
Soumis le : 06 Juin 2011

Forme révisée acceptée le : 24 Janvier 2012

Email de l'auteur correspondant :

ferdaousmani78@yahoo.fr

Effet du saccharose sur la tubérisation *in vitro* de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.)

MANI Ferdaous^a, MHAMDI Mahmoud^a, BETTAIEB Taoufik^b, HANNACHI Chérif^a

^a Institut Supérieur Agronomique Chott Mariem, Chott Mariem, Sousse, 4042, Tunisie

^b Institut National Agronomique de Tunisie, Adresse : 43 Avenue Charles Nicolle, Tunis- Mahragène, 1082, Tunisie

Résumé

Des extrémités apicales de pomme de terre, variété Spunta, mises en culture pendant 4 semaines sur le milieu de Murashige et Skoog (MS), additionné de saccharose (30 g. L⁻¹), d'agar (7 g. L⁻¹) et d'AIB (0,5 mg. L⁻¹), ont régénéré des plantes entières. Les boutures de têtes et boutures de nœuds, prélevées sur ces plantes, ont tubérisé sur le milieu MS liquide dilué de moitié (MS/2), additionné de BA (5 mg. L⁻¹) et de différentes concentrations de saccharose (40, 80, 120 et 160 g. L⁻¹). La concentration 80 g. L⁻¹ de saccharose a donné le meilleur rendement en microtubercules (nombre de microtubercules /plante).

Mots clés: *Solanum tuberosum* L.; régénération ; micropropagation ; tubérisation ; *in vitro* ; saccharose.

Abstract

Apical extremities of potato variety Spunta, cultivated during 4 weeks in Murashige and Skoog medium (MS), added of sucrose (30 g. L⁻¹), agar (7 g. L⁻¹) and IBA (0, 5 mg. L⁻¹), were regenerated plants. Microcuttings, taken from these plants, were tuberized in MS liquid medium halfly diluted (MS/2) without agar, containing BA (5 mg. L⁻¹) and different concentrations of sucrose (40, 80, 120 and 160 g. L⁻¹). The best yield of microtubers (number of microtubers/plant) is obtained with 80 g. L⁻¹ of sucrose.

Keywords: *Solanum tuberosum* L.; regeneration; micropropagation; tuberization; *in vitro*; sucrose.

1. Abréviations

AIB: Acide-β-Indole butyrique

BA : Benzyladénine

2. Introduction

La pomme de terre est la quatrième production végétale alimentaire dans le monde, après les trois principales céréales: le blé, le riz et le maïs. Elle est cultivée sur environ vingt millions d'hectares, avec une production de l'ordre de trois cent millions de tonnes [1]. En Tunisie, la pomme de terre constitue un secteur stratégique. Sa production est issue de 4 saisons de culture: Arrière saison (15 août – 15 décembre), extra-primeur (octobre – janvier), primeur (novembre – février) et saison (mars – juin). Selon le GIL [2], 25 mille hectares

ont donné 360 mille tonnes, soit un rendement de 14,4 t/ha. Cependant, les semences certifiées (sans parasites) locales (5170 t en 2010) ne couvrent pas tous les besoins de ces quatre types de culture. D'où le recours aux importations (24 000 tonnes). Donc, l'augmentation des quantités des semences locales s'impose. Pour des raisons phytosanitaires, la technique de production doit passer par la culture *in vitro* de vitroplants donnant des microtubercules sains de virus. Ces microtubercules sont acclimatés en (serre insect-proof) puis multipliés en plein-air sous contrôles strictes pour obtenir des semences certifiées. Ainsi, le présent travail examine l'amélioration du rendement en microtubercules *in vitro* des plants de pomme de terre (Var. Spunta) régénérés à partir d'extrémités apicales, sur le milieu MS en présence de différentes concentrations de saccharose.

3. Matériel végétal

Les tubercules de pomme de terre utilisés dans cette étude appartiennent à la variété Spunta, (Béa x USDA x 96-95). Cette variété d'origine néerlandaise, inscrite dans le catalogue de l'INRAT est caractérisée par son bon rendement. Ses tubercules sont très gros, oblongs, allongés, peu sensibles au noircissement interne, aux bourgeons très superficiels, à peau jaune pâle et lisse et à chair jaune- pâle. Les germes du tubercule sont de couleur bleu violacé, à pointes vertes, plus colorés à la base et de faible pilosité [3].

Les tubercules de cette variété sont mis à germer à température ambiante pendant 20 jours. Les germes obtenus mesurant 5 à 10 cm de long ont servi au prélèvement des extrémités apicales et à la régénération de plantes entières. Ces plantes, âgées de 4 semaines et indemnes de virus (test ELISA), ont servi au prélèvement des boutures de têtes (2 cm de longueur et possèdent deux feuilles vraies), et des boutures de nœuds (2 cm et un nœud axillant une vraie feuille). Les plantes issues de ces deux types de boutures sont utilisées pour la production de microtubercules *in vitro*.

Les analyses statistiques des données relatives aux paramètres mesurés ont été effectuées avec le logiciel SAS moyennant la Proc GLM (Model Linéaire General) avec le test SNK de comparaison des moyennes.

4. Conditions environnementales

Dans la chambre de culture, la croissance des plantes est faite à une température de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, une photopériode de 16 h de lumière et une intensité lumineuse de $24 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La tubérisation de ces plantes est effectuée à l'obscurité totale et à cette même température.

5. Recipients et milieu de culture

Les extrémités apicales sont cultivées dans des tubes à essai en verre pyrex (200 mm de longueur, 20 mm diamètre, 25 mL de volume). La culture des boutures et des vitroplants est réalisée dans des bocaux en verre d'une capacité de 380 mL, obturés par des couvercles en plastique. Le milieu de culture est le milieu de Murashige et Skoog [4], autoclavé à 120°C , pendant 30 min à une pression de 1 bar, son pH est ajusté à 5,8 par des solutions de NaOH et HCl (1N), puis solidifié par l'agar (7g. L^{-1}). Le volume de milieu est de 10 mL/tube et 120 mL/bocal.

6. Approche méthodologique

Les extrémités apicales des germes de tubercules de pomme de terre sont cultivées en présence de différentes concentrations d'AIB (0 ; 0,5 ; 1 et $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Pour chacune de ces concentrations, 12 explants sont mis en culture, à raison d'un explant par tube à essai. Les boutures de têtes et les boutures de nœuds, prélevées sur les plantes régénérées, sont mises à tubériser dans le milieu MS/2, liquide en présence de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA et de différentes concentrations de saccharose (0, 40, 80, 120 et $160 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Par la suite, les plantes ayant donné la meilleure tubérisation à la concentration $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de saccharose associé à $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA, sont cultivées sur le même milieu MS/2, à l'état liquide (sans agar), solide ($7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'agar) et semi-solide (MS solidifié par $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'agar + MS/2 sans agar). Chaque concentration de saccharose et chaque état du milieu de culture est représenté par 10 bocaux à raison de 7 plantes/bocal.

Au cours de la culture, le nombre d'extrémités apicales évoluées en plantes entières, en cals enracinés ou nécrosés sont comptées pour chaque concentration. Le nombre de plantes ayant tubérisé, le nombre de microtubercules/plante, les poids frais et secs de microtubercules, le diamètre du microtubercule et le nombre d'yeux/tubercule sont déterminés.

7. Résultats

7.1. Régénération des plantes

Après quatre semaines de culture, les extrémités apicales ont évolué en plantes entières, en cals enracinés ou en cals nécrosés (Tab. 1). En effet en absence d'AIB, la régénération fait défaut. Alors qu'en présence d'AIB, les extrémités apicales ont donné des plantes (Fig. 1). Le meilleur taux de régénération (52%) est obtenu à la concentration de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Dans ce cas, les plantes sont botaniquement entières: tiges à entrenœuds longs, feuilles de couleur vert sombre et racines adventives fasciculées. Mais, 12 % des extrémités apicales ont développé des pousses présentant un cal à leur base, de couleur vert-gris et de forme sphérique et 36% des explants sont nécrosés, cals de couleur noire.

Les plantes enracinées sont multipliées par microbouturage et au stade 12 feuilles elles sont mises à tubériser (Fig.2.).

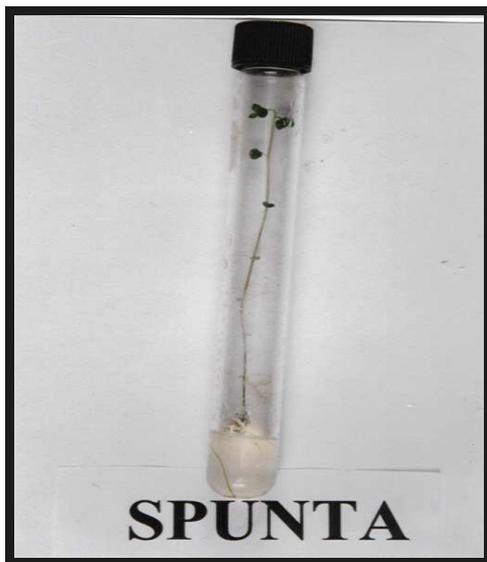


Fig. 1 : Plant de pomme de terre issu des extrémités apicales (Variété Spunta), cultivé sur le milieu MS enrichi en AIB ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), en saccharose (30 g.L^{-1}) et solidifié par l'agar-agar (7 g.L^{-1}).

Conditions de l'expérience : Température : $24 \pm 1^\circ\text{C}$, photopériode : 16 h, Intensité lumineuse : $24 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$



Fig. 2 : Vitroplants (Variété Spunta), cultivés sur le milieu MS enrichi en saccharose (30 g.L^{-1}) et solidifié par l'agar-agar (7 g.L^{-1}), stade 12 feuilles, mis à tubériser.

Conditions de l'expérience : Température : $24 \pm 1^\circ\text{C}$, Photopériode : 16 h, Intensité lumineuse : $24 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

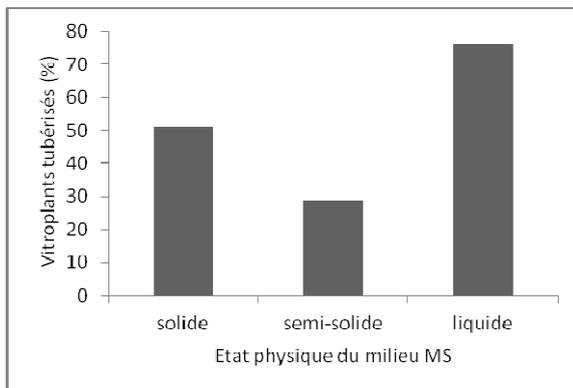


Fig. 3 : Effet de l'état physique du milieu de culture (MS) sur la capacité de tubérisation des vitroplants (stade 12 feuilles) cultivés sur milieu MS et ayant tubérisé au bout de 5 semaines.

Conditions de l'expérience : Température : $24 \pm 1^\circ\text{C}$, Obscurité totale.

Légende Solide : agar-agar = 7 g.L^{-1} ;

Liquide = Agar-agar = 0 g.L^{-1}

Semi-solide = double phases: solide (Agar-agar = 7 g.L^{-1}) + liquide (agar-agar : 0 g.L^{-1})

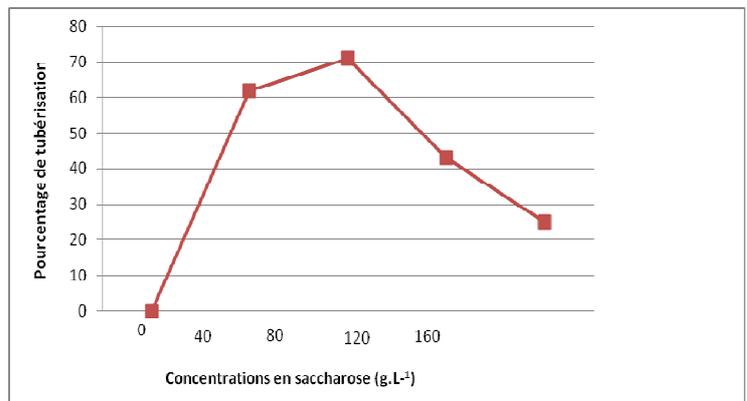


Fig. 4 : Effet du saccharose sur la tubérisation de la pomme de terre, variété Spunta. Milieu de culture MS/2 liquide + BA (5 mg.L^{-1}).

Conditions de l'expérience : Température : $24 \pm 1^\circ\text{C}$, Obscurité totale: 5 semaines.



Echelle : 1/2

Fig. 5: Microtubercules de pomme de terre, variété Spunta, récoltés sur des vitroplants, pesant 50 à 104 mg).

Conditions de l'expérience : Milieu de culture : MS/2 liquide + BA (5 mg. L^{-1}) + Saccharose ($20 \text{ à } 80 \text{ g. L}^{-1}$) ; Température : $24 \pm 1^\circ\text{C}$, Obscurité totale : 5 semaines.



Echelle : 1/2

Fig. 6 : Vitroplants de pomme de terre (variété Spunta), cultivés sur le milieu MS/2 (A), liquide contenant 5 mg. L^{-1} de BA et 80 g. L^{-1} de saccharose, produisant des microtubercules (B) après 5 semaines de culture.

Conditions de l'expérience : Température : $24 \pm 1^\circ\text{C}$, Obscurité totale: 5 semaines.

7.2. Effet de l'état physique du milieu de culture sur la tubérisation

Quelque soit l'état physique du milieu de tubérisation (solide, semi-solide ou liquide) les plantes tubérisent. Le pourcentage de tubérisation varie de 29% (milieu semi-

solide) à 76% (milieu liquide). Le pourcentage de tubérisation enregistré pour le milieu solide est de 51% (Fig.3).

7.3. Effet du saccharose sur la tubérisation

Les plantes cultivées pendant 5 semaines dans le milieu MS liquide sont capables de tubériser, mais leur tubérisation dépend de la concentration du saccharose (Fig. 4 et 5). En effet, en absence de saccharose dans le milieu de culture, les plantes ne tubérisent pas. Par contre, en présence de saccharose, elles produisent de microtubercules. Le pourcentage de plantes tubérisées a atteint 70% à la concentration de 80 g.L⁻¹. Au-delà de cette concentration, le pourcentage de tubérisation chute à 25% avec la plus forte concentration (160 g.L⁻¹). La figure 2 montre que la tubérisation a concerné plus particulièrement la base des tiges et la taille du tubercule diminue en fonction de la hauteur du vitroplant.

Le plus grand nombre de microtubercules produits par plant (près de 14 unités/plant) est obtenu à la concentration 80 g.L⁻¹ (Fig. 6 et Tab. 2). Soit 8051 microtubercules par litre de milieu de culture. Mais au-delà de 80 g.L⁻¹ de saccharose, le rendement en microtubercules diminue significativement en fonction de la concentration, le plus faible nombre de microtubercules (6 unités/plant) est obtenu à 160 g.L⁻¹.

Les plantes qui ont donné le plus grand nombre de microtubercules (cultivées en présence de 80 g.L⁻¹ de saccharose) se sont également caractérisées par la production des plus gros microtubercules (Fig. 5). En effet, leur poids frais (103,73 mg) dépasse significativement celui produit par le reste des autres plantes. Dans ce cas, le rendement par plant est de 1,4 g de microtubercules/plante. Ceci équivaut à 83 g de microtubercules/L de milieu de culture. Ceci est aussi valable pour le poids sec du microtubercule. Les microtubercules ayant le plus gros diamètre (1,74 cm.) à 80 g.L⁻¹ de saccharose pèsent 14,43 g de matière sèche. Cependant au-delà de cette concentration, le diamètre du microtubercule diminue significativement.

Tableau 1.

Pourcentage des extrémités apicales (EA.) des germes de tubercules de pomme de terre, variété Spunta, évoluées en plantes entières ou en cals (enracinés ou nécrosés).

AIB (mg. L ⁻¹)	0	0,5	1	2
EA. évoluées en plantes entières (%)	0	52	13	11
EA. évoluées en cals enracinés (%)	0	12	0	0
EA. évoluées en cals nécrosés (%)	100	36	87	89

Conditions de l'expérience : 4 semaines de culture, température: 24°C, Photopériode 16 h. Milieu de culture MS + 30 g. L⁻¹ de saccharose + 7g. L⁻¹ d'agar.

Tableau 2.

Effet de la concentration en saccharose sur la tubérisation de pomme de terre, variété Spunta.

Saccharose (g.L ⁻¹)	Microtubercules			
	Nombre /plante	Poids frais (mg)	Poids sec (mg)	Diamètre (cm)
0	0	0	0	0
40	4,40 ^c ± 1,93	73,53 ^b ± 13,86	7,47 ^b ± 1,7	1,47 ^b ± 0,14
80	13,83 ^a ± 1,60	103,73 ^a ± 7,79	14,43 ^a ± 0,4	1,74 ^a ± 0,57
120	4,56 ^c ± 2,47	50,33 ^d ± 15,18	7,17 ^b ± 2,12	1,12 ^c ± 0,19
160	6,00 ^b ± 4,30	53,6 ^c ± 24,02	7,61 ^b ± 3,37	1,41 ^b ± 0,38

Les moyennes de la même colonne suivies de la même lettre ne diffèrent pas entre elles au seuil $\alpha = 0,01$.

Les paramètres sont examinés sur 70 vitroplants/concentration de saccharose. Le poids frais, le poids sec et le diamètre des tubercules sont examinés sur 300 microtubercules pour chaque concentration de saccharose.

Conditions de l'expérience : Température : 24°C et obscurité totale pendant 5 semaines. Milieu de culture MS/2 + BA (5 mg.L⁻¹).

8. Discussion

L'évolution des extrémités en plantules entières (tiges, racines et feuilles) a également été obtenue par d'autres auteurs [5] dans le milieu MS chez cette même variété (Spunta). Toutefois, l'aptitude à la régénération dépend de la concentration de l'hormone (AIB) présente dans le milieu de culture ; en effet, la concentration 0,5 mg.L⁻¹ d'AIB a donné le meilleur taux de régénération (52%). Cette même concentration est recommandée pour la régénération des extrémités apicales des espèces à bulbes comme le glaïeul [6].

Certaines de ces extrémités apicales n'évoluent pas en plantes entières et donnent plutôt des cals nécrosés et enracinés (48%). Cette nécrose est un phénomène physiologique qui serait causé par l'appauvrissement du milieu de culture en éléments nutritifs. Elle peut également être due à l'oxydation des composés polyphénoliques sécrétés par les cellules [7], ou la production de l'éthylène par les cellules du cal, c'est le cas du carroubier [8] et de l'œillet [9], ce qui provoque la mort des cellules.

Les plantes ainsi régénérées ne peuvent tubériser qu'en présence de saccharose. Toutefois, le rendement en microtubercules dépend de l'état physique du milieu de culture. Ainsi, le meilleur résultat est obtenu en milieu liquide. En effet, l'agar-agar dans certaines conditions du milieu, peut entraver la tubérisation. En effet, l'acide alginique et le D-mannitol, contenus dans l'agar-agar chélatent les éléments minéraux et empêcheraient leur absorption ce qui évite l'accumulation de l'amidon et par conséquent la formation du tubercule [10 ; 11]. De même la présence de sucre dans le milieu de culture est

obligatoire. Son hydrolyse permet la synthèse et l'accumulation de l'amidon et de la patatine via les enzymes cytoplasmiques impliquées dans le métabolisme du saccharose (saccharose phosphate synthase (SPS), saccharose synthase (SuSy) et Invertase) [12 ; 13].

De même, la présence du sucre est obligatoire pour la tubérisation, mais il peut être un facteur limitant à certaines concentrations. En effet, la variation de la concentration de saccharose (40 à 160 g.L⁻¹) montre que le meilleur rendement est obtenu à 80 g.L⁻¹ (microtubercule pesant 104 mg, 14 microtubercules/plants). Les faibles concentrations (40 et 60 g.L⁻¹) ne sont pas suffisantes pour permettre une bonne tubérisation [14]. Donc, les teneurs en glucose et en fructose deviennent insuffisantes pour stimuler les hexokinases, impliquées dans la phosphorylation de ces deux hexoses [15]. Par conséquent, la tubérisation est réduite. Par ailleurs, les fortes concentrations (120 et 160 g.L⁻¹) aboutissent également à une diminution de la tubérisation (poids frais faible du microtubercule, nombre de microtubercules/plante réduit) qui est due non seulement à la diminution de l'activité de l'invertase mais également celle de la SuSy et de la SPS [16 ; 17].

9. Conclusion

La culture de pomme de terre *in vitro*, variété Spunta, montre que les extrémités apicales peuvent évoluer en plantes entières (52%) lorsqu'elles sont cultivées sur le milieu MS solidifié par l'agar-agar (7 g.L⁻¹), enrichi de saccharose (30 g.L⁻¹) et en présence de 0,5 mg.L⁻¹ d'AIB. Les plantes, ainsi régénérées, tubérisent à l'obscurité sur le milieu MS/2 liquide et la meilleure tubérisation (nombre de microtubercules/plante, poids frais et poids secs des microtubercules/plante, diamètre du microtubercule) est obtenue en présence de 80 g.L⁻¹ de saccharose et 5 mg.L⁻¹ de BA. Cette capacité de tubérisation peut être encore améliorée si à ce même milieu de tubérisation seront testées d'autres substances stimulatrices de la tubérisation, tels que le paclobutrazol ou l'ancymidol.

10. Références

- [1] Ellisseche D., 2001. Aspects physiologiques de la croissance et du développement ; In: la pomme de terre. INRA Editions 71-124.
- [2] GIL. 2010. Multiplication des semences de pomme de terre.1. Le projet national de production de semences de pomme de terre <http://www.gil>
- [3] Daami-Remadi M. et Mahjoub M., 2006. Présence en Tunisie de *Fusarium sambucinum* résistants aux benzimidazoles : Développement *in vitro* et agressivités sur tubercules de pomme de terre. *Biotec. Agrono. Soc. Env.* 10 (1), 7-16.
- [4] Murashige T. et Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant. Physiol.*, Vol 15 ; 473-497.
- [5] Hannachi C., 1997. Amélioration de la tolérance de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) à la salinité (NaCl) par voie biotechnologique. Thèse d'état en Sciences Agronomiques et Biologies appliquées. Faculté de Sciences Agronomique de GENT.
- [6] Bettaieb T., Denden M., Hajlaoui I., Mhamdi M. et Methlouthi M., 2007. Multiplication et bulbaïson *in vitro* du glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) *Tropicultura*, 25 (4), 228-231.
- [7] Le C. et Thomas D., 2009. Production de microtubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) *Revue Suisse Agric.*, 41 (5), 289-293.
- [8] Gharni N. et Ennabili A., 2011. Essais préliminaires de culture *in vitro* du caroubier (*Ceratonia siliqua*) originaire du nord ouest du Maroc. *Biomatech Echo*, 3 (6) , 18-25.
- [9] Haouala F., Hannachi C. et Zid E., 2003. Exploitation de la variabilité somaclonale pour la recherche d'oeillet (*Dianthus caryophyllus* L.) tolérants à la salinité. *Tropicultura* 21 (1) 16-21.
- [10] Kamarainen-Karpinnen T., Virtanen E., Rokka V. et Pirttilä A. , 2010. Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers. *Plant Cell Tiss. Et Org. Cul*, 101, 245-249.
- [11] Mercier M., Laffite C., Borderies G. et Fournier G., 2001. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor for plant defense. *New Phytologist*, Vol. 149 , 43-51.
- [12] Roitch T., et Ehness R., 2000. Regulation of sucrose/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regul.* N°32: 359-367.
- [13] Du Jardin Y., Hdider C. et de Rick J., 1995. Carbon nutrition *in vitro* regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated system. *Automaten and environmental control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht p: 411-471.
- [14] Iraqi D., Le V., Lamhamedi S. et Tremblay F., 2004. Sucrose utilization in black spruce. Involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium. *Journal of Plant Physiology* 162, 115-124.
- [15] Farrar J., Pollock C. et Gallagher J., 2000. Sucrose and the integration metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154, 1-11.
- [16] Roitsch T. et Gonzalez M. , 2004. Function and régulation of plant invertases, sweet sensation. *Trends in Plant Science* 9, 606-613.
- [17] Chicinska I., Lieshe J., Krugel U., Mikalsa J., Geigenberg J. et Khun C., 2008. Sucrose transporter ST SUTL from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance Response. *Plant Physiology* 146, 515-528.