

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



MEMOIRE pour l'obtention du DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES

présenté à la Faculté des Sciences et Techniques
Département de Biologie Végétale

par

ALIOUNE DIALLO
Maître ès-Sciences

SUJET:

MICROPROPAGATION ET REGENERATION *IN VITRO* DE
QUELQUES VARIETES DE PATATE DOUCE (*IPOMOEA batatas*
(L) CONVOLVULACEE) CULTIVEES AU SENEGAL

Soutenu le 24 Avril 1996

devant la commission d'examen composée de :

Président: Mr. Papa Ira SAMB Maître de conférence.
Membres: Mr. Alain BORGEL chargé de recherche ORSTOM.
Mr. Alain MBAYE chercheur ISRA/CDH.
Mme Marie Madeleine BARRETO maître de conférence.
Mr Nicolas DIALLO Maître-assistant

REMERCIEMENTS

Ce travail a été entièrement réalisé dans le laboratoire commun, à l'ISRA et à l'ORSTOM, de culture in vitro (URCI) du centre de recherche de Bel-Air.

Le sujet proposé a été traité sous la responsabilité scientifique de M^r. Alain BORGEL, chargé de recherche à l'ORSTOM, de M^r Alain MBAYE, chercheur à l'ISRA/CDH et de M^{me} M.M. BARRETO maître de conférence au département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

Nous tenons à remercier vivement toutes les personnes qui de prêt ou de loin, ont permis la réalisation de ce travail, et en particulier:

M^r. Philippe MATHIEU, Représentant de l'ORSTOM au Sénégal pour avoir accepté notre admission dans votre établissement,

M^r. Amadou Tidiane BA Professeur titulaire, chef du département de biologie Végétale, pour avoir facilité notre admission à l'ORSTOM,

M^r. Alain BORGEL, Chargé de recherche ORSTOM, pour avoir facilité notre accueil dans le laboratoire d'URCI, mais aussi avec la pédagogie et la générosité dont vous avez dirigé ce travail,

M^r. Alain MBAYE Chercheur à l'ISRA, Directeur du CDH, pour avoir accepté de suivre ce travail et de mettre à notre disposition tout le matériel biologique nécessaire, nous avons noté en vous une disponibilité et un grand esprit critique qui nous ont beaucoup aidés dans ce travail,

M^{me} Marie Madeleine BARRETO, maître de conférence au département de Biologie Végétale, pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de diriger ce travail. Nous avons beaucoup apprécié en vous votre patience, votre disponibilité, votre générosité et votre approche pédagogique que vous avez fait montre tout au long de ce travail,

M^r. Papa Ibra SAMB, Maître de conférence au département de Biologie Végétale, pour avoir accepté de présider le jury,

M^r. Nicolas DIALLO, Maître-assistant au département de Biologie Végétale, pour avoir accepté de faire partie du jury.

M^r Jean Paul BRIZARD, pour l'aide que vous nous avez apportée pour la réalisation du document final.

Nous tenons à remercier de tout coeur mes frères Papa Thiama Diallo, Youssoupha Diallo, Birahim Diallo et Papa Bô Diallo, ainsi que leurs épouses respectives, pour leurs soutiens et leurs conseils depuis le début de mes études.

Nos vifs remerciements s'adressent également à M^r. Ténémakha Sidibé, Technicien au CDH et à tout le personnel de l'URCI: Mahecor Diouf, Maurice Sagna, sidy N'diaye, Diaminatou Sanogo, Ousmane MBodj, Talla gueèye, Amy Bâ Diop, Fallou MBengue, Amy Diop, Guilaye Diop, Pierre Sagna, Pierre Claver Munyemana, Khady NDoye NDir, Abdoulaye Dieng, pour avoir été les véritables artisans de ce travail et pour le soutien constant que vous nous avez témoigné durant notre stage.

Nous remercions enfin M^r Abdoulaye Dia et sa famille et tous nos amis avec qui, nous avons vécu des moments faits de rêves, de joies, mais aussi de peines. Ce sont particulièrement, Abdoulaye Diéye, Elimane Gueye, Kodé Tthiaw, Ousmane Guèye, Alioune Badara Cissé, Thierno Diop, Balla Mbaye, Moustapha Dièye, Alioune Fofana, Youssoupha Dièye, Ndeye Safietou Pouye, Cheikh Ndao, Nderaw Hann, Mar Fall Diagne, Ngaye Ndao, Bara Lamine Dièye, Papa Mbodj, Cheikh Moustaha Dièye et mes camarades de L'AEERT.

DEDICACE

A la mémoire de mon père qui nous a donné goût pour la quête du savoir et une bonne éducation.

A mes mères pour leur amour et leur soutien à leur fils.

A mes frères et soeurs pour leur soutien moral et matériel.

A mes cousins et cousines.

A mes neveux et nièces.

A mes belles-soeurs.

A mon ancien professeur de mathématiques, Mr. Ndji fall pour ses conseils.

RESUME

TITRE: Micropropagation et Régénération *in vitro* de quelques variétés de patate douce (*Ipomoea batatas* (L). Convolvulacée) cultivées au Sénégal.

La patate douce: *Ipomoea batatas*, est une culture vivrière de grande importance au Sénégal. Deux problèmes entravent toutefois l'expansion de cette culture. Ce sont des problèmes liés d'une part au faible taux de multiplication obtenu par les techniques de bouturage traditionnelles et d'autre part, à la grande sensibilité de cette plante aux différents pathogènes: champignons, bactéries, nématodes et virus.

L'application des techniques de culture *in vitro*: culture de méristèmes pour l'assainissement et microbouturage pour la production massive a donc été envisagée.

Ce travail a porté sur le genre *Ipomoea batatas* à travers cinq génotypes à savoir les variétés *Ndargu* et *Walo*, le clone 2, le clone 19 et le clone 29, sélectionnés au CDH. A partir de ces génotypes, il a été mis sur place un protocole pour la multiplication conforme de plants de patate douce par microbouturage de noeuds sur milieu M.S. en présence d'ANA, de BAP et du GA₃ avec un pH ajusté à 5,7.

La culture *in vitro* de méristèmes sur des plantes en serre et sur des vitroplants sur milieu MS en présence d'AIA et BAP, a conduit à l'obtention de plantes assainies. L'enracinement des vitroplants a été obtenu sur milieu M.S. avec de l'AIA (0,05mg/l) et de la kinétine (0,5mg/l).

Les capacités embryogènes d'explants de patates douces ont été testés sur milieu MS avec différentes concentrations en 2,4 - D. Ces expériences ont permis la formation de cals, et dans certains cas une néoformation de racines et de bourgeons après transfert sur milieu d'induction sans toutefois produire de structures bipolaires assimilables à des embryons.

Mots clés : *Ipomoea batatas*, *in vitro*, virus, méristème, embryons somatiques.

SUMMARY

Title. Micropropagation and Regeneration *in vitro* for some varieties of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Convolvulaceae) cultivated in Senegal.

Sweet potato: *Ipomoea batatas*, is a media food crop in Sénégal. However, two problems hinder this expansion of this crop, these are problems related to the low rate of multiplication obtained through traditional cutting planting techniques on the one hand and great sensitiveness of that plant to different pathogens on the other hand: mushroom, bacteria, nematodes and viruses.

The application of *in vitro* farming techniques: cultivation of meristem tips for decontamination and microbouturage for massive production, has therefore been envisaged.

this work mainly concern with the *Ipomoea batatas* king through five genotypes namely varieties such as *Ndargu* and *Walo*, the clone 2, the clone 19 and the clone 29. On the basis of this genotypes, it has been put in place protocol for the true multiplication of sweet potato plants by means of microbouturage of nodes in the MS medium in presence of ANA, BAP and GA₃ with a pH adjusted to 5,7. The *in vitro* cultivation of meristem tips on plants in green-house and on vitroplants gave decontaminated plants with AIA and BAP: The implanting of vitroplants was obtained in the MS medium with AIA (0,05mg/l) and kinetine (0,5mg/l).

The capacities of sweet potato explants embryos have been tested in the MS medium with different concentration on 2,4-D. This experiments permitted the formation of callus and in certain cases a neoformation on roots and buds after transfer in an induction medium, however without producing polar structure assimilable to somatic embryos.

Key words: *Ipomoea batatas*, *in vitro*, virus, meristem tips, somatic embryos.

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX.

LISTE DES FIGURES ET PLANCHES.

INDEX DES SIGLES ET ABREVIATIONS.

INTRODUCTION..... 1-2

A. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE..... 3-11

I. MICROPROPAGATION

1. Microbouturage de noeuds..... 3-4

1.1. L'aséptie..... 4

1.2. La multiplication..... 4

1.3. Préparation des vitroplants à l'acclimatation..... 4

1.4. Acclimatation des vitroplants..... 4

2. Culture *in vitro* de méristèmes..... 5-8

2.1. Organisation des méristèmes chez les Angiospermes.

2.1.1. Organisation du méristème de tige..... 5

2.1.2. Organisation du méristème de racine..... 5

2.2. Quelques applications de la culture de méristèmes.

2.2.1. Fonctionnement des méristèmes..... 6

2.2.2. La culture de méristème comme moyen d'assainissement de plantes virosées..... 6

2.2.3. La culture de méristème comme moyen pour la micropropagation conforme avec un taux de variations faibles..... 7

2.3. Quelques difficultés liées à la culture *in vitro* de méristèmes et les précautions à prendre pour la réussite de cette technique..... 7-8

II. REGENERATION *IN VITRO* PAR EMBRYOGENESE SOMATIQUE..... 8-9

III. MICROPROPAGATION ET REGENERATION CHEZ LA PATATE DOUCE..... 10-11

B. MATERIELS ET METHODES.

I. LA PLANTE..... 11

1. Origine et production..... 12-12

2. Teneur nutritionnelle..... 13

3. Taxonomie..... 14

II. LA CULTURE *IN VITRO*

1. Prélèvement et stérilisation du matériel végétal.....	14-15
1.1. Microbouturage et culture de méristèmes.....	15
1.2. Embryogenèse somatique.....	15

2. Milieux et conditions de mise en culture.....	15-17
2.1. Microbouturage et culture de méristèmes.....	15
2.2. Embryogenèse somatique.....	16-17

C. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	18-33
---	--------------

I. MICROPROPAGATION.....	18-29
---------------------------------	--------------

1. Microbouturage de noeuds.....	18-25
1.1. Choix d'une auxine.....	18-19
1.2. Choix du GA ₃	19
1.3. Résultats après détermination du milieu de culture optimal pour le développement des microboutures.....	20-25

2. Culture <i>in vitro</i> de méristèmes.	
Reprise de développement des méristèmes.....	26-28
2.2. Enracinement des vitroplants issus de culture <i>in vitro</i> de méristème.....	28-29
2.3. Conclusion.....	29

3. Acclimatation des vitroplants issus de la micropropagation.....	29
---	-----------

II. EMBRYOGENESE SOMATIQUE.....	30-33
--	--------------

III. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	34-35
--	--------------

BIBLIOGRAPHIE.....	36-42
---------------------------	--------------

LISTE DES TABLEAUX .

Tableau n°I. Productivité comparée de racines et tubercules et des céréales.

Tableau n°II. Composition du milieu de base pour le microbouturage et la culture de méristème.

Tableau n°III. Milieu de base pour l'initiation des explants en cals au cour des tests pour l'embryogenèse somatique.

Tableau n°IV. Pourcentage d'explants qui ont débourré pour les différents génotypes en fonction de la nature de l'auxine.

Tableau n°V. Pourcentage de reprise de microboutures de noeuds des génotypes en fonction de la concentration en ANA.

Tableau n°VI. Mise en culture initiale de fragments de noeuds. Résultats après 30 jours.

Tableau n°VII. Subculture I de noeuds. Résultats après 30 jours.

Tableau n°VIII. Subculture II de noeuds. Résultats après 30 jours.

Tableau n°IX. Subculture III de noeuds . Résultats après 30 jours.

Tableau n°X. Taux de multiplication des génotypes en fonction du temps de mise en culture.

Tableau n°XI Comparaison entre le T.M.D et le T.M.G pour chaque génotype, après un mois de mise en culture.

Tableau n°XII. Résultats sur la reprise du développement des méristèmes des génotypes en fonction du milieu de culture.

Tableau n°XIII. Pourcentage de reprise du développement des méristèmes prélevés sur des vitroplants et sur des plantes mobilisées en serre. Résultats après 45 jours.

Tableau n°XIV. Nombre d'explants enracinés par génotype en fonction du milieu.

Tableau n°XV. Résultats sur la mise en culture de pointes apicales sur milieux callogènes après 2, 4 et 6 semaines puis repiquées pendant un mois sur milieu d'induction.

Tableau n°XVI. Résultats de la mise en culture de pointes apicales dans différents milieux en fonction de la durée.

LISTE DES FIGURES ET PLANCHES.

Planche n°I. ORGANISATION DES MERISTEMES CHEZ LES ANGIOSPERMES.

Figure n°1. Apex d'oeillet, d'après Auge et al.,(1982)."La culture *in vitro* et ses applications horticoles".

Figure n°2. Schéma d'un méristème de tige d'Angiosperme, d'après Margara (1982). "Base de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogenèse".

Figure n°3. Schéma d'un méristème de racine d'Angiosperme, d'après Margara (1982). "Bases de la multiplication végétative . Les méristèmes et l'organogenèse".

Planche n°II. PIEDS-MERES FOURNISSANT NOEUDS ET MERISTEMES POUR LA MICROPROPAGATION.

Figure n°4. Variété *Ndargu*, variété *Walo* et clone 19.

Figure n°5. Clone 2 et clone 29.

Planche n°III. DEVELOPPEMENT ET ENRACINEMENT DE VITROPLANTS ISSUS PAR MICROBOUTURAGE DE NOEUDS

Figure n°6. Microbouture de noeuds après 5 jours de mise en culture.

Figure n°7. Microbouture de noeuds après 15 jours de mise en culture.

Planche n°IV. MULTIPLICATION EN MASSE DE VITROPLANTS ISSUS PAR MICROBOUTURAGE DE NOEUDS. RESULTATS APRES 30 JOURS DE MISE EN CULTURE .

Figure n°8. Multiplication en masse sans GA₃.

Figure n°9. Multiplication en masse en présence de GA₃.

Planche n°V. MERISTEMES DE PATATE DOUCE AVANT ET APRES LA MISE EN CULTURE.

Figure n°10. Méristème prêt à être excisé.

Figure n°11. Méristème après 13 jours de mise en culture.

Figure n°12. Développement et enracinement d'un vitroplant issu par culture de méristème.

Planche n°VI. ACCLIMATATION.

Figure n°13. Vitroplants acclimatés en serre pendant 25 jours.

Planche n°VII. CALS DE 4 SEMAINES REGENERANT DES RACINES APRES TRANSFERT SUR MILIEU D'EXPRESSION

Figure n°14 Cal chlorophyllien régénérant des racines.

Figure n° 15. Cal brun non chlorophyllien régénérant des racines.

SIGLES ET ABREVIATIONS.

AIA: Acide β Indol Acétique.

ANA: Acide α Naphtalène Acétique.

AVRDC: Asian Vegetable Research and Development Center/Taiwan.

BAP: 6-Benzyl Amino-purine.

ISRA/CDH: Institut Sénégalais de Recherches Agricoles/Centre pour le Développement de l'Horticulture.

2,4-D: Acide 2,4-Dichlorophénoxy acétique.

F.A.O.: Food and Agriculture Organisation.

FeEDTA: fer Ethylène Diamine Tétra-acétique Acide.

GA₃: Acide gibbérèllique 3

ITA: International Institute of Tropical Agriculture/ Ibadan Nigéria.

MS : Murashige et Skoog.

ORSTOM: Institut Français pour la Recherche Scientifique et Technique en coopération.

INTRODUCTION GENERALE

La patate douce, la pomme de terre, l'igname, le manioc font partie des produits qui bien vulgarisés, pourraient constituer des supports pour l'alimentation locale et créer les conditions pour une meilleure sécurité alimentaire.

Ne nécessitant pas beaucoup de moyens d'exploitation, la patate douce dans nos pays sous l'effet de la dévaluation monétaire, peut constituer une source alimentaire disponible et à moindre coût, pouvant même concurrencer certains produits comme la pomme de terre.

L'intérêt alimentaire de cette plante et du rôle probablement économique qu'elle peut être amené à jouer par le biais de l'exportation, justifient les études qui lui sont consacrées aussi bien sur le plan national avec l'I.S.R.A au C.D.H, que sur le plan international via l'A.V.R.D.C et l'I.I.T.A.

Mais malgré tous les efforts qui sont menés pour améliorer l'exploitation de cette culture, certains facteurs limitent sa production. SIHACHAKR (1982), identifie ces problèmes et les classe en trois catégories.

1- La difficulté de conservation des tubercules et la propagation de plants à partir de ces derniers. En effet, ces tubercules dépourvus de dormance ne peuvent être conservés longtemps et doivent être mis en germination une fois les conditions satisfaites.

2- L'existence d'une très grande hétérogénéité au sein de cette culture dans une même plantation. Des études ont montré que les différentes parties des tiges (KRAKER et BOLHUIS, 1967) ou de tubercules (CORDNER *et al.*, 1950) ne sont pas dotées des mêmes potentialités, d'où l'existence de phénotypes différents entre individus d'une même plantation.

3- La présence de nombreux agents pathogènes tels que: la mouche blanche, les pucerons responsables du complexe viral. A ces pathogènes, nous pouvons y ajouter les nématodes principalement ceux du genre *Meleiodogyne* plus répandus en Afrique Occidentale avec *Meleiodogyne incognita*, *Meleiodogyne javanica* et *Meleiodogyne aremaria*

En ce qui concerne les attaques virales elles sont liées au mode de propagation de cette plante, qui se fait essentiellement par multiplication végétative. Ces pathologies peuvent entraîner une baisse considérable des rendements et même dans certains cas causer la quasi "extinction" des variétés sélectionnées pour leur structure génétique intéressante (GUNKEL *et al.*, 1972).

La culture *in vitro* présente de nombreuses techniques pour l'investigation à la recherche biologique et physiologique végétale. Elle est aussi utilisée pour la propagation de plantes au service de la production. Toutes ces techniques procèdent de la même manière, en essayant de contrôler les facteurs de l'environnement (température, lumière, composition du milieu, pH...). Elles permettent aussi d'analyser la nature de l'explant mis en culture pour mieux connaître son fonctionnement physiologique afin de l'orienter vers un programme déterminé de morphogenèse.

Certaines de ces techniques ont été utilisées pour l'amélioration de la production végétale: des plus grandes cultures jusqu'aux arbres fruitiers en passant par les domaines de l'horticulture. De tels avantages ont motivé le choix de cet outil.

Il s'agira dans ce travail de proposer un protocole de multiplication conforme et intensive sur quelques variétés de patate douce cultivées au Sénégal par microbouturage de noeuds.

Nous présenterons ensuite les potentialités de la culture *in vitro* de méristèmes de patate douce pour l'assainissement de plantes virosées. Dans le dernier chapitre, nous présenterons les premiers résultats des investigations sur les capacités embryogènes des variétés de patate douce les plus cultivées au Sénégal.

A. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.

I. MICROPROPAGATION

Même si les premières tentatives de régénération de tissus apparaissent avec HABERLANDT (1902); ROBBINS (1922) , on peut situer les travaux de GAUTHIERET (1959) sur la carotte, de NOBECOURT (1946) sur le même matériel végétal, comme étant le début des premières étapes décisives pour la culture *in vitro* de tissus végétaux.

Depuis, plusieurs travaux font état de l'utilisation de cette technique pour l'amélioration variétale des plantes. Elle est largement utilisée en horticulture depuis les travaux de DAUX (1975) ; POITIER (1976) ; BOCCON-GIBOT *et al.*, (1978) sur le *Sainpaulia*. Elle est aussi utilisée en recherche forestière pour l'utilisation d'espèces adaptées à la sécheresse.

1. *Microbouturage de noeuds.*

La multiplication végétative de plante *in vitro* offre des possibilités de reproduction, conforme ou non conforme selon les méthodes et de la nature de l'explant utilisé. Sur le plan de la multiplication conforme, on utilise généralement un explant ayant une structure organisée: bourgeon (fragments de tiges présentant un noeud.) d'où le terme microbouturage. Il en résulte la production de plantes semblables à la plante-mère. Cette méthode est essentiellement basée sur les capacités naturelles de la plante à la multiplication végétative. Ce microbouturage ne peut être réalisé que si l'explant mis en culture est maintenu dans un environnement favorable dont les conditions sont strictement contrôlées et maîtrisées, ce qui permet à cette technique de jouer plusieurs rôles en permettant.

- L'obtention de plantes conformes à la plante- mère avec une grande vitesse de production .Ceci permet de mettre rapidement et en grand nombre sur le marché des variétés rares ou obtenues à haut prix.

- La constitution de pieds- mères en vitrothèque. En effet la micropropagation permet de stocker sur une petite surface une grande quantité de vitroplants pouvant servir de pieds-mères. On peut ainsi arriver à la création de "banques" de plantes pour la collection d'espèces ou de variétés présentant des intérêts agronomique, industriel, médical, horticole...

- La sauvegarde d'espèces en voie de disparition par une régénération intensive. Mais le plus intéressant de cette technique, est sans doute la possibilité qu'elle offre pour la programmation des différentes manipulations pendant toute l'année sans tenir compte des conditions climatiques, saisonnières et autres.

Pour arriver à de tels objectifs, il serait nécessaire de prendre en compte ces quelques critères.

- La nature de l'explant et son emplacement au niveau de la plante-mère.
- L'âge physiologique de l'explant.
- La période de prélèvement de l'explant.
- L'état physiologique de la plante-mère à laquelle l'explant appartient.

Nous pouvons schématiquement sérier le microbouturage en quatre phases.

1.1. L'aseptie.

Une bonne prise en compte des conditions aseptiques est indispensable pour la réalisation de la culture *in vitro*. L'aseptie est souvent facile chez certains organes protégés (méristèmes), elle peut cependant être délicate chez d'autres organes en contact avec le sol (racines, rhizomes et tubercules).

Les explants prélevés sur la plante-mère sont ainsi désinfectés pour l'élimination de tous les agents responsables de la contamination des cultures. Ces explants peuvent provenir des différentes parties de la plante, ainsi ils peuvent être des fragments de tiges ou de racines entre autres.

L'aseptie concerne également la stérilisation de la verrerie par la chaleur humide par autoclavage. La stérilisation des cultures est réalisée par autoclavage par exemple à 110°C pendant 20 minutes.

Les cultures sont ensuite effectuées sous hotte à flux laminaire après que les instruments d'ensemencement soient flambés à la chaleur après trempage dans l'alcool 95°.

1.2. La multiplication.

Elle consiste à déterminer et à obtenir une grande quantité d'unités et d'avoir le meilleur taux de multiplication. Ces unités peuvent être de natures différentes selon le protocole à étudier (noeuds, feuilles, apex...). Chacune de ces unités conduit à un type particulier de morphogenèse. Il faudrait cependant dans le cadre d'une micropropagation "conforme", éviter d'utiliser des unités qui peuvent entraîner d'importantes variations somaclonales.

1.3. Préparation des vitroplants à l'acclimatation .

Une méthode de multiplication végétative *in vitro* efficace, doit assurer un fort pourcentage de plantules vivantes après leur sortie en tube et leur repiquage en serre. Ainsi avant tout transfert sur un substrat d'acclimatation, on doit s'assurer que les vitroplants qui doivent être acclimatés, ont une bonne vigueur et un bon niveau d'enracinement, leur permettant de résister aux différents stress notamment au stress hydrique.

1.4. Acclimatation des vitroplants.

C'est une phase très délicate. La principale difficulté réside au fait que les racines des vitroplants possèdent un épiderme non subérifié et des feuilles non cutinisées qui souvent sont les causes de dessèchements des vitroplants. Mais aussi chez certaines espèces les vaisseaux du système racinaire sont mal raccordés à ceux de la tige du fait de la présence d'un cal au contact du milieu ce qui limite les échanges entre parties aériennes et parties souterraines.

Afin d'éviter ce désagrément, on place souvent les vitroplants à acclimater sous une atmosphère contrôlée pendant une à trois semaines pour permettre la formation de racines plus résistantes.

PLANCHE N° I.

ORGANISATION DES MERISTEMES CHEZ LES ANGIOSPERMES.

Figure n°1. Apex d'oeillet. La culture *in vitro* et ses applications horticoles, d'après Auge *et al.*, (1982).

Figure n°2. Schéma d'un méristème de tige d'Angiosperme. Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogenèse d'après Margara (1982).

Figure n°3. Schéma d'un méristème de racine d'Angiospermes. Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogenèse, d'après Margara (1982).

2. Culture in vitro de méristèmes

Régions organogènes terminales, les méristèmes correspondent à des zones de haute activité mitotique où les cellules constitutives sont toujours à l'état embryonnaire (cellules indifférenciées). L'état juvénile de ces cellules de même que leur pouvoir mitotique élevé justifient leur utilisation pour la régénération de plantes.

On distingue deux grands types de méristèmes, les méristèmes de tige et les méristèmes de racine qui diffèrent de par leur emplacement et leur organisation.

2.1. Organisation des méristèmes chez les Angiospermes.

Plusieurs théories ont été énoncées sur l'origine, la structure et le fonctionnement des méristèmes, les développer ne nous paraît pas opportun. Ainsi nous nous limiterons à l'organisation d'ensemble et aux faits fonctionnels les moins discutés.

2.1.1. Organisation du méristème de tige.

D'origine superficielle, le méristème de tige comprend essentiellement.

- Une partie épidermique composée de plusieurs assises cellulaires, *la tunica*.
- Une partie interne, le *corpus* qui a une seule assise cellulaire.
- Un centre quiescent où les cellules constitutives présentent une activité mitotique réduite.
- L'anneau initial présentant des cellules en division active.
- Un méristème médullaire.

2.1.2. Organisation du méristème de racine .

Structure souterraine, le méristème de racine présenterait une origine profonde avec:

- une coiffe terminale protectrice constituée de cellules mortes après desquamation,
- un centre quiescent révélé par les études histologiques, se trouvant au dessus des cellules génératrices de la coiffe et qui présenterait une activité mitotique réduite ou nulle. Ce centre n'est pas toujours visible chez les jeunes racines ou sa mise en place se fait tardivement,
- un stèle,
- un cortex.

On note aussi la présence de fuseaux.

2.2. Quelques applications de la culture in vitro de méristèmes.

Si la culture *in vitro* de méristème est principalement, comme son utilisation un moyen d'assainissement pour les plantes virosées, elle est aussi entreprise pour mieux connaître le fonctionnement des méristèmes mais aussi pour une multiplication conforme avec un taux minimum de variations.

2.2.1. Fonctionnement des méristèmes.

Les premiers travaux sur le fonctionnement des méristèmes furent menés par ROBBINS (1922), (sans succès) sur des extrémités de tiges et de racines de pois et de maïs. Ceci a permis de se demander si les méristèmes avaient une autonomie de croissance et de développement ou s'ils dépendaient de l'action des substances provenant des différents organes de la plante. C'est BALLE (1946) qui obtient pour la première fois la régénération de quelques plants de lupin et de capucine à partir d'apex. De même la culture de points végétatifs fut réalisée chez les Pteridophytes des genres *Adiantum*, *Osmunda*, *Selaginella*, par WETMORE et MOREL (1949) et WETMORE (1954).

Ces expériences fondamentales avaient pour but de rechercher les exigences de fonctionnement des méristèmes mis en culture. Actuellement la *culture in vitro* de méristèmes est utilisée dans l'étude des processus impliqués dans la morphogenèse, l'induction florale, le développement séquentiel du méristème floral ainsi que dans les reversions éventuelles vers l'état végétatif.

2.2.2. La culture in vitro de méristèmes comme moyen d'assainissement de plantes virosées.

La régénération de plantes à partir de pieds-mère virosés, est essentiellement basée sur quelques observations intéressantes. WHITE (1934) constata que les extrémités de racines de tomate virosées cultivées, donnaient des plantes saines. LIMASSET et CORNUET (1949) constatèrent l'absence de virus au niveau des méristèmes de plantes infectées. Nous remarquons à travers ces différentes observations, une concentration croissante de virus des parties les plus jeunes vers les parties adultes. Ceci permet donc de supposer que les limites de la multiplication des virus se situerait au niveau de la zone sous méristématique, le méristème lui même étant indemne.

Les raisons de cette répartition et le fait que les méristèmes dans la grande majorité des cas, soient indemnes de virus, sont encore inexpliqués. Mais on pense généralement que les cellules en voie de division active posséderaient une certaine immunité et aussi qu'une compétition s'établirait entre les cellules méristématiques et les virus pour l'utilisation des métabolites, compétition qui tournerait à l'avantage des cellules méristématiques.

Les études réalisées sur la thérapie semblent confirmer cette deuxième hypothèse car une augmentation de la température favoriserait la multiplication des cellules méristématiques tout en diminuant la vitesse de multiplication des virus.

A la suite de tels travaux, MOREL et MARTIN (1952 et 1955) obtinrent pour la première fois la régénération de plantes saines de Dahlia et de pomme de terre à partir de clones infestés par des virus.

Ces travaux considérés comme significatifs apportent des renseignements aussi bien sur le plan fondamental par la mise en évidence de l'aptitude des points végétatifs à la régénération de plantes entières, que sur le plan appliqué avec la preuve expérimentale de la capacité des tissus méristématiques à demeurer pratiquement indemnes de virus dans un environnement tissulaire infesté.

Cette technique a ainsi permis la régénération de plantes d'importance économiques telles que la pomme de terre mais aussi la régénérations de quelques espèces fruitières telles que le pommier, l'abricotier, le pêchier, le figuier, le fraisier et le bananier (BOXUS et DRUART 1986) . Elle fut ensuite élargie à d'autres espèces appartenant à des familles diverses , ainsi les travaux de MELLOR et STACE-SMITH (1977) donnent une liste de quelques 34 cultivars susceptibles d'être guéris par cette méthode.

2.2.3. La culture in vitro de méristèmes, comme moyen de multiplication conforme avec de faibles taux de variations somaclonales.

En plus de son rôle d'assainissement des plantes virosées, la culture *in vitro* de méristèmes est aussi un puissant outil pour la multiplication conforme avec de faibles taux de variations. Elle permet ainsi d'associer la lutte phytosanitaire à la micropropagation réalisable avec un taux de multiplication élevé.

2.3. quelques difficultés liées à la culture in vitro de méristèmes et les précautions à prendre pour la réussite de cette technique.

La culture *in vitro* de méristèmes présente cependant quelques limites inhérentes à la technique, à la physiologie de l'explant mis en culture et à la pathologie elle-même.

- La technique.

Elle peut en fait constituer un facteur limitant la réussite de cette technique avec un taux de dessèchement et de contamination assez sensibles selon les espèces.

- La physiologie.

Des expériences ont montré que chez les espèces herbacées, quand les méristèmes sont prélevés sur des axes en croissance active, le taux de régénération atteint 80% à 90% de l'effectif, ce taux est de 5% à 10% quand le prélèvement se fait sur des méristèmes en croissance ralentie MARGARA (1982).

- la pathologie.

Des travaux ont montré que certains virus s'éliminent plus facilement que d'autres. Ainsi chez la pomme de terre, MOREL *et al.*, (1968) de même que TEN HOUTEN *et al.*, (1968), ont montré que le virus "A" s'élimine plus facilement que le virus "X". Chez l'oeillet , STONE (1968), montre que le virus du "ring-spot" s'élimine plus facilement que celui de la mosaïque. Dans de tels cas on associe souvent la culture de méristème à la thérapie (KASSANIS (1965 et 1967).

Les plantes issues de culture *in vitro* de méristèmes, doivent nécessairement subir des tests destinés à confirmer que les virus ont été effectivement éliminés. Ces contrôles peuvent se faire soit par indexage sur des plantes sensibles aux virus comme le tabac ou le *Chenopodium quinoa* (en général trois indexages suffisent et s'ils sont négatifs les plantes sont alors considérées comme étant régénérées), soit par des méthodes sérologiques ou immunologiques qui sont plus chères mais plus spécifiques car elles permettent de tester des virus connus, par exemple test ELISA.

Ces contrôles sanitaires ne peuvent cependant que renseigner sur la présence ou l'absence de virus, mais non sur la qualité génétique des plantes. Des mutations sont toujours possibles bien que rares, ainsi, doit-on s'assurer de la conformité des plantes avant leur distribution.

L'utilisation de cette filtre sanitaire peut restituer à certaines espèces leur aspect originel qu'elles avaient perdu suite aux multiplications traditionnelles continues, source de contaminations permanentes. Les plantes ainsi assainies présentent un gain de vigueur souvent attribué au rajeunissement d'où le terme de régénération AUGE *et al.*, (1982).

Il faut, cependant, noter que même si cette technique permet d'éliminer les viroses, les plantes indemnes obtenues ne sont pas pour autant immunisées, elles restent ainsi sensibles au même titre que l'était la plante-mère. Ce qui nécessite donc dans la mesure du possible, d'éviter les recontaminations et lorsqu'une telle disposition ne peut se prendre, il faut renouveler régulièrement le matériel végétal.

Des expériences ont montré que si toutes ces précautions sont prises, les plantes saines obtenues et mises en culture en plein champ peuvent conserver leur vigueur et leur productivité pendant au moins trois ans.

II. Embryogenèse somatique.

L'embryon provient en général du développement d'un zygote lui-même issu de la fécondation de l'oosphère par l'anthérozoïde, d'où le nom d'embryon zygotique. L'apport de la culture "*in vitro*", a été de montrer que des cellules somatiques pouvaient produire des structures semblables à des embryons zygotiques et connues sous le nom d'embryons somatiques. Ainsi la capacité de reproduire un nouvel individu n'est pas seulement de l'apanage strict du zygote, mais une aptitude fondamentale des cellules végétales qui, selon HABERLANDT (1902) sont dotées d'une totipotence cellulaire. C'est à dire que quelque soit leur origine, les cellules capables de se diviser, peuvent en principe régénérer des plantes normales.

Cette théorie de la totipotence cellulaire ainsi que les observations faites sur la polyembryonie avec la formation d'embryons spontanés issus de structures somatiques (nucelle, synergides, antipodes, téguments de l'ovule), ont servi de références quant aux expériences menées pour l'obtention d'embryons somatiques "*in vitro*".

Ce sont principalement les études faites sur la carotte (*Daucus carota*) qui ont contribué au développement des concepts sur l'embryogenèse somatique après que des observations furent faites par NOBECOURT (1946) et LEVINE (1951) sur la néoformation de bourgeons ou d'embryoïdes à partir de tissus. Les travaux sur l'embryogenèse expérimentale furent initiés par REINERT (1958) puis par STEWARD et MEARS (1958) sur la carotte (*Daucus carota*).

L'embryogenèse somatique se limite à quelques familles car elle ne s'exprime de manière reproductible que chez certaines espèces suivant des conditions définies, à partir de certains tissus et sur un milieu de culture approprié. En effet peu d'espèces sont aptes à cette technique (AMMIRATO 1983) et pour certaines d'entre elles comme le palmier à huile PANNETIER *et al.*, (1981) et le caféier SONDAHL and SHARP (1977), l'embryogenèse somatique est obtenue de manière indéfinie par embryogenèse adventive. Des résultats similaires ont été obtenus par NAG et STREET (1973) sur des suspensions cellulaires de carotte et par TISSERAT (1987) sur des cals embryogènes de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*).

De nombreux travaux sur l'embryogenèse somatique des conifères ont fait l'objet de publications au cours des dernières années. C'est ainsi que des souches embryogènes ont été obtenues par, HAKMAN et VON ARNOLD (1985), GUPTA et DURZAN (1986a), LELU *et al.*, (1987) sur *Picea abies*, HAKMAN et FOWKE (1986), LU et THORPE (1987), sur *Picea glauca*, GUPTA *et al.*, (1987), BECWAR *et al.*, (1988) sur *Pinus taeda*, GUPTA et DURZAN (1986b) sur *Pinus lamertiana*, LAINE *et al.*, (1990) sur *Pinus caribaea*, KROGSTRUP *et al.*, (1988), VON ARNOLD et WOODWARD (1988) sur *Picea sitchensis*.

III. MICROPROPAGATION ET REGENERATION CHEZ LA PATATE DOUCE

Des études sur la culture d'organe ont été menées chez la patate douce pour la mise en place de protocoles permettant une micropropagation intensive de cette plante à des buts différents. C'est ainsi que WILLIAM et GRANT en 1960, ainsi que GREIC et SMITH à la même date ont eu recours à la régénération de plants de patate douce pour mieux connaître la nutrition minérale de ce tubercule. Sur le plan de la lutte phytosanitaire, les travaux de JONES and GUTHBERT (1973), de SEHGAL (1975 et 1978), de LIZT et CONEVER (1978), ainsi que ceux de JONES and DUKES (1980) et de CLARK (1986) font état de la régénération et de la micropropagation de plants de patate douce *in vitro* contre l'attaque des différents agents pathogènes.

L'action des substances exogènes sur les capacités morphogénétiques de différents explants de patate douce, a été étudiée par HOUNDONUGBO (1975 et 1989) et YAMAGUCHI (1978) après les travaux de NAKAJIMA et KAWAKAMI (1969) ; YAMAGUCHI et NAKAJIMA (1972) ; GUNKEL *et al.*, (1972) et HOZYU (1973).

D'autres tentatives de régénération et de micropropagation furent ensuite menées et ce sur des explants variés. Ainsi MURATA *et al.*, (1987), obtinrent la régénération et la multiplication de plants de patate douce à partir de pétioles. Quant à ALLOUFA M. (1990) il n'a obtenu que des cals sans aucune régénération à partir de disques de tubercules.

Bien que tous ces travaux mentionnent la néoformation de bourgeons adventifs à l'exception de ceux d'ALLOUFA, une grande partie de néoformations caulinaires n'a été obtenue que par SEHGAL (1975) à partir de cals de feuilles et par SEHGAL (1978) ; TSAY et TSENG (1979), sur des cals de parois d'anthères.

Dans tous les cas précités, la néoformation de bourgeons est consécutive à une phase callogène et d'une manière générale on note une grande variabilité génétique chez les clones issus de cals.

Mais avec les travaux de SIHACHAKR (1982); de SCARAMUZZI DEGAETANO (1983) et de SEBASTIAO *et al.*, (1991) on assiste à une régénération directe, ceci à partir de différents types d'explants (noeuds, entre-noeuds, feuilles entières, limbes, pétioles, et apex). Ces dernières études sont d'autant plus intéressantes qu'elles réduisent les variations somaclonales à leur strict minimum.

Des études sur la régénération de plantes de patate douce atteintes de viroses à partir de culture de méristème ont été réalisées par NIELSON (1960); LOBENSTEIN et HARPAZ (1960); MORI (1971) ; OVER DE LINDEN et ELLIOT (1971); ALCONERO *et al.*, (1975); TERRY (1981) mais aussi ARRENDELL and COLLINS (1986).

La culture de méristèmes de plantes de patate douce pour la micropropagation de cette plante avec un taux réduit de variations somaclonales a été réalisée par ELLIOT (1969); LIZT et CONEVER (1978). De plus des études menées au Brésil ont permis l'amélioration des rendements sur quelques variétés de patate douce par culture d'apex SEBASTIAO *et al.*, (1991).

Quant aux travaux sur l'embryogenèse somatique chez la patate douce, ils ont concernés un nombre important d'explants. C'est ainsi que TSAY and TSENG (1979), ont pu obtenir la régénération par embryogenèse somatique de plantes de patate douce à partir de paroi d'anthère. D'autres résultats satisfaisants ont été obtenus par différents auteurs sur des

feuilles, pointes apicales, tiges et racines LIU and CANTLIFFE (1984), mais aussi sur des bourgeons latéraux JARRET *et al.*, (1984) et CHEE and CANTLIFFE (1988).

Il faut ajouter à ces travaux, les publications de CHEE and CANTLIFFE (1989a; 1989b; 1992), CHEE *et al.*, (1992) mais aussi celles de MARIE E. BIENIEK *et al.*, (1995).

Tous ces auteurs ont pu obtenir, la régénération de plantes de patate douce par embryogenèse somatique, cependant il faut noter que ces travaux n'ont intéressé qu'un nombre limité de génotypes. Toutefois, les travaux de CAVALCANTE *et al.*, (1994), montrent un élargissement du matériel végétal sur la même espèce (*Ipomoea batatas*) avec quelques dix cultivars.

Nous nous proposons dans cette présente étude, de tester les capacités à l'embryogenèse somatique de quelques variétés locales de patate douce sélectionnées pour des critères agronomiques d'adaptation et de rendement par le C.D.H/I.S.R.R.A.

PLANCHE N° II.

**PIEDS-MERES FOURNISSANT NOEUDS ET MERISTEMES POUR LA
MICROPROPAGATION**

Figure n°4. Variété *Ndargu*, variété *Walo* et clone 19.

Figure n°5. Clones 2 et clone 29.



Figure n°4. Variété *Ndargu*, variété *Walo* et clone 19.

12 cm.

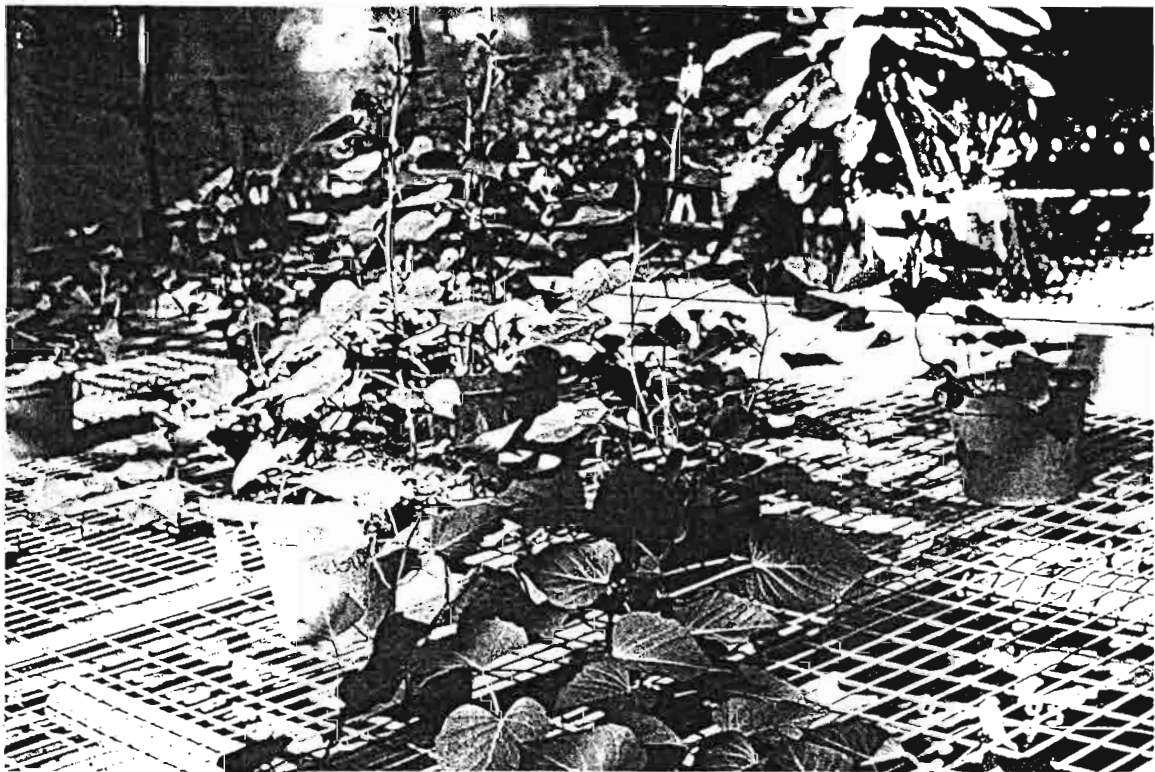


Figure n°5. Clone 2 et clone 29.

12 cm

B. MATERIELS ET METHODES

I. La plante

1. Origine et production.

Originnaire de l'Amérique tropicale, la patate douce, espèce *batatas* n'existerait plus aujourd'hui à l'état sauvage. Elle est maintenant cultivée dans toutes les régions tropicales et subtropicales du monde, de même que dans certaines régions tempérées. On la rencontre principalement en Asie avec comme principaux producteurs la Chine, l'Indonésie, la Corée et le Japon. Elle commence à se vulgariser en Inde. En Amérique latine, le Brésil constitue le principal producteur de cette plante où elle est cultivée pour des fins commerciales locales mais ne fait point l'objet d'échanges commerciaux internationaux. La patate douce est aussi largement cultivée en Afrique où elle s'insère bien dans le système d'exploitation grâce à son mode de croissance agressif qui écarte les mauvaises herbes.

La patate douce est une culture qui n'épuise généralement pas le sol et les paysans africains pensent que, cultivés après la patate douce, les céréales donnaient de meilleurs rendements.

Considérée comme une culture secondaire mineure, la patate douce donne cependant de bons rendements et ne requiert qu'un minimum de pratiques culturales. Elle est très répandue avec une production mondiale de 133.2 millions de tonnes occupant ainsi le troisième rang mondiale (F.A.O. 1989). Au Sénégal, cette production dépasse les 4000 tonnes pour une superficie de moins de 1000 hectares. Les rendements peuvent varier de 25 à 50 t/ha selon les variétés. Les rendements les plus élevés sont obtenus pendant la période comprise entre Mars et Juin. (ISRA/CDH 1995).

C'est une plante qui, en quatre mois, donne plus de glucides à l'hectare qu'une igname en sept ou huit mois.

Le tableau N°I donne la productivité comparée de quelques céréales et tubercules.

TABLEAU N°1 Productivité comparée des racines et tubercules et des céréales.

	Tonnes/ha	cal/100g	Portion comestible (%)	Cal/ha 10 ⁶	Durée de croissance (jours)	Cal/ha/jour 10 ³
Riz	2	352	70	5	150	33
Ble	1,2	344	100	4,1	120	34
Maïs	2,1	363	100	7,6	135	56
Manioc	9,1	153	83	11,6	330	35
Patate douce	6,5	114	88	6,5	135	48
Igname	8	104	85	7,1	280	25
Colocasia	5,8	113	85	5,5	120	46

Source: De Vries, C.A *et al.*, 1967.

L'analyse de ce tableau, montre que la patate douce fournit plus de calories/hectare/jour que tous les céréales et tubercules répertoriés dans le tableau et que le pourcentage de la portion comestible est la plus importante parmi toutes les tubercules. Ceci montre que la patate douce est une source d'énergie disponible.

2. Teneur nutritionnelle

Cultivée à la fois pour ses grosses racines et ses feuilles, la patate douce fournit essentiellement des glucides.

C'est une plante riche en eau, avec une teneur de 50 à 60% dans les variété farineuses, laquelle teneur peut aller jusqu'à 80% du poids frais de tubercule dans les variété tendres et glutineuses.

La patate douce contient plus de protéines, avec des teneurs allant de 1 à 2.5% que dans les autre tubercules y compris le manioc et l'igname *F.A.O. (1989)*.

La plus part des tubercules contiennent en plus, de la vitamine C (bien qu'une bonne partie soit perdue par traitement et par cuisson), des caroténoïdes précurseurs de la vitamine A. Ces caroténoïdes sont plus fréquentes dans les variétés jaunes notamment chez les cultivars à chair orange, elles deviennent rares dans les variétés blanches.

Les feuilles en plus de leur richesse en caroténoïdes, renferment du calcium et de la provitamine A. Elles contiennent en poids sec environ 8% de fécule, 4% de sucre et jusqu'à 27% de protéines. Elles sont largement consommées en plats d'accompagnement, bouillies ou frites avec oignons, tomates et épices, mais on peut en mettre dans la soupe ou le ragoût.

3. Taxonomie.

La patate douce: *Ipomoea batatas*, est un dicotylédone à évolution gamopétalée avec un ovaire supère, appartenant :

- à l'ordre: Lamiales,
- au sous-ordre: Tubiflores,
- à la famille: Convolvulacée,
- à la sous-famille: Convolvulée,

Le genre *Ipomoea* présente des souches sauvages d'espèces diverses mais *Ipomoea batatas* est la seule du genre à être utilisée comme produit comestible et décoratif. On note cependant des genres voisins de *Ipomoea* tels que les genres *Merremia* et *Quamoclit* beaucoup plus fréquents dans les régions tempérées.

Ipomoea batatas et les genres voisins sont classés en trois groupes selon leur garniture chromosomique NISHIYAMA *et al.*, (1975). Les espèces du premier groupe comprennent *Ipomoea batatas* ($2n=6x=90$) avec trois autres espèces qui sont *Ipomoea trifida* ($2n=4x=90$) qui serait l'ancêtre direct de la patate douce, *Ipomoea littoralis* ($2n=4x=60$) et *Ipomoea leucantha* ($2n=2x=30$). Le deuxième groupe contient quatre diploïdes ($2n=2x=30$) espèces, *Ipomoea triloba*, *Ipomoea lacunosa*, *Ipomoea tricarpa* et *Ipomoea ramosa*. Les deux autres tétraploïdes à savoir *Ipomoea gracilis* et *Ipomoea tiliacea* du troisième groupe, n'ont pas une garniture chromosomique clairement définie.

La patate douce présente en plus une autoincompatibilité génétique avec un taux d'allogamie estimé à 60%. IL a aussi été noté, une incompatibilité de croisement entre certaines espèces Edmond *et al.*, (1971).

II. LA CULTURE IN VITRO.

1. Prélèvement et stérilisation du matériel végétal.

Le matériel de départ est constitué de boutures de 30 cm appartenant à deux variétés (*Walo* et *Ndargu*) et à trois clones (clone "2", clone "19" et clone "29"), toutes âgées de 60 jours. Elles nous ont été fournies par le C.D.H. le 03 janvier 1995, et le repiquage en pots effectué 3 jours après. Les boutures ainsi repiquées ont été placées en serre.

Ces différentes variétés et clones se distinguent bien par leurs aspects à savoir la couleur de la peau et de la chair avec une peau rouge et une chair orange pour la variété *Ndargu*, une peau blanche et une chair jaune pour la variété *Walo* et le clone "29", une peau blanche et une chair blanchâtre pour le clone "2" et pour le clone "19", une peau blanche et chair blanc-laiteux.

Tableau n° II : Composition du milieu de base pour le microbouturage et la culture de méristème.

Microbouturage et culture de méristèmes	
Macroéléments de Murashige et Skoog (1962) en mg/l	
KNO ₃	1 900
NH ₄ NO ₂	1 650
CaCl ₂ -2H ₂ O	440
MgSO ₄ -7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microéléments de Murashige et Skoog (1962) en mg/l	
KI	0,83
MnSO ₄ -4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ -7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ -5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ -6H ₂ O	0,025
Vitamines de Nitsch-Nitsch (1965) en mg/l	
Inositol	100
Thiamine-HCl	0,5
Nicotinic-Acid	5
Pyridoxine-HCl	0,5
Biotin	0,05
Folic-acid	0,5
Fer chélaté en mg/l	
FeSO ₄	27,8
EDTA	37,3
Saccharose	30g/l
Agar	7g/l

Le pH est ajusté à 5,7 pour la micropropagation et de 5,8 pour la culture de méristème.

Le choix de ces cinq géotypes se justifie par leur grande sensibilité aux différentes attaques virales. Dans cette étude, nous cherchons à proposer un protocole d'assainissement et de micropropagation de quelques espèces locales de patate douce.

1.1. Microbouturage et culture de méristèmes.

Pour la micropropagation par microbouturage de noeuds, des fragments de 1 cm sont prélevés de manière non aseptique sur les plantes mobilisées en serre. Ces fragments de noeuds, issus des zones apicale et médiane pour leur meilleur taux d'enracinement SIHACHAKR (1982), ont été désinfectés avec de l'hypochlorite de calcium 7% pendant 25 minutes et du chlorure mercurique 1⁰/₁₀₀ pendant 5 minutes. Ces explants sont ensuite lavés trois fois avec de l'eau distillée stérile, pendant 15 minutes (5 minutes par lavage). Après un tel traitement nous avons obtenu le meilleur taux de démarrage et le plus faible taux de contamination.

Pour la culture de méristèmes, les fragments ont été prélevés sur des vitroplants issus du deuxième et troisième repiquage et sur des plantes mobilisées en serre pendant cinq mois. Nous avons effectué sur les apex prélevés sur les plantes mobilisées en serre, une désinfection en les maintenant dans de l'hypochlorite de calcium 7% durant 5 minutes et en les lavant trois fois à raison 5 minutes par lavage avec de l'eau distillée stérile. Sur ces fragments, a été prélevé, sous hotte stérile à flux laminaire avec une loupe binoculaire à lumière froide, uniquement le dôme méristématique. Tout au début des manipulations, le dôme méristématique a été prélevé exceptionnellement avec les deux derniers primordia foliaires.

1.2. Embryogenèse somatique.

Pour l'embryogenèse somatique, des pointes apicales de 0,5cm de long ont été prélevées sur des vitroplants stériles issus des troisième et quatrième repiquage pour leur initiation en cal.

2. Milieux et conditions de mise en culture.

2.1. Microbouturage et culture de méristèmes.

Le même milieu de base (tableau N°II) a été utilisé pour la culture de méristème et pour la micropropagation par microbouturage de noeuds. Il s'agit du milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) auquel nous avons ajouté du Fe-EDTA, des vitamines de NITSCH et NITSCH (1965) du saccharose 3%.

C'est un milieu gélosé avec 0.7% d'agar pour le microbouturage et un pH ajusté à 5.7. Ce milieu a été distribué dans des tubes à raison de 10 ml par tube et dans des bocaux avec 50 ml par bocal.

Ce milieu est gélosé avec 0.7% d'agar mais aussi liquide, pour la culture de méristème avec un pH de 5.8, reparti dans des tubes à raison de 10 ml par tube. Nous avons utilisé des ponts de papiers filtres sur milieu liquide pour une meilleure oxygénation des explants.

Tableau n° III : Milieu de base pour l'initiation des explants en cals au cours des tests sur l'embryogenèse somatique.

Macroéléments de Murashige et Skoog (1962) en mg/l	
KNO ₃	1 900
NH ₄ NO ₂	1 650
CaCl ₂ -2H ₂ O	440
MgSO ₄ -7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microéléments de Murashige et Skoog (1962) en mg/l	
KI	0,83
MnSO ₄ -4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ -7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ -5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ -6H ₂ O	0,025
Inositol	100
Thiamine-HCl	0,5
Niobin-acid	5
Pyrodoxine-HCl	0,5
Fer Chélaté en mg/l	
FeSO ₄	27,8
EDTA	37,3
Saccharose	30g/l
pH	5,8
Agar	7g/l

La stérilisation des milieux s'est faite à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes pour le microbouturage et par stérilisation filtrante (milieu liquide) à l'aide d'encoques stériles pour la culture de méristème.

Ce milieu de base a été enrichi par différentes doses de régulateurs de croissance et en plusieurs combinaisons dont les résultats seront exploités dans le chapitre suivant.

Les conditions de culture sont les mêmes pour les deux séries de manipulations, ainsi les tubes sont maintenus dans une même chambre de culture à 27°C avec une photopériode de 16h/jour, une hygrométrie de 70% et une luminosité égale à 25 à 80 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ assurée par des tubes fluorescents de 58W.

2.2. Embryogenèse somatique.

- Milieu d'initiation pour la callogenèse.

Durant cette étape, nous avons utilisé comme milieu de base du MS nommé MS₀ (tableau N°III) avec les sels minéraux de MURASHIGE et SKOOG (1962), de 500 μM de Mio-insitol, de 5 μM de Thiamine-HCl, de 10 μM de Nicotinic-acid, de 5 μM de Pyrodoxine-HCl du Fe-EDTA et 3% de saccharose. C'est un milieu gélosé avec 0.7% d'agar et le pH est ajusté à 5.8.

Pour la première expérience, ce milieu a été enrichi par différentes concentrations en 2,4-D ce qui nous a amené de tester quatre milieux qui sont:

- M.So (milieu A),
- M.So. + 0,1 mg de 2,4-D (milieu B),
- M.So. + 0,2 mg de 2,4-D (milieu C),
- M.So. + 0,4 mg de 2,4-D (milieu D).

Ces différents milieux sont répartis dans des bocaux à raison de 50ml/bocal. Pour chaque milieu nous avons neuf bocaux avec trois explants/bocal d'où vingt sept explants pour chaque milieu et par génotype. Les bocaux ont été réparti en trois périodes de deux, quatre et six semaines. Cette expérience n'a été réalisée que sur quatre des cinq génotypes de départ car pour le clone "29" beaucoup de vitroplants ont été perdus pour cause de contamination bactérienne et mychorales.

Compte tenu des résultats limités obtenus lors de la première expérience, nous avons programmé une autre série de manipulations en augmentant d'une part la quantité de 2,4-D combinée avec à la BAP et d'autre part en changeant les conditions de mise en culture. Nous avons maintenu les concentrations 0,4mg/l et 0.2 mg/l de 2,4-D, car elles se sont avérées satisfaisante pour la callogenèse sur le milieu d'initiation.

Les bocaux ensemencés sont répartis en deux groupes de quinze bocaux avec trois explants par bocal, ceux du premier groupe sont placés sous une alternance lumière-obscurité avec 16h de lumière, à une température de 27°C, à 70% d'humidité relative, pour une intensité lumineuse de 25 à 80 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$, tandis que ceux du deuxième groupe sont à l'obscurité totale à une température de 27°C, pour une hygrométrie de 70% et la même intensité lumineuse.

- Milieu d'induction.

Le même milieu sans hormones , à savoir le milieu MS. a été utilisé pour l'induction des embryons sur les cals obtenus lors de la phase d'initiation. Les cals ainsi repiqués en milieu d'induction gélosé avec 7mg/l d'agar, ont été placés dans une chambre de culture avec une photopériode de 16 heures de jour sous une température de 27°C.



Figure n°6 Microbouture de noeud
près 5 jours de mise en culture.

2,25 cm



4,3 cm

Figure n°7 Microbouture de noeud
après 15 jours de mise en culture.

C. RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. MICROPROPAGATION.

1. Microbouturage de noeuds.

1.1. Choix d'une auxine.

Le milieu de base MS (1962), que nous avons utilisé, a été enrichi en auxines du fait du retard de démarrage observé chez les explants mis en culture dans ce milieu. Ainsi comme auxines, nous avons testé l'ANA et l'AIA qui d'une manière générale, sont favorables pour l'organogenèse chez la patate douce, HOUNDONUGBO (1989).

Les résultats obtenus dans cette expérience sont consignés dans le tableau n°IV.

Le nombre d'explants utilisés par génotype et par milieu est égal à 10

TABLEAU N°IV. Pourcentage d'explants qui ont débouffé pour les différents génotypes en fonction de l'auxine utilisée.

	<i>Walo</i>	<i>Ndargu</i>	Clone "19"	Clone "29"	Clone "2"
M.S ₀	70%	60%	60%	70%	60%
M.S ₀ + AIA (0,01mg/l)	80%	70%	60%	50%	70%
M.S ₀ + ANA (0,01mg/l)	90%	70%	75%	60%	80%

L'analyse du tableau N°IV ci dessous montre que, aussi bien l'ANA que l'AIA ont donné un bon pourcentage de démarrage des explants pour tous les génotypes. Mais il s'est avéré que les explants ensemencés dans le milieu contenant l'ANA, régénéraient plus précocement par rapport à ceux ensemencés dans le milieu avec AIA.

Il faut cependant noter que SIHACHAKR (1982) a obtenu de bons taux de démarrage avec l'A.I.A (1mg/l) comme source d'auxine sur un milieu avec les macroéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962) et des microéléments de HELLER (1953) sur une variété de patate douce originaire de la Guyane.

Une fois l'auxine déterminée, nous avons ensuite recherché les doses optimales pour une meilleure croissance des explants. Ainsi quatre gammes de concentrations ont été déterminées en plus du milieu de base. Les résultats ainsi obtenus ont été consignés dans le tableau N°V.

Le nombre d'explants utilisés par génotype et par milieu est de 10.



Figure n°8. Multiplication en masse sans GA_3 .

4,6 mm



Figure n°9. Multiplication en masse en présence de GA_3 .

4,6 mm

TABLEAU N°V. Pourcentage de reprise de microboutures de noeuds des génotypes en fonction de la concentration en ANA du milieu.

	<i>Walo</i>	<i>Ndargu</i>	Clone "19"	Clon "29"	Clone "2"
M.S₀	60%	70%	50%	60%	60%
M.S₀+ANA (0,025mg/l)	80%	60%	90%	70%	80%
M.S₀+ANA (0,05mg/l)	90%	80%	80%	70%	90%
M.S₀+ANA (0,1mg/l)	20%	10%	30%	10%	20%
M.S₀+ANA (1mg/l)	10%	10%	20%	10%	10%

A la lecture du tableau N°V, nous constatons une faible reprise des explants pour des concentrations d'A.N.A supérieures à 0,05mg/l . Nous avons alors conservé cette concentration de 0.05mg/l pour la suite de notre travail. Sur le même milieu de base , SEBASTIAO *et al.*,(1991), ont utilisé une dose voisine de celle-ci à savoir 0,03mg/l pour la régénération de plants de patate douce à partir d'apex végétatifs.

Après avoir retenu l'ANA comme auxine, nous nous sommes intéressés à la composante cytokinine du milieu afin d'obtenir la ramification des vitoplants car jusque là nous n'avons pu avoir qu'une seule tige feuillée. Et pour se faire, nous avons testé différentes doses de B.A.P (0,25mg/l , 0,5mg/l et 1mg/l) et aussi de kinétine pour les mêmes concentrations. Mais quelles que soient la source de cytokinines et les concentrations utilisées, nous n'avons pas pu obtenir la ramification des explants. Par contre nous avons noté de bons taux de démarrage entre 80 et 100% selon les génotypes avec 0,5mg/l de B.A.P après seulement 5 jours de mise en culture .

1.2.Choix du GA₃

Même si la combinaison A.N.A - B.A.P a donné plus rapidement de bons taux de démarrage, il reste cependant que nous avons constaté une faible élévation des entre-noeuds, l'adjonction de GA₃ en faible concentration (0,05mg/l) nous a permis d'avoir une meilleure élévation des pousses feuillées.

1.3. Résultats du développement des microboutures après détermination du milieu.

Le milieu type utilisé après ces différents tests, est composé du milieu à base MS. (1962) auquel nous avons ajouté 0,05mg/l d'A.N.A , 0,5mg/l de B.A.P et 0,05mg/l de GA₃. Les tableaux N°VI, VII, VIII et IX, montrent les résultats de la première mise en culture et de trois autres subcultures.

TABLEAU N°VI. Mise en culture initiale de fragments de noeuds. résultats après 30 jours.

	<i>Walo</i>	<i>Ndargu</i>	Clone "19"	Clone "29"	Clone "2"
nombre d'explants mis en culture	24	24	24	24	24
pourcentage de contamination	67%	25%	21%	100%	33%
Pourcentage d'explants débourrés	30%	75%	42%	0	67%
Pourcentag d'explants nécrosées	3%	0	37%	0	0
Nombre de noeuds par vitroplant	7	6	5	6	6
Nombre de pousses par vitroplant	une seule	une seule	une seule	une seule	une seule
longueur des vitroplants	7,5 cm	8 cm	9 cm	8 cm	8,5 cm
Enracinement des vitroplants	très satisfaisant	très satisfaisant	très satisfaisant	très satisfaisant	très satisfaisant
Couleur des vitroplants	vert-foncé	vert-clair	verte	verte	vert-clair
Cal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal

TABLEAU N°VII. Subculture I de noeuds. Résultats après 30 jours.

	<i>Walo</i>	<i>Ndargu</i>	Clone "19"	Clone "29"	Clone "2"
Nombre d'explants mis en culture	33	37	62	34(2° mise en culture)	14
Pourcentage de contamination	54%	11%	0%	85%	7%
Pourcentage d'explants débouré	42%	89%	92%	9%	78%
Pourcentage d'explants nécrosés	4%	0	8%	6%	15%
Nombre de noeuds par vitroplant	6	6	5	5	6
Nombre de pousses par vitroplants	une seule	une seule	une seule	une seule	une seule
Longueur des vitroplants	8cm	7,5cm	8cm	7cm	9cm
Euracinement des vitroplants	très satisfaisant	très satisfaisant	très satisfaisant	très satisfaisant	très satisfaisant
Couleur des vitroplants	vert-foncé	vert-clair	verte	verte	vert-clair
Cal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal

TABLEAU N°VIII. Subculture II de noeuds. Résultats après 30 jours.

	<i>Walo</i>	<i>Ndargu</i>	Clone "19"	Clone "29"	Clone "2"
Nombre d'explants mis en culture	61	158	281	24	37
Pourcentage de contamination	21%	21%	31%	29%	0%
Poucentage d'explants débouré	79%	78%	69%	71%	59%
Pourcentage d'explants nécrosés	0	1%	0	0	41
Nombre de noeuds par vitroplant	6	7	7	7	7
Nombre de pousses par explants	une seule	une seule	une seule	une seule	une seule
Longueur des vitroplants	8cm	9cm	8cm	7,5cm	9cm
Enracinement des explants	très satisfaisant	très satisfaisant	très satisfaisant	très satisfaisant	très satisfaisant
Couleur des vitroplants	vert-foncé	vert-clair	verte	verte	vert-clair
Cal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal



Figure n°13. Vitroplants acclimatés en serre pendant 25 jours.

12 cm

TABLEAU N°IX. Subculture III de noeuds. Résultats après 30 jours.

	<i>Walo</i>	<i>Ndargu</i>	Clone "19"	Clone "29"	Clone "2"
Nombre d'explants mis en culture	123	112	112	48	124
Pourcentage de contamination	10%	15%	5%	35%	0%
Pourcentage d'explants débouré	88%	80%	89%	62%	97%
Pourcentage d'explants nécrosés	2%	5%	6%	3%	3%
Nombre de noeuds par vitroplant	7	6	7	6	7
Nombre de pousses par vitroplants	une seule	une seule	une seule	une seule	une seule
Longueur des vitroplants	8cm	7,6cm	8cm	7,5cm	9cm
Enracinement des vitroplants	très satisfaisant	très satisfaisant	très satisfaisant	très satisfaisant	très satisfaisant
Couleur des vitroplants	vert-foncé	vert-clair	verte	verte	vert-clair
Cal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal	cal cicatriciel basal

Les résultats obtenus montrent, que la mise en culture d'un fragment de noeud de 1 cm après un mois, donne une seule tige feuillée verte avec des longueurs comprises entre 8 et 9 cm selon les géotypes. Nous avons pu noter à la base des vitroplants la présence d'un cal cicatriciel de petite taille.

Nous avons aussi noté que la période de production optimale de vitroplants se situe au cours de la première subculture. Ainsi pour toute exploitation de cette étude pour une propagation intensive, les vitroplants peuvent commencer à être acclimatés après cette phase.

A la suite des résultats obtenus depuis la mise en culture jusqu'à la troisième subculture, nous avons noté des différences selon les géotypes du taux de multiplication (nombre de noeuds contenus dans une tige et susceptibles d'être mis en culture) en fonction du temps. Le tableau N°X donne le taux de multiplication des différents géotypes après 15 et 30 jours de mise en culture.

TABLEAU N°X. Taux de multiplication des géotypes en fonction du temps de mise en culture.

	Après 15 jours de mise en culture	Après un mois de mise en culture
<i>Walo</i>	4,5	6,5
<i>NDargu</i>	4,25	6,25
Clone "2"	4	6,75
Clone "19"	3,75	6,25
Clone "29"	3	6

Ce taux de multiplication déduit des quatre repiquages, a été calculé chez les explants qui ont débourré. Ce taux de multiplication des débourrés (T.M.D) est le rapport du nombre total de noeuds pour chaque géotype sur le nombre d'explants qui ont débourré.

Mais pour mieux apprécier le taux de multiplication réel pour chaque géotype, nous avons comparé (tableau N°XI) le T.M.D avec le taux de multiplication global (T.M.G), qui est le rapport pour chaque géotype du nombre total de noeuds sur le nombre total d'explants mis en culture.

TABLEAU N°XI. Comparaison entre le T.M.D et le T.M.G pour chaque géotype après un mois de mise en culture.

	T.M.D	T.M.G
<i>Walo</i>	6,5	6,25
<i>Ndargu</i>	6,25	6
Clone "2"	6,75	6,25
Clone "19"	6,25	6
Clone "29"	6	3

Une grande différence apparaît, à l'analyse de ce tableau comparatif, entre le T.M.D et le T.M.G chez le clone "29", laquelle différence s'explique par le fait que beaucoup d'explants de ce clone sont perdus pour cause de contamination limitant ainsi sa micropropagation. Pour les autres génotypes, les contaminations étant limitées, les différences entre le T.M.D et le T.M.G ne sont pas significatives.

Le microbouturage de noeuds *in vitro* est facilité chez la patate douce par un fort taux d'enracinement observé chez tous les génotypes étudiés sans traitement préalable ni conditions particulières. Ainsi, le même milieu a permis aussi bien le démarrage du bourgeon axillaire que à son enracinement. L'apparition de racines se note généralement 7 jours après la mise en culture, soit 2 jours après le démarrage du bourgeon axillaire. Mais dans le cas où l'explant est constitué de noeuds à bourgeon apical, nous constatons une apparition plus précoce de racines, c'est à dire en même temps que le démarrage du bourgeon. Ceci constitue la seule différence constatée entre les noeuds avec bourgeon apical et les noeuds avec bourgeons axillaires.

Nous notons une certaine différence dans la morphologie de ces racines avec:

- des racines longues, épaisses et peu nombreuses, ayant une origine bien déterminée au niveau du noeud. Ces racines peuvent même être observées sous forme d'ébauches méristématiques avant le repiquage (racines nodales),

- des racines plus nombreuses et plus fines, sont néoformées à la base des boutures (racines internodales).

Toutes ces racines présentent un géotropisme positif. SIHACHAKR (1982) a constaté en plus des racines présentant un géotropisme positif, d'autres à géotropisme négatif sur des cultures d'entre-noeuds et des racines présentant les deux types de géotropisme sur des cultures de pétioles isolés.

Le polymorphisme racinaire ainsi observé chez la patate douce ne se limite pas à ces trois types. En effet il a été constaté par SIHACHAKR (1982) chez des vitroplants âgés de 8 semaines une augmentation de l'épaisseur des racines pouvant atteindre 2 mm, cette augmentation peut aller jusqu'à 4 mm, mais ne dépasse jamais 7 mm sur des vitroplants âgés de 24 semaines, SIHACHAKR (1980c).

Dans notre étude, nous n'avons observé aucun phénomène de tubérisation même sur des vitroplants âgés de 10 semaines.

En conclusion de cette partie, nous pouvons dire que la multiplication *in vitro* par microbouturage de noeuds avec bourgeon axillaire ou apical, est satisfaisante chez la patate douce vu les résultats obtenus pour l'ensemble des génotypes étudiés. Cette technique nous a permis d'obtenir des vitroplants présentant les mêmes caractéristiques que les individus de départ c'est dire donc une conformité du matériel végétal.

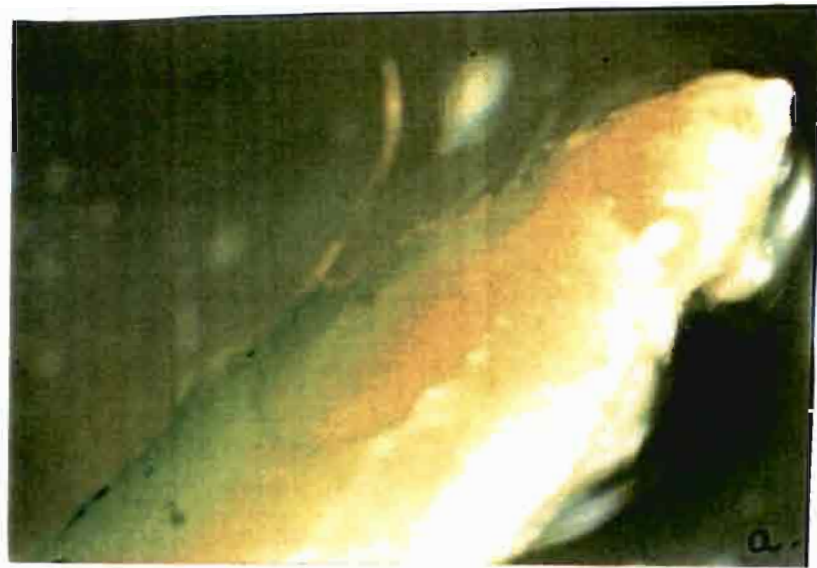


Figure n°10. Méristème prêt à être excisé.

1,5 mm



Figure n°11. Méristème après 13 jours de mise en culture.

1 mm



Figure n°12. Développement et enracinement d'un vitroplant issu par culture de méristème.

2,25 cm.

2. culture in vitro de méristème.

2.1. Reprise du développement des méristèmes.

Cette reprise du développement des méristèmes a été testée dans plusieurs milieux avec comme source d'auxine l'A.I.A au vu les résultats satisfaisants obtenus par différents auteurs. L'A.I.A a été combinée à différentes doses de cytokinines constituées de la B.A.P et de la kinétine. Les différentes combinaisons d'hormones de croissance nous ont permis d'expérimenter quatre milieux avec une dose fixe en GA₃ qui est de 0.5mg/l.

-MS₀ : milieu O.

-M.S₀ + A.I.A (0,01mg/l) + kinétine (0,1mg/l) + GA₃ (0,5mg/l) : milieu P.

-M.S₀ + A.I.A (0,05mg/l) + B.A.P (0,1mg/l) + GA₃ (0,5mg/l) : milieu Q.

-M.S₀ + A.I.A(0,05mg/l) + kinétine (0,1mg/l) + GA₃ (0,5mg/l) : milieu R.

Après 45 jours de mise en culture, nous avons obtenu les résultats suivants.

TABLEAU N°XII. Résultats sur la reprise du développement des méristèmes des géotypes en fonction du milieu de culture.

	<i>Walo</i>	<i>Ndargu</i>	Clone "2"	Clone "19"	Clone "29"
Milieu O	1b	1a	1a	1b	1a
Milieu P	3	1b-2	1a	1b-2	1a
Milieu Q	3	1b	1b	1b	1b
Milieu R	3	1b	1b	1a	1a

Légende:

1a- Démarrage faible

1b- Bon démarrage

2- Néof ormation de racines

3-Formation de cal s.

IL est apparu au cours de ces expériences, que les géotypes utilisés subissent différemment l'action du milieu choisi, en particulier la variété *Walo*, qui ne donne que des cal s. Mais, le milieu Q peut cependant être considéré, comme milieu type pour la reprise du développement des méristèmes car il donne les meilleurs résultats. Ainsi nous l'avons utilisé dans la suite de notre travail.

Nous pouvons aussi constater à partir de ces résultats, que le milieu P, permet en plus de du développement, l'enracinement des explants chez la variété *Ndargu* et le clone "19", ce qui nous a permis de l'utiliser comme milieu d'enracinement.

Les cals obtenus avec la variété *Walo*, repiqués sur un milieu MS (1962) sans hormones de croissance (tableau n°XI), n'avaient pu régénérer ni bourgeons, ni racines au bout d'un mois.

Nous avons par la suite fait une comparaison sur la reprise de développement de méristèmes prélevés sur des plantes en serre âgées de 5 mois et sur ceux prélevés sur des vitroplants du deuxième et troisième repiquage dans les mêmes conditions.

Le nombre d'explants, utilisés pour chaque génotype et par milieu est le même.

TABLEAU N°XIII. Pourcentage de reprise du développement des méristèmes prélevés sur des vitroplants et sur des plantes mobilisées en serre. Résultats après 45 jours.

	<i>Walo</i> N=6	<i>Ndargu</i> N = 9	Clone "2" N = 5	Clone "19" N = 6	Clone "29" N = 5
Milieu O	P ₁ = 83% P ₂ = 50%	P ₁ = 77,7% P ₂ = 44,4%	P ₁ = 80% P ₂ = 40%	P ₁ = 83% P ₂ = 50%	P ₁ = 80% P ₂ = 40%
Milieu P	P ₁ = 66.6% P ₂ = 33%	P ₁ = 100% P ₂ = 44.4%	P ₁ = 100% P ₂ = 20%	P ₁ = 100% P ₂ = 33%	P ₁ = 80% P ₂ = 60%
Milieu Q	P ₁ = 100% P ₂ = 33%	P ₁ = 77,7% P ₂ = 22,2%	P ₁ = 100% P ₂ = 40%	P ₁ = 100% P ₂ = 33%	P ₁ = 80% P ₂ = 40%
Milieu R	P ₁ = 100% P ₂ = 50%	P ₁ = 44,4% P ₂ = 44,4%	P ₁ = 100% P ₂ = 80%	P ₁ = 66.6% P ₂ = 50%	P ₁ = 40% P ₂ = 60%

Légende

N= Nombre de méristèmes.

P₁= Pourcentage de reprise du développement des méristèmes prélevés sur des vitroplants.

P₂= Pourcentage de reprise du développement des méristèmes prélevés sur des plantes mobilisées en serre

Ces résultats, montrent que les méristèmes prélevés sur les vitroplants se développent mieux que ceux prélevés sur des plantes mobilisées en serre. De plus, nous notons une croissance plus rapide et plus précoce chez ces mêmes méristèmes.

Ces résultats pourraient s'expliquer, non seulement par le fait que les méristèmes prélevés sur des plantes en serre, subissent l'action du désinfectant, ce qui limite leur développement, mais aussi par le fait que les méristèmes prélevés sur des vitroplants s'adaptent plus vite aux conditions de mise en culture.

Sur des vitroplants obtenus par repiquages successifs, nous avons pu constater un certain retard quant à l'apparition des racines nodales, ou même dans certains cas leur absence totale. Certains auteurs comme NOZERAN et ROSSIGNOL-BANCILHON (1972); NOZERAN (1978) et SIHACHAKR (1982), pensent que ce phénomène pourrait être considéré comme un marqueur morphologique de rajeunissement du matériel végétal obtenu par culture *in vitro* par rapport aux plantes propagées par multiplication végétative au champs. Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée par le fait que chez les plantes de patate douce issues de graines ou de tubercules, l'apparition de racines s'observe tardivement (après que les plantes aient atteint une dizaine de centimètres).

2.2. Enracinement des vitroplants issus de culture de méristème

Cet enracinement a été testé sur cinq milieux à base MS. (1962), avec une variation des doses et des combinaisons en hormones de croissance. L'A.I.A a été reconduit comme source d'auxine.

M.S₀ : milieu 1

M.S₀ + A.I.A (0.05mg/l) + kinétine (0.25mg/l): milieu 2

M.S₀+A.I.A (0.05mg/l) + B.A.P (0.25mg/l): milieu 3

M.S₀ +A.I.A (0.05mg/l) + kinétine (0.5mg/l): milieu 4

M.S₀+ A.I.A (0.05mg/l) +B.A.P (0.5mg/l): milieu 5

Le nombre d'explants, testés en fonction du milieu et par génotype, est de 5.

TABLEAU N°XIV. Nombre d'explants enracinés par génotype en fonction du milieu.

	<i>Walo</i>	<i>Ndargu</i>	Clone "2"	Clone "19"	Clone "29"
Milieu 1	60%	40%	60%	80%	60%
Milieu 2	60%	60%	80%	60%	60%
Milieu 3	40%	60%	60%	60%	100%
Milieu 4	80%	60%	80%	100%	80%
Milieu 5	80%	40%	60%	60%	40%

Tous les milieux testés, présentent un taux d'enracinement satisfaisant. Cependant, l'A.I.A à 0,05mg/l combiné avec de la kinétine (0,5mg/l) a donné de meilleurs résultats pour l'ensemble des génotypes. Ces résultats sont conformes avec ceux obtenus précédemment. En effet HOUNDONUGBO (1989), a montré, que l'A.I.A, à faibles doses, stimulait la néoformation de racines, augmentant aussi le nombre moyen de racines par explants, et que cette capacité rhizogène de l'A.I.A est renforcée par la kinétine.

Nous avons noté un bon taux d'enracinement des vitroplants sur milieu MS (1962) sans hormones de croissance chez tous les géotypes étudiés. Ceci montre que l'enracinement des vitroplants peut être envisagé sans adjonction d'hormones de croissance. Le recours à cette technique d'assainissement comporterait un avantage financier important du fait de la réduction des dépenses pour l'achat d'hormones de croissance pour l'enracinement des vitroplants.

2.3. Conclusion.

Il est apparu, avec les résultats obtenus, que la culture de méristèmes a été dans l'ensemble satisfaisante chez la patate douce. En fait, cette technique, en plus du rôle d'assainissement permettant de mettre à la disposition des producteurs des plantes assainies et en grande quantité, contribue au rajeunissement du matériel végétal augmentant ainsi la vigueur des plantes.

3. Acclimatation des vitroplants obtenus par microbouturage et par culture de méristèmes.

L'acclimatation des vitroplants issus de micropropagation, a été réalisée sur trois types de substrats aussi bien chez les plantes issues de microbouturages de noeuds que chez les plantes obtenues par culture de méristème. Les trois types de substrats ainsi expérimentés sont:

- sables fins,
- sables mélangés avec du terreau,
- du sol prélevé sous les filaos.

Les vitroplants obtenus par culture de méristème de même que ceux issus par microbouturage et sortis en serre se sont acclimatés à 100% et ceci sur les trois types de substrats.

Nous avons pu noter chez les vitroplants acclimatés, un bon développement des parties aériennes et souterraines.

La parfaite acclimatation des vitroplants issus des deux différentes techniques de culture *in vitro*, montre la capacité de ces vitroplants à constituer des pieds adultes prêts à être soumis aux conditions de culture.

II. Embryogenèse somatique.

La mise en culture de pointes apicales sur milieu d'initiation et leur transfert après 2, 4 et 6 semaines sur milieu d'induction, a donné les résultats consignés dans les tableaux ci-après. La composition des milieux A,B,C et Dest donné dans la partie matériels et méthodes. Cette manipulation a concerné quatre des cinq génotypes à savoir la variété Ndargu, la variété Walo et les clones 2 et 19.

TABLEAU N°XV. Résultats sur la mise en culture de pointes apicales de patate douce dans différents milieux pour leur initiation en cals après 2, 4 et 6 semaines puis repiquées pendant un mois sur milieu d'induction.

	Milieu A	Milieu B	Milieu C	Milieu D
Nombre d'explants mis en culture	108	108	108	108
Pourcentage d'explants pollués et nécrosés	20%	40%	47%	48%
Pourcentage d'explants ayant débourré	80%	30%	14%	10%
Pourcentage de cals formés	0%	26%	40%	42%
Pourcentage de cals avec néoformations de bourgeons et de racines	0%	36%	19%	13%
Pourcentage de cals néoformant que des racines	0%	43%	32%	29%
Pourcentage de cals embryogènes	0%	0%	0%	0%
Pourcentage de cals dégénérés	0%	21%	49%	58%

TABLEAU N°XVI. Résultats de la mise en culture de pointes apicales dans différents milieux d'initiation en fonction de la durée.

		2 semaines	4 semaines	6 semaines
Milieu A	Nombre d'explants mis en culture	36	36	36
	nombre d'explants débourrés	24	30	32
	Nombre de calcs formés	0	0	0
Milieu B	Nombre d'explants mis en culture	36	36	36
	Nombre d'explants débourrés	13	15	7
	Nombre de calcs formés	5	10	13
	Nombre d'explants mis en culture	36	36	36
Milieu C	Nombre d'explants débourrés	0	0	0
	Nombre de calcs formés	7	16	20
	Nombre d'explants mis en culture	36	36	36
Milieu D	Nombre d'explants débourrés	0	0	0
	Nombre de calcs formés	8	17	20



Figure n°14. Cal chlorophyllien régénérant des racines.

5,5mm



Figure n°15. Cal brun non chlorophyllien régénérant des racines.

5mm

L'analyse des résultats obtenus (tableaux n°XV et tableau n°XVI), fait ressortir la capacité à la callogénèse des différents milieux utilisés, à l'exception du milieu A, où l'on peut observer une régénération directe des explants mis en culture. Cette capacité à la callogénèse, varie en fonction de la durée de mise en culture et du milieu, elle est plus favorable après 6 semaines de mise en culture sur milieu D.

Ces cals friables non chlorophylliens devenant chlorophylliens après transfert sur milieu d'induction, avaient un devenir différent selon la durée. Après deux semaines les cals obtenus, donnent le plus souvent des néoformations de bourgeons et de racines. Par contre après quatre et six semaines dans le milieu d'induction, soit les cals ne régénèrent que des racines (après quatre semaines), soit ils dégèrent 15 jours après leur transfert sur milieu d'induction (après six semaines). Dans tous les cas, il n'a été observé aucune structure assimilable à des embryons somatiques.

Il ressort de ces expériences deux enseignements majeurs.

- La néoformation de bourgeons bien que limitée, ne peut être réalisée que sur des cals relativement jeunes initiés après deux semaines.
- Les différents milieux utilisés pour l'initiation des explants en cals peuvent être considérés comme étant favorables, bien que le pourcentage de cals obtenu reste faible.
- Les cals d'aspect friable, ne permettent pas la formation de structures embryogènes.

Ces résultats sont en partie en accord par les travaux de CAVALCANTE AIVES *et al.*, (1994) et ceux de MARIE E. BENIEK *et al.*, (1995), qui pensent que les cals friables bien qu'ayant une forte croissance par rapport aux cals compacts HEYSER *et al.*, (1983) et LU *et al.*, (1983), ne régénèrent pas d'embryons. Mais ces auteurs, bien qu'ayant constaté des néoformations sur des cals initiés après quatre semaines, ont en plus obtenu la formation de structures polarisées, ceci sur des cals compacts initiés en six semaines.

Nous avons situé cette absence de structures embryogènes à deux niveaux à savoir:

- au niveau des concentrations et des combinaisons en hormones de croissance,
- au niveau des conditions de culture.

Le but recherché dans de tels réajustements, est d'arriver à obtenir un pourcentage important de cals compacts. Ces réajustements sont enregistrés au niveau de la phase callogène des explants et au niveau de l'expression de ces cals en embryons.

- Phase callogène.

En plus des milieux C et D qui ont manifesté une forte capacité callogène au moment de l'initiation des explants lors des premiers essais, nous avons testé un autre milieu en augmentant la dose de 2,4-D jusqu'à 2mg/l. Ainsi en plus du milieu témoin MS₀, nous avons expérimenté trois autres milieux ce qui nous a donné quatre milieux à tester.

- MS₀. Milieu A'.
- MS₀ + 2,4-D (0.2mg/l) + BAP (1mg/l). Milieu B'.
- MS₀ + 2,4-D (0.4mg/l) + BAP (1mg/l). Milieu C'.
- MS₀ + 2,4-D (2mg/l) + BAP (1mg/l). Milieu D'.

L'utilisation de la BAP (1mg/l), ainsi que l'augmentation de la concentration en 2,4-D à 2mg/l ont été ressorties des résultats significatifs obtenus par CHEE and CANTLIFFE (1989a).

Après une période d'incubation de 4, 6 et 8 semaines, nous avons noté une importante capacité callogène des milieux B', C', et D'. Quant au milieu A', il permet une régénération directe des explants mis en culture.

Nous avons essayé de voir les capacités callogènes des différents milieux avec ou sans adjonction de BAP.

Nous avons constaté à cet effet, que les différents milieux présentent de fortes capacités callogènes quelle que soit la nature des cytokinines mais que le pourcentage de cals compacts est beaucoup plus important en présence de la BAP (90%) dans le milieu.

La BAP aurait donc pour effet de rendre les cals plus compacts.

Les explants ainsiensemencés, ont été soumis à deux conditions à savoir l'obscurité totale à une température de 27°C et une alternance lumière-obscurité avec une photopériode de 16 heures de jour; et à la même température.

Dans de telles conditions, les explants soumis à une alternance lumière-obscurité, sont légèrement plus callogènes (85%) que les explants mis sous une obscurité totale (70%).

- Phase d'induction des embryons sur les cals

Les cals ainsi obtenus, ont été transférés sur milieu d'induction gélosé (tableau n°III) où nous avons cependant augmenté la quantité d'azote du milieu en y ajoutant 10 mM de NH_4NO_3 tel que ressorti des études de CHIEE *et al.*, (1992). Différents auteurs ont aussi montré sur des plantes diverses, que la teneur du milieu en azote particulièrement en azote réduit, est un facteur favorisant la bonne maturation des embryons.

Après un mois d'expression dont une semaine à une obscurité totale, les cals dépourvus d'organes au moment du transfert sur milieu d'induction, brunissent et dépérissent progressivement sans exprimer aucune réponse morphogène.

- Conclusion.

Les différentes tentatives faites pour obtenir des réponses embryogènes à partir de pointes apicales de patate douce, se sont avérées peu fructueuses pour les différents génotypes étudiés. Cependant nous pouvons y en tirer certaines indications.

- L'absence totale de structures assimilables à des embryons somatiques identifiables à l'oeil nu. Dans les meilleurs des cas, nous n'avons que la néoformation de bourgeons et de racines sur de jeunes cals,

- La forte capacité callogène des différents milieux utilisés.

Ce très faible niveau de réponses, ne nous permet pas de dégager des conclusions claires et précises sur les capacités embryogènes de ces variétés locales de patate douce. Cependant les quelques indications obtenues peuvent servir de base pour de nouveaux développements sur le même type de matériel végétal avec possibilité d'étendre ce choix à d'autres explants comme par exemple les feuilles.

III. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Sur la micropropagation par microbouturage de noeuds, nous avons pu mettre en place un protocole de multiplication intensive et conforme sur tous les génotypes étudiés. Cette technique peut permettre d'éviter les variations souvent rencontrées au sein d'une même plantation composée de mêmes clones d'où son importance dans la sélection variétale. Elle peut être envisagée dans le cadre d'une multiplication en masse de variétés nouvellement sélectionnées.

Par culture *in vitro* de méristèmes, nous avons mis au point un procédé qui pourrait permettre l'assainissement des plantes de patate douce virosées. ces résultats pourraient être donc utilisés dans le cadre d'un programme d'assainissement de plantes virosées. Aussi avec le rajeunissement observé chez les vitroplants, nous pouvons avoir un gain de vigueur des plantes pouvant se manifester par une augmentation des rendements tels que déjà observé par SEBASTIAO *et al.*,(1991), ces vitroplants peuvent ainsi être conservés en conditions aseptique pour la reconstitution de clones à l'abri des recontaminations.

Comme perspective à cette étude, nous devons en collaboration avec le CDII, essayer de déterminer le complexe viral responsable de la dégénérescence des cultures. Ceci permettrait de proposer un moyen de lutte efficace par thermothérapie suivie de culture *in vitro* de méristèmes.

Nous avons noté à travers nos investigations sur l'embryogenèse somatique chez la patate douce, deux niveaux importants de réponse:

- la forte capacité callogène des génotypes,
- la néoformation de bourgeons et de racines et de racines à partir de ces cals.

Cependant ces résultats limités obtenus demandent d'autres investigations pour apporter des solutions sur les capacités embryogènes de nos variétés locales de patate douce pour la recherche de variants. Car, si des résultats ont été obtenus sur l'embryogenèse de la patate douce notamment en France et aux Etats Unis sur des variétés européennes et américaines, aucune étude prenant en compte nos variétés locales n'a été entreprise de manière significative.

L'intérêt d'une telle étude, réside dans la recherche de variants pour élargir le polymorphisme de cette plante sans recourir à la sexualité, vue les difficultés de croisement que rencontre cette plante, mais aussi d'essayer d'avoir des variétés plus résistantes aux attaques parasitaires et plus productives.

Pour atteindre de tels objectifs, nous devons mettre sur place un protocole nous permettant de produire des embryons somatiques. Pour se faire nous pourrions prendre en compte dans une étude plus générale tous les facteurs qui agissent pour la formation et la maturation d'embryons *in vitro*. Nous devons ainsi essayer de maîtriser certains de ces facteurs.

- L'apport d'azote dans le milieu. Plusieurs travaux ont montré l'importance de l'azote sous toutes ces formes pour une bonne réponse embryogène. a cet effet, nous devons étudier à quelle phase (initiation des explants en cals ou l'induction des embryons sur les cals) son action est le plus efficace.

- Action séquentielle des différents milieux. La faible fréquence des réponses organogènes et l'absence de structures dans les expériences précédentes, nous amenera à envisager le transfert des cals dans différents milieux d'expression avec une suppression totale de l'auxine ou une diminution de sa concentration. Car si des séquences de milieux avec suppression de l'auxine dans le milieu d'expression ont souvent donné de bons résultats. Les travaux de REINERT et BAJAJ (1977), ont montré que l'aptitude à l'embryogenèse somatique peu cesser au cours des repiquages successifs sur milieu dépourvu de 2,4-D par suite de l'épuisement d'un facteur embryogène. Il faudrait donc essayer de voir toutes les combinaisons possibles pour de meilleures réponses embyogènes.

- Concentration en sucre du milieu. Il est ressorti dans quelques études qu'une augmentation de la concentration en saccharose permet d'améliorer légèrement ou de régulariser l'obtention d'une morphogenèse de type pre-embryonnaire. L'optimalisation de ces facteurs , peut conduire à de meilleurs résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLOUFA M** (1990). Production de cals à partir d'explants de tubercules d'*Ipomea batatas*(L) LAM et tentative de régénération *in vitro*. Colloque de l'I.N.R.A. **51**: 239-241.
- ALCONERO R., SANTIAGO A.G, MORALES F. et RODRIGUEZ F.** (1975). Meristem tip culture and virus indexing of sweet potatoes. *Phytopathology*. **65**: 769-773.
- AMMIRATO P.V** (1983). "Embryogénésis". Hand-book of plant cell culture, Vol. 1 , techniques for propagation and breeding , D.A. EVANS , W.R. SHARP , P.V. AMMIRATO and A. YAMADA eds , Mac Milans N.Y, pp: 82-123
- ARRENDELL S.and COLLINS W.W** (1986) Réaction of sweet potato seedling to the russet crack strain of feathery mottle virus. *Hort sciences*. **21** : 1191-1193.
- AUGE R. , BEAUCHESNE G. , BOCCON-GIBOT B. , MINIER R. , MORAND J.CL. , DECOURTYE L. , OUDIN Y. , VIDALIE H** (1982). La culture *in vitro* et ces applications horticoles. Technique et documentation (Lavoisier). pp : 153
- BALLE E** (1946). Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropacalum majus* L. and *Lupinus albus* L. *Am. J. Bot.* **33** : 301-318.
- BALLADE P** (1970). Précisions nouvelles sur la caulogénèse apicale de racines axillaires de cresson. *Planta*. **92** : 138-145 .
- BECWAR M . R . , WANN .S .R . , JOHNSON M .A . , VERHAGAEN S . A. , FEIRER R .P . , NAGMANI R** (1988) . Development and characterization of *in vitro* embryogenic systems in conifers. Somatic cell genetics of woody plants, Eds .Kluwer. Academ Publishers.pp: 1-18.
- BOCCON-GIBOT J. , DAUX P. , POITTIER J .C.** (1978).Clonal propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl . *in vitro*: determination of index propagation's speed. *4th. international congress of plant tissue and cell culture* Calgary, Canada. pp : 151.
- BOXUS P. and DRUART P.** (1986).Virus free trees through tissue culture *In*: Bajaj, Y.P.S (ed). Biotechnology in agriculture and forestry,Vol I: *Trees* springer-Verlag Berlin. pp:111-122 .
- CHEE R. P. and CANTLIFFE D. J.** (1988). Selective enhancement of *Ipomoea batatas* (L). Embryogenic and non-embryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. *Plant cell tiss. Org. Cult.* **15** : 169-177.
- CHE R. P and CANTLIFFE D.J.** (1989a). Composition of embryogenic suspension cultures of *Ipomoea batatas* (L). and production of individualized embryos.*Plant Cell tiss.Org. Cult.* **17**: 39-52.

- CHEE R.P and CANTLIFFE D.J** (1989b). Embryo development from discrete cell aggregates in *Ipomoea batatas(L)* in response to structural polarity. *In vitro Cell. Dev.Biol.* **25** : 757-760.
- CHEE R.P. AND CANTLIFFE D.J.** (1992). Improved production procedures for somatic embryos of sweet potato for a synthetic seed system. *Hort.Sci.* **27** : 1314-1316.
- CHE R.P., LESKOVAR D.I and CANTLIFFE D.J.** (1992). Optimizing embryogenic callus and embryo growth of a synthetic seed system for sweet potato by varying media nutrient concentrations. *J. Amer. Soc.Hort. Sci.* **117** : 663-667.
- CLARK C.A** (1986). Réaction of sweet potato selections to *Fusarium* root and stem canker caused by *Fusarium solani*. *Plant. Dis* **70** : 869-871.
- CORDNER H.B., THOMSON H. and JAYYOUSSE M.S** (1950). Proximal dominance and plant production in bedded tools of the sweet potato. *Proc.Amer. Soc. Hort. Sci.* **55**: 423-426
- DAUX P.** (1975). Contribution à l'étude de la multiplication végétative *in vitro* de *Saintpaulia ionantha Wendl.* Memoire. E.N.I.T.A.H., Angers.
- DE VRIES et al.,** (1967). *Agric. Sc.* **15**: 241.
- EDMOND J.B., AMMERMAN G.B.** (1971). Sweet potatoes: production , processing , marketing . West. Port.Connecticut. *The air publishing company* .129 : 1-3 ;30-31 ;56-66.
- ELLIOT R.F.** (1969). Growth excised meristem tips of kumara *Ipomoea batatas(L)* in axenic culture. *N.Z.J. Bot.* **7** : 158-166.
- F.A.O.**(Food and Agriculture Organisation) (1989) Production yearbook, Rome. pp : 139.
- GAUTHERET** (1959). La culture des tissus végétaux. *Masson edit.*
- GREIC J.K and SMITH S.W** (1960). Effects of KCl and dolomitic limestone on growth and ion of sweet potato.*Soil. Sci.* **89** : 347-352.
- GUNKEL J.E., SHARP W.R., WILLIAM B.W. WEST W.C. and DRINKWATZER W.O.** (1972). Root and shoot initiation in sweet potato explants as related to polarity and nutrient media variation. *Bot. Gaz.* **133 (3)** : 254-256.
- GUPTA P.K., DURZAN D.J** (1986a). Plantlet régénération via somatique embryogenesis from subcultural callus of mature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *In vitro cell. and develop. Biology.* **22 (11)** : 685-688.
- GUPTA NP.K., DURZAN D.J.** (1986b). Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. *Biotechn.* 643-645.

- GUPTA P.K. , DURZAN D.J., FINKLE B.J.** (1987). Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (Loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen. *Can.J. For. Res.* 17 : 1130-1134.
- HABERLANDT G.** (1902). Cultiversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Silzungsber Akad. Wiss wien ,Math. Nort.Classe 111 , Abt. 1 : 69-92
- HAKMAN I. ,VON ARNOLD S.** (1985). Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). *J. Plant. Physiology.* 137 : 149-158.
- HAKMAN I. , FOWKE L.C.** (1986). Somatic embryogenesis in *Picea glauca*(Whit spruce) and *Picea marina*(Black spruce) *Can. J. Bot.* 65 : 656-659.
- HELLER.R** (1953). Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux *in vitro*. *Ann.Sci. Nat. Bot.* 14 : 1-223
- HEYSER J.W., DYKES T.A, DE MOTT K.J.and NABORS M.W.** (1983). *Plant. Sci.* 29: 175-182.
- HOUNDONUGBO B.** (1975). Sur la culture *in vitro* de tissus de patate douce. Thèse doctorat de 3^e cycle. Univ. des Sciences et techniques de Lille. pp : 77.
- HOUNDONUGBO B .** (1989). Influence de différentes concentrations d'acide indole-3-acétique, d'acide naphthalène-acétique, d'acide 2,4-dichlorophenoxy-acétique et de Kinétine sur la callogénèse et l'organogénèse *in vitro* de fragments d'entre-noeuds de deux variétés de patate douce (*Ipomoea batatas* (L) Lam) *Agronomie.* 9 : 653-660 .
- HOZYO. Y.** (1973). The callus formation on tissue explant derived from tuberous roots of sweet potato plants. *Bull. Nat. Inst. Agr. Sci. Serie D, Japon.* 24: 1-33.
- ISRA/CDII** (1995) Patate douce/culture.
- JARRET R.L. , SALAZAR S. et FERNANDEZ R.** (1984). Somatic embryogenesis in sweet potato. *Hort. Science.* 19 : 397-398.
- JONES A. and GUTHBERT F.P Jr** (1973) Associated effects of mass selection for soil insect resistances in sweet potato. *J.Am. Soc. Hortic Sci.* 98 : 480-482
- JONES A. and DUKES P.D** (1980) Heritabilities of sweet potato resistance to rootknot caused by *Meleiodogyne incognita* and *Meleiodogyne javanica*. *J. Am. Soc. Hort Sci.* 105: 154-156.
- J.M. CAVALCANTE ALVES, D. SIHACHAKR, M. ALLOT, S. TIZROUTINE, I. MUSSIO, A. SERVAES and G. DUCREUX** (1994) Isozyme modification and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Lam). *Plant Cell Reports.* 13 : 437-441.

- KASSANIS B.** (1965). Therapy of virus infected plants. *J.R. Agric. Soc.Engl.* **126**: 105-114.
- KASSANIS B.** (1967). Plant tissue culture. *In: Méthods in virology* (MARAMOROSCH et KOPPOWSKI ed) . *Acad. Press. New-York.* **1** : 537-556.
- KRAKER J.P. et BOLHUIS G.G.** (1967). Propagation in sweet potato with differents kinds of cutting. Proc of the 1rst Inter. Symp. on tropical root crops. Univ. of west indies. S^t Augustine, trinidad, 2-8 April, 1 , **III** : 131-135.
- KROSTRUP P., ERIKSEN E.N , MELLER J.D. , ROULUND H.** (1988). Somatic embryogenesis in Sitka spruce(*Picea sitchensis*) (Bong car). *Plant cell reports.* **7** : 594-597.
- LAINE E.et DAVID A.** (1990). Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplasts of *Pinus caribaea*. *Plant Science.* **69** : 215-224.
- LELU M.A. , BOULAY M. , ARNAUD Y.** (1987) . Obtention de cals embryogènes à partir de cotyledons de *Picea abies* (L.) *KARST* prélevés sur des jeunes plantes âgées de 3 à7 jours après germination. *C.R. Acad. Science. Paris.t.* **305** , série. **III** : 105-109.
- LEVINE M.** (1951). The effect of growth substances and chimical carcinogens on fibrous roots of carrot tissue grown *in vitro*. *Am. J. Bot.* **38** : 132-138.
- LIMASSET P. et CORNUET P.** (1949). Recherche de virus de la mosaïque du tabac dans les méristèmes des plantes infectées. *C.R. Acad. SCi.* **228** : 1971-1972.
- LIZT R.E and CONNEVER R. A.** (1978). *In vitro* propagation of sweet potato. *Hort. Science.* **13(6)** : 659-660.
- LIU J.R. and CANTLIFFE D. J.** (1984). *Plant. Cell. Report.* **3**: 112-115.
- LOEBENSTEIN C. and HARPAZ I.** (1960) Virus disease of sweet potatoes in Israel *Phytopathology.* **50** : 100-104.
- LU C.Y, VASIL V. and VASIL I.K.** (1983) *Theor Appl. Genet.* **66** : 285-289.
- LU C.Y.and THIROPE T. A.** (1987) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in culture immature embryos of *Picea glauca*. *J. Plant. Physiol.* **128** : 297-302.
- MARGARA J.** (1982) Base de la multiplication végétative : Les méristèmes et l'organogénèse. *Laboratoire de morphogénèse. I.N.R.A. Versailles: pp* : 262.
- MARIE E. BIENIEK, ROY C. HARRELL and DANIEL J. CANTLIFFE** (1995). Enhancement of somatic embryogenesis of *Ipomoea batatas* in solid culture and production of mature somatic embryos in liquid cultures for application to a bioreactor production system. *Plant. Cell, Tissue and organ Culture.* **41**: 1-8.

- MELLOR F. et STACE-SMITH R.** (1977) Virus free potatoes by tissue culture. *In* : Applied and fondemental aspects of plant cell , tissue and organe culture(REINERTY and BAJAJ,Ed.). Springer. Verlag. New-York. pp : 616-635
- MOREL G.et MARTIN C.** (1952). Guérison de Dahlia atteints d'une maladie à virus. *C.R. Acad. Sci.* **235** : 1324-1325.
- MOREL G. et MARTIN C.** (1955). Guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus.*C.R. Acad. Agr Fr.* **41** : 472-475.
- MOREL G., MARTIN C. et MULLER J.F.** (1968). La guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus. *Ann. Physiol. Veg. I.N.R.A.* **10** : 113-139.
- MORI K.** (1971). Production of virus free plants by means of meristem culture. Japon. *Agr. Res. Quart.* **6** : 1-7.
- MURATA T., HOSHIMA K. and MIYOTI Y.** (1987). Callus formation and plant regeneration from petiole, protoplast of sweet potato (*Ipomoea batatas L. LAM*). *Ikushugaku Zashi (Japanese journal of breeding).* **37(3)**: 291-298.
- MURASHIGE T. and SKOOG F.** (1962). A revised medium of rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant. Physiol.* **15**: 473-497.
- NAG K.K and STREET H.E.** (1973). Freeze preservation of culture plant cells II. *The freezing and thawing phasis physiol plamt.* **34** : 261-265.
- NAKAJIMA T. and KAWAKAMI Y.** (1969) Root culture and initiation of adventitious buds in culture roots of sweet potato , *Ipomoea batatas (L).* *Proc. Crop. Sci. Soc. Jap.* **38**: 454-458.
- NIELSON L. W.** (1960) . Elimination of the internal cork virus by culturing apical meristems of infected sweet potatoes. *Phytopathology.* **50** : 840-841.
- NISHIYAMA T, MIYAZY T.and SAKAMOTO S.** (1975) Evolutionary autoploïdy in the sweet potato (*Ipomoea batatas (L) Lam*) and its progenitors.*Euphytica.* **24** : 197-208.
- NITSCH J.P. and NITSCH C.** (1965) Néofomation de fleurs in vitro chez une espèce de jours courts: *Plumbago indica.* *Ann. Physiol. Veg.* **7** : 251-256
- NOBECOURT P.** (1946) Productions de nature caulinaire et foliaire sur des cultures de racines de carotte en milieu synthétique. *C.R. Soc. Biol.* **140** : 944-953.
- NOZERAN R.** (1978). La multiplication végétative chez les végétaux supérieurs. Belgium. *Crops inter. Soc. for hort. Sci. Gembloux..* pp : 5-47.

- NOZERAN L. et ROSSIGNOL-BANCILHON L.** (1972). La culture *in vitro* en tant que technique pour l'approche des problèmes posés par l'amélioration des plantes. *Ann. Amelio. Plantes*. **22(2)**: 167-185.
- OVER DE LINDEN A.J. and ELLIOT R.F.** (1971). Virus infection in *Ipomoea batatas* and method of its élimination. *N.Z.J. Agr. Res.* **14** : 720-724.
- PANNETIER C. , ARTHUIS P. et LIEVOUX D.** (1981). Néoforrnations de jeunes plantes d'*Eleasis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro*. **36** :119-122.
- POITTIER J.C.** (1976). La multiplication végétative *in vitro* du *Saintpaulia ionantha* Wendl :conditons de culture , comportements des plantes en serre. *Memoire ENITAFI , Angers*.
- REINERT J.** (1958) . Morphogenese und ihren kontrolle an gewebeulturen aus carotten. *Natuwissens chaften*. **45** : 344-345.
- REINERT J. and BAJAJ Y.** (1977). Applied and fundemental aspects of plant cell, tissue and organ cultur. *Springer-verlag. New. York.* pp: 803.
- ROBBINS W.** (1922) . Cultivation of excised root tips and stem tip under sterile conditions. *Bot. Gaz.* **73** : 376-390.
- SCARAMUZZIF DEGAETANO A.** (1983). Organogénèsisè propagazione " *in vitro*" di *Ipomoea batatas* L. de apici vegetativi. *Rivo . Orthoflorofruti. Italia* **67(3)** : 213-229.
- SEBASTIAO DE OLIVEIRA E SILVA , ANTONIO DA SYLVA SOUZA e OSVALDO PEREIRA DA PAZ .** (1991). Effeto da multicação vegetativa *in vitro* na productividãde da batata doce(*Ipomoea batatas* (L.)Lam) *Rev. Bras. Fisiol. Vegetal* **3(1)** : 47-52.
- SEHGAL C.B.** (1975). Hormonal control of differenciation in leaf culture of *Ipomoea batatas*. *L.. Beitr. Biol. Pflanzen.* **51** : 47-52.
- SEHGAL C.B.** (1978). Regeneration of plants from anther culture of sweet potato(*Ipomoea batatas* L.) *Z. Pflanzen. Physiology. Bot.* **88** : 349-352.
- SIHACHAKR D.** (1980c) Histogénèsisè de la base "tubérisée" du pétiole de-feuilles bouturées et de celle de boutures de tiges chez *Ipomoea batatas* Lam. (Convolvulacée). *Revue gén. Bot.* **87** : 337-352.
- SIHACHAKR D.** (1982) . Premiers résultats concernant la multiplication végétative *in vitro* de la patate douce(*Ipomoea batatas* L. Lam. Convolvulacee). *Agronomie tropicale* **37(2)** : 142-151.
- SONDAHL M.R. AND SHARP W.R.** (1977). Hight frequency induction of somatic embryos in culture leaf explants of *Coffea arabica*. *Z. Pflanzen. Physiol.* **18** : 395-408.

- STEWART F. et MEARS K.** (1958). Growth and organized development of culture cells II. Organisation in culture grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* **45** : 705-708.
- STONE O.** (1968). The elimination of four viruses from carnation and sweet William by meristem tip culture. *Ann. Appl. Biol.* **62** :119-122.
- TISSERAT B.H.** (1987) . "Palme". Cell and tissue culture in forestry , Vol. 3. **In:**Bonga J. M. et DURZAN D.J. eds , MARTINUS NIJOBUFF publishers. **pp** : 338-356.
- TEN HOUTEN J. , QUAKE F. and VAN DER MEER F.** (1968) . Heat treatment and meristem culture for the production of virus free plant material. *Heth. J. Plant. Pathol.* **74**: 17-24.
- TERRY E.R.** (1981) Les maladies virales de la patate douce et leur élimination. *In:* Agence de coopération culturelle et technique (ed). La patate douce. *Proc. Ist Int Symp.* Paris **pp** : 171-177.
- TSAY H. and TSENG M.** (1979). Embroid formation and plantlet regeneration from anther callus of sweet potato. *Bot. Bull. Acad. Sinica.* **20** : 117-123.
- VON ARNOLDS. and WOODWARD D.** (1988). Organogenesis and embryogenesis in mature zygotic embryos of *Picea sitchensis* Tree. *Physiol.* **4** : 291-300.
- WETMORE R.** (1954). The use of the in vitro cultures in the investigation of growth and differentiation in vascular plants. *Brookhaven Symp. Biol.* **6** : 22-40.
- .WETMORE R. and MOREL G.** (1949). Growth and development of *Adiantum pedatum* on nutrient agar. *Am. J. Bot.* **36** : 305-306
- WHITE P .** (1934). Multiplication of viruses of tobacco and aucuba mosaïque on growing excised tomato roots . *Phytopathology.* **24** : 1003-1011.
- WILLIAM A.J. and GRANT W.** (1960). Effects of KCl and dolomitic limestone on growth and ion of sweet potato. *Soil. Sci.* **89** : 347-352.
- YAMAGUCHI T.** (1978). Hormonal regulation on organ formation in culture tissue derived from root tubers of sweet potato. *Bull. Univ. Osaka. Pref. Serie B.* **30**: 55-58.
- YAMAGUCHI T. and NAKAJIMA T.** (1972). Effects of abscissic acid on adventitious bud formation from culture tissue of sweet potato. *Proc. Crop. Sci. Soc. Japon.* **41**: 531-532.