaf and Stem Nodal Section Explants of Potato (*Solanum tuberosum* L.) *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences*. 46(3): 301-312.
- Fitri, A & Iriawati (2014).** Induction of Somatic Embryos from Leaf and Stem Nodal Section Explants of Potato (*Solanum tuberosum* L.) *J. Math. Fund. Sci.* 46 (3): 301-312.

- Foroughi-Wehr B., Mix G., Gaul H., Wilson H.M (1976).** Plant production from cultured anthers of *Hordeum vulgare* L. *Z Pflanzenzucht.* 77:198-204.
- Fotso, M., Elian, H. D., Tchouga, A. O., Djeuani, A. C., Mbouobda, H. D., & Omokolo, N. D(2014).** Effect of exogenous phytohormones and sucrose on micropropagation and microtuberisation of *Manihot esculenta* Crantz var. *Africain journal of biotechnology.*13: 3966-3976.
- Frank, M., Rupp, H.-M., Prinsen, E., Motyka, V., Van Onckelen, H., & Schmölling, T (2000).** Hormone autotrophic growth and differentiation identifies mutant lines of *Arabidopsis* with altered cytokinin and auxin content or signaling. *Plant Physiology.* 122: 721–729.
- Gabriele, S., & Hans-George, S (2003).** Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in the greenhouse of *Primula* ssp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*72: 53-61.
- Gallais, A., Bannerot, H (1992).** Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de selection. *Mieux Comprendre.* Paris, FRA : INRA Editions, 768 p.
- Gandonou, C.H., Abrini, J.N., & Skali, S (2005).** Response of sugarcane (*Saccharum* sp.) varieties to embryogenic callus induction and in vitro salt stress. *African Journal of Biotechnology.* 4 (4): 350-354.
- Garcia, E. D & Martinez ,S (1995).** Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree from stem nodal sections. *Journal of. Plant Physiology.* 145: 526-530.
- Garcia-luis A., Y. Bordo N, J. M. Moreira-dias, R. V. Molina & J. L. Guardiola (1999).** Explant Orientation and Polarity Determine the Morphogenic Response of Epicotyl Segments of Troyer Citrange *Annals of Botany.* 84: 715-723.
- Gautheret, R (1939).** Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *C. R. Soc. Biol. Paris* 208: 118-120.
- George, E. F., Hall, M A. K. & Geert-J. (2008).** Plant GrowthRegulators I:Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition,* 175-204.
- George, EF., Hall, MA., & De Klerk, GJ (2008).** Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, Vol. 1. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 501 p.
- Ghavidel., R.A, Bolandi, A.R., Hamidi, H & Foroghian, S (2012).** Effects of plant growth regulators and photoperiod on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *African Journal of Biotechnology.* 11(53): 11585-11590.

- Gopal, J, Chamail, A., & Sarkar, D (2004).** In vitro production of microtubers for conservation of potato germplasm: Effect of genotype, abscisic acid, and sucrose. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*.40:485-490.
- Goebel, K.1908.** Einleitung in die experimentelle morphologie derpflanzen. In: Emberger, L; Roger, Hein.1964. Annales des sciences naturelles, botanique et biologie végétale
- Guillermo P.P., Claudia H A.,Fernando R M., Arturo D P.,Claudia, L.M., &Efraín,M. O (2013).** High intensity LED light in lettuce seed physiology (*Lactuca sativa* L.). *Acta Agrophysica*. 20(4) : 665-677.
- Haque, M., I. Mila, N. B., Khan., MS & Sarker, R. H (1996).** Shoot regeneration and *in vitro* microtuber formation in potato (*Solanum tuberosum* L). *Bangladesh Journal of Botany* . 25: 87-93.
- Hellali,R.(2002).** Role du potassium dans la physiologie de la plante.Atelier sur la fertilisation potassique,acquis et perspectives de la recherche,institut nationale agronomique de tunisie.
Pp :07.
- Hera, C., Nida, F., & Iffat, Z. A (2014).** Establishment of callus and cell suspension cultures of *Nigella Sativa* L. for Thymol Production. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6, 788.
- Hian, T. S., Radzali ,M., Ariff A & Maziah, M (2010).** Effect of Plant Growth Regulators on Callus, Cell Suspension and Cell Line Selection for Flavonoid Production from Pegaga (*Centella asiatica* L. urban). *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* .6 (4): 284-299.
- Hong, W & Debergh, P (1995).** Somatic embryogenesis and plant regeneration in garden leek. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 43: 21-28.
- Hopkins W.G., (2003)** .Physiologie végétal ,2ème édition .De Boeck , Bruscelles : 61-476.
- Hoque, M. E.(2010).** *In vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *POJ* 3(1):7-11
- Humrea, A. (2006).** Biochemical and molecular markers of somaclonal variants induced mutants of potato (*Solanum tuberosum* L). Doctora thesis university of Punjab, Lahore Pakiston : 13-15.
- Hussey, G., Stacy, N. J (1984).** Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany*. 53: 565–578.
- Ighilhariz, Z., Bouabdallah, L., & Belkhodja, M (2008).** Hormonal influence on the induction of callus in *Atriplex Halimus* L. L. and *Atriplex Canescens* (Pursch. Nutt). *European Journal of Scientific Research*. 24: 211-218.

- Ikeuchi, M , Sugimoto, K., & Iwase, A (2013).** Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *Plant Cell*. 25(9): 3159-3173.
- Iqbal, H., Chaudhry Z ., Muhammad, A., Asghar, R., Saqlannaqvi, S.M. & Hamid.Rashid (2006).** Effect of chlorocholine chloride ,sucrose and BAP on in vitro tuberization in potato(*Solanum tuberosum L.CV.Cardinal*) *Pak. J. Bot.*, 38(2): 275-282.
- Ikuchi, Akira., Sanuki, Nobuya., Higashi, Katsumi., Koshiha, Tomokazu & Kamada, Hiroshi.(2006).** Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta*. 223(4): 637-645.
- Innocent, C O., Chinonye, J. E & Chibuikem I.N. U (2011)** *In Vitro* Prevention of Browning in Plantain Culture. *OnLine Journal of Biological Sciences*. 11 (1): 13-17.
- Iranbakhsh ,A., M. Ebadi & Z. Zare (2011).** Effects of Nitrogen and Potassium on in vitro Microtuberization of Potato (*Solanum tuberosum L. var Agria*). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5(12): 442-448,
- Ishii, Y., Takamura, T. Goi, M., & M. Tanaka (2004).** Callus induction and somatic embryogenesis of Phalaenopsis. *Plant Cell Repport*. 17: 446-450.
- Jabbar Taha Alla, Dr., & Mutasher Halla, H (2017).** Increase production of some secondary products in callus of *Citrullus colocynthis L.* using chemical and physical elicitors. *International journal of innovative research in science, engineering and Technogyl*, 4 (3).
- Jackson, S.D (1999).** Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiol*. 119:1-8.
- Jayanthi, M. & Mandal, P. K (2001).** Plant regeneration through somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plantlets in *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill. *In vitro In Vitro Cellular & Developmental Biology plant*.37: 576–580.
- Jeyakumar, J. J & Vivekanandan, L (2015).** Optimization of conditions for callus induction and indirect organogenesis of *Cucumis anguria L.* *Asian Journal of Plant Science and Research*. 5(11): 53-61.
- Jean-Louis, R., Hugues, S., David, M (2002).** Production de minitubercules de pomme de terre par hydroponie : évaluation d’un système combinant les techniques “NFT” et “Gravel Culture” pour deux types de solutions nutritives. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 6(3) :155–161.
- João, C.B.F & Kazumi, H (1997).** Embryogenic callus formation and histological studies from *Steviare boudiana* (BERT.) BertoniFloret Explanter. *Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 9(3):185-188.

- José R. F. de Santanaa., Renato. P, Magd, A .I. A, Eurico ,E. Pinto de Lemosd (2003).** Efficiency of ampicillin and benomyl at controlling contamination of Annonaceae leaf segments cultured *in vitro*. *Fruits*. 58: 357-361.
- Joshi ,R & Kumar, P.(2013).** Regulation of somatic embryogenesis in crops: A review .*Agricultural Reviews*. 34 (1).
- Juan, C., Ritieni, A., & Mañes, J. (2012).** Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 134(4): 2389-97.
- Kamil, R, Ma´ria ˇS, J. D., Jan, P, Eva, Z., Sib, S, Jirˇı ,F., Marc, C. E., Van, M & Eva, B (2009).** Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport.*Proceeding of national academy of science of the united state of America*. 106 (11).
- Kami'nek, M., Motyka, V., & Vankova, R(1997):** Regulation of cytokinin content in plant cells. *Physiol. Plant*. 101: 689-700.
- Karimi, N., Reza, G H & Yari, M (2014).** Effect of Different Growth Regulators on Callus Induction and Plant Regeneration of *Satureja* species. *Annual Research & Review in Biology*.4(16): 2646-2654.
- Karin, L (2002).**Auxin Biosynthesis and Homeostasis in *Arabidopsis thaliana* in Relation to Plant Growth and Development. These de doctorat .*Department of Forest Genetics and Plant Physiology*. Swedish University of Agricultural Sciences. Umeh. P51
- Rikiishi K ., Takakazu M., Masahiko M & Kazuyoshi T (2008).** Light control of shoot regeneration in callus cultures derived from barley (*Hordeum vulgare* L.) immature embryos. *Breed. Sci*. 58: 129-135.
- Keda-Iwai, M; Umehara, M; Satoh, S & Kamada, H (2003).** Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, April, vol. 34, no. 1, p. 107-114: In **Maria Amely Zavattieri*** Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions (2010) . *Electronic Journal of Biotechnology* 13 (1):15.
- Khadiga, G. A., Rasheid, S. M., & Mutasim, K (2009).** Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. *African Journal of Biotechnology*. 8: 2529-2534.
- Khadiga, G. A., Mohamed, A. M & Khalid, M. M. N (2015).** Effect of Explants and Plant Growth Regulators on Callus Induction in *Ricinus communis* L, *Research. Journal of Pharmaceutical Science*. 4(1):1-6.

- Kibler, R. ., J. Blaschke., E. Forche & K.-H. Neumann (1980).** Investigation on ploidy levels of haploid and diploid callus and cell suspension culture of *Datura Innoxia* MILL. *J. Cell Set.* 44. 365-373.
- Keda-Iwai, M., Umehara, M., Satoh, S & Kamada, H (2003).** Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 1, vol. 34, no. 1, p. 107-114: In **Maria Amely Zavattieri*** Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions (2010) Vol. Electronic Journal of Biotechnology 13 (1):15.
- Koutoua, A., Houda, EY., & R. Atmane (2007).** 2, 4-D influence on embryonic callus explants Wheat. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.*146: 97-112.
- Kowalska , L & Arseniuk, E (2016).** The effect of medium composition on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat cultivars with various resistance to *Parastagonospora nodorum*. *Indian Res. J. Genet. & Biotech.* 8(3) : 183-189.
- Krystyna, R. (2013).** Assessment of PotatoMother Tuber VigourUsingthe Method of Accelerated Ageing .*Plant Prod. Sci.* 16(2): 171-182.
- Kumar, V., Rashmi, D., & Banerjee, M (2014).** Callus induction and plant regeneration in *Solanum tuberosum* L. cultivars (Kufri Chipsona 3 and MP-97/644) via leaf explants. *International Research Journal of Biological Sciences.* 3: 66-72.
- Kumar, S., Kumar, Virendra., Kumar, M S., Kumar, N., Kumar, A., Tomar, K P S., Kumar, S S., Kumar, M S., Sengar, R. S. & Jaiswal, N(2015) .** Effects of different plant growth regulators on *in vitro* callus induction in physic nut (*Jatropha curcus* L.) *Journal of Applied and Natural Science.* 7 (1): 30-37.
- Kurdyukov, S., Song, Y., Tiew, T. W., Wang, X. D., Nolan, K. E., Rose, R. J (2015).** Protocols for Obtaining Zygotic and Somatic Embryos for Studying the Regulation of Early Embryo Development in the Model Legume *Medicago truncatula*. *Journal of Visualized Experiments.* (100), e52635, doi:10.3791/52635.
- Kwang-Soo, C &Tae-Ho, P (2014).** Potato breeding via protoplast fusion. *Journal of Plant Biotechnology.* 41:65–72.
- Laboney, U.Z., Biswas, G.C., & Abdullah-Al-Shoeb, M (2013).** Callus induction and regeneration of potato shoot tip culture. *International Journal of Agriculture Sciences.* 3:40-45.
- Lahlimi, Q., Chlyah, B., & Chlyah, H (2001).** Callogenèse et régénération *in vitro* du kiwi (*Actinidia chinensis*) à partir de divers explant. *Actes Insitut. Agronomique de. Veterinaire.* 21:75-81.

Lam, S.L (1975). Shoot formation in potato tuber discs in tissue culture. *American Potato Journal* 52:103-106.

Leyser, O (2001). Auxin signalling: The beginning, the middle and the end. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:382–386.

Ljung, K., AK. Hull., M. Kowalczyk., A. Marchant., J Celenza., JD. Cohen, G. S (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 49: 249-272.

Lo, F. M., B. R. Irvine, and W. G. Barker (1972). *In vitro* tuberization of the common potato (*Solanum tuberosum*) is not a response to the osmotic concentration of the medium. *Canadian Journal of Botany*. 50: 603-605.

Loïc, F., Nathalie, L., Patrice L., Véronique, G., & Louis-P, V (2001). La production de protéines à usage biopharmaceutiquedans les plantes médecine/sciences. 17 : 867-77

Loiseau, J., Michaux-Ferriere, N, & Le Deunff Y (1998). Histology of somatic embryogenesis in pea. *Plant Physiology and Biochemistry*. 36: 683-687.

Lozzi, A., A. Abousalim., & Abdelwahd, R (2015). Effet du 2,4-D sur l'induction de l'embryogenèse somatique à partir de cotylédons matures de caroubier (*Ceratonia siliqua* L). *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*. 3 (3):24-29.

Lu, C. Y., I. K. Vasil (1985). Histology of somatic embryogenesis in *Panicum maximum* (Guinea grass). *American Journal of Botany*. 72: 1908-1913.

Majid, I., Muhammad, J., Rizwan, R., Syed, Z U., Muhammad, S I., Misbah, R & Salman, M (2014). Effect of Plant Growth Regulators on Callus Formation. *Potato Journal of Agri-Food and Applied Sciences*. 2: 77-81.

Malgorzata, D. G (2004). Factors Influencing Somatic Embryogenesis Induction and Plant Regeneration with Particular Reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) *Plant Growth Regulation*. 43(1): 27-47.

Mammoto,T & Donald, E. I (2010). Mechanical control of tissue and organ development. *Development*. 137: 1407-1420.

Manel, A.S., Malabika, R. P., Ahmed, A., Mohamed, A., & Assma, A (2014). Effect of plant growth regulators on the regeneration of endangered plant *Calligonum colosum* L Henry in the kingdom of Bahrain .*African journal of biotechnology*. 13: 2513-2523.

Manzur, P J., Calvache-Asensio, M. L. N, & Rodriguez-Burruezo, A (2014). Growth regulators and darkness increase efficiency in *in vitro* culture of immature embryos from peppers . *Science. Agricultural*.71(6):488-493.

- Marcia, O .M., Murilo, M & Beatriz, A (2015).** Histological Analysis of the Callogenesis and Organogenesis from Root Segments of *Curcuma zedoaria*. *Roscoe*. 44(2): 197- 203.
- Margara, J (1989).** Bases de la multiplication végétative, Les méristèmes et l'organogénèse INRA, Paris, p 260.
- Martin, KP (2004).** Plant regeneration protocol of medicinally important *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Wallich Ex Nees Via Somatic Embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology plant* . 40:204-209.
- Melchers, G., Sacristan, M.O & Holder, A. A (1978).** Somatic hybrid of plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Research Communications*.. 43: 203-218.
- Meneses, A., Flores, D., Muñoz, M., Arrieta, G. and Espinoza, A.M (2005).** Effect of 2, 4-D, hydric stress and light on *ndica* rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis *Revista de biologia tropical*. 53 (3-4): 361-368.
- Mes, M.G. & Menge, U. (1954).**Potato shoot and tuber cultures *in vitro*. *Physiol. Plant.*, **7** : 637-349.
- Michael, R., B & Barry, F (1984).** Phytochrome Intermediates and Action Spectra for Light Perception by Dry Seeds.' *Plant Physiol*. 74: 601-604.
- Michaux-Ferrière, N & Schwendiman, J (1993).** Modalités d'initiation des cellules à l'origine des embryons somatiques, *Acta Botanica Gallica*, 140:6, 603-613, DOI: 10.1080/12538078.1993.10515641.
- Miheretu, F & Mulugeta, D. (2014).** Microtuber Induction of Two Potato (*Solanum tuberosum* L.) Varieties, *Advances in Crop Science and Technology*. 2:2.
- Mix,G.1985.**preservation of old potato varieties .In :In vitro technique –propagation and long term storage (Advence in Agricultural Biotechnology).A.Schafer-Menuhr Ed,149-153.
- Mohamed N. H., El-Metwally M., El-Hoseiny, H., Abdelaziz Omar, S & El-Sheery, N. I (2014).** Effect of nanoparticles on biological contamination of *in vitro* cultures and organogenic regeneration of banana. *Australian Journal of Crop Science*. 8(4):612-624.
- Mohammad, B. Y., Mansour, G., Mahmoud, E. A., & Hussein, k. (2014).** Effect of season and explants type on in vitro propagation of *Juglansregia* L.genotypes Z60 and Z63. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 7-9: 624-629.

- Moitreyee, S., Shrivastava, K & Sibgh, S.S (2013).** Effect of culture media and growth hormones on callus induction in *aquilaria malaccensis* Lam. *Asian Journal of Journal of Experimental Biology*. 6(2) : 96-105.
- Mozafri, J., Wolyn, D. J., & Ali Khan, S. T. (1997).** Chromosome doubling via tuber disc culture in dihaploid potato as determined by confocal microscopy. *Plant Cell. Rep.* 16: 329-333.
- Murashige, T & Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- Mutasim, M.K., Khadiga, G.A., & Rasheid, S.M. (2010).** Callus formation and organogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L) cultivar Almeriz. *Journal of Phytology*. 2:40-4.
- Naik, P.S & D. Sarker (1997).** Influence of light-induced greening on storage of potato microtubers. *Biologia Plantarum*, 39: 31-34.
- Nasrin, S., Hossain, MM., Anjumarana, K., Alam, MF., & Mondal, MRK (2003).** Induction and evaluation of somaclonal variation in potato *Solanum tuberosum* L. *Online J Biol. Sci.*; 3:183-190.
- Nissen, P., Minocha, S. (1993).** Inhibition by 2, 4-D of somatic embryogenesis in carrot as explored by its reversal by difluoromethylornithine. *Physiologia Plantarum* . 89 (4).
- Nistor, A., Câmpeanu, Gh., Nicoleta, Ch & Diana, K (2009).** Effect of auxine and cytokinin on callus Induction in potato (*Solanum tuberosum* L.) Explants. *Agricultura – Stiintasi Practica*. 1-2:69-70.
- Nistor, A., Chiru, N., Cioloca, M & Monica (2012).** Popa influence of different potassium concentrations in potato microtuberization Vasile Goldiș”, *Seria Științele Vieții*. 22(4): 543-547.
- Novak, F.J., Zadina, J., Horackova, V. & I. Moskova, (1980).**The effect of growth regulators on meristem tip development and in vitro multiplication of *Solanum tuberosum* L. plants. *Potato Research*.23: 155-166.
- Nurul, S.A., Robiah, A & Rusli, I (2014).** Effects of Red and Blue (RB) LED on the *in vitro* Growth of *Rosa Kordesii* in Multiplication Phase. *2nd International Conference on Agriculture and Biotechnology. IPCBEE vol. 79*.
- Omari., C., (2009).** La filière pomme de terre en Algérie". In Revue Filaha-innove. Ed. Magvet. n°1111-4762. p.19. Alger.Palmer et Smith ,1969.
- Palmer ,C.E. & Smith,O.E(1969).** Effect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of *Solanum tuberosum* .L.cultured in vitro .*Plant Cell Physiol*,11:303-314.

- Pan, J. & Guo, B (2016).** Effects of Light Intensity on the Growth, Photosynthetic Characteristics, and Flavonoid Content of *Epimedium pseudowushanense*. B.L.Guo. *Molecules*. 21:1475.
- Park, Y.L, Chow W.S & Anderson, J.M (1995)** .Light inactivation of functional photosystem II in leaves of peas grown in moderate light depends on photon exposure. *Planta*. 196: 401-411.
- Pedrosa, L.F. and Vasil, I.K. (1996).** Optimisation of somatic embryogenesis and long term regeneration in callus cultures of diploperennial teosinte (*Zea diploperennis* Iltis, Doebley & Guzman). *Maydica*. 41: 333-348.
- Per Nissen and Subhash C. Minocha. (1993).** Inhibition by 2, 4-D of somatic embryogenesis in carrot as explored by its reversal by difluoromethylornithine. *Physiologia Plantarum*. 89: 673-80.
- Phillips, G. S & Luteyn, K. J. (1983).** Effects of picloram and other auxins on onion tissue cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 108: 948-953.
- Pierre D., Marie-Laure, F & Patrick J.(2008).** Méthodes de mesure de l'âge physiologique des tubercules semences de pomme de terre (*Solanum tuberosum*L.). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*.12(2). (<http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=2448>).
- Pretova, A., & Dedicova, B. (1992).** Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree from unripe zygotic embryos. *J. Plant Physiol*. 139: 539-542.
- Przetakiewicz, J., Nadolska-Orczyk, A., Kuć, D., & Orczyk, W. (2007).** Tetraploid somatic hybrids of potato (*Solanum tuberosum* L.) obtained from diploid breeding lines. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 12: 253-267.
- Purnamaningsih, P. (2002).** Plant regeneration through somatic embryogenesis and its Controlling. *Buletin Agrobiologi*. 5(2) : 51-58.
- Rahayu, S ., Roostikai, I., & Bermawie, N. (2016).** The effect of types and concentrations of auxins on callus induction of *Centella asiatica*. *Nusantara Bioscience*, 8, No. 2: 283-287.
- Rahman,M.M.,Amin, .M.N., Ahmed,T., Ali,M.R & Habib, A. (2004).** Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from leaf base derived callus of *Kaempferia galangga* L.*Asian journal of plant science* 3(6):675-678.
- Ramdan R, Handaji N., Beyahia H & Ibriz M. (2014).** Influence of growth regulators on callus induction from embryos of five citrus root stocks. *Journal of Applied Biosciences* 73:5959- 5965.

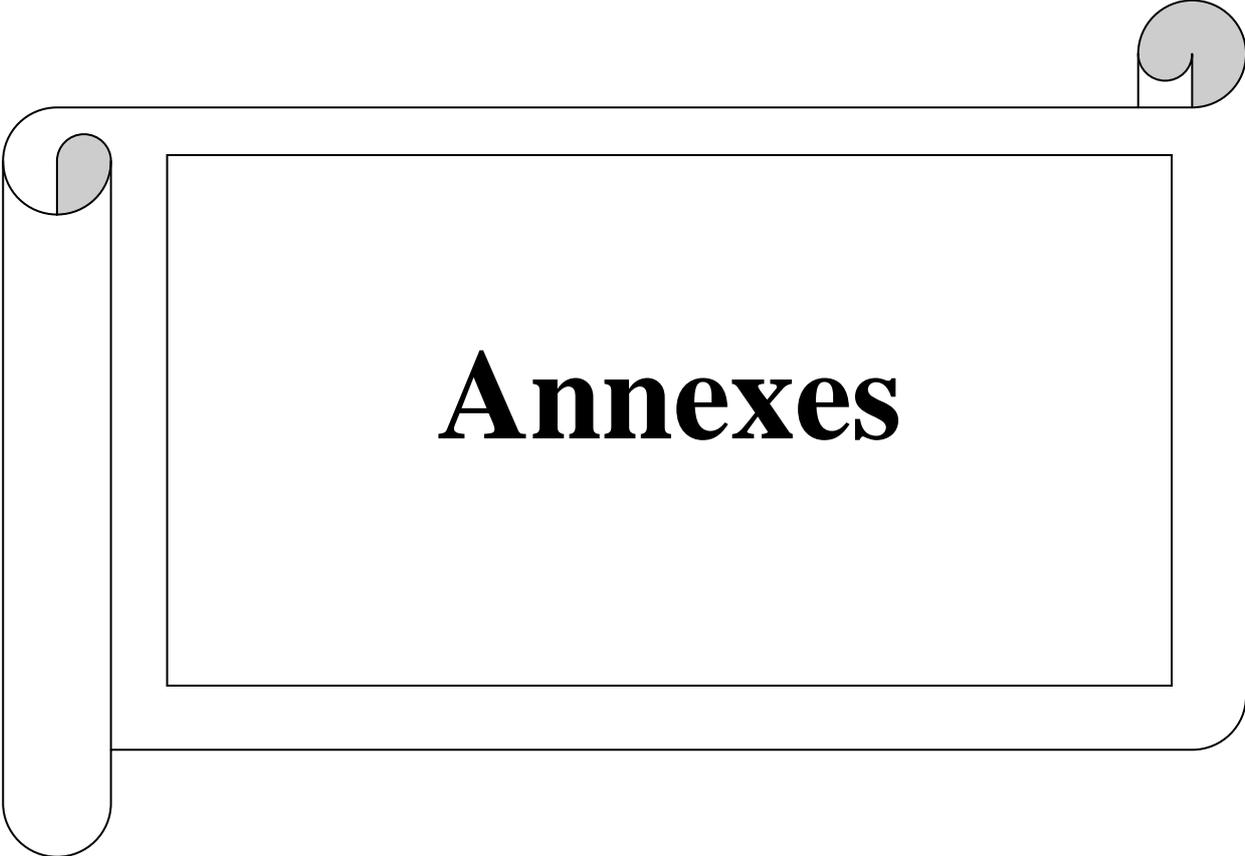
- Ranalli, P., Bassi, F., Ruaro, G., Del Re, P., Dicandilo, M., & Mandolino, G. (1994).** Microtuber and minituber production and field performance compared with normal tubers. *Potato Research*. 37: 383-391.
- Renu., S & Nidhi, B. (2011).** Impact of growth regulators on Callus production of two medicinal plants viz. *Adhatoda vasica* and *Ageratum conyzoides*. *International Journal of Research in Plant Science*. 1: 1-8.
- Reinert, J. (1958).** Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft* . 71: 15.
- Joshi, R & P. Kumar (2013).** Regulation of somatic embryogenesis in crops: A review. *Agriculture. Reviews*. 34 (1): 1-20.
- Rose RJ, Nolan, KE (2006).** Genetic regulation of somatic embryogenesis with particular reference to *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 42: 473-481.
- Ross, H (1986).** Potato breeding – Problems and perspectives. *Advances in Plant breeding*. Supplement 13 to the *Journal of Plant Breeding*, 132 pp.
- Rout, G.R. (2004).** Effect of Cytokinins and Auxins on Micropropagation of *Clitoria ternatea* L. *Biological Letters*, 41, 21-26.
- Rousselle, P., Robert, Y., Crosnier, J.C., (1996).** La pomme de terre: production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations. INRA-paris, 26, 65-66, 72, 97, 100, 138-139, 145p.
- Sagare, A.P., Suhasini, K. and Krishnamurthy, K.V (1995).** Histology of somatic embryo initiation and development in chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Plant Sci*. 109: 87-93.
- Saha, S., M. Ahmed M. M. I, Remmeand, R. N. M., & Ali .R (2013).** Effect of different levels of sucrose on microtuberization and different substrates on minituber production resulted from potato meristem culture. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 4 (6): 58-62.
- Samad, H A, Mehran, E., Shariatpanahi, R.A., Mona, E., Mahnaz, O., Ghorbanali, N.T., Seyed A. S. N & Erwin, H-B (2011).** Effect of 2, 4-D as a Novel Inducer of Embryogenesis in Microspores of *Brassica napus* L. *Genetic and Plant Breeding*. 47 (3): 114-122.
- Sarker R.H. & B.M. Mustafa (2002).** Regeneration and *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation of two indigenous Potato varieties of Bangladesh. *Plant. Tissues. Culture*. 12(1): 69-77.
- Syedardalan, A & David, W.M. L. (2015).** Microtuber formation in potato callus. *Science Asia*. 41: 1-4.

- Shahab-ud-din., Sultan, I. N., kakar, M.A., Yousafzai, A., Sattar, F. A., Ahmmad, F., Ibrahim, S. M., Hassanullah, M., & Arif, B (2011).** The Effects of Different Concentrations and Combinations of Growth Regulators on the Callus Formation of Potato (*Solanum tuberosum*) Explants. *Current Research Journal of Biological Sciences*.3: 499-503.
- Shahin, A. E & Kaneko, K (1986).** Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of non bulbing onions. *Horticultural Science*. 21: 294-295.
- Sharma, S.K. and Millam, S (2004).** Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum*: A histological examination of key developmental stages. *Plant Cell Reports*. 23: 115-119.
- Sharma, S.K, Bryan G.J, WinWeld M.O, Millam, S (2007).** Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta*; 226:1449–1458. Doi: 10.1007/s00425-007-0583-2.
- Shirin, F., Hossain, M., Kabir, M. F., Roy, M., & Sarker S. R (2007).** Callus Induction and Plant Regeneration from Internodal and Leaf Explants of Four Potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. *World J. Agric.Sci*. 3: 01-06.
- Steward, F. C & S. M. Caplin (1951).** A tissue culture from potato tubers, The synergistic action of 2,4-D and coconut milk, *Science*, Vol.113, pp.518–520.
- Siddra, I, Saba, I & Manzoor Khan T(2016).** Protocol Optimization for In Vitro Regeneration System in Frost Sensitive Potato Genotypes: As a Basis for Genetic Transformation Studies in *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiology and Biochemistry*. 4:2
- Silvertand, B., van Rooyen, A., Lavrijsen, P., van Harten, A. M., & Jacobsen, E (1996).** Plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures derived from zygotic embryos of leek (*Allium ampeloprasum*). *Euphytica*.91(3) : 261–270.
- Skirvin, R.M. Lam, S.L & Janick, J.(1975).** Plantlet formation from potato callus *in vitro*. *Horticultural Science*. 10: 413.
- Skoog, F & Miller, C.O. (1957).** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 11: 118–130.

- Soumahoro, B. A., Kone, M., Kouassi ,K.M., Koffi ,K. E., Kone, T., Kouakou, T.H., Kouadio, Y. J (2015).** Effects of plant growth regulators and carbohydrates on callus induction and proliferation from leaf explant of *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenacea) . *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 8 (2): 118-127.
- Steward, F.C., Mapes, M.O, & Mears, K (1958).** Growth and development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*. 45: 705–708
- Sultana, U., Shimasaki, K., Monjurul, A., & Meskatul A. Md (2014).** Effects of different light quality on growth and development of protocorm-like bodies (PLBs) in *Dendrobium kingianum* cultured *In vitro*. *Bangladesh research publication journal*. 10 (2): 223-227.
- Tan, S.H., R. Musa., & A. Ariff, M (2010).** Effect of plant growth regulators on a callus, cell suspension and cell line selection for flavonoid production from pegaga (*Centella asiatica* L. urban) *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 6: 284-299.
- Afshari, T.R. Angoshtari,R & Kalantari,S (2011).** Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. *Journal of Plant Omics*. 4(2):60-67.
- Tayazza, M., Lucioli, A., Ancora, G. & Benvenuto, E. (1989).** cDNA cloning of artichoke mottled crinkle virus RNA and localization and sequencing of the coat protein gene. *Plant Molecular Biology* 13: 685-692.
- Tek AL., Stevenson WR., Helgeson JP., & Jiang, J. (2004).** Transfer of tuber soft rot and early blight resistances from *Solanum brevidens* into cultivated potato. *Theoretical and Applied Genetics*.109:249–254.
- Teresa, E.V., Eva, D. G., & O. Maira. (2005).** Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures: Histological analysis and extracellular protein patterns. *Journal of Plant Physiology*. 162: 449-456.
- Teresa, Y.U., EwaHanus, F., & Adam, Ś (2007).** Effect of light wave length on *in vitro* organogenesis of a *Cattleya* hybrid . *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*.49 (1): 113-118.
- Tourte, Y., Bordonneau M & henry, M (2005).** Le monde des végétaux, organisation, physiologie et génétique .édition Dunod .p 384.
- Udhaya, A., Peter, G. A., & Arun, N. (2012).** Effect of growth hormones on callus induction of *Sauropus androgynous* (Sweet shoot) .*Annals of Biological Research*. 3: 4668-4674.

- Uhrig, H (1985).** Genetic selection and liquid medium conditions improve the yield of androgenetic plants from diploid potatoes. *Theoretical and Applied Genetics*. 71: 455-460.
- Val, R. (2004).** Role of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in: somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of Arabidopsis: Cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. *American Journal of Botany*. 91(11): 1743-1756.
- Vargas, T. E., Eva, D. G & Maira, O (2005).** Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures: histological analysis and extracellular protein patterns. *Journal of Plant Physiology*. 162: 449-456.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Fillonova, L. (2002).** Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69 (3):233-249.
- Wang P, Hu C (1982).** In vitro mass tuberization and virus free seed potato production in Taiwan. *American Journal of Potato*. 59:33-37.
- Warren, K. C., Danielle, J. D., & Shirlyn, E. (2001)** Coleman Potato Microtubers as Research Tools: A Review. *American Journal of Potato Research*. 78:47-55.
- Weiguo, F, Pingping, L, Yanyou, W & Juanjuan, T (2012).** Effects of different light intensities on anti-oxidative enzyme activity, quality and biomass in lettuce. *Horticultural Science*. 39(3): 129-134.
- Wendy, A. P. (2013).** From perception to attenuation: auxin signalling and responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 23:561-568.
- Westcott, R. J., G. G., Henshaw & W. M., Roca, (1977).** Tissue culture storage of potato germplasm: Culture initiation and plant regeneration. *Plant Science. Letters*. 9: 309–315.
- White, P.R. (1939).** Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *American Journal of Botany*. 26: 59-64.
- William, G. H (2003).** Physiologie végétale Debeok université, Bruxelles 532p
- Winarto, B., Nurhayati, A M., Agus, P., and Budi, M.(2010).**Improvement of Selected Induction Culture Media on Callus induction in Anther Culture of Anthurium and a Histological :Study on its Callus Formation. *Jurnal Natur Indonesia* 12(2): 93-101.
- Yadav, N.R. & M.B. Sticklen. (1995).** Direct and efficient plant regeneration from eaf explants of *Solanum tuberosum* L. cv. Bintje. *Plant Cell reports*. 14:645-647.
- Yasmin, S., Nasiruddin, KM., Begum, R., & Talukder, SK (2003).** Regeneration and stablishment of potato plantlets through callus formation with BAP and NAA. *Asian Journal. Of Plant Science*. 2(12):936-940.

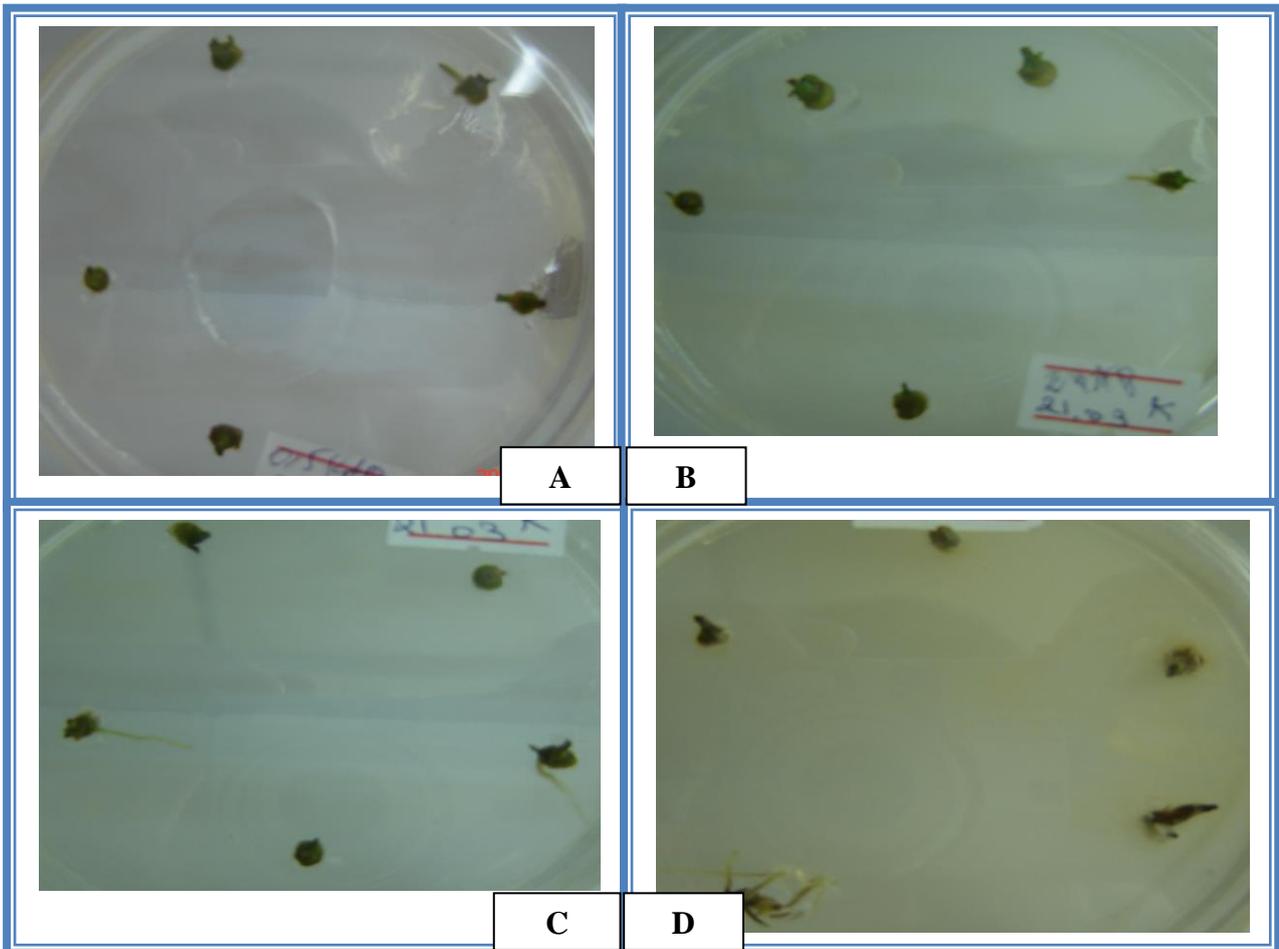
- Yoesef, A.A.R., Suwwan, M.A., Musa, A.M. & Abu-Qaoud, H.A (1997).** *In vitro* culture and microtuberization of spunta potato (*Solanum tuberosum* L.). *Dirasat Agricultural Sciences*.24: 173-181.
- Yu, Y., Ye, W., He, L., Cai, X., Liu, T., & Liu, J (2013).** Introgression of bacterial wilt resistance from eggplant to potato via protoplast fusion and genome components of the hybrids. *Plant Cell Reports*. 32:1687–1701.
- Yves, T (2002).** Génie génétique et biotechnologies : concepts, méthodes et applications agronomiques / Dunod, Paris 241p.
- Zahoor, A.S & Fahee, A (2009).** Effect of thidiazuron (TDZ) on in vitro micropropagation of *Solana tuberosum* LDesiree and Cardinal. *Pakistan Journal of Botany* . 41(4): 1811-1815.
- Zeng, F., Zhang, X., Cheng, L., Hu, L., Zhu, L., Cao, J & Guo, X (2007).** A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics*. 90(5): 620-628.
- Zheng, Y & Konzak, C.F (1999).** Effect of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction and plant regeneration in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*. **19**: 69-73.
- Zimmerman, J.L (1993).** Somatic embryogenesis: a model for early development in higer plant. *Plant cell* .5:1411-1423
- Zouzou, M ., Kouakou, T H ., Koné M., Amani N G ., & Kouadio Y J (2008).** Effect of genotype, explants, growth regulators and sugars on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *Australian Journal of Crop Science*. 2(1): 1-9.

A decorative border resembling a scroll, with a central rectangular frame. The scroll is unrolled on the left side and has small circular details at the top corners.

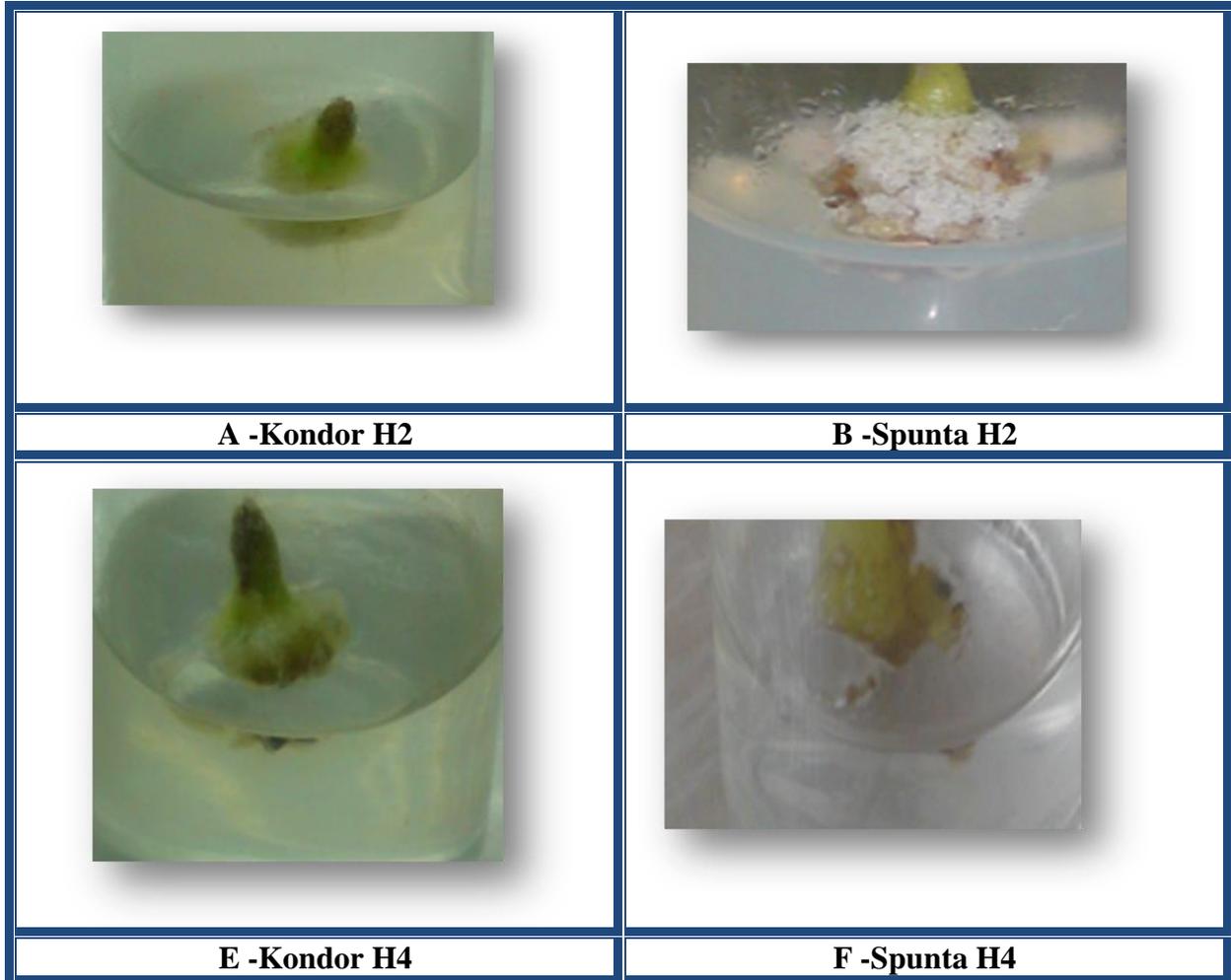
Annexes

Annexe 1

A et B : Début développement des germes de Spunta et Kondor respectivement après une semaine d'incubation sur milieu M1 par gonflement et verdissement (0.5mg/l de BAP).
C,D : Croissance des explants après un mois d'incubation, verdissement et début de développement des racines (**C**:1mg/l BAP avec Kondor, **D**:1mg/l BAP avec Spunta,).

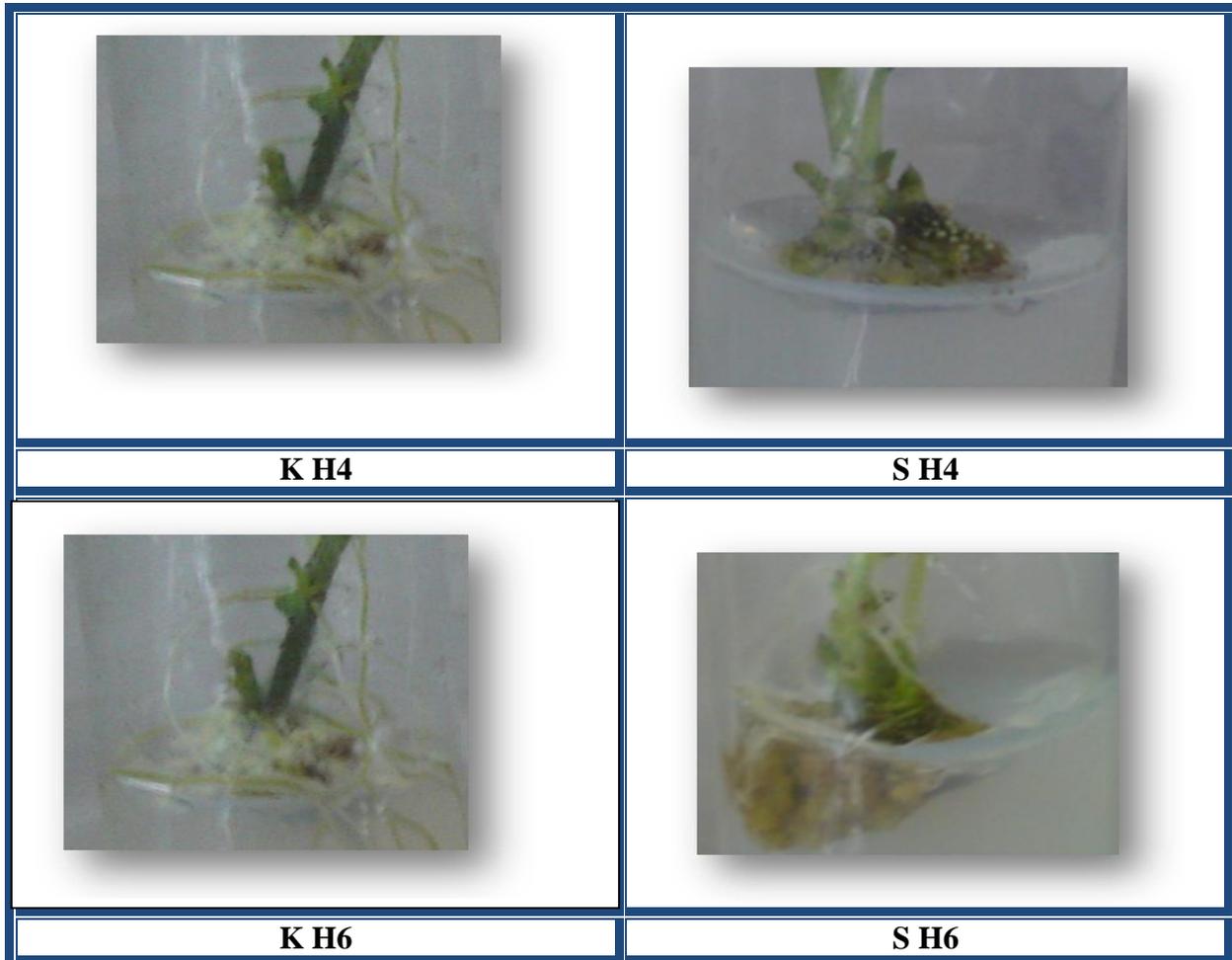


Annexe 2



Influence des différents milieux (**2,4-D** et **2,4-D/BAP**) sur la callogenèse des germes après deux semaines de culture. Les cales de Kondor et Spunta (**A ,B ,E,F**) après deux semaines d'incubation sur milieux (**H2, et H4**) (Gonflement et verdissement des explants et début de formation de cals blancs)

Annexe 3



Influence des différents milieux (**2,4-D** et **2,4-D/BAP**) sur la callogenèse des germes après deux semaines et deux mois de culture. Les cales de Kondor et Spunta (**C,D,E,F**) après deux mois d'incubation sur les milieux (**H4,H6**), les cals prennent des couleurs vert, vert clairs et brun, ainsi formation de bourgeons sur les explants de germes et émission de racines.

Annexe 4

1: Taux de contamination, de brunissement et de réussite pour les deux variétés *Spunta* et *Kondor* sur les différents milieux en présence de (MS+2,4-D).

	Spunta			Kondor		
Milieux de cultures	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3
Taux de contamination	40,74%	21,43%	33,33%	77,5%	11,11%	57,14%
Taux de brunissement	37,04%	7,14%	0%	17,5%	11,11%	14,28%
Taux de réussite	22,22%	71,43%	66,67%	5%	77,78%	28,57%

2-Taux de contamination, de brunissement et de réussite pour les deux variétés *Spunta* et *Kondor* sur les différents milieux en présence de (MS+ NAA/BAP)

variétés	Spunta						Kondor					
Milieux de culture	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Taux de contamination%	58,33	50	0	36.37	60	50	21.43	50	33.33	20	45.46	66.66
Taux de réussite%	41.66	50	100	63.63	40	50	78.57	50	66.66	80	54.54	33.33

Annexe 5

Types de régulateurs de croissance et leur solubilité

Régulateurs		Solvants
Auxines	2-4-D	EtOH ou 1N NaOH
	ANA	1N NaOH
Cytokinines	BAP	EtOH ou NaOH

Annexe 6

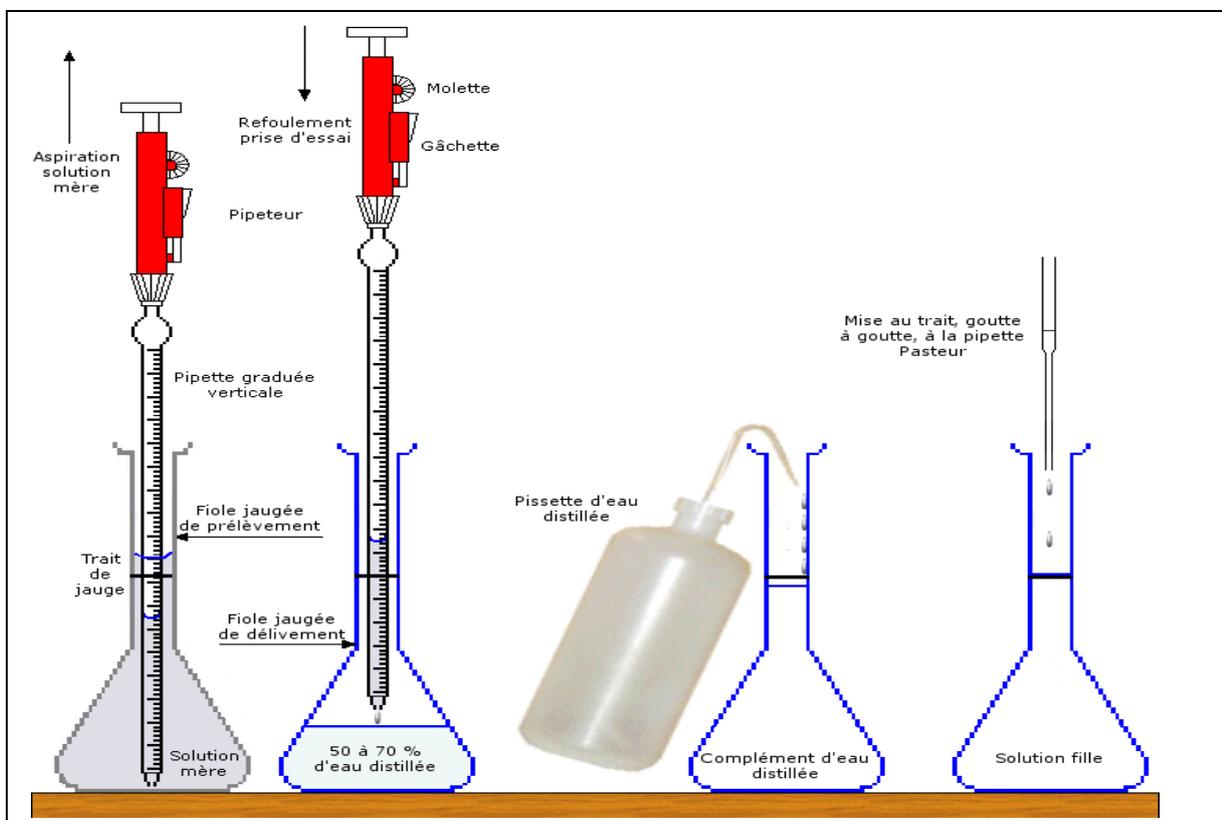
Protocole de dilution d'une solution mère

À partir de la fiole jaugée contenant la solution mère, on prélève du liquide avec la pipette graduée en dépassant le zéro des graduations. On élimine goutte à goutte du liquide jusqu'à ce que le bas du ménisque affleure la graduation zéro de la pipette. On transvase le volume calculé de la prise d'essai de solution mère dans une fiole jaugée contenant de 50 à 70 % du volume final de la solution fille. On agite puis on laisse reposer. À la pissette, on complète avec de l'eau distillée jusqu'à 1 cm en dessous du trait de jauge. On procède à la mise au trait, au goutte à goutte, avec une pipette Pasteur. On bouche et on étiquette

Calcul du volume v de la prise d'essai dans la solution mère:

La dilution n'affecte pas la quantité de matière de soluté: $n' = n \Rightarrow C' \times V' = C \times v \Rightarrow$

$$v = \frac{C' \times V'}{C}$$



Annexe07 : Composition du milieu MS

Les macroéléments 20 X		Concentrations de la solution finale		
Macro-éléments		Solution mère mg/l	Volume à ajouter ml/l	Concentration finale mg/l
NH ₄ NO ₃ (mg)		33 000	50 ml	1650
KNO ₃ (mg)		38000		1900
CaCl ₂ - 2H ₂ O (mg)		8800		440
KH ₂ PO ₄ (mg)		3400		170
MgSO ₄ - 7H ₂ O		7400		370
Solution mère mg/l			Volume à ajouter ml/l	Concentration finale mg/l
Micro-éléments 100X	MnSO ₄ - H ₂ O	2 230	10 ml	22,3
	ZnSO ₄ - 7 H ₂ O	860		8,6
	H ₃ BO ₃	620		6,2
	KI	83		0,83
	Na ₂ MoO ₄ - 2 H ₂ O	25		0,25
	CuSO ₄ - 5 H ₂ O	2.5		0,025
	CoCl ₂ - 6 H ₂ O	2.5		0,025
Acides aminée et vit 10 X	Glycine	20	100 ml	2.0
	Ac. Nicotinique	5		0,5
	Pyridoxine - HCl	5		0,5
	Thiamine - HCl	1		0,1
Myo-inositol		100 mg / l		100 mg / l
Le Fer 100 X	Na ₂ EDTA	3 730	10 ml	37.3
	FeSO ₄ - 7 H ₂ O	2 780		27.8

Improvement of Callogenesis Ability by Selecting a Better Hormonal Balance in Potato (*Solanum tuberosum* L).

Sadek Chahredine *1,2 Nadia Ykhlef2

1Genetics, Biochemistry & Plant Biotechnology Laboratory, University Mentouri Constantine

1, PO Box. 325 road Ain El Bey, Constantine 25017, Algeria

2Department of Ecology and Agronomy, University of Jijel, BP 98 Ouled Aissa, Jijel 18000, Algeria

International Journal for Innovation Education and Research www.ijer.net

Vol:-4 No-09, 2016

Online-ISSN 2411-2933, Print-ISSN 2411-3123 September 2016



Online ISSN	2411-2933
PRINT - ISSN	2411-3123
impact Facteur	2015 - 4.565
Frequence	MONTHLY
Pays	Ba
Liste des bases de données	Index Copernicus, Academia, Research Bible, Internet Archive, Publication List, SSRN, Mendeley, Issuu, Scribd, ORCID, J-Gate

**Etude Des Effets Des Régulateurs De Croissance Sur
Les Stades De Prolifération Et De Développement
De La Pomme De Terre (*Solanum Tuberosum*. L) In
Vitro**

Sadek Chahredine (PhD)

Genetics, Biochemistry & Plant Biotechnology Laboratory, University
Mentouri Constantine 1, Algeria

Department of Ecology and Agronomy, University of Jijel, Algeria

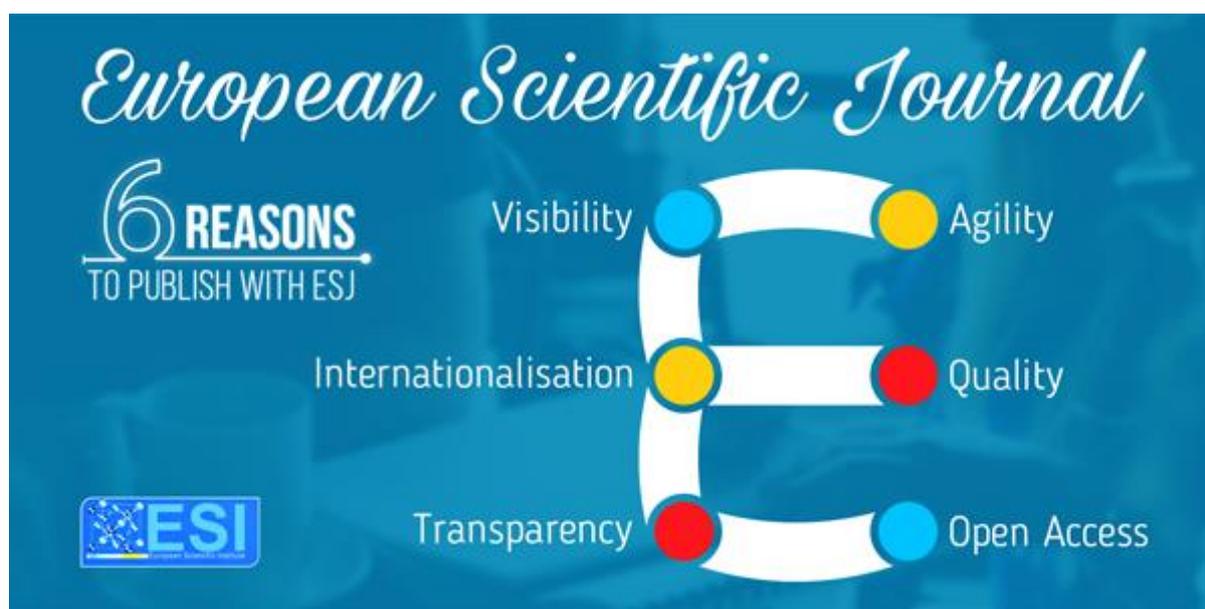
Nadia Ykhlef (Pr)

Genetics, Biochemistry & Plant Biotechnology Laboratory, University
Mentouri Constantine 1, Algeria

doi: 10.19044/esj.2017.v13n24p145 URL:<http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n24p145>

European Scientific Journal August 2017 edition Vol.13, No.24 ISSN: 1857 – 7881 (Print) e -
ISSN 1857- 7431

Website: <http://www.ejournal.org/index.php/es>



Online ISSN	1857 – 7431
PRINT - ISSN	1857 – 7881
impact Facteur	2015, 0.654
Frequence	Monthly
Pays	Macedonia
<u>Liste des bases de données</u>	<u>Google Scholar</u> , <u>EBSCO</u> , <u>ProQuest</u> , <u>Open J gate</u> , <u>Index Copernicus</u> , <u>Gale's Academic Databases</u> , <u>Ulrich's</u> , <u>Electronic Journals Library</u> , <u>Scirus</u> .

Nom & prénom: Chahredine Sadek

Date de soutenance :

Thème: Amélioration de l'aptitude à l'embryogenèse somatique par la sélection de meilleurs équilibres hormonaux chez pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*)

Nature du diplôme: Biotechnologies végétales

Option : Biotechnologies végétales

Résumé

L'objectif principal de cette mémoire est de d'étudier la réponse des différents explants de pomme de terre Spunta et Kondor à la callogenèse et l'embryogenèse somatique en présence des combinaisons avec NAA/BAP et 2,4-D/BAP. Nous avons opté dès le départ pour les bourgeons et les entrenœuds comme explants. La couleur et la texture des cals varient selon la nature des régulateurs de croissance et la présence ou l'absence de lumière. Avec la combinaison NAA/BAP la variété Spunta développe la meilleur callogénèse dans tous les milieux par rapport à la variété Kondor en fonction de la concentration des hormones, il existe une gamme de variations de jours nécessaires pour cals initiation, le pourcentage des explants qui ont développé des cals, la texture, la couleur et le degré de sa formation. Pour la combinaison 2,4-D/BAP les résultats indiquent qu'après trois semaine de culture, que les cals sont d'apparence humide, molle et friable de couleurs vert et vert blanchâtre et blanc avec la combinaison NAA/BAP, et de couleur de couleur vert, vert-clair et brun pour les deux explant avec tous les milieux avec la combinaison 2,4-D/BAP .La croissance des cals varie selon les conditions de culture à savoir la lumière et la température, les cals incubé à l'obscurité donnent des couleurs brun et une structure friable à compacte, tandis que les cals incubé à la lumière présentent des couleurs variable (vert, vert-clair ,blanc et brun) qui sont due à l'action de la lumière sur les pigments photosynthétiques. Le taux de callogenèse et le poids frais des cals sont corrélation positivement avec la concentration des de l'auxine. L'étude histologique de cal obtenu à partir d'explants internodale après 3 et 60 jours montre que la division cellulaire est produite dans l'épiderme seulement après trois jours de culture puis s'étendue à la première couche du cortex. Pendant l'embryogenèse somatique les cals des différents explants développent avec tous les milieux (1-2) bourgeons et des racines denses. Dépassant trois mois d'incubation les cals sont plus volumineux et commencent à brunir et perd la couleur verte après dégradation de la chlorophylle. Une observation surprenante dans notre étude qui est la formation de microtubercules à partir des cals des germes de tubercules sur milieu M1 et M2 après 37 à 60 jours d'incubation.Cette recherche a permis de mettre en évidence les conditions nécessaires à la callogenèse et l'embryogenèse somatique. En fin il est recommandé d'essayer d'induire l'embryogenèse somatique en appliquant un stress (osmotique, avec des ions, ABA..), avec l'ajout de source de nitrogènes organique et minérale pour une période dépassant trois mois.

Mots clés : NAA/BAP, embryons somatiques, 2,4-D/BAP, Callus, *Solanum tuberosum L.*

Laboratoire de recherche: Lab/Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales_ Université Constantine1

Devant le jury d'évaluation :

Président : Mr DEHIMET Laid Prof Université de Mentouri- Constantine1

Encadreur : Mme YEKHLEF Nadia Prof Université de Mentouri- Constantine1

Examineurs :

Mr YAHIA Abdelouahab Prof Centre universitaire Abdelhafid-Boussouf - Mila

Mr BENDERRADJI Laid MCA Université Mohamed Boudiaf - M'Sila

Mme BOUATROUSSE Amina MCA Université Mohamed Khider- Biskra

Mme BOUSBA Ratiba MCA Université des frères Mentouri-Constantine1