Introduction et Conservation in vitro de Germplasme de Tomate (LYCOPERSICON ESCULENTUM)

REMERCIEMENTS

Ce travail a été entièrement réalisé au laboratoire de biotechnologies végétales de la Faculté de Sciences et Techniques sous la direction scientifique du Professeur Yaye Kène Gassama Dia.

Nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué à son élaboration et à sa présentation, en particulier :

Monsieur Kandioura NOBA, Maitre de Conférences au département de biologie végétale pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider ce jury avec spontanéité et ceci malgré votre emploi du temps chargé.

Monsieur Djibril Sané , Maître assistant au département de biologie végétale. Vous avez accepté spontanément de participer au jury. Cela ne nous étonne pas vu l'ensemble des conseils que vous nous avez prodigués tout au long de notre stage et votre sens élevé des relations humaines.

Mr Abdoulaye DRAME, Agronome et Enseignant à l'Université de Thiès ; vous avez accepté de participer à notre jury malgré de nombreuses contraintes Veuillez trouver dans ces quelques lignes l'expression de nos remerciements les plus sincères

Madame Yaye Kène Gassama Dia, Professeur au département de biologie végétale. Vous avez accepté de guider nos premiers pas dans la recherche avec patience et rigueur. Votre grande disponibilité malgré votre emploi du temps chargé ne nous a pas laissée indifférent.

Nous remercions également Maurice Sagna, technicien au laboratoire de biotechnologies végétales qui nous a initié aux techniques de culture in vitro et nous a assisté à toutes les étapes de notre travail avec rigueur et gentillesse.

Nos remerciements vont également à l'endroit de madame Mame Ourèye Sy et de Monsieur Diaga Diouf, chercheurs au laboratoire de biotechnologies végétales ainsi qu'à tous les enseignants qui nous ont fait aimer les sciences naturelles et la biologie végétale en particulier.

Nous remercions nos camarades de laboratoire avec qui il nous a été donné de travailler dans la sérénité tout ceci ne serait pas possible. Je veux nommer Amadou Diagne Alioune Ndiaye, Dame Niang, Mahamadou Thiam, Mamadou Saliou Diallo, Mamadou Hadi Diallo, Loubar Diouf, Amar Saloum Fall, Mamadou Lamine Ndoye, Mame Abounahr Sambe, Abraham

Diémé, François Abaye Badiane, Léopold Diatta, Badara Guèye, Seckouna Diatta, Adama Khoulé, Ami Bodian, Hamidou Tall,etc

Nous profitons de cette occasion pour remercier tous nos amis et promotionnaires en particulier : Bakhaw Sow, Mamadou Ly, Fawrou Sèye, Aly Diallo, Abdoulaye Sylla, Babacar Sarr, Mor Fatou Mbengue, Abdourahmane Mbengue

Remerciements particuliers au Colonel Mbareck Diop et à la World Federation of Scientists pour leur appui financier

DEDICACES

Ce travail est dédié à :

- ma défunte mère, arrachée à notre affection quelques mois avant cette soutenance que le Tout Puissant l'accueille dans son paradis éternel
- aux défunts Mamadou Diallo et Mansor Ndoye, Que Le Tout Puissant leur accorde al firdaws
- mon père qui n'a cessé de m'encourager pour que j'aille toujours de l'avant
- mes frères et sœurs : Néné, Aissata, Kène, Oulèye, Iba, Mamadou
- mes nièces : kène bou ndaw, Khadija, Penda, Dieynaba, Coumba
- mes cousins : Ndiouck, ameth, thierno,Demba Kène, Ismaila
- papa Ambi, papa Demba, Poulho, tonton hamdou
- mes boys : Aidara, ibou niang, maodo
- mes frères : ibrahim sall, ahmad sarr, moussa diouf, ahmad guèye, malang, souleymane, ,mbaye, omar, momar, ousmane diamé

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Quelques espèces du genre Lycopersicon sp

Tableau n°2 : Liste des régulateurs de croissance utilisés par divers auteurs pour l'organogenèse et la callogenèse chez la tomate

Tableau n°3 : Composition minérale du milieu de Murashige et Skoog (1962)

Tableau n° 4 : Composition minérale du milieu de Linsmaier et Skoog (1965)

Tableau n°5 : Effet du type d'explant sur les potentialités organogènes des différentes variétés

Tableau n°6 : Influence de l'ANA combinée à la BAP sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4

Tableau n°7 : Influence de la kinétine sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4

Tableau n°8 : Influence de la BAP sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4

Tableau n°9 : Influence de la zéatine et du lait de coco sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires sur le milieu MS

Tableau n°10: Influence de la zéatine et du lait de coco sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires sur le milieu LS

Tableau n°11 : Influence de la zéatine associée à la BAP sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires sur le milieu LS

Liste des planches

Planche 1 : Germination et Croissance chez la tomate

Planche 2 : Germination de graines de tomate et expression morphogénétique de nœuds axillaires et de nœuds apicaux après 30 jours de culture sur le milieu MS

Planche 3 : Expression morphogénétique de bourgeons axillaires de la variété Le3 après 30 jours de culture sur le milieu MS contenant de l'ANA seule ou combinée à La BAP

Planche 4 : Expression morphogénétique de nœuds axillaires de la variété Le4 sur le milieu LS après 30 jours de culture

Planche 5 : Formation de boutons floraux, d'une fleur et d'un fruit chez la variété Le4 sur le milieu MS

Planche 6 : Enracinement de nœuds axillaires de la variété Le4 après 30 jours de culture sur différents milieux

Planche 7 : Première acclimatation

Planche 8 : Deuxième acclimatation

Planche 9 : Fruits mûrs de tomate après 3 mois d'acclimatation

Liste des figures du texte

Figure 1 : Pourcentage de germination chez les différentes variétés de tomate

Figure 2 : Enracinement dans le milieu MS supplémenté d'ANA et de BAP

Figure 3 : Enracinement dans le milieu MS supplémenté de kinétine

Liste des sigles et abréviations

Le1 : lot de graines n°1

Le2 : lot de graines n°2

Le3 : Lot de graines n°3

Le4 : Lot de graines n°4

ANA : Acide Naphtalène Acétique

BAP : 6-Benzylamino-purine

Kin : Kinétine

Zéa : Zéatine

MS : Murashige et Skoog

LS : Linsmaier et Skoog

ISRA : Institut Sénégalais de Recherches Agricoles

ABN : African Biosciences Network

CW : Coconut Water

2iP: isopentyladénine

RESUME

TITRE : Introduction et Conservation in vitro de germplasme de tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Le présent travail a permis l'introduction et la conservation du germplasme de quatre variétés de tomate (*Lycopersicon esculentum*). La culture de nœuds axillaires a été réalisée sur les milieux de Murashige et Skoog ,1962 (MS) et de Linsmaier et Skoog, 1965 (LS) en présence régulateurs de croissance suivants (ANA, BAP, Kinétine et Zéatine).

Le milieu LS en présence de zéatine à une concentration de 2,2 mg/l s'est révélé être optimal pour la propagation à partir de nœuds axillaires avec le taux de multiplication le plus élevé (3,2 pour la variété Le4).

Sur les milieux LS et MS, un enracinement spontané des explants est enregistré au bout de 15 jours de culture sans apport d'hormone exogène. Dans tous les autres milieux, on observe un enracinement des explants au bout de 30 jours de culture à l'exception des milieux avec zéatine où aucun enracinement n'est constaté.

L'acclimatation des vitroplants est réalisée sur un substrat constitué d'un mélange de terreau (2/3) et de sable (1/3). Le taux de survie est de 90% au bout de 7 jours. L'arrosage est journalier et se fait avec l'eau de robinet. Les plants vigoureux ont fleuri et fructifié. Les semences ont été récoltées sur les quatre variétés au bout de trois mois de culture.

Mots clés : conservation, germplasme, micropropagation, *Lycopersicon esculentum*, bourgeonnement axillaire, zéatine

Sujet : Introduction et Conservation *in vitro* de germplasme de tomate

(*Lycopersicon esculentum*)

Introduction……..……...……1

A.Revue bibliographique…….…..……3

1 Généralités sur la tomate...…….3

1.1- Position systématique……..……3

1.2- Historique..……..……3

1.3- Description de la tomate.....……4

1.3.1 Le système racinaire…...…...…… 5

1.3.2 La tige….……5

1.3.3 Les feuilles.…….5

1.4- Germination et croissance...…….5

1.5- Floraison…....……..6

1.6- Fructification…….……..6

1.7- Exigences climatiques…...….…….7

1.7.1-Température…….……..7

1.7.2- Humidité relative…...……7

1.7.3- Lumière……8

1.8- Utilisations de la tomate……...……...8

2. Généralités sur la culture in vitro……...…….9

2.1- Composition du milieu de culture……...9

2.1.1- Eau……9

2.1.2 - Eléments minéraux……..9

2.12.1- Les macroéléments…….9

2.1.2.2- Les microéléments ou oligoéléments……...10

2.1.3- Substances organiques……10

2.1.3.1- Sucres……...10

2.1.3.2- Vitamines…….10

2.14- Régulateurs de croissance……..……..……11

2.1.4.1- Les auxines……...11

2.1.4.2- Les cytokinines…….11

2.1.4.3- Les giberellines…….12

2.1.5- Autres composés naturels……....12
2.1.6- La gélification du milieu par l'agar…….13
2.2- Les conditions de culture……...13
2.2.1- Stérilisation du milieu et du matériel de culture…….13
2.2.2- La température……14
2.2.3- La lumière……...14
2.3- La culture in vitro de la tomate……..14
2.3.1- Effet de la lumière……...15
2.3.2- Effet du milieu de culture……15
2.3.3- Effet de la concentration de sucres...……...15
2.3.4- Le développement de plantes haploîdes…….....16
2.3.5- Développement d'hybrides somatiques…….16
2.3.6- la micropropagation……...16
B- Matériels et méthodes……..……...21
1- Matériel……..21
1.1- Matériel végétal……21
1.2- Milieux de culture…….21
2- Méthode de culture……24
2.1- Désinfection du matériel végétal et ensemencement……24
2.2- Micropropagation…….24
2.2.1 Comparaison des capacités organogènes entre noeud axillaire et nœud apical……24
2.2.2 Influence de l'ANA combinée à la BAP sur le bourgeonnement et l'élongation des noeuds axillaires…….....25
2.2.3 Influence de la BAP sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires……25
2.2.4 Influence de la kinétine sur le bourgeonnement et L'élongation des nœuds axillaires……..26
2.2.5 Influence de la zéatine associée au lait de coco sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires sur le milieu LS…….26
2.2.6 Influence de la zéatine associée au lait de coco sur

le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires
sur le milieu MS…….27
2.2.7 Influence de la zéatine combinée à la BAP sur le
bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires….……...…27

2.3- Enracinement……27
2.4- Acclimatation……27
3- Conditions de culture…….……27
C- Résultats……..29
1- Taux de germination……..29
2- Micropropagation…….….29
2.1- Effet du type d'explant sur les potentialités
organogènes chez des différentes variétés ……...29
2.2- Influence de la BAP combinée à l'ANA sur le
bourgeonnement et l'élongation des noeuds axillaires chez
la variété Le4 ……....30

2.3- Influence de la kinétine sur le bourgeonnement et l'élongation
Des noeuds axillaires chez la variété Le4 ……....31
2.4- Influence de la BAP sur le bourgeonnement et l'élongation des
nœuds axillaires chez la variété Le4…….....32
2.5- Influence de la zéatine et du lait de coco sur le bourgeonnement
et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4 sur le
milieu MS….....33
2.6- Influence de la zéatine et du lait de coco sur le bourgeonnement
et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4 sur le
milieu LS…..……33
2.7- Influence de la zéatine combinée à la BAP sur le bourgeonnement
et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4
sur le milieu LS…….34
2.8- Autres résultats enregistrés lors de la
de la micropropagation……...……..35
3- Enracinement……35

3.1- Enracinement dans les milieux MS et LS…….36
3.2- Enracinement dans le milieu MS additionné de BAP et d'ANA…….36
3.3- Enracinement dans le milieu MS additionné de kinétine…….37
3.4- Enracinement dans le milieu MS supplémenté de BAP……...37
3.5- Enracinement dans les milieux à zéatine……..38
4- Acclimatation…….38
4.1- Première acclimatation…….38
4.2- Deuxième acclimatation……...38
D- Discussions……..39
1- Desinfection et germination……..39
2- Micropropagation……..39
2.1- Comparaison des capacités organogènes entre nœuds apicaux et nœuds axillaires……....40
2.2- Influence des cytokinines sur le développement des nœuds axillaires……..40
2.3- Influence de la BAP associée à l'ANA ..…….....41
2.4- Autres résultats enregistrés lors de la micropropagation……..……42
3- Enracinement…….43
4- Acclimatation…….44
E- Conclusions et Perspectives……..45
F- Références bibliographiques…….46

Introduction

La tomate est l'un des légumes les plus cultivés et les plus consommés de par le monde. C'est par le volume de la production le troisième légume au plan mondial après la pomme de terre et la patate douce (Wikipédia, 2005).

Au Sénégal le marché du double concentré de tomate représente environs 12 000 tonnes correspondant à 70 000 tonnes de tomate fraîche. Cette demande bien qu'étant réduite n'a été que très rarement satisfaite (Dramé, 2003). Exceptionnellement durant cette saison 2004-2005, la production a atteint un record de 100 000 tonnes (L'Office, 2005).

Malgré les résultats satisfaisants enregistrés dans le secteur, un certain nombre de problèmes subsistent dans la culture de la tomate et sont parfois liés aux semences. En effet, la SOCAS, principal fournisseur en semences des producteurs de la vallée du fleuve Sénégal ne distribuait aux paysans que deux variétés de tomate. C'est ce qui d'ailleurs avait poussé les professionnels du secteur à proposer l'intervention d'un deuxième fournisseur de semences et l'expérimentation de nouvelles variétés dans les bassins de production (CIFA, 2000).

C'est ce qui motive d'ailleurs notre étude qui se propose pour objectifs la multiplication de nouvelles variétés de tomate et leur introduction dans la culture de la tomate à côté des variétés anciennes. La multiplication de ces variétés se fera par l'intermédiaire de la micropropagation qui nous permettra de multiplier en grande quantité ces variétés d'intérêt mais aussi de disposer à tout moment de plants de tomate prêts au transfert en champ.

La micropropagation que nous envisageons de mener se veut une multiplication conforme par rapport au matériel de départ pour une conservation efficace du matériel génétique. C'est pour cette raison que nous avons envisagé la régénération directe à partir de nœuds axillaires comme moyen de multiplication de ces variétés de tomate. Ceci devra se faire en évitant de passer par une étape intermédiaire de callogenèse entre l'explant de départ et la plante nouvellement régénérée. Ceci est d'autant plus difficile que la plupart des travaux de micropropagation chez la tomate fait intervenir une phase intermédiaire de formation de cal. Or comme l'affirment Dwivedi et al (1992), le cal est considéré comme instable et pouvant mener à des variations génétiques par rapport à l'individu de départ. Ce phénomène est encore plus important chez la tomate si l'on en croit les travaux de Sibi rapportés par Demarly et Sibi (1989). Ces travaux révèlent que la fréquence d'apparition de phénovariants est très importante chez la tomate.

Ainsi ce travail propose comme objectifs :

- de mettre au point les paramètres d'une régénération conforme et d'une multiplication en masse de ces variétés de tomate à partir de nœuds axillaires
- d'assurer les conditions d'une conservation du germplasme de ces variétés de tomate en les maintenant en culture in vitro et sous forme de semences à partir des vitroplants acclimatées et cultivées sous serre.

A cette fin nous présentons le plan de travail suivant qui nous permet d'aborder en premier lieu la revue bibliographique dans laquelle nous parlerons de généralités concernant la tomate et la culture in vitro. La deuxième partie sera consacrée aux matériels et méthodes utilisés pour réaliser nos objectifs d'étude. Dans la troisième partie, les résultats seront présentés. La discussion de l'ensemble de ces résultats fera l'objet de la quatrième partie. Et à la lumière de tout ce qui précède des conclusions seront tirées et des perspectives d'étude dégagées.

A- Revue bibliographique

Notre revue bibliographique vise à mieux cerner le champ de l'étude en s'intéressant tout d'abord aux généralités sur la tomate (historique, biologie,etc.) et ensuite aux généralités sur la culture *in vitro*.

1. Généralités sur la tomate

1.1- Historique

L'histoire documentée de ce fruit débute lors de la conquête du Mexique par les Espagnols. De récents travaux archéologiques ont montré des traces de domestication du genre Lycopersicon dans les zones côtières de Pérou (Tabone, 2000). La conquête du Mexique en 1519 permit à la tomate de traverser l'Atlantique. En Europe (Italie, Espagne) elle fut cultivée comme plante ornementale pendant trois siècles environs car on la croyait toxique à cause de sa parenté avec la mandragore (Schumann, 2004). Il faudra attendre le milieu du 18ème siècle pour que les ouvrages scientifiques reconnaissent enfin sa comestibilité et ses qualités alimentaires. Depuis lors la tomate est trouvée dans tous les pays. Et elle constitue l'un des légumes les plus consommés de par le monde (Bal & Abak, 2003).

1.2- Position systématique

La tomate : *Lycopersicon esculentum* (Miller, 1768) appartient à la classification suivante :

Embranchement	: Phanérogames
Sous embranchement	: Angiospermes
Classe	: Dicotylédones
Sous classe	: Gamopétales
Ordre	: Solanales
Famille	: Solanacées
Genre	: Lycopersicon
Espèce	: esculentum

La tomate appartient au genre Lycopersicon qui fait partie de la famille des Solanacées tout comme l'aubergine, le poivron, le tabac, la pomme de terre. La caractéristique principale qui distingue le genre Lycopersicon du genre Solanum est le type de déhiscence des anthères : latérale pour le premier et terminal pour le second (Padapoulos, 2001)

Le genre Lycopersicon comprend deux sous-genres caractérisés par la couleur typique de leurs fruits à maturité. Ces deux sous genres sont le sous genre Ericopersicon aux baies vertes non comestibles et le sous genre Eulycopersicon aux baies rouges comestibles. La tomate appartient à ce sous genre de même que la tomate de Corinthe (*Lycopersicon pimpinellifolium*) (Tabone, 2000). Le tableau qui suit présente quelques membres du genre Lycopersicon ainsi que leur distribution géographique et leurs caractères chromosomiques.

Tableau 1 : Quelques membres du genre *Lycopersicon*

Sous genre	Espèce	Distribution Géographique	Nom commun	Nombre chromosomique
Eulycopersicon	*L. esculentum esculentum*	Globale	Tomate	24
	L. esculentum Mill. Var. *cerasiforme*	Andes, Brésil, Colombie, Amérique centrale, Mexique	Tomate cerise	24
	L. pimpinellifolium	Pérou (cote est) Équateur	Tomate de Corinthe	24
Eriopersicon	*L. peruvianum*	Pérou Chili (nord)	Espèce sauvage	24
	L. hirsutum	Pérou (centre sud)	Espèce sauvage	24
	L. cheesmanii	Iles Galapagos	Espèce sauvage	24
	L. chilense	Pérou (sud) Chili (nord)	Espèce sauvage	24
	L. chmielewskii	Pérou	Espèce sauvage	24
	L. glandulosum	Pérou	Espèce sauvage	24

1.3- Description de la tomate

La tomate est une plante herbacée à port rampant et aux tiges ramifiées. Les tiges, les feuilles et les jeunes fruits sont couverts de poils de deux sortes, poils simples et poils glanduleux (Messiaen, 1989). Les poils glanduleux sont couronnés par quatre cellules contenant une huile essentielle appelée solanine et qui répand une odeur caractéristique lorsqu'on froisse la plante (Chibane, 1999).

1.3.1- Le système racinaire

Le système racinaire chez la tomate est très puissant et ramifié sur les 30 premiers centimètres (Wikipédia, 2005). Il est constitué d'une racine pivotante bien structurée et d'un grand nombre de racines latérales. La plante développe également des racines adventives qui peuvent être utiles lorsque les racines sont endommagées ou atteintes de maladies (Padapoulos, 1991).

1.3.2- La tige

La tige de la tomate est herbacée, naturellement rampante si elle n'est pas soutenue par un tuteur (Messiaen, 1989). La tige est vigoureuse et ramifiée comme chez les autres solanacées.

1.3.3- Les feuilles

Les feuilles sont composées et velues. Elles sont indispensables pour la photosynthèse. En effet les vieilles feuilles perdent leur pouvoir photosynthétique et deviennent même nuisibles pour la plante chez laquelle elles peuvent causer des retards de croissance des fruits (Messiaen, 1989). Après avoir déployé deux cotylédons ovales et foliacés, la plante produit sept à quatorze feuilles comptant de plus en plus de folioles avant de développer sa première inflorescence.

1.4- Germination et croissance

Les graines de tomate de couleur blanche sont aplaties et velues. Le poids de 1000 graines varie entre 3 et 4 grammes selon la variété (Chibane, 1999). Chez la tomate, la germination

est épigée (Messiaen, 1989). A mesure que la radicule s'enfonce dans le substrat (planche 1), l'hypocotyle (portion de tige située sous les cotylédons) adopte une forme courbe désignée sous le nom de crochet plumulaire. Ce crochet s'allonge jusqu'à la surface du sol où la lumière contribue à le redresser et à le verdir. Lorsque la plante est fermement ancrée dans le sol et que le crochet plumulaire s'est complètement redressé, les téguments se détachent des cotylédons et tombent sur le sol (Padapoulos, 1991). Chez la tomate, deux types de croissance peuvent être observées :

- la croissance indéterminée (planche 1) : dans ce cas après la production de la première inflorescence, on compte en général trois feuilles entre chaque bouquet pourvu de quatre à douze fleurs (Messiaen, 1989).

- la croissance déterminée : après la production du premier ou deuxième bouquet floral, on ne compte plus qu'une ou deux feuilles entre les inflorescences et la tige s'arrête avec une inflorescence terminale (Messiaen, 1989).

1.5- Floraison

Les fleurs de tomate de coloration jaune clair sont regroupées en grappes florales. La tige principale de la grappe (pédoncule) peut se ramifier une ou plusieurs fois. La ramification est souhaitable du fait qu'elle augmente le nombre de fleurs par grappes (Padapoulos, 1991). Les fleurs de la tomate cultivée sont caractéristiques et généralement composées de cinq sépales qui constituent le calice et de cinq pétales qui constituent la corolle (Padapoulos, 1991). L'ovaire est surmonté d'un style et entouré par les étamines. Celles-ci s'ouvrent par des fentes internes et tombent directement sur le stigmate qui généralement n'émerge pas du cône staminal (Messiaen, 1989). L'autopollinisation est donc ainsi assurée (Padapoulos, 1991). C'est pour cela que la tomate est considérée comme une plante autogame.

1.6- Fructification

Le fruit de la tomate est une baie charnue comportant deux ou plusieurs loges (Padapoulos ; 1991). Une même plante peut produire deux types de fruits (bi et pluriloculaires ; pluriloculaires et fasciés suivant leur position sur le bouquet). Dans ce cas, le fruit produit par la première fleur présente plus de loges que les suivantes (Messiaen, 1989). Il s'écoule entre 45 et 55 jours entre l'épanouissement d'une fleur et la maturité commerciale du fruit

correspondant et par conséquent 90 à 120 jours du semis à la première récolte (Messiaen, 1989).

1.7- Exigences climatiques

1.7.1- La température

La température est le facteur le plus déterminant dans la culture de la tomate. En effet cette dernière réagit énormément aux variations thermiques, en particulier celles de la température de l'air qui influence la croissance végétative, la formation des grappes florales, la fructification, le développement des fruits, le mûrissement et la qualité des fruits (Padapoulos, 1991).

Les basses températures (celles inférieures à 10 °C) ralentissent la croissance et le développement des plantes, elles provoquent aussi la formation d'un feuillage important au détriment de la production, elles entraînent aussi des difficultés de nouaison (Chibane, 1999). C'est sans doute pour cette raison que la tomate est considérée comme une plante des régions chaudes. Pour une bonne croissance de la tomate il faut que les maxima journaliers soient supérieurs d'au moins 10° C aux minima tout en étant inférieurs ou égaux à 30° C (Messiaen, 1989). Bien que la tomate soit une espèce adaptée aux hautes températures, le premier bouquet floral peut rester à peine ébauché si les jeunes plantes sont soumises à des alternances thermiques variant entre 24 et 31° C. Si les plantes sont soumises à un stade jeune à des températures de 10 à 12° C, le premier bouquet est plus robuste et pourvu de nombreuses fleurs. On comprend ainsi mieux qu'à des latitudes de 10 à 20° Nord, les rendements soient plus satisfaisants pour des semis de Novembre – Décembre où les jeunes plantes subissent les températures les plus basses possibles, ceci particulièrement en climat sahélien (Messiaen, 1989).

1.7.2- L'humidité relative

Les effets de l'humidité relative sur le rendement de la tomate ne sont pas bien connus. Les cultures peuvent supporter une humidité relative variable pourvu que les écarts ne soient pas trop prononcés ou fréquents (Padapoulos, 1991). Cependant selon certains auteurs parmi lesquels Chibane (1999), une humidité relative de 75 % est jugée optimale car elle permet d'obtenir des fruits de bon calibre avec peu de gerçures. En effet pour un taux d'humidité

relative bas, l'irrigation est absolument nécessaire alors qu'une humidité trop élevée favorise le développement des maladies telles que le Botrytis et le mildiou (Chibane, 1999).

1.7.3- La lumière

La lumière est un facteur climatique fondamental dans la culture de la tomate. La tomate est une plante neutre à la photopériode cependant elle est exigeante en énergie lumineuse dont un manque peut inhiber l'induction florale et entraîner une baisse du pourcentage de germination du pollen (Chibane, 1999). La réduction de l'intensité lumineuse réduit l'activité photosynthétique et les hydrates de carbone produits durant le jour sont employés par la plante durant les longues nuits (Padapoulos, 1991).

1.8- Utilisations de la tomate

La tomate est l'un des légumes les plus cultivés de par le monde. D'après Ahmad (1976) la tomate est l'un des légumes les plus nutritifs, ceci sans doute à cause de sa richesse en vitamines mais également en sels minéraux. La tomate est très riche en vitamines A et C et est totalement libre de cholestérol (Hobson and Davies, 1971). Elle est également riche en éléments minéraux tels le Potassium, le Chlore, le Phosphore, etc.

Outre ses utilisations dans l'alimentation sous forme de tomate fraîche ou concentrée ; la tomate peut être utilisée pour ses nombreuses applications médicales :

- la chair de la tomate permet grâce à la chlorine qu'elle contient de mieux filtrer les déchets de l'organisme. A ce titre, elle joue un rôle antitoxique important pour le foie. Contre l'hypertension la chair de tomate est aussi recommandée grâce à son taux élevé de Potassium.
- La feuille fraîche peut jouer le rôle d'antibiotique, appliquée à une plaie avec une goutte d'eau.

Cependant, l'application médicale la plus importante et qui fait en ce moment l'objet de nombreuses recherches est l'intervention des caroténoides contenus dans le fruit de la tomate dans la prévention du cancer. Ceci serait possible grâce au lycopène qui possède une action antioxydante (Di Mascio & al, 1989). Des études épidémiologiques ont aussi suggéré le rôle possible de la tomate dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Ceci grâce à

l'inhibition par le lycopène de la formation des produits oxydés du cholestérol (Weisburger, 1998 ; Nguyen & al, 1999 ; Arab & al, 2000).

Après ces quelques généralités sur la biologie de la tomate, ses exigences culturales ainsi que ses nombreuses utilisations, nous abordons la partie consacrée au généralités sur la culture in vitro.

2. Généralités sur la culture in vitro

2.1- Composition du milieu de culture

Le milieu de culture a pour rôle d'assurer la nutrition des explants. Puisque ces derniers ne sont pas en contact avec le sol il faut leur fournir l'ensemble des éléments dont ils ont besoin pour assurer leur bonne croissance. C'est ainsi que l'on peut trouver dans le milieu de culture des sels minéraux, des composés organiques et des substances naturelles diverses.

2.1.1- L'eau

L'eau est un élément essentiel des milieux de culture car la plante, à l'instar des autres êtres vivants est constituée en majeure partie d'eau, de même l'ensemble des réactions métaboliques se déroulent en phase aqueuse. En culture in vitro l'eau utilisée peut être déionisée, filtrée sur charbon actif, purifiée par osmose inverse et ultrafiltration. Dans nos laboratoires, on utilise généralement de l'eau bidistillée pour préparer les milieux de culture.

2.1.2- Les éléments minéraux

La matière organique est constituée pour la majeure partie par les éléments suivants : Carbone, Hydrogène, Oxygène, Azote. Il existe également d'autres éléments minéraux nécessaires à la culture *in vitro* des plantes. Selon leur concentration dans le milieu de culture, on distingue les macroéléments (concentration supérieure à 0.5 millimoles par litre) et les microéléments ou oligoéléments (concentration inférieure à 0.5 millimoles par litre) (De Frossard, 1976). Les compositions minérales les plus souvent utilisées sont celle de Murashige et Skoog et celui de Gamborg (Boccon et al., 1989).

2.1.2.1 Les macroéléments

Les six macroéléments (Azote, Phosphore, Potassium, Soufre, Magnésium, Calcium) sont apportés en quantité variable suivant les besoins des souches tissulaires en culture (Téoulé, 1993. Puisqu'il serait long et fastidieux de peser les produits nécessaires à chaque fois que l'on prépare un milieu de culture, on utilise généralement des solutions mères de macroéléments que l'on dilue au besoin de façon adéquate (Boccon et al., 1989). A coté de ces macroéléments indispensables, on en trouve d'autres comme le Sodium et le Chlore qui ne sont employés que dans la culture de certaines plantes.

2.1.2.2 Les microéléments ou Oligoéléments

Les cellules végétales ont besoin de microéléments et les plus essentiels sont le Fer, le Chlore, le Manganèse, le Zinc, le Cuivre, le Cobalt et le Molybdène. Les cinq derniers éléments sont indispensables pour la synthèse de la chlorophylle et le bon fonctionnement des chloroplastes (Sundquist et al, 1980) De même le Fer, le cuivre, le Zinc, le Manganèse, le Molybdène, le Bore jouent un rôle essentiel dans les mécanismes enzymatiques (Téoulé, 1993). Les microéléments sont apportés dans le milieu sous la forme de solution mère (Boccon et al, 1989).

2.1.3- Les substances organiques

Les substances organiques apportées dans le milieu sont les sucres, les vitamines, les acides aminés et les régulateurs de croissance.

2.1.3.1 Les sucres

Les sucres les plus souvent utilisés sont le glucose et le saccharose. Ils constituent la principale source de carbone car en culture *in vitro* les explants sont hétérotrophes du fait de la faible assimilation chlorophyllienne (Téoulé, 1993). Le saccharose est généralement apporté à des concentrations pouvant varier entre 5 et 40 g/l. Dans des cas particuliers d'autres sources carbonées peuvent être utilisées, c'est le cas du maltose (Raquin, 1984) ou bien le galactose et le lactose (Ankler, 1974).

2.1.3.2 Vitamines

Certaines vitamines ont un effet favorable sur la croissance des tissus en culture. Ces vitamines appartiennent au groupe B et les plus efficaces sont la thiamine, l'acide nicotinique, la pyridoxine, la riboflavine (Téoulé, 1993). Les concentrations sont de l'ordre du milligramme par litre et les vitamines sont apportées sous forme de solution mère et le myoinositol est apporté séparément à des concentrations de l'ordre de 10 à 100 mg/ l (Boccon et al., 1989).

2.1.4 Les Régulateurs de croissance

Les régulateurs de croissance sont des composés qui ont un rôle de régulation dans la croissance et le développement des plantes et sont généralement actifs à de faibles concentrations (Wareing et Philips, 1981).
On utilise plusieurs groupes de régulateurs de croissance : les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'acide abscissique et l'éthylène ; les auxines et les cytokinines sont les hormones de croissance les plus souvent utilisées. Les cellules répondent généralement à des combinaisons d'au moins deux de ces hormones et le développement du tissu en culture est fonction du rapport de concentration entre elles (Robert et al., 1998).

2.1.4.1 Les auxines

Selon Téoulé (1993), on distingue les auxines faibles comme l'acide indolacétique (AIA), l'acide b-indolbutyrique (AIB) ou l'acide b-indolylpyruvique (AIP) Dans le groupe des auxines fortes on distingue l'acide naphtalène acétique (ANA) et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4 D) qui sont toutes deux des auxines de synthèse. Le 2,4- D est toxique aux fortes concentrations et est considérée comme un herbicide de synthèse (Boccon et al, 1989). Les auxines régulent la morphogenèse en utilisation conjointe avec les cytokinines. En culture *in vitro* les auxines sont utilisées car ils favorisent l'élongation cellulaire. Le choix de l'auxine dépend du type de croissance ou de développement souhaité, et de la capacité des tissus à synthétiser les auxines entre autres (Téoulé, 1993).

2.1.4.2 Les cytokinines

Les cytokinines les plus souvent utilisées sont la kinétine, la Benzyl-aminopurine (BAP), le 2-isopentyladénine (2-iP) et la zéatine qui est une substance naturelle. Actuellement c'est la BAP qui est la plus utilisée en raison de sa bonne activité et de son faible coût (Téoulé, 1993). La zéatine est une cytokinine naturelle stable en milieu aqueux et à l'autoclave, l'isopentyladénine est aussi une cytokine naturelle, par contre la BAP et la kinétine sont des cytokinines de synthèse (Boccon et., 1989). Les extraits de levure et le lait de coco contiennent également des cytokinines (Wareing et Philips, 1981), la phénylurée et le thidiazuron montrent également une activité cytokinique (Mok et al., 1987). Le rôle des cytokinines est considéré comme essentiel dans le développement des bourgeons et la néoformation de bourgeons sur les cals (Margara, 1982).

Les cytokinines contrôlent la croissance et la morphogenèse (Wareing et Philips, 1981). Elles permettent également la formation directe ou indirecte de pousses, elles interviennent dans la prolifération axillaire (Hussey, 1976) mais aussi inhibent la formation de racines (Georges et Sherrington, 1984).

2.1.4.3 Les gibbérellines

Les gibbérellines sont des substances de croissance naturelles. La première gibbérelline fut découverte chez un ascomycète : *Giberella fugikoroi* qui parasite et provoque le gigantisme chez le riz (Yabuta et Sumiki, 1938). Il existe plusieurs types de gibbérellines mais la gibbérelline GA3 est la plus utilisée en culture *in vitro* mais c'est un composé qui se dégrade rapidement en solution. Seule elle est peu efficace mais exerce synergique avec les auxines et les cytokinines, elle est souvent combinée à la cytokine pour accélérer la croissance des organes déjà formés (Robert et al, 1998).

2.1.5 Autres composés naturels

Des substances naturelles complexes de composition mal définie comme l'extrait de levure, l'hydrolysat de caséine, le lait de coco, des jus de fruits divers peuvent être ajoutés aux milieux de culture car ils constituent un mélange de vitamines, d'acides aminés, de glucides et de régulateurs de croissance divers et peuvent ainsi jouer un rôle important dans le développement des tissus cultivés *in vitro*. C'est ainsi que le lait de coco en association avec

le 2,4- D s'est révélé particulièrement efficace pour l'établissement de souches cellulaires à partir de matériels récalcitrants (Robert et al, 1998).

2.1.6 La gélification du milieu par l'agar

L'agar ou gélose est un polyoside extrait des algues du genre *Golidium*, elle se dissout dans l'eau vers 90° C puis en dessous de 40° C, elle donne un gel transparent plus ou moins solide (Boccon et al., 1989). L'intérêt de solidifier le milieu est de constituer un complexe colloïdal laissant circuler les ions car pour les cultures statiques si on utilise un milieu liquide l'explant est submergé et meurt par asphyxie. Les milieux liquides sont employés essentiellement pour les cultures de cellules et de protoplastes et ils sont maintenus en agitation constante pour permettre l'oxygénation. L'agar est en général ajouté au milieu à des concentrations variant entre 5 et 10 grammes par litre. D'autres agents gélifiants comme l'agarose ou le gelrite sont parfois subtilisés à l'agar avec des concentrations de 0,6 à 0.8 % pour l'agarose et 0,1 à 0,3 % pour le gelrite (Boccon et al., 1989).

2.2- Les conditions de culture

2.2.1- Stérilisation du milieu et du matériel de culture

Les explants doivent être stérilisés avant leur mise en culture dans un milieu de culture aseptique. On peut rendre les explants indemnes de microorganismes en contrôlant essentiellement trois facteurs : la concentration du stérilisant, la nature du tissu à désinfecter et la période d'exposition au stérilisant (Mc Culloch et Briggs, 1982). Le traitement du matériel végétal avant la stérilisation est une étape importante dans le processus de décontamination. Le matériel végétal doit être sain, vigoureux et si possible indemne de virus. Les traitements suivants sont suggérés pour réduire la contamination des explants (De Frossard, 1986):

- Les feuilles à utiliser doivent être sèches
- Les plantes doivent être élevées dans des conditions de haute température et d'humidité relative faible
- Les plantes contenues dans les pots peuvent être maintenues secs et protégés des microorganismes en les couvrant dans des pochettes de cellophane avant que les explants ne soient prélevés.
- Les parties de la plante sélectionnées peuvent être traitées avec un fongicide et / ou un insecticide pour prévenir les attaques d'insectes ou de champignons.

2.2.2- La température

Les températures classiquement utilisées en culture *in vitro* varient entre 22 et 26° C (Téoulé, 1993). Cependant selon Boccon et al. (1989), cette pratique est critiquable car la température réelle des tissus à l'intérieur des récipients de culture peut être supérieure de 2 à 4° C à celle de la salle de culture. C'est pour cela qu'il est préférable de régler la température de la salle de culture à 2° C en dessous de celle que l'on désire pour les tissus cultivés. Les espèces des climats tempérés subissent dans la nature des températures plus basses que les espèces tropicales. C'est pourquoi il serait intéressant d'avoir dans les salles de culture une température d'environ 20° C pour les premières et de l'ordre de 25° C pour les secondes (Boccon et al., 1989). Chez la tomate, Reynolds et al. (1982) ont montré que les températures tièdes (19° C) permettaient d'améliorer la régénération chez des explants de tiges par rapport à des températures plus chaudes (28 ° C).

2.2.3- La lumière

La photopériode est généralement longue (16 heures) et l'intensité lumineuse comprise entre 2000 et 6000 lux. Pour les tissus cultivés la photosynthèse n'est pas une activité nécessaire, puisque l'énergie est fournie sous forme de glucides. Cependant la lumière est indispensable pour réguler certains phénomènes morphogénétiques (Boccon, 1989).

2.3- La culture in vitro de la tomate

La régénération in vitro de la tomate a été le sujet de bon nombre de recherches à cause de sa haute valeur commerciale et aussi de ses bonnes dispositions pour des améliorations génétiques (Evans, 1989). La culture in vitro de la tomate concerne essentiellement quatre domaines (Bhatia et al, 2004) :

- sélection de lignées résistantes aux stress biotiques et abiotiques
- développement de plantes haploïdes
- production d'hybrides somatiques
- micropropagation.

Toutes ces recherches ont pu être réalisées grâce à une bonne connaissance de l'ensemble des facteurs qui interviennent dans la culture des tissus de tomate. Ainsi l'influence de plusieurs facteurs ont été étudiés par les chercheurs.

2.3.1- Effet de la lumière

La lumière est indispensable pour la régénération de la tomate in vitro et aucune régénération n'est observée lorsque les explants sont cultivés à l'obscurité (Pugliesi et al., 1999). Dans la multiplication in vitro de la tomate, la lumière joue donc un rôle primordial et des résultats d'étude ont montré que la croissance des explants cultivés en lumière blanche est plus importante que celle des explants cultivés en lumière rouge (Schutze & Wieczorrek, 1987).

2.3.2- Effet du milieu de culture

Le choix du milieu de culture est essentiel en culture in vitro. Et selon l'espèce considérée et le type de résultat attendu différents milieux de culture peuvent être utilisés.

Dans les travaux de culture in vitro de la tomate, le milieu de culture le plus fréquemment utilisé est le milieu MS (Kartha & al.,1976 ; Chandel & Katiyar, 2000 ; Gunay & Rao, 1980 ; Pongtongkam & al.,1993 ; etc.). D'autres auteurs ont utilisé, pour leurs travaux un milieu MS légèrement modifié. C'est le cas de Cano & al.(1990) qui ont étudié la croissance de cals sur un milieu de culture qui différe du milieu MS par les compositions en vitamines et en acides aminés. Quant à Selvi & Khader (1993), ils ont utilisé les macroéléments et les microéléments du milieu de MS en combinaison avec les vitamines du milieu de Gamborg & al. pour étudier la morphogenèse chez la tomate.

2.3.3- Effet de la concentration en sucres

En culture in vitro, les tissus ne sont pas autotrophes vis-à-vis du Carbone, c'est pour cette raison que l'addition d'une source carbonée est nécessaire. Dans la plupart des travaux la source carbonée est le saccharose (Sambe, 2005 ; Ndiaye, 2001 ; Ndiaye, 2005 ; Fall, 2006 ; Thiam, 2003 ; Ndoye,2004 ; Sané & al,2001). Dans la culture in vitro de la tomate, le saccharose est aussi le sucre le plus fréquemment utilisé (Chaudary & al., 2001 ; Uddin & al., 2004 ; Dwivedi & al.,1992 ; etc..). Cependant certains auteurs ont essayé d'autres sources carbonées comme le turanose, le palatinose ou encore le glucose (Sinha & Roitsch, 2001). Chez de nombreuses espèces, la concentration de saccharose employée par les chercheurs est

de 20 g / l (Fall ,2006 ; Sambe, 2005 ; etc.) Chez la tomate par contre, Schnapp & Preece (1986) ont montré que la concentration optimale de saccharose est de 30 g / l en comparaison avec des concentrations plus faibles (5,10 ou 20 g /l)

2.3.4- Le développement de plantes haploïdes

La production d'haploïdes a été obtenue chez la tomate grâce à la culture d'anthères ou de microspores. La culture d'anthères a été développée par Gresshoff & Doy (1972) de même que Levenko & al. (1977) et Thomas & Mythili (1995). Quant à la culture de microspores elle a été initiée avec succès par Varghèse & Yadav (1986).

Il faut noter que la production d'haploides est très importante dans les processus de création et d'amélioration variétales car elle permet d'obtenir des lignées pures. En effet le doublement chromosomique des individus haploides par haplo-diploidisation aboutit à la production d'individus parfaitement homozygotes.

2.3.5- Le développement d'hybrides somatiques

Les hybrides somatiques sont issus de la fusion de protoplastes appartenant à des variétés ou des espèces différentes. Les hybrides somatiques permettent de régénérer des plantes possédant les caractéristiques des deux individus parents.

Plusieurs expériences d'hybridation somatique ont été menées chez la tomate

(*Lycopersicon esculentum*). Les espèces apparentées à la tomate possèdent de meilleures capacités de régénération. Lech & al. (1996) ont identifié les gènes responsables de cette capacité importante de régénération chez les espèces sauvages de *Lycopersicon peruvianum, Lycopersicon chesmanii*, etc. Ces gènes sont portés par un allèle dominant et sont facilement transférables aux variétés cultivées de tomate par fusion somatique. Ainsi cette haute capacité de régénération de *Lycopersicon peruvianum* a été transférée à la tomate cultivée par Koormeef et al (1993). Faria et al (2002) ont aussi réussi à cultiver des variétés de tomate récalcitrantes après hybridation somatique avec une espèce sauvage (*Lycopersicon pimpinellifolium*). La résistance à l'atrazine peut être conférée à la tomate cultivée après hybridation somatique avec *Solanum nigrum* qui possède un gène de résistance à l'atrazine (Jain & al. 1988).

2.3.6- La micropropagation

La micropropagation est une méthode moderne qui consiste à provoquer la néoformation de méristèmes de tiges puis de racines à partir de petits fragments d'organes (Robert et al., 1998)
La micropropagation de la tomate a été réalisée à partir de différentes techniques faisant appel à la culture de méristèmes (Fari & al., 1992 ; Izadpanah & Khosh, 1992) mais aussi à l'embryogenèse somatique (Chandel & Katyar, 2000). L'organogenèse directe à partir d'explants intacts ou encore à partir de protoplastes a été initiée par différents chercheurs comme Duzyaman & al. (1994).Il faut rappeler que la majorité des travaux de micropropagation chez la tomate fait intervenir une phase intermédiaire de formation de cal, cependant Dwivedi et al. (1990) ont pu régénérer directement des pousses à partir d'explants foliaires sans passer par un cal. Pour assurer une bonne micropropagation chez la tomate, les chercheurs ont souvent recours à des régulateurs de croissance exogènes Les régulateurs de croissance les plus fréquemment utilisés sont les cytokinines comme la zéatine, la BAP, l'isopentyladenine, la kinétine. Ces derniers peuvent être utilisés seuls ou combinés à des auxines telles que l'AIA, l'AIB ou l'ANA. Leur choix dépend du matériel végétal de départ et du résultat escompté (voir tableau 2).
Après cette revue bibliographique qui nous a permis de mieux nous familiariser avec l'espèce végétale objet de notre étude et de passer en revue les principales techniques de la culture *in vitro*, nous présenterons les matériels et les méthodes employés lors de notre expérimentation.

Tableau2 : Régulateurs de croissance utilisés par divers auteurs pour l'organogenèse et la callogenèse chez la tomate (d'après Bhatia et al., 2004)

N°	Explant	Régulateurs de croissance (mg/l)	Réponse	Référence
1	Hypocotyle, feuille,cotytlédon	Zéatine (4)	Pousse	Davis & al. (1994)
		ANA (0,1)	Racine	
2	Cotylédon	Zeatine (1)+ AIA (1)	Pousse	Ye & al. (1994)
3	Cotylédon	Zéatine(0,5)+AIA(0,5)	Pousse	Hamza & Chupeau (1993)
4	Pistil	Zéatine (0,5)	Fruit	Lu & Liang (1994)
5	Cotylédon	Zéatine (1)+AIA (0,1)	Pousse	Ichimura & Oda (1998)
6	Feuille,cotylédon,hypocotyle	BAP (2-3)+ AIA (0,2)	Pousse	Duzyaman & al. (1994)
7	Disque foliaire, segment de tige, bourgeon apical	AIA (0,2)+BAP (2,5)	Cal	Selvi & Khader (1993)
		AIA(0,2)+Kinétine(2,5)	Pousse	
		AIA (2)	Racine	
8	Disque foliaire	BAP (4)+AIA (4)	Pousse	Villiers & al. (1993)
9	Feuille	BAP (0,5)+ANA (0,25)	Bourgeons	Dwivedi & al. (1990)
		BAP(0,25)+ANA(0,01)	Pousse	
10	Inflorescence	Kinetine (2,15)+AIA ou ANA (0,0001)	Pousse	Compton & Veilleux (1991)
		AIA, AIB ou ANA (0,02)	Racine	
		AIA (1,75)+ Kinétine (0,02)	Fleur	
11	Feuille	ANA (0,1)+ Kinétine (0,1-2)	Pousse et racine	Santana & Ramirez (1989)
		Kinétine (0,1-2)	Racine	
		Kinétine (1) + AIA (0,1)	Cal	
12	Feuille	BAP (1,5) + AIA (1,5)	Pousse	Chandel & Katyar (2002)
		Kinétine (1,5) + ANA (1)	Embryons	
13	Feuille	BA (4,5) + ANA (0,2)	Bourgeons	Geetha & al. (1998)
		AIB (1)	Racine	
14	Hypocotyle, cotylédon, feuille	BAP ou Zéatine (0,1-10)	Pousse	Plastira & Perdikaris (1997)
15	Hypocotyle	Zéatine (1) + AIA (0,02)	Pousse	Zelcer & al. (1984)

Tableau2 (suite) : Régulateurs de croissance utilisés par différents auteurs pour l'organogenèse et la callogenèse chez la tomate

N°	Type d'explant	Régulateurs de croissance (mg/l)	Réponse	Références
16	Hypocotyle, cotylédon	AIA (0,5) + BAP (2)	Pousse	Gunay & Rao (1980)
		AIA (0,5)	Racine	
17	Feuille	Zéatine (0,02) + AIA (1,8)	Pousse et racine	Kartha et al. (1976)
		Zéatine (0,2) + AIA (0,02)	Pousse et racine	
18	Feuille	AIA (0,2) + BAP (1 ou 5)	Cal	Kurtz & Lineberger (1983)
		AIA (0,2-2)	Racine	
		BAP (2,5 ou 5) + AIA (0,2 ou 1)	Pousse	
19	Cotylédon, feuilles, segments de tige	AIA (1,6) + Kinétine (4)	Cal	Vnuchkova (1977)
		AIB (1)	Racine	
20	Feuille	GA3 ou GA4 (0,003-34,63)	Racine	Coleman & Greyson (1977)
21	Hypocotyle	ANA (1) + Kinétine (0,1)	Cal	Venkatachalam & al. (2000)
		AIB (0,1-0,5)	Racine	
22	Cotylédon	Zéatine (1) + AIA (0,1) ou	Pousse	Costa & al. (2000)
		BAP (2,5) + AIA (0,2)		
23	Hypocotyle	BAP (0,5-5) + AIA (0,2-2) ou	Cal et pousse	Chen & al. (1999)
		BAP (2,5) + AIA (0,2) ou		
		BAP (1-2) + AIA (2)		
24	Cotylédon	Kinétine (2) + AIA (0,2) ou	Cal, pousse et racine	Ramiah & Rajappan (1996)
		2iP (2) + AIA (0,2)	Poussse	
25	Feuille	Kinétine (2,9) + AIA (1)		Chandra & al. (1995)

B- Matériel et méthode

Pour mener à bien nos expérimentations un matériel adéquat et une méthode adaptée ont été choisis pour nous permettre d'aboutir aux principaux résultats obtenus.

1. Matériel

1.1- Matériel végétal

Le matériel est constitué de graines provenant de quatre variétés de tomates cultivées en France et récoltées entre les années 2000 et 2003

- Variété cœur de bœuf et chair de bœuf que nous avons nommé par commodité expérimentale Le1
- Variété tomate noire de mi-saison (Noire de Crimée) que nous avons nommée par commodité expérimentale Le2
- Variété tomate rose (Rose de Berne) que nous avons nommé par commodité expérimentale Le3
- Variété tomate cerise que nous avons nommée par commodité expérimentale Le4

1.2- Milieux de culture

Deux milieux de culture ont été utilisés :

- le milieu de Murashige & Skoog (1962 ;Tableau n° 2)
- le milieu de Linsmaier & Skoog (1965 ; Tableau n° 3)

Dans le premier milieu de culture, l'effet des régulateurs de croissance tels la BAP, la kinétine, l'ANA, la zéatine et le lait de coco ; a été testé

Dans le deuxième milieu de culture, l'effet de la zéatine, de la zéatine combinée au lait de coco et de la zéatine associée à la BAP a été étudié.

2. Méthode de culture

Dans la partie méthode de culture plusieurs points seront abordés. Il s'agit de :

- la désinfection du matériel végétal et son ensemencement
- la micropropagation où l'on va comparer les capacités organogènes entre nœud apical et nœud axillaire pour les différentes variétés. Par la suite l'influence de divers

régulateurs de croissance sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires sera étudiée. L'effet de l'ANA combinée ou non à la BAP sera étudié en premier lieu. Ensuite l'effet de la BAP seule et de la kinétine seule et enfin l'effet de la zéatine seule ou combinée au lait de coco ou à la BAP seront étudiés.

- L'enracinement des explants où l'on va mettre en place un dispositif qui nous permettra de déterminer les milieux qui favorisent le mieux l'enracinement des plants.
- L'acclimatation : pour la réussite du transfert des vitroplants en conditions naturelles une méthode adéquate doit être trouvée. Nous présenterons si dessous celle que nous avons employée et qui nous a permise d'observer des résultats satisfaisants.

2.1- Désinfection du matériel végétal et ensemencement

La désinfection est faite en trempant les graines dans de l'hypochlorite de sodium (eau de javel) pendant dix minutes puis les graines sont rincées trois fois de suite avec de l'eau distillée stérile. Ensuite les graines sont semées dans des boites de Pétri contenant de l'eau gélosée en raison de 8 g / l et mises à germer à la température de 27° C +/- 1° C. Les graines prégermées sont transférées dans des bocaux contenant du milieu MS. Au bout d'une semaine de culture, la partie apicale est repiquée sur du milieu MS. Ceci va favoriser une ramification intense de la plante et fournir le matériel végétal utilisé dans les différentes manipulations.

Tableau 3: Composition minérale du milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962)

Macroéléments	Concentrations (mg / l)
NH4NO3	1650
KNO3	1900
MgSO4, 7H2O	370
CaCl2, 2H2O	440
KH2PO4	170
Microéléments	
H3BO3	6,2
MnSO4, H2O	22,3
ZnSO4, 7H2O	8,6
KI	0,83
Na2MoO4, 2H2O	0,25
CuSO4, 5H2O	0,025
CaCl2, 6H2O	0,025
Vitamines	
Myo-inositol	100
Glycine	2
Acide nicotinique	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1
Saccharose	30 g / l
Autres composés	
Na2EDTA	37,25
FeSO4, 7H2O	27,85
Agar-agar	8 g/l

pH du milieu ajusté entre 5,7 et 5,8

Tableau 4 : Composition minérale du milieu de LINSMAIER et SKOOG (1965)

Macroéléments	Concentrations (mg/l)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$MgSO_4, 7H_2O$	370
$CaCl_2, 2H_2O$	440
KH_2PO_4	170
Microéléments	
H_3BO_3	6,2
$MnSO_4, H_2O$	22,3
$ZnSO_4, 7H_2O$	8,6
KI	0,83
$Na_2MoO_4, 2H_2O$	0,25
$CuSO_4, 5H_2O$	0,025
$CaCl_2, 6H_2O$	0,025
Vitamines	
Myo-inositol	100
Thiamine HCl	0,4
Saccharose	30 g/l
Autres composés	
Na_2EDTA	37,25
$FeSO_4, 7H_2O$	27,85
Agar-agar ou Bacto Difco-agar	8 g / l

pH du milieu ajusté entre 5,7 et 5,8

2.2- Micropropagation

La micropropagation se fera à partir des plantes obtenues lors de la manipulation précédente. Elle consistera en la culture de nœuds axillaires ou apicaux selon l'expérimentation entreprise.

2.2.1- Comparaison des capacités organogènes entre nœud apical et axillaire chez les différentes variétés

Des plants de tomate âgés de trente jours sont découpés en fragments de 1,5 à 2 cm contenant soit un nœud apical ou un nœud axillaire. Ces deux types de nœuds sont cultivés séparément sur du milieu MS pour comparer les capacités morphogénétiques entre nœuds apicaux et nœuds axillaires. Pour ce faire, pour chaque variété, 24 nœuds apicaux et 24 nœuds axillaires sont mis en culture sur du milieu MS contenant 30g/l de saccharose et solidifié à l'agar en raison de 8 g/l. Différents paramètres sont calculés au bout de 15 et 30 jours de culture : il s'agit du nombre moyen de pousses formées, de la longueur moyenne des pousses ainsi que du nombre moyen de nœuds.

Pour chaque paramètre les moyennes obtenues chez les deux types de bourgeons sont comparées grâce au test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

2.2.2- Influence de l'ANA combinée ou non à la BAP sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires

Dans cette expérimentation, des microboutures constituées de nœuds axillaires snt placées sur un milieu MS supplémenté de ANA à une concentration de 0,1 mg /l. L'ANA est combinée ou non à la BAP à des concentrations variant entre 0,1 et 5 mg /l. Pour ce faire 24 explants issus de plants de tomate âgés de 30 jours sont repiqués sur chaque milieu. Cette expérimentation concerne essentiellement les variétés Le1 et Le3.

A la suite de cette expérience, des nœuds axillaires appartenant à la variété Le4 sont mis en culture sur du milieu MS toujours. Cependant, cette fois-ci, les concentrations des régulateurs de croissance sont plus faibles. C'est ainsi que l'ANA à des concentrations de 0,01mg/l est associée ou non à la BAP à des concentrations variant entre 0,01 et 0,5 mg /l. Pour chaque milieu de culture, 24 répétitions sont effectuées. Après 15 et 30 jours de culture, les paramètres suivants sont mesurés sur chaque milieu de culture : le nombre moyen de pousses formées, la longueur moyenne des pousses, le nombre moyen de nœuds et éventuellement le

diamètre moyen des cals. Pour chaque paramètre les moyennes obtenues sur les différents milieux sont comparées à l'aide du test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

2.2.3- Influence de la BAP sur le bourgeonnement et l'élongation des Nœuds axillaires chez la variété Le4

Pour étudier l'influence de la BAP sur l'activité organogène de bourgeons axillaires, des nœuds axillaires de 1,5 à 2 cm de long, issus de vitroplants âgés de 30 jours, sont cultivés sur un milieu MS supplémenté de BAP à des concentrations variant entre 1 et 2 mg/l. Pour chaque milieu, 24 explants sont utilisés et les paramètres suivants sont mesurés : le nombre moyen de pousses, la longueur moyenne des pousses, le nombre de nœuds et éventuellement le diamètre moyen des cals. Pour chaque paramètre les moyennes obtenues sur les différents milieux sont comparées à l'aide du test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

2.2.4- Influence de la kinétine sur le bourgeonnement et l'élongation Des nœuds axillaires chez la variété Le4

Des nœuds axillaires issus de plants de tomate de la variété Le4 âgés de 30 jours sont repiqués sur le milieu MS supplémenté de kinétine à des concentrations variant entre 1 et 2 mg /l. Pour chaque milieu de culture, 24 explants de 1,5 à 2 cm de long sont mis en culture. Au bout de 15 et 30 jours, le nombre moyen de pousses formés, la longueur moyenne des pousses ainsi que le nombre moyen de nœuds et éventuellement le diamètre moyen des cals sont calculés. Pour chaque paramètre les moyennes obtenues sur les différents milieux sont comparées à l'aide du test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

2.2.5- Influence de la zéatine et du lait de coco sur le bourgeonnement Et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4 sur le Milieu LS

L'influence de la zéatine seule ou associée au lait de coco a été testée sur des nœuds axillaires issus de plants de tomate de la variété Le4 âgés de30 jours. C'est ainsi que 4200 ml de milieu LS sont préparés et répartis dans 7 béchers en raison de 600 ml par bécher. Le premier bécher est laissé tel quel et constitue le milieu témoin. Dans les béchers 2 à 6, de la zéatine est ajoutée à des concentrations variant entre 1 et 3,5 mg/l. Dans le $7^{ème}$ bécher, 20% du milieu

sont retirés et remplacés par la même quantité de lait de coco, puis de la zéatine à une concentration de 2,2 mg/l est ajoutée. Pour chaque milieu, 24 explants sont mis en culture. Le nombre moyen de pousses formées, la longueur moyenne des pousses ainsi que le nombre de nœuds et éventuellement le diamètre moyen des cals sont calculés à 15 et 30 jours. Le test de Newman et Keuls au seuil de 5% sera utilisé pour la comparaison des moyennes.

2.2.6- Influence de la zéatine et du lait de coco sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4 sur le Milieu MS

L'influence de la zéatine à une concentration de 2,2 mg/l associée ou non au lait de coco, a été étudiée sur les potentialités organogènes de nœuds axillaires de la variété Le4. 1800 ml de milieu MS sont préparés et répartis dans 3 béchers contenant chacun 600 ml de milieu. Le premier bécher est laissé tel quel et constitue le milieu témoin. Dans le 2ème bécher de la zéatine à une concentration de 2,2 mg/l est ajoutée alors que dans le 3ème comme dans l'expérience précédente, 20% de milieu sont retirés puis remplacés par du lait de coco dans les mêmes proportions. Par la suite de la zéatine à une concentration de 2,2 mg / l est ajoutée. Dans chaque milieu 24 explants sont mis en culture et, à 15 et 30 jours le nombre moyen de pousses formées, la longueur moyenne des pousses ainsi que le diamètre moyen des cals sont mesurés. La comparaison des moyennes se fera grâce au test de Newman et Keuls à 5%.

2.2.7- Influence de la BAP combinée à la zéatine sur le bourgeonnement et l'élongation de noeuds axillaires chez la variété Le4 sur le milieu LS

Des explants de nœuds axillaires issus de plants de tomate âgés de 30 jours sont mis en culture sur du milieu LS supplémenté de zéatine (2,2 mg / l) et combiné ou non à la BAP à des concentrations comprises entre 1 et 2 mg / l. Dans chaque milieu, 24 explants de 1,5 à 2 cm de long sont mis en culture et des mesures portant sur le nombre moyen de pousses, la longueur moyenne des pousses, le nombre moyen de nœuds et éventuellement le diamètre moyen des cals, sont effectuées à 15 et 30 jours de culture. Les moyennes seront comparées à l'aide du test de Newman et Keuls à 5%.

2.3- Enracinement

L'enracinement des explants a été étudié sur les mêmes milieux que ceux utilisés pour la micropropagation. C'est ainsi que sur des plants de tomate âgés de 30 jours, des nœuds axillaires de 1,5 à 2 cm de long sont mis en culture en raison de 24 explants par milieu. Après 15 et 30 jours de culture, le taux d'enracinement est noté pour chaque traitement.

2.4- Acclimatation

Après deux semaines de culture dans le milieu MS, de jeunes plants de tomate bien enracinés sont acclimatés en serre. Une fois retirés des bocaux et débarassés de leur gélose par lavage à l'eau de robinet, les jeunes plants sont repiqués dans des bacs contenant un substrat composé d'un mélange de sable et de terreau dans les proportions suivantes : 2/3 terreau + 1/3 sable. Ces bacs sont par la suite recouverts d'un morceau de toile transparent. Les plants sont maintenus en atmosphère humide dans la mini-serre ainsi réalisée par mouillage de la toile. L'arrosage se fait chaque jour avec l'eau de robinet. Au bout de une semaine, on enlève la toile et si on constate que les plants sont toujours vigoureux, on les transfère dans des sacs en plastique contenant un mélange terreau-sable dans les mêmes proportions que précédemment.
Au cours de notre étude, on a réalisé deux acclimatations :

- la première a été effectuée au mois de Mai où on a acclimaté 10 plants de la variété Le1 et 10 plants de la variété Le3.
- la deuxième acclimatation a été réalisée au mois de Janvier et a concerné cette fois-ci toutes les variétés.

3. Conditions de culture

Tous les milieux de culture utilisés sont solidifiés à l'agar en raison de 8 g / l avant d'être stérilisés à l'autoclave 110° C pendant 20 minutes. Le repiquage des explants dans les milieux de culture se fait sous une hotte à flux laminaire. Après repiquage, les explants sont cultivés dans des chambres de culture sous une photopériode : 16 / 8 h à la température de 27° C et une lumière incidente de 19 Watt / m2.
Après la présentation du matériel utilisé pour l'expérimentation et la méthode employée pour l'étude, les différents résultats obtenus seront présentés dans le chapitre suivant.

C- RESULTATS

Les résultats concernant le taux de germination ainsi que l'influence des différents régulateurs de croissance sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds, de même que l'enracinement des explants et leur acclimatation sont présentés ci-dessous.

1. Taux de germination

Le taux de germination a été déterminé chez l'ensemble des variétés et la figure suivante présente les résultats obtenus (Figure 1)

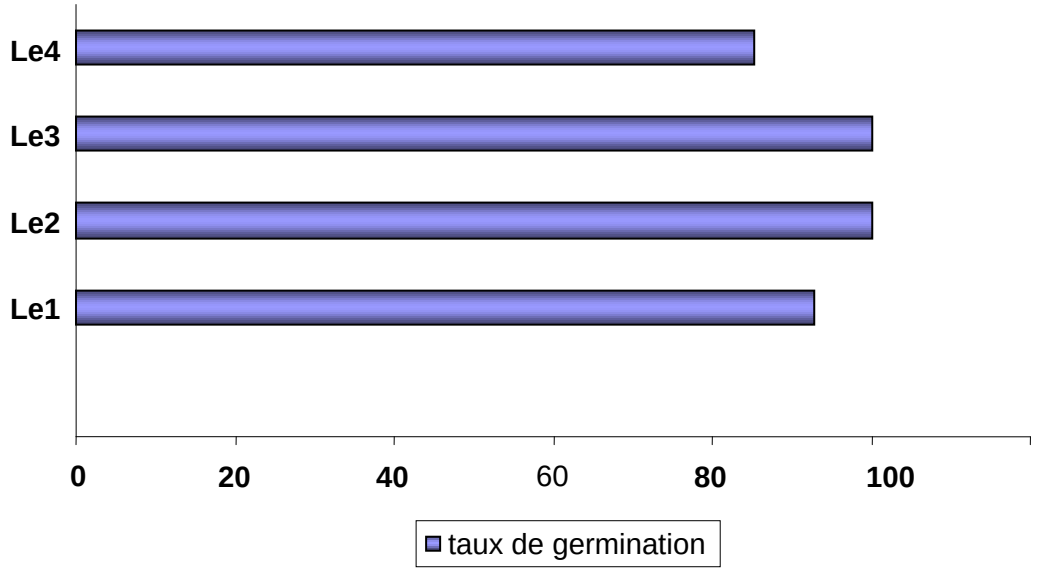


Figure 1. Pourcentage de germination chez les différentes variétés de tomate
3 jours après ensemencement

L'analyse de la figure 1 montre, 3 jours après l'ensemencement, les taux de germination suivants : 100 % pour les variétés Le2 et Le3 ; 92,85% pour les tomates de la variété Le1 et 85,36%, pour les tomates de la variété Le4. Par ailleurs il faut noter que l'ensemble des graines qui n'ont pas germé n'ont pas été infectées par les microorganismes.

2. Micropropagation

2.1- Effet du type d'explant sur les potentialités organogènes chez les différentes variétés

L'effet du type d'explant (apical ou axillaire) sur les potentialités organogènes a été étudié chez les 4 quatre variétés. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant (voir aussi planche 2)

Tableau 5 : Effet du type d'explant sur les potentialités organogènes chez les différentes variétés

Type de nœud		Nombre moyen de pousses	Longueur moyenne des pousses	Nombre moyen de nœuds
Le1	apical	1.04a	6.93a	4.37a
	Axillaire	1a	5.7a	3a
Le2	Apical	1,08a	7.28a	4.59a
	Axillaire	1,08a	7,41a	4,29a
Le3	Apical	1a	8.14a	4.17a
	Axillaire	1a	7.85a	3.16a
Le4	apical	1a	10.92a	7.66a
	Axillaire	1a	7.14b	6.12a

Pour une même variété et pour un même paramètre, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 5% du test de Student-Newman et Keuls

Ces résultats montrent que le nombre de pousses formé par à partir des noeuds apicaux et des noeuds axillaires sur le milieu MS ne sont pas suffisamment différents. Cependant la longueur moyenne des pousses formées chez la variété Le4 est plus importante avec les nœuds apicaux.

2.2- Influence de la BAP combinée à l'ANA sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4

L'influence de l'ANA (0,1 mg/l) combinée ou non à la BAP (0,1 à 5mg /l) a été testée sur le développement des bourgeons axillaires chez les variétés Le1 et Le3. Au bout de 30 jours de culture aucune régénération n'est observée dans les différents milieux à BAP où il ne se forme que des cals. La régénération de plants à partir de nœuds axillaires n'est observée que sur le milieu MS contenant de l'ANA à une concentration de 0,1 mg / l, cette régénération est accompagnée d'une callogenèse importante (planche 3)

Dans un deuxième temps les concentrations de la BAP et de l'ANA sont revues à la baisse et l'influence de ces hormones sur le développement des bourgeons axillaires est étudiée avec la variété Le4. L'ANA est à une concentration de 0,01 mg/l alors que la BAP est à des concentrations comprises entre 0,01 et 0,5 mg/l Les résultats sont présentés dans le tableau 6

Tableau 6: Influence de l'ANA combinée à la BAP sur le bourgeonnement et l'élongation des noeuds axillaires chez la variété Le4

Milieux	Nombre moyen de pousses	Longueur moyenne des pousses	Nombre moyen de nœuds	Diamètre moyen des cals
MS	1,04a	6,9a	4,72a	0a
MS + ANA 0,01	1,2a	5,01b	4,84a	0,93b
MS + ANA 0,01 + BAP 0,01	0,88a	3,58b	4,68a	1,07b
MS + ANA 0,01 + BAP 0,05	0,92a	2,25c	3,4b	1,24c
MS + ANA 0,01 + BAP 0,1	0,96a	2,076c	3,28b	1,27c
MS + ANA 0,01 + BAP 0,5	1,08a	1,66c	3,24b	1,38c

Dans une même colonne, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % du test de Student Newman et Keuls

L'analyse du tableau montre que les différentes combinaisons hormonales n'ont pas d'effet significatif sur le taux de multiplication (le nombre de pousses formées ne varie pas significativement avec les différentes combinaisons hormonales). On constate également qu'il y a une corrélation entre le diamètre moyen des cals et le la longueur des pousses. En effet plus le diamètre des cals est important, plus la longueur des pousses est faible.

2.3- Influence de la kinétine sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4 sur le milieu MS

L'influence de la kinétine à des concentrations variant entre 1 et 2 mg / l a été testée sur le développement des bourgeons issus de noeuds axillaires chez la variété Le4 (tableau 7).

Les résultats présentés sur ce tableau montrent que la kinétine à des concentrations de 1mg / l et de 2 mg / l permet d'augmenter le nombre de pousses formées. Les cals observés à la base

des explants n'ont pas d'effet significatif sur la longueur moyenne des pousses car la longueur moyenne des pousses dans les milieux MS + Kin 1 et MS + Kin 2, n'est pas significativement différente de la longueur moyenne des pousses dans le milieu MS sans hormone où la production de cal est nulle.

Tableau 7 : Influence de la kinétine sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4

Milieux De culture	Nombre moyen de pousses	Longueur moyenne des pousses	Nombre moyen de nœuds	Diamètre des cals
MS	1,04a	6,89a	4,29a	0a
MS + KIN 1	1.5b	6,25a	7,08b	1,12b
MS + KIN 1,5	1,2ab	3.95b	4,08a	1,08b
MS + KIN 2	1.54b	6,77a	5,87b	1,12b

Dans une même colonne, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % du test de Newman et Keuls

2.4- Influence de la BAP sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4 sur le milieu MS

L'influence seule de la BAP sur les capacités organogènes des bourgeons axillaires a été étudiée avec la variété Le4. Les résultats sont consignés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Influence de la BAP sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4

Milieux de culture	Nombre moyen de pousses	Longueur moyenne des pousses	Nombre moyen de nœuds	Diamètre moyen des cals
MS (témoin)	1,08a	8,04a	5,7a	0a
MS + BAP1	1,08a	4,28b	3,66b	1,21c
MS+ BAP2	1a	2,35c	2,28c	0,96b

Dans la même colonne les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % du test de Newman et Keuls

Les résultats du tableau 8 montrent que la BAP à des concentrations de 1 et 2 mg / l a un effet depressif sur le taux de multiplication car ne permet pas d'accroître le taux de multiplication car le nombre moyen de pousses formées n'est pas significativement différent de celui du témoin (milieu MS). La longueur moyenne des pousses est beaucoup plus importante avec le milieu témoin (MS) qu'avec les milieux à BAP. on note une certaine corrélation entre le diamètre moyen des cals et la longueur moyenne des pousses. En effet on constate que plus le diamètre des cals est important, plus la longueur des pousses est importante.

2.5- Influence de la zéatine et du lait de coco sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4 sur le milieu MS

L'influence de la zéatine seule ou associée à du lait de coco sur les capacités organogènes de bourgeons axillaires a été étudiée avec la variété Le4. Les résultats sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Influence de la zéatine et du lait de coco sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires sur le milieu MS

Milieu de Culture	Nombre moyen de pousses	Longueur moyenne des pousses	Nombre moyen de nœuds	Diamètre moyen des cals
MS	1,25a	4,97a	4,45a	0a
MS + Zea 2.2	3,37b	1,9b	4,08ab	1,6b
MS + Zea 2.2 + CW 20 %	2,37b	1,13b	3,16b	1,49b

Dans la même colonne les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % du test de Newman et Keuls

La zéatine seule ou associée au lait de coco permet d'accroître considérablement le nombre de pousses formées par rapport au témoin (milieu MS sans hormone). Cet accroissement du nombre de pousses formées s'accompagne d'une diminution de leur longueur moyenne et d'une augmentation de la taille des cals formés à la base explants.

2.6- Influence de la zéatine et du lait de coco sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires chez la variété Le4 sur le milieu LS

L'influence de la zéatine seule ou associée au lait de coco a été étudiée sur le développement des bourgeons axillaires dans le milieu LS avec la variété Le4. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 10

Tableau 10 : Influence de la zéatine et du lait de coco sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires sur le milieu LS

Milieu de Culture	Nombre moyen pousses	Longueur moyenne pousses	Nombre moyen de Nœuds	Diamètre moyen des cals
LS	1,12ab	7,65a	5,37c	0a
LS + Zea 1	1,12ab	3,1c	3,33b	1,4b
LS + Zea 1.5	1,54b	3,31c	3,5b	1,26ab
LS + Zea 2.2	3,16c	5,56b	8,08a	1,35b
LS + Zea 2.2 + CW 20 %	0,79a	6,12ab	4,66bc	1,92c

Dans la même colonne les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % du test de Newman et Keuls

Les résultats présentés sur le tableau 10 montrent que le nombre moyen de pousses formées augmente significativement lorsque le milieu LS est additionné de zéatine à une concentration de 2,2 mg / l (planche 4). La longueur moyenne des pousses est beaucoup plus importante dans le milieu témoin (milieu LS), mais elle est également importante dans les deux derniers milieux (LS + Zéatine 2,2 et LS + Zéatine 2,2 + CW 20%). Dans ce dernier milieu de culture le nombre de nœuds n'est pas important par rapport à la longueur des pousses du fait de l'allongement important des entrenoeuds. Avec des concentrations de zéatine supérieures à 2,2 (2.5 à 3,5), les explants ne montrent pas d'évolution et présentent un aspect vert pâle.

2.7- Influence de la zéatine combinée à la BAP sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires

L'influence de la zéatine à une concentration de 2,2 mg / l combinée à la BAP à des concentrations variant entre 1 et 2 mg / l a été étudiée. Les résultats sont rapportés dans le tableau 11.

L'analyse de variance des moyennes obtenues ne montre pas de différence significative concernant le nombre de pousses formées par explant sur les milieux utilisés. Cependant la longueur moyenne des pousses ainsi que le nombre moyen de nœuds sont plus importants avec le milieu LS témoin. Les milieux avec BAP 1,5 et BAP 2 mg/l montrent des résultats très similaires.

Tableau 11 : Influence de la zéatine associée à la BAP sur le bourgeonnement et l'élongation des nœuds axillaires sur le milieu LS

Milieux de Culture	Nombre moyen de pousses	Longueur moyenne des pousses	Nombre moyen de nœuds	Diamètre moyen des cals
LS	1a	6a	5,04a	0a
LS + Zea 2.2 + BAP 1	1,37a	3,56b	3,58b	1,11b
LS + Zea 2.2 + BAP1.5	1,16a	1,63c	2,45b	0,86c
LS + Zea 2.2 + BAP 2	1,08a	1,45c	2,16c	0,9b

Dans la même colonne les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % du test de Newman et Keuls

2.8- Autres résultats enregistrés lors de la micropropagation

La méthodologie utilisée nous a permis d'enregistrer des résultats appréciables non recherchés au départ mais fournissant des connaissances intéressantes sur la tomate.

Au bout d'une dizaine de subcultures sur le milieu MS, l'on a observé sur certains explants de nœuds axillaires l'apparition de boutons floraux. La formation d'une fleur a été notée de même que celle d'un fruit qui a mûri par la suite Cependant les boutons floraux n'ont pas évolué pour donner des fleurs. De même la fleur n'a pas évolué en fruit. Les explants sur lesquels sont apparus ces différents phénomènes n'ont pratiquement pas évolué tout au long de leur incubation dans le milieu de culture. C'est-à-dire qu'ils sont de petite taille et ne présentent même pas de feuille (planche 5)

3. Enracinement

Nous avons déterminé les paramètres de l'enracinement sur les mêmes milieux utilisés pour la multiplication (milieu de bourgeonnement et de croissance). Des observations sur les différents milieux utilisés nous ont permis de comparer leur effet sur les facteurs de l'enracinement (planche 6).

3.1- Enracinement sur les milieux MS et LS

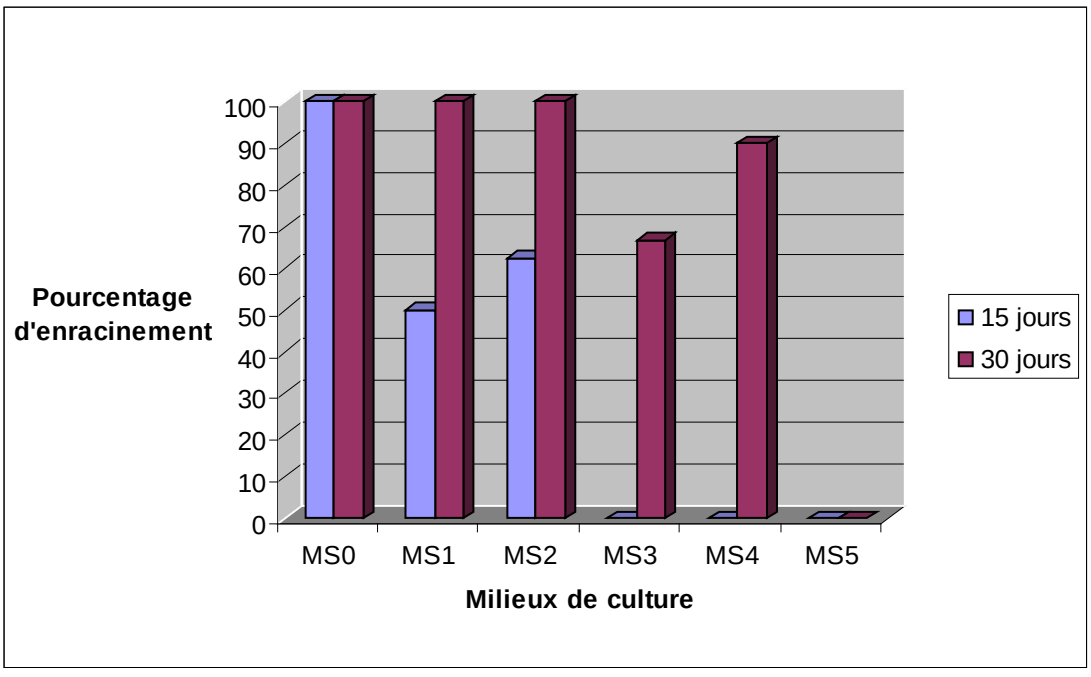
L'enracinement des nœuds axillaires de 1,5 cm de long a été étudié sur les milieux LS et MS. Pour ce faire 24 explants de nœuds axillaires issus de plants de tomate âgés de 30 jours sont cultivés sur les milieux LS et MS. Au bout de 15 jours de culture l'ensemble des explants sont très bien enracinés. Les racines apparaissent directement à la base des explants et sont très bien ramifiées

3.2- Enracinement dans le milieu MS additionné de BAP et d'ANA

L'enracinement a été étudié dans le milieu MS additionné de BAP et d'ANA. La figure 2 montre les pourcentages d'enracinement à quinze et trente jours dans les différents milieux.

L'analyse de la figure montre une évolution importante du taux d'enracinement entre le quinzième et le trentième jour. Au quinzième jour les explants ne sont enracinés que dans les milieux MS, MS + ANA 0,01 et MS + ANA 0,01 + BAP 0,01. Cependant au trentième jour de culture, on observe un enracinement dans tous les milieux à l'exception du milieu MS + ANA 0,01 + BAP 0,5. Le taux d'enracinement de 100 % n'est atteint qu'avec les trois premiers milieux caractérisés par des teneurs en BAP faibles ou nulles.

Figure 2 : Enracinement dans le milieu MS supplémenté d'ANA et de BAP



MS0 : Milieu MS sans hormone

MS1 : MS + ANA 0,01

MS2 : MS + ANA 0,01 + BAP 0,01

MS3 : MS + ANA 0,01 + BAP 0,05

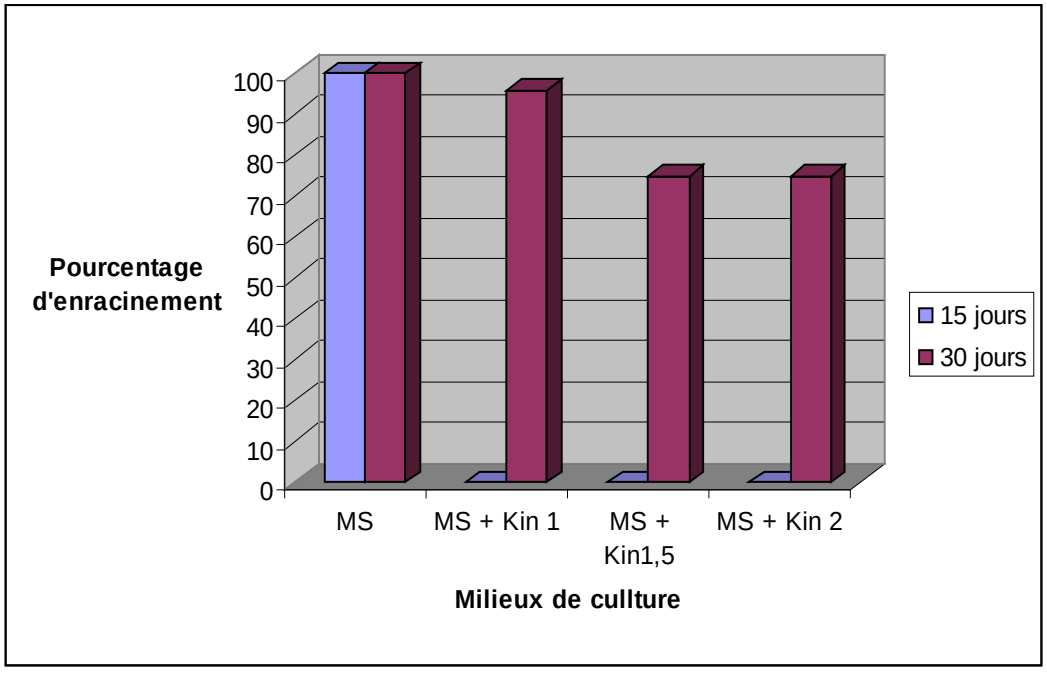
MS4 : MS + ANA 0,01 + BAP 0,1

MS5 : MS + ANA 0,01 + BAP 0,5

3.3- Enracinement des explants sur le milieu MS supplémenté de kinétine

L'enracinement des explants de nœuds axillaires a été étudié sur un milieu MS supplémenté de kinétine à des concentrations variant entre 1 et 2 mg /l. Pour ce faire, sur des plants de tomate âgés de 30 jours, on découpe des nœuds axillaires dont la taille varie entre 1,5 et 2 cm. Ces nœuds sont ensuite cultivés sur le milieu MS témoin et les milieux à MS et kinétine en raison de 24 explants par milieu. La figure 3 représente le pourcentage d'enracinement des explants à quinze et trente jours de culture

Figure 3 : Enracinement dans le milieu MS additionné de kinétine



L'analyse de la figure 3 montre que au bout de trois jours aucun enracinement n'est observé sauf sur le milieu dépourvu d'hormone. L'enracinement surs les milieux de culture contenant de la kinétine n'est observable qu'au trentième jour où l'enracinement est très important surtout dans le milieu MS additionné de kinétine à une concentration de 1 mg / l. Il y atteint 95,8 % contre 75 % dans les milieux contenant de la kinétine à une concentration de 1,5 ou 2 mg / l. Ainsi on note une décroissance du taux d'enracinement lorsque la concentration en kinétine augmente.

3.4- Enracinement sur le milieu MS supplémenté de BAP

Dans les milieux MS + BAP 1 et MS + BAP 2, aucun enracinement n'est enregistré au bout des trente jours de culture.

3.5- Enracinement en présence de zéatine

Dans les milieux de culture contenant de la zéatine seule ou associée à d'autres régulateurs de croissance telles que la BAP ou le lait de coco aucun enracinement n'a pu être observé au bout de trente jours de culture.

4. Acclimatation

4.1- Première acclimatation

Durant cette première acclimatation réalisée au mois de Mai caractérisé par des températures élevées et une humidité relative faible, 10 plants de la variété Le1 et 10 autres de la variété Le3 sont utilisés. Ces plants sont issus de nœuds axillaires et ont été cultivés sur du milieu MS. Ils étaient âgés de 15 jours au moment de leur acclimatation et étaient tous très bien enracinés. Les plants ont très bien supporté leur transfert en milieu naturel et se sont bien développés. Certaines plantes ont fleuri après un mois de culture mais ces dernières n'ont pas donné de fruits (planche 7).

4.2- Deuxième acclimatation

Cette deuxième acclimatation a été réalisée au mois de Janvier caractérisé par des températures basses et une humidité relative faible, elle a concerné cette fois l'ensemble des variétés. Les conditions sont les mêmes que lors de la première acclimatation, seule la période diffère. Les plants acclimatés sont âgés de 15 jours et sont très bien enracinés au moment de leur transfert. Ils se sont bien adaptés aux conditions du milieu extérieur. Les plants se sont bien développés, ont fleuri au bout de 1 mois et ont produit des fruits mûrs après 3 mois de culture (planches 8 et 9).

D-DISCUSSIONS

Après la présentation des différents résultats, ce chapitre passe au critique des points les plus importants

1. Désinfection et germination

Les résultats satisfaisants obtenus avec une méthode de désinfection relativement simple (hypochlorite de sodium), démontreraient que le matériel végétal (graines de *Lycopersicon esculentum*) n'a pas été contaminé en profondeur notamment par les piqûres d'insectes comme l'a du reste mentionné Seck (1996) avec *Prosopis juliflora* et *Prosopis chilensis.*

Par ailleurs plusieurs auteurs ont utilisé l'hypochlorite de sodium à des concentrations différentes comme moyen de désinfection des graines de tomate. C'est le cas par exemple de Bhatia *et al.* (2005) qui ont utilisé de l'hypochlorite de sodium à 1% pendant quinze minutes avant de rincer ensuite les graines à l'eau distillée stérile. Chaudary *et al.* (2001) ont quant à eux utilisé de l'hypochlorite de sodium 5% pendant cinq à sept minutes avant de rincer leurs graines trois fois de suite avec de l'eau distillée stérile pendant quinze minutes.

Donc suivant la concentration en chlore de l'eau de javel, le temps de trempage des graines de tomate diffère. En effet on constate que plus cette concentration est élevée, moins le temps de contact avec les graines doit être faible.

Il faut aussi noter que d'autres auteurs ont utilisé des produits autres que l'hypochlorite de sodium pour la désinfection des graines de tomate. C'est ainsi que Gunay et Rao (1980) ont utilisé du chlorure mercurique 0,1% pendant trois minutes avant de rincer les graines plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile. Donc ceci confirme le fait que le temps de contact des graines avec le désinfectant doit décroître avec la concentration du produit utilisé.

Une fois désinfectées, les graines peuvent être transférées sur de l'eau gélosée pour leur germination comme l'ont du reste fait Bhatia et al (2005).

Gunay et Rao (1980) ont quant à eux réalisé la germination sur du coton imbibé. Pour obtenir des hypocotyles et des disques foliaires comme matériel pour la callogenèse et la régénération chez la tomate, Chaudary et al (2001) ont réalisé la germination des graines de tomate sur du milieu MS (Murashige and Skoog).

Cependant ces résultats appréciables ont été obtenus avec un nombre de variétés relativement restreint et doivent être confirmés par une étude plus étendue regroupant un plus grand nombre de variétés.

2- Micropropagation

Dans cette partie nous discuterons surtout de l'influence des cytokinines sur le développement des nœuds axillaires mais aussi de celle de l'ANA associée à la BAP et pour finir, nous tenterons à la lumière des travaux d'autres chercheurs, d'expliquer l'apparition des boutons floraux, d'une fleur et d'un fruit lors de la micropropagation.

2.1- Organogenèse à partir de nœud apical et de nœud axillaire

Comme nous l'avons vu dans les résultats, aussi bien la longueur des pousses que le nombre de nœuds formés sont plus importants pour les nœuds apicaux que pour les nœuds axillaires et ceci pour l'ensemble des variétés de tomate étudiées. Ceci serait dû au fait que chez la tomate la dominance apicale est très accentuée. C'est sans doute pour cette raison que Fari *et al.* (1992) et Padliskikh et Yarmishin (1990) ont procédé à la décapitation pour éliminer la dominance apicale et permettre le développement des bourgeons axillaires.

2.2- Influence des cytokinines sur le développement des noeuds axillaires

Selon Bhatia et al. (2004), quatre cytokinines à savoir : la zéatine, le 2iP, la BAP et la Kinétine peuvent être utilisées pour l'organogenèse chez la tomate soit seules ou combinées à des auxines.

La zéatine à une concentration de 2,2 mg/l ajoutée au milieu de Linsmaier et Skoog (LS) nous a permis d'obtenir un taux moyen de multiplication de 3,16, une longueur moyenne des pousses égales à 5,5 et un nombre moyen de pousses égal à 8. Ces résultats ont été obtenus avec les tomates de la variété Le4 et l'on pas eu le temps nécessaire de les vérifier avec les autres variétés.

Donc de toutes les cytokinines utilisées, la zéatine présente les meilleures capacités pour induire la formation multiple de bourgeons à partir de nœuds axillaires.

Des concentrations de zéatine supérieures à 2,2 mg/l (2,5 ; 3 ; 3,5mg/l) n'ont pas permis d'accroitre le taux de multiplication des explants. Au contraire les explants au bout de trente jours de culture présentent une petite taille et montrent des signes de chlorose. Ces résultats

sont similaires à ceux obtenus par El Kbiach et al (2002) qui ont montré que chez le chêne-liège, l'utilisation de cytokinines à des doses très élevées ne permet d'augmenter que faiblement la longueur moyenne des bourgeons et accentue par contre les symptômes de chlorose.

Plusieurs études effectuées chez la tomate relatent l'utilisation de la zéatine pour la formation de pousses à partir d'explants variés. C'est le cas de celles réalisées par Davis et al. (1994) qui sont parvenus à régénérer des pousses à partir d'explants d'hypocotyles, de feuilles ou de cotylédons avec la zéatine à une concentration de 4 mg/l. C'est le cas aussi des études de Plastira et Perdikaris (1997) qui ont pu régénérer de nouvelles pousses de tomate à partir d'explants d'hypocotyles, de cotylédons et de feuilles avec des concentrations de zéatine variant entre 0,1 et 10 mg/l.

L'association de la zéatine à une concentration de 2,2 mg/l à la BAP à des concentrations comprises entre 1 et 2 mg/l n'a pas permis d'améliorer le taux de multiplication par rapport à la zéatine seule.

Par ailleurs d'autres chercheurs ont employé la BAP ou la Kinétine seules pour la régénération de pousses mais ils ne sont pas très nombreux. On peut citer parmi eux Pongtongkam et al. (1993) qui ont pu régénérer de nouvelles pousses de tomate à partir de feuilles, de segments de tige ou de nœuds dans du milieu MS associé à des concentrations de kinétine variant entre 1 et 2 mg/l. Cependant la régénération ne s'est pas faite directement à partir des explants mais il y a eu passage par un stade intermédiaire de callogenèse. Venkatachalam et al. (2000) ont aussi réussi à induire la formation de pousses à partir d'explants d'hypocotyles dans un milieu contenant de la BAP.

2.3- Influence de la BAP associée à l'ANA

Dans les premiers essais associant ces deux régulateurs de croissance, on n'a pas pu obtenir une régénération de nouvelles pousses à partir des bourgeons axillaires mis en culture. Au contraire on n'a obtenu que des cals dont le diamètre augmente avec la concentration de BAP. C'est seulement dans le milieu contenant seulement de l'ANA à une concentration de 0.1 mg/l que l'on observe des pousses. Lorsqu'on a diminué les concentrations en BAP et en ANA on a pu obtenir des pousses mais il n'y a pas eu une amélioration nette du taux de multiplication.

Dwivedi *et al*. (1990) avaient utilisé les mêmes régulateurs de croissance pour la régénération directe de pousses à partir d'explants foliaires. Cependant après avoir introduit

les explants dans un milieu morphogénétique pendant sept jours, ils les ont par la suite transféré dans un milieu d'expression contenant uniquement de l'ANA à une concentration de 0,01 mg/l, pour éviter la callogenèse et obtenir la formation directe de pousses. Geetha et al (1998) ont aussi réussi à régénérer des pousses à partir d'explants foliaires en utilisant une combinaison ANA – BAP en passant cependant par une étape intermédiaire faisant intervenir un cal.

Plusieurs travaux incluant des combinaisons hormonales auxine – cytokinine ont été menés pour la régénération de pousses à partir de divers explants mais pour la plupart des cas les auteurs sont d'abord passés par une étape intermédiaire de callogenèse. C'est le cas par exemple de Norton et Boll (1954) qui ont réussi à régénérer des pousses de tomate à partir de racines. C'est le cas aussi de Padmanamhan *et al.* (1974) qui ont réussi à régénérer des plants de tomate à partir de cals obtenus sur des explants foliaires. On peut également citer l'exemple de Selvi et Khader (1993) qui à partir d'explants de feuilles et de tiges de tomate ont pu régénérer des pousses dans un milieu contenant de l'AIA et de la BAP. Auparavant les feuilles ont d'abord donné des cals dans un milieu contenant de l'AIA et de la kinétine. Les exemples sont nombreux et comme le dit Dwivedi et al (1990) sur un total de 16 articles scientifiques publiés sur la micropropagation de la tomate, dans tous les cas il est noté une phase intermédiaire de callogenèse. La phase de callogenèse paraîtrait donc indispensable pour la régénération à un taux de multiplication optimal .

2.4- Autres résultats enregistrés lors de la micropropagation

Au cours des différentes subcultures sur le milieu MS, on a pu observer l'apparition de boutons floraux, d'une fleur et d'un fruit sur des explants de nœuds axillaires différents. Chez de nombreuses plantes, la floraison in vitro ne s'observe qu'avec l'adjonction au milieu de culture de régulateurs de croissance exogènes et l'habileté des explants à donner des fleurs dépend de l'interaction entre un ensemble de facteurs chimiques, physiques et internes à l'explant et dont le résultat est imprévisible (Croes & al., 1985 ; Compton & Veilleux, 1992). La floraison in vitro peut s'observer chez des explants provenant de plantes elles-mêmes en floraison. C'est ce qui observé chez certaines ligneuse (Scorza, 1982). C'est le cas aussi chez le tabac où Wardell & Skoog (1969) ont montré que la mise en culture de fragments de tige issus de plantes en fleurs, permet la formation de boutons floraux et de fleurs. Pour ce qui est de la formation de fruits in vitro, Ravindar et al (1996), ont pu observer l'apparition de fruits

de tomate à partir d'explants de pédicelles foliaires. Ces explants ont été cultivés sur du milieu MS supplémenté de d'isatine et de zéatine. Donc qu'il s'agisse de boutons floraux, de fleurs ou de fruits, leur apparition en culture in vitro nécessite l'adjonction de phytohormones au milieu de culture. Ainsi, le milieu MS seul n'est pas approprié pour la formation de ces éléments. Dans notre expérimentation, les explants ont pu passer d'une phase végétative à une phase reproductive grâce aux différentes subcultures qui leur ont permis d'acquérir les caractères adultes nécessaires à la formation de boutons floraux, de fleurs ou de fruits.

En conclusion de cette partie consacrée à la micropropagation, nous regrettons l'insuffisance des semences qui nous a un peu pénalisée dans la conduite de nos manipulations. Avec une quantité beaucoup plus importante de semences, des expérimentations plus nombreuses auraient pu être réalisées et auraient permis des comparaisons intéressantes entre les différentes variétés.

3. Enracinement

En général, l'enracinement des plants produits in vitro se fait en présence d'auxine et lorsque la balance auxines / cytokinines penche en faveur des cytokinines, les explants ne s'enracinent pas très bien. En effet ce sont les fortes concentrations d'auxines dans la partie basale des plantes qui induit le développement des racines. Dans notre étude on a constaté que les explants produits *in vitro* s'enracinent très bien dans le milieu LS ou MS dépourvu d'hormones. Ceci serait lié à des teneurs élevées en auxines endogènes. La même constatation a été faite par Delanghe et Bruijne (1974) et Kartha et al (1976) sur la même espèce. Donc les milieux de Murashige et Skoog et de Linsmaier et Skoog constituent de bons milieux d'enracinement pour les nœuds axillaires et les nœuds apicaux. Des résultats similaires ont été observés par Mensuali-Sodi *et al.* (1995) qui ont obtenu un enracinement des explants cotylédonaires cultivés sur du milieu LS dépourvu de substance de croissance. On a pu observer cet enracinement spontané chez d'autres epèces. C'est le cas par exemple de *Atriplex halimus* chez laquelle Souayah *et al.* (2004) ont pu obtenir un enracinement des explants dans un milieu de Murashige et Skoog dilué de moitié et en l'absence de substance de croissance. Cependant l'addition d'auxines au milieu de culture permet d'améliorer l'enracinement. L'enracinement spontané des explants en culture peut survenir parfois chez certaines espèces mais dans la plupart des cas surtout chez les ligneux il faut ajouter des auxines pour faciliter l'enracinement (Michèle et Bray,1994). L'efficacité de l'auxine employée différe d'une espèce à l'autre. Chez les légumineuses, l'AIB est considéré comme l'auxine qui favorise plus

la rhizogenèse (Michèle et Bray, 1994), la même observation a été faite par El kbiach et al (2005) sur le chêne-liège. Chez d'autres espèces comme l'olivier (*Olea europae* L.) l'ANA a donné les meilleurs résultats lors de l'enracinement d'explants issus de matériel jeune (Abousalim *et al* ,2005).

Chez la tomate donc l'enracinement est plus important dans un milieu dépourvu d'hormones comme le milieu de Murashige et Skoog ou le milieu de Linsmaier et Skoog. Cependant les auxines tendent à inhiber la caulogenèse en favorisant la formation de cals basaux qui participent à diminuer la nutrition minérale des explants

4. Acclimatation

La première acclimatation qui a lieu au mois de Mai caractérisé par des températures élevées et une humidité relative basse a vu le floraison des vitroplants transférés en milieu naturel. Cependant il n'y a pas eu de formation de fruit. Cependant les plantes acclimatées au mois de Janvier ont donné des fleurs et des fruits. Ainsi la période de transfert des vitroplants en serre est essentielle pour obtenir une fructification. Il faut que les plants à un stade jeune soient soumis aux plus basses températures possibles en milieu sahélien. Si les plants, à un stade jeune sont soumis à des températures élevées cela peut affecter leur développement futur et empêcher leur fructification (Messiaen,1989). Par conséquent la tomate est une espèce qui a des exigences climatiques particulières, elle est sensible au froid, craint beaucoup le gel et les vents chauds et est très exigeante en température (Chibane, 1999). Donc pour avoir un taux de survie important lors de l'acclimatation, plusieurs paramètres doivent être pris en compte, notamment la température, l'humidité dont l'optimum doit tourner autour de 75% mais aussi la lumière dont une baisse peut entraîner des défauts de germination du pollen (Chibane,1999). C'est ce qui fait que la tomate soit beaucoup plus cultivée en saison sèche et fraîche dans la zone sahélienne. Cependant il existe des variétés de tomate (Xina de l'ISRA) très bien adaptées à la saison chaude et humide (saison des pluies).

E- Conclusions et Perspectives

Ce travail a permis de mettre au point une méthode efficace de conservation du germplasme de tomate (*Lycopersicon esculentum*) grâce à des méthodes de culture in vitro.

Une méthode relativement simple de désinfection du matériel végétal a été mise en place ; ce qui nous a permis d'obtenir des taux de germination importants chez toutes les variétés. Les graines ayant germé et transférées sur du milieu de Murashige et Skoog (MS) ont fourni de nombreux nœuds qui seront utilisés pour tester les différentes combinaisons hormonales.

Le milieu de Murashige et Skoog et le milieu de Linsmaier et Skoog constituent de très bons milieux de régénération et d'enracinement de la tomate à partir d'explants de nœuds. D'ailleurs ce sont des plants cultivés sur du milieu MS qui ont été utilisés pour l'acclimatation en serre. Cependant le taux de multiplication dans ces milieux est voisin de 1 et pour essayer de l'améliorer on a utilisé des cytokinines et plus particulièrement la zéatine qui a permis d'améliorer considérablement le taux de multiplication. Par contre les auxines ne doivent pas être privilégiés dans la multiplication conforme de la tomate car elle favorisent la callogenèse qui est sensée favoriser les variations génétiques chez les plantes. Ce phénomène semble très important chez la tomate ou une variabilité chromosomique s'est largement exprimée dans les cals et parfois même chez les plantes régénérées à partir de cals (Sibi,1986) in Demarly et Sibi (1989).

Nos études nous ont également permis de montrer que chez la tomate la période d'acclimatation est très importante et que pour nos variétés elle doit avoir lieu en saison froide.

Et puisque la régénération à partir de cal permettrait d'améliorer considérablement le nombre d'individus régénérés, il serait intéressant d'essayer cette voie tout en prenant la précaution de vérifier le génotype des nouveaux individus formés pour s'assurer de la conservation effective de l'identité génétique.

La création d'industries semencières doit aussi être envisagée pour assurer une autonomie au niveau national de l'approvisionnement en semences.

D'une facon générale, c'est un institut de préservation et de collection des ressources génétiques du pays qui doit être créé. Cet institut aura entre autres pour vocation

- de réaliser une prospection et une conservation du matériel sauvage et de permettre ainsi aux sélectionneurs de réaliser des croisements avec les variétés cultivées pour la création de variétés nouvelles.

- d'évaluer le matériel en décrivant ses qualités actuelles et ses différentes potentialités
- de cataloguer ces variétés en les décrivant de manière succinte
- de multiplier par différentes voies et de diffuser ces variétés en maintenant leur identité et leur variabilité

Avec ces méthodes simples et pratiques à la fois de micropropagation c'est le problème de l'autosuffisance alimentaire qui trouve peut être ici une voie de résolution.

F- Références bibliographiques

Abousalim A, Brhadda N, Walali Loudiyi D (2005). Essai de proliferation et d'ennracinement de materiel issu de rajeunissement par bouturage d'oliviers adultes (*Olea europae* L.) et de germination in vitro : effet de cytokinines et d'auxines. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 9 (4): 237-240

Bhatia P., Ashwath N., Senaratna T. and Midmore D. (2004). Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Cell. Tissue and Organ Culture 78: 1-21

Bhatia P, Ashwath N, Senaratna T, Krauss S L (2005). Genetic analysis of cotyledon derived regenerants of tomato using AFLP markers. Current Science, vol. 88 n°2: 280-284

Boccon-Gibod J., Augé R., Beauchesne G., Decourtye L., Digat B., Jalouzot R., Minier R., Morand J. Cl., Reynoird J. P., Strullu D. G. et Vidalie H. (1989). La culture in vitro et ses applications horticoles, 3ème éd., Tech. Et Doc.- Lavoisier- Paris (France), 225 p.

Cano E.A., Moreno V., Romero M & Bolarin M.C. (1990). The role of culture medium, explant source and genotype on callus growth in cultivated and wild tomato species and interspecific hybrids. Proceedings of the XIth Eucarpia meeting on tomato genetics (p 167-172)

Centre Interprofessionnel pour la Formation aux métiers de l'Agriculture- CIFA (2000). Journées Professionnelles Tomate Industrielle

Chaudary Z, Feroz I, Ahmed W, Rashid H, Mirza B, Quraishi A (2001). Varietal response of *Lycopersicon esculentum* L. to callogenesis and regeneration. Online Journal of Biological Sciences 1(12): 1138-1140

Chandel G & Katiyar SK (2000). Organogenesis and somatic embryogenesis in tomato *(Lycopersicon esculentum* Mill.). Adv. Plant Sci. 13: 11-17

Chen LZ & Adachi T (1994). Plant regeneration via somatic embryogenesis from cotyledon protoplasts of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Breed. Sci. 44 : 337-338

Chibane A. (1999). Fiche technique tomate sous serre. Bulletin mensuel d'information et de liaison du Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture (PNTTA) n°57:1-4

Crompton M.E. & Vielleux R.E. (1992). Thin cell layer morphogenesis. Horticultural Reviews 4 : 239-264.

Croes A.F., Creemers-Molenaar T.,Van Den Ende G.,Kemp A. & Barendse G.M.W. (1985). Tissue age as an endogenous factor controlling in vitro bud formation on explants from the inflorescence of *Nicotiana tabacum* L. Journal of Experimental Botany 36: 1771-1775

Davis DG, Breiland KA, Frear DS & Secor GA (1994). Callus initiation and regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars with different sensitivities to metribuzin. Plant Growth Regul. Soc. Am. Quart. 22: 65-73

De Frossard (1976). Tissue culture for plant propagators. Univ. New England Printery, Armidale. 409 p

Delanghe F & DeBruijne E (1976). Continuous propagation of tomato plants by means of callus culture. Science Hort.4: 221-224

Demarly Y & Sibi M (1989). Amélioration des plantes et biotechnologies. Collections universités francophones : 1-152

Dhruva B, Ramaktishnan T & Vaidyanathan CS (1978). Regeneration of hybrid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants from leaf callus. Curr. Science 47: 458-460

Di Michèle M. N. & Bray L. (1995). Multiplication in vitro d'*Acacia flava syn. erhenbergiana* In: Qual avenir pour l'amélioration des plantes. Dubois J. & Demarly Y. , John Libbey Eurotext, Paris: 97-108

Dramé Boubacar (2003). Essais d'expérimentation d'itinéraires de protection des cultures horticoles (tomate, piment, chou et haricot vert) en vue d'une qualité de production compatibles avec les norms sur les résidus de pesticides. Mémoire de Diplôme d'études approfondies (DEA). Faculté des sciences et Techniques. Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

Duzayman E, Tanrisever A & Gunver G (1994). Comparative studies on regeneration of different tissues of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in vitro. Acta.Horti: 235-242

El kbiach M.L., Lamarti A, Abdali A et Badoc A (2002). Culture in vitro des bourgeons axillaries de chêne-liège (*Quercus suber* L.) I Influence des cytokinines sur la caulogenèse et la callogenèse des nœuds de plantules. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 141 : 73-88

El kbiach M.L., Lamarti A, Abdali A et Badoc A (2002). Culture in vitro des bourgeons axillaires de chêne-liège (*Quercus suber* L.) II Influence des régulateurs de croissance sur la multiplication et l'enracinement. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 141 : 85-104

Evans D.A. (1989). Somaclonal variation-genetic basis and breeding applications. Trends Genet. 5: 46-50

Fall A.S. (2006). Capacités germinatives et Multiplication in vitro du bois de palissandre ou ebenier du Sénégal:Dalbergia melanoxylon (Guill et Perrot). Mémoire de Diplôme d'études approfondies (DEA). Faculté des Sciences et Techniques. Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal. 57p.

Geetha N, Venkatachalam P, Reddy PS & Rajaseger G (1998). In vitro plant regeneration from leaf callus cultures of tomato (*Lycopesicon esculentum* Mill.) Adv. Plant Sci. 11: 253-257.

Georges E.F. & Sherrington P.D. (1984). Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of commercial laboratories. Exergetics limited (eds.). 709 p

Gresshoff P.M. & Doy C.H. (1972). Developement and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta 107:161-170

Gunay AL & Rao PS (1980). In vitro propagation of hybrid tomato plants (*Lycopersicon esculentum* L) using hypocotyls and cotyledon explants. Ann. Bot. 45: 205-207

Hussey G. (1971). In vitro growth of vegetative tomato (*Lycopersicon esculentum*) shoot apices. J. Exp. Bot. 22: 688-701

Hussey G. (1976). In vitro release of axillary shoots from apical dominance in monocotyledonous plantlets. Ann. Bot. 1323-1325.

Izadpanah M. & Khosh-Khui M. (1992). Comparisons of in vitro propagation of tomato cultivars. Iran Agric. Res. 8: 37-47

Jain S.M., Shahin E.A. & Sun S. (1988). Interspecific protoplast fusion for the transfer of atrazine resistance from Solanum nigran to tomato (Lycopersicon esculentum L.). Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 12: 189-192

Kaparakis G & Aldeson PG (2002). Influence of high concentration of cytokinins on the production of somatic embryos by germinating seeds of tomato, aubergine and pepper. J. Hort. Sci. Biotechnol. 77: 292-301

Kartha KK, Champoux S, Gamborg OL & Pahl K (1977). In vitro propagation of tomato *(Lycopersicon esculentum)* by shoot apical meristem culture. J. Am. Soc. Hort. Sci. 102: 346-349

Koorneef M., Bade J., Hanhart C., Horsman K, Shel J.,Soppe W, Verkerk R & Zabel P. (1993). Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. Plant J. 3: 131-141

Lech M, Miczynski K & Pindel A (1996). Comparison of regeneration potentials in tissue cultures of primitive and cultivated tomato species (*Lycopersicon* sp.). Acta Soc. Bot. Poloniae 65: 53-56

Levenko B.A., Kunakh V.A., Yurkova G.N., Legeida VS, Kiforak O.V. & Alpatova LK (1977). Formation of strains of plants callus tissue during prolonged culture. In vitro 292: 82

Margara J (1982). Bases de la multiplication végétative. INRA éditions, Paris, 262 pages
Mc Culloch S. M. & Briggs B.A. (1982). Preparation of plants for micropropagation. In: The combined proceedings of the international plant propagators society, pp: 32, 297-304

Mensuali-Sodi A, Panizza M & Tognoni F (1995). Endogenous ethylene requirement for adventitious root induction and growth in tomato cotyledons and lavandin microcuttings in vitro. Plant Growth Regul. 17: 205-212

Messiaen C M (1989). Le potager tropical. 2- cultures spéciales. Agence de coopération culturelle et technique en collaboration avec le conseil international de la langue française: 198-230

Mok M.G., Mok D.W.S., Turner J.E. & Mujer C.V. (1987). Biological and biochemical effects of cytokinin active phenylurea derivatives in tissue culture systems. Hort. Sci. 22 (6): 1194-1197.

Newman PO., Krishnaraj S, & Saxena PK (1996). Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyls explants induced with 6-benzyladenine. Int. J. Plant Sci. 157: 554-560

Ndiaye A. (2001). Etudes des conditions optimales de régénération in vivo et in vitro chez *Bambusa vulgaris*, Wendel. Mémoire de DEA. Faculté des Sciences et Techniques. Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal, 51 p.

Ndoye M. (2004). Biologie de la reproduction et potentialités in vitro chez *Balanites aegyptiaca*, Del. Thèse de doctorat de troisième cycle. Faculté des Sciences et Techniques. Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal, 93 p.

Papadopoulos A. P.(1991). La culture de la tomate en serre sur sol et sans sol. Ministère des approvisionnements et Services / Canada N° cat A 53-1865 /
1991 F

Padliskikh VL & Yarmishin AP (1990) Features of microclonal propagation in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Vestsi Akademii Navuk BSS, Reryya Biyalagichnykh Navuk 6: 52-54

Padmanamhan V, Paddock EF & Sharp WR (1974). Plantlet formation in vitro from Lycopersicon leaf callus. Can. J. Bot. 52: 1429-1432

Pandey D. K. (1995). Liquid presevatives to improve longevity of tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) seeds. Sci. hortic., vol.

Plastira VA & Perdikaris AK (1997). Effet of genotype and explant type in regeneration frequency of tomato in vitro. Acta Horti.: 231-234

Pongtongkam P, Rattisontorn P, Suputtitada S, Piyachoknagul S. Ngernsiri L. & Thonpan A (1993). Tomato propagation by tissue culture. Kasetsart J. 27: 269-277

Pugliesi C, Cionini G, Bertram L & Lercari B (1999). A histological study of light- dependent shoot regeneration in hypocotyls explants of tomato cultured in vitro. Adv. Hort. Sci. 13: 168-172

Reynolds JF, Bieber NE & Sun El (1982). Environmental, genotype and pretreatment influences on regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in vitro. In vitro 18: 318

Robert D, Dumas C, Bajon C (1998) Biologie végétale, volume 3 : La reproduction. Doin initiatives santé 389 p.

Sambe M.A. (2005). Evaluation in vitro des potentialities germinatives et morphogénétiques de *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. Mémoire de DEA. Faculté des Sciences et Techniques. Université Cheikh Anta Diop. Dakar, Sénégal, 68p.

Sané D., Borgel A., Chevallier M.H. et Gassama Y.K. (2001).Induction in vitro de l'enracinement de microboutures d'*Acacia tortilis* subsp. raddiana par traitement transitoire à l'auxine. Ann. For. Sci. 58 : 431-437

Schnapp S.R. & Preece J.E. (1986). In vitro growth reduction of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and carnation microplants. Plant cell. Tiss. Org. Cult. 6 : 3-8

Schumann E. (2004). Tomates. Aartselaar Belgique. 79 p

Schutze R. & Wieczorrek G (1987). Investigations into tomato tissue cultures. I Shoot regeneration in primary explants of tomato. Arch. Zuchtungsforschung 17: 3-15

Seck Mamour (1996) Etudes des conditions de régénération « in vitro » chez *Prosopis juliflora* (Swartz) DC et chez *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz. Mémoire de DEA. Faculté des Sciences et Techniques. Université Cheikh Anta DIop . Dakar, Sénégal, 60p

Selvi D.T. & Khader M.A. (1993). In vitro morphogenetic capacity of tomato (*Lycopersicon esculentu*m Mill.) var. PKM1. South Indian Hort. 41 : 251-258

Sinha A.K. & Roitsch T (2001). Effect of different sugars on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in photoautotropic tomato suspension cell cultures. Photosynthetica 39:611-614

Souayah N, Khouja M.L., Rejab M.N & Bouzid S. (2004) Micropropagation d'un arbuste sylvopastoral : *Atriplex halimus* L. (chenopodiacées) in Ferchichi A. (comp.) : Réhabilitation des paturages et des parcours en milieux méditerranéens : 131-134

Tabone B. (2000). La Tomate. Aubanel Avignon. 117 p

Téoulé E. (1993). Biotechnologie et amélioration des plantes in Biotechnologie 4ème édition. Technique et Documentation – Lavoisier : 565-588

Thomas P & Mythili J.B. (1995). Development of cultured tomato anther to a fruit like structure accompagned by *in vitro* ripening. Curr. Sci. 69: 94-95

Uddin F., Taher A., Islam A. & Zakir H. (2004). Effect of variety and Plant Growth Regulators in MS medium on Shoot induction from virus infected Calli of Tomato. Journal of Biological Sciences 4: 521-526.

Ugar Bal & Kazim Abak (2003). Attempts of haploidy induction in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) via gynogenesis II: in vitro non fertilized ovary culture. Pakistan Journal of Biological Sciences 6 (8): 750-755

Varghese T.M. & Yadav G (1986). Production of embryoids and calli from isolated microspores of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in liquid media. Biol. Planta 28:126-129

Wareing P.F. & Philips I.D.J (1981). Growth and differenciation in plants. Pergamon Press, New York.

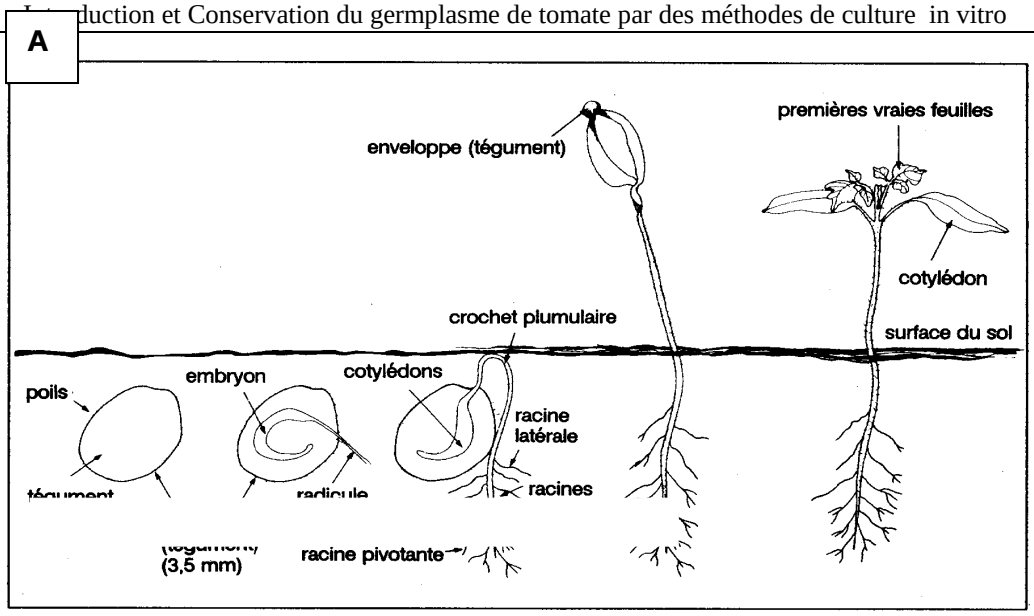
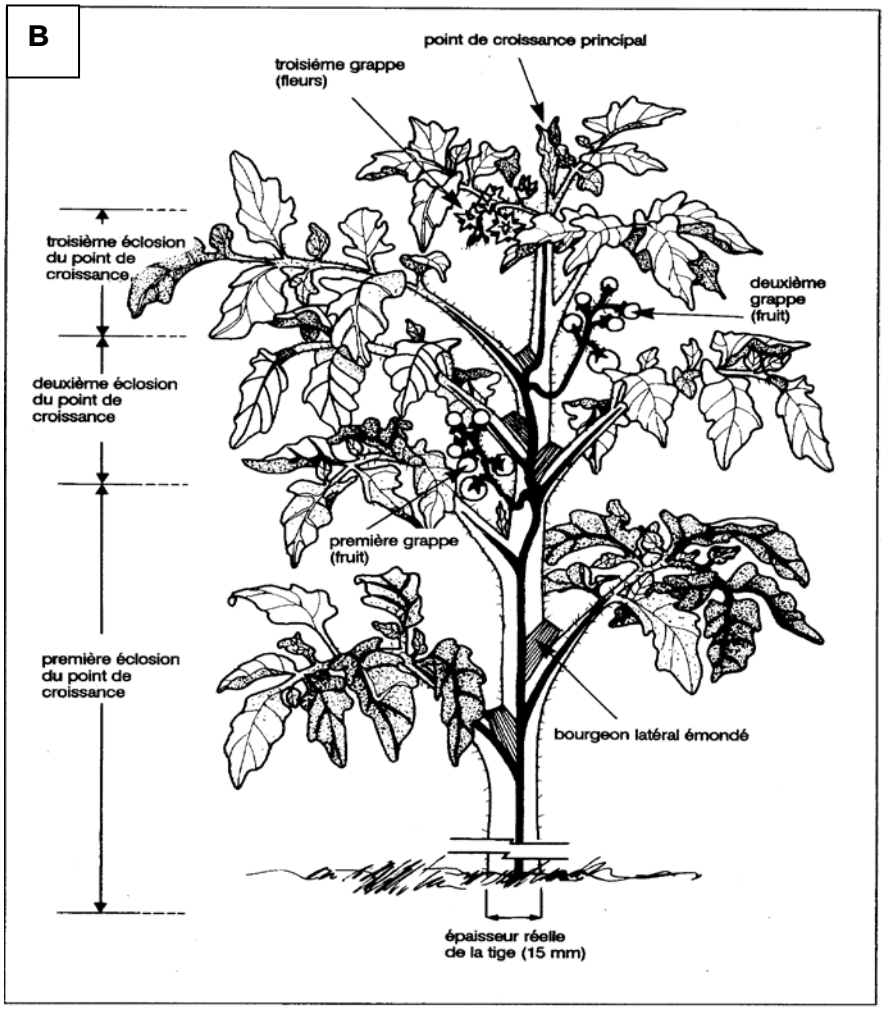


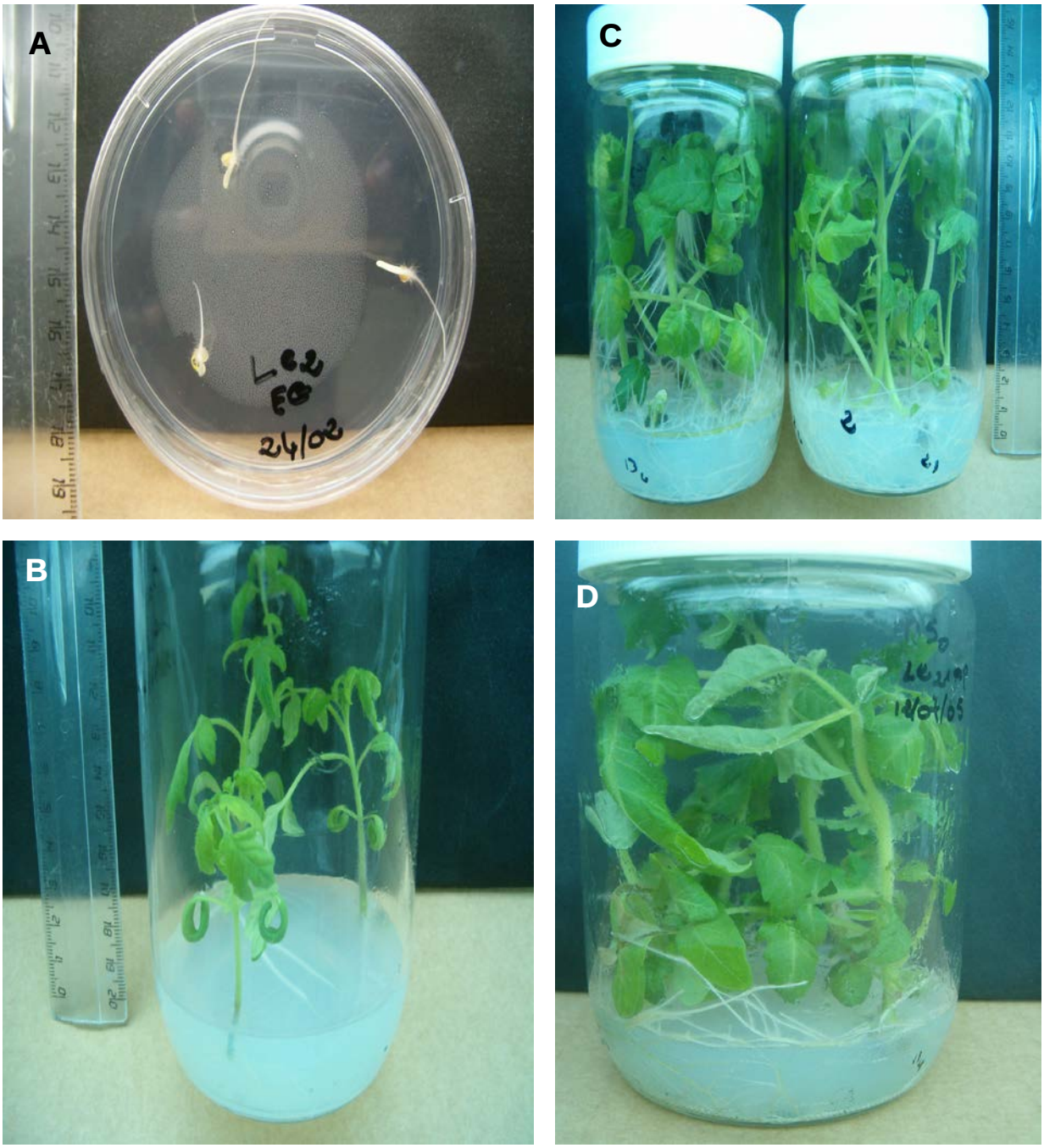
Fig. 3 Germination de la graine de tomate.



<u>Planche 1</u> : Germination et Croissance chez la tomate (Papadopoulos, 1991)5

A : La Germination chez la tomate

B : La Croissance indéterminée chez la tomate



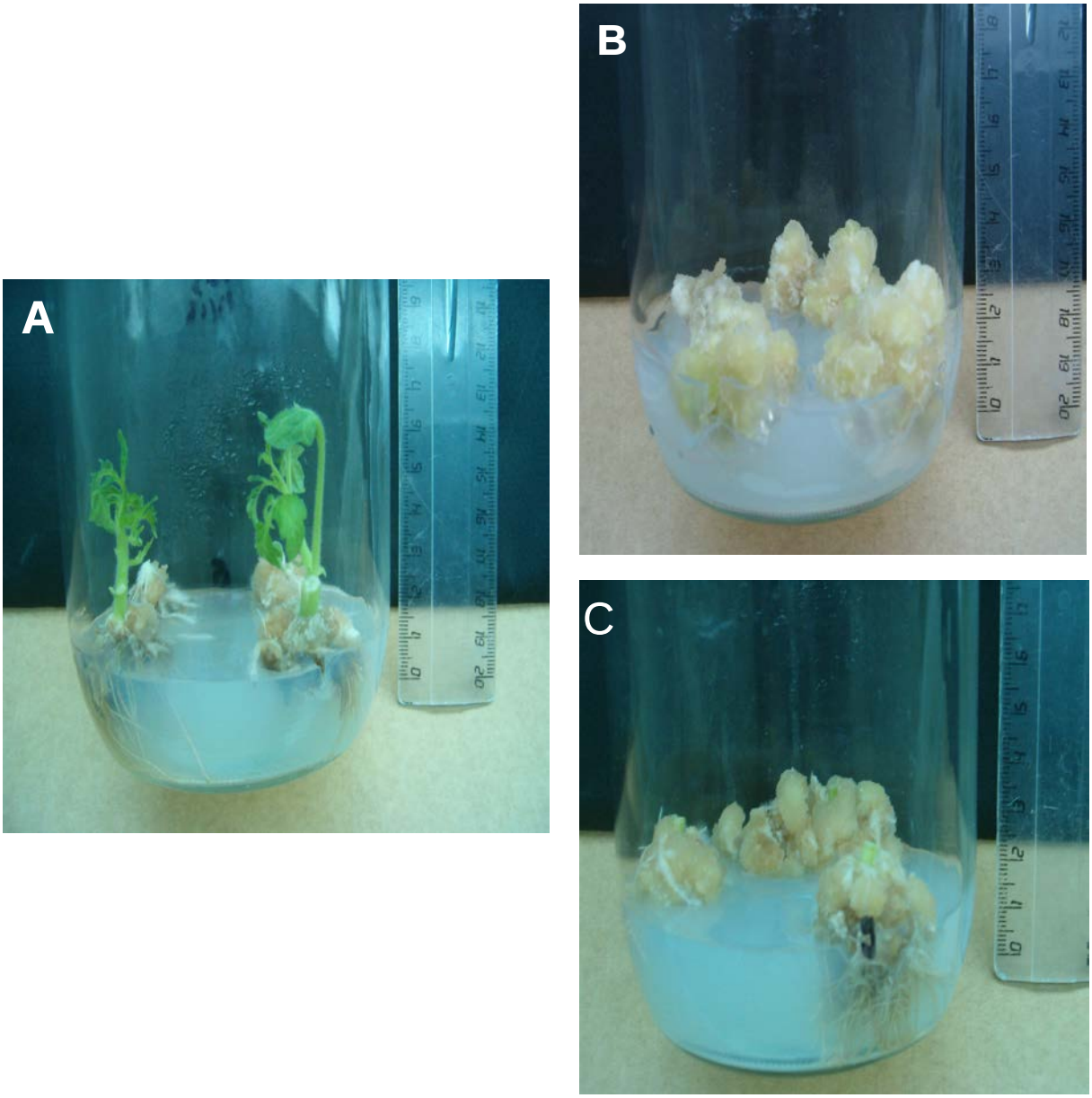
<u>Planche 2</u> : Germination de graines et expression morphogénétique de nœuds axillaires et apicaux après 30 jours de culture sur le milieu MS

A : Germination de graines de la variété Le2 sur de l'eau gélosée après 2 jours de semis

B : Croissance des semis une semaine après germination

C : Croissance de nœuds apicaux après 30 jours sur le milieu MS

D : Croissance de nœuds axillaires après 30 jours sur le milieu MS

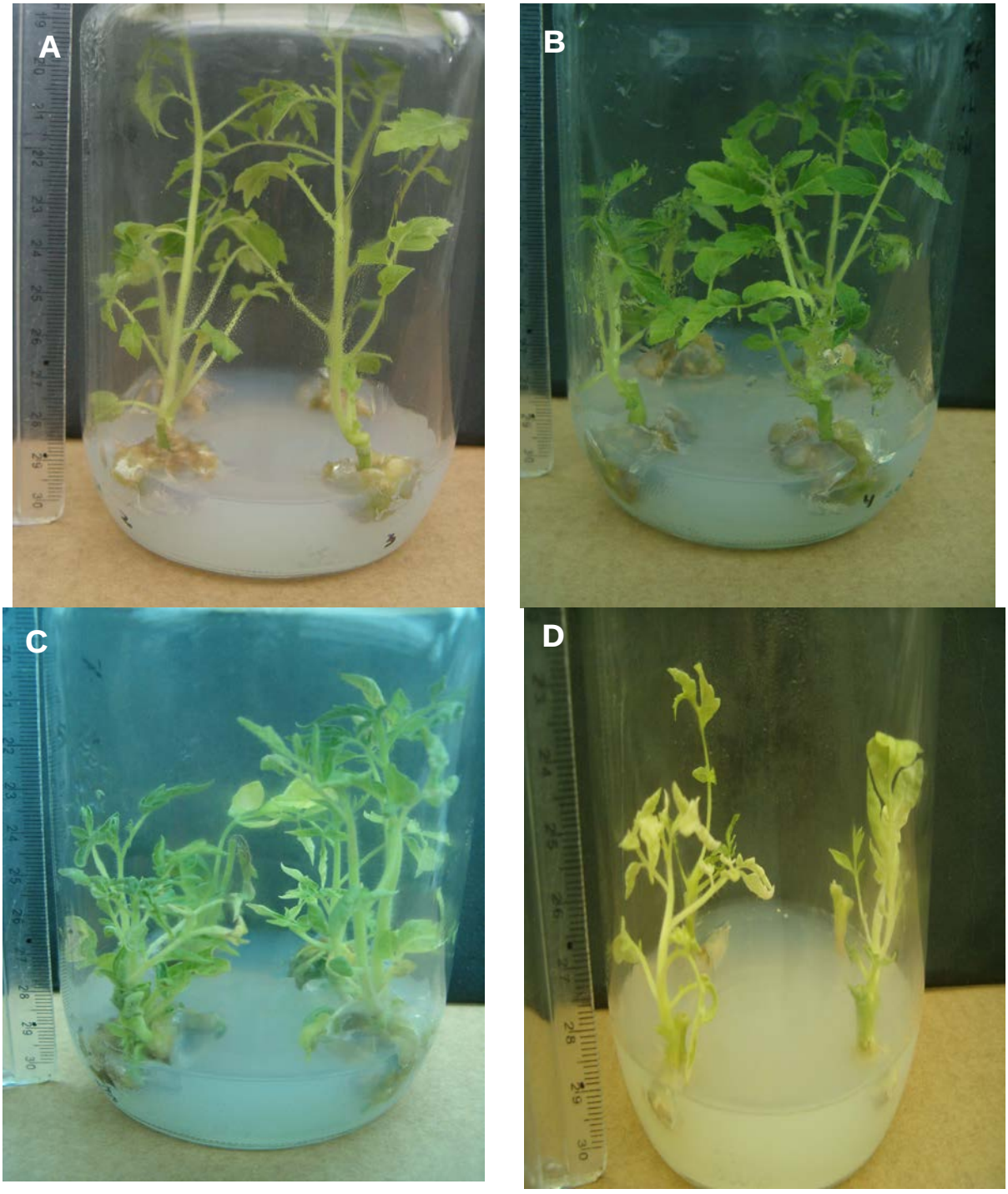


<u>Planche 3</u> : Expression morphogénétique de bourgeons axillaires de la variété Le3 après 30 jours de culture sur le milieu MS contenant de l'ANA seule ou combinée à la BAP

A : Milieu MS + ANA 0,1

B : Milieu MS + ANA 0,1 + BAP 0,1

C : Milieu MS + ANA 0,1 + BAP 0,5



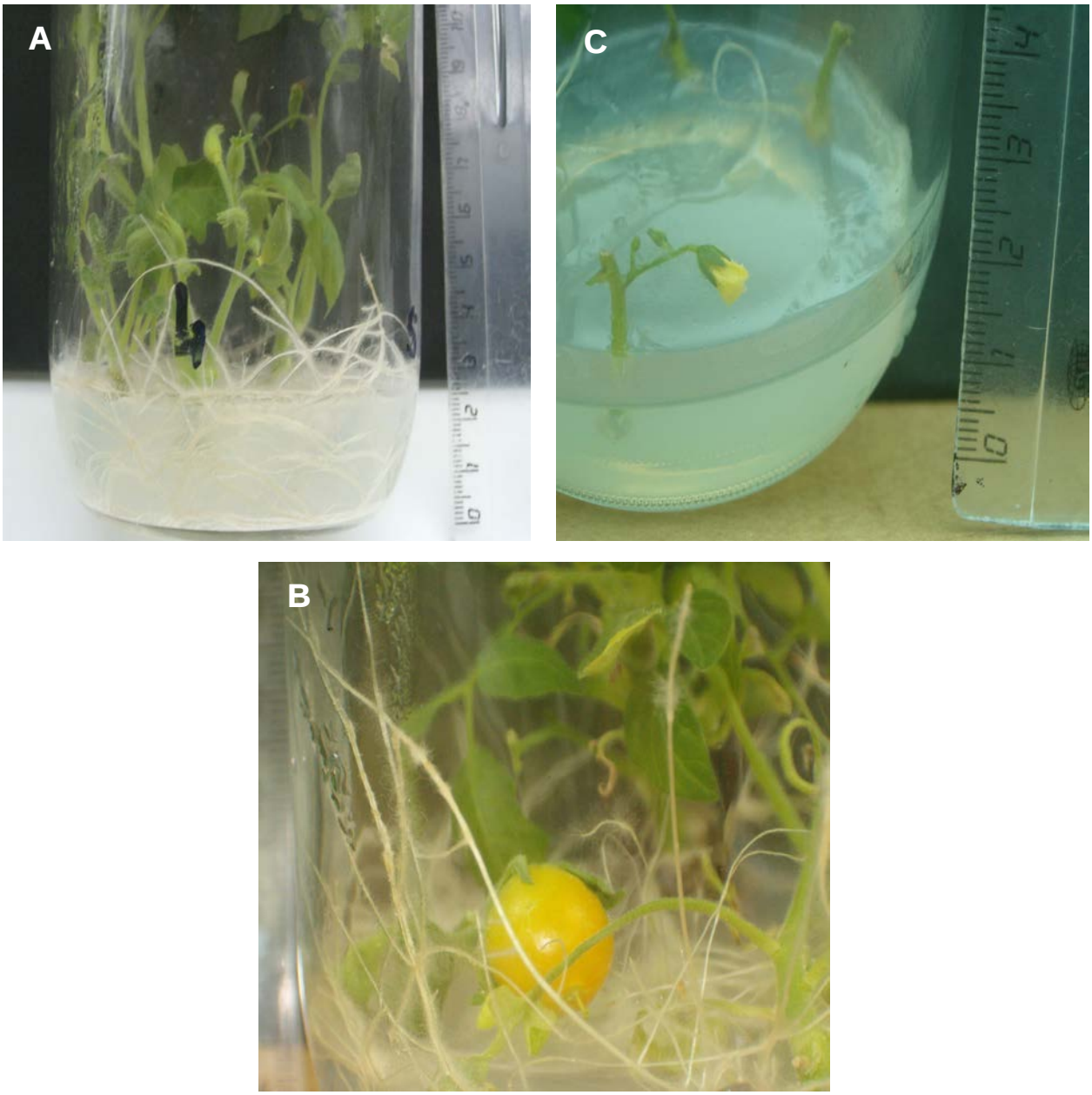
<u>Planche 4</u> : Expression morphogénétique de nœuds axillaires de *Lycopersicon esculentum* de la variété Le4 sur le milieu LS après 30 jours de culture

A : Milieu LS + Zeatine 1 mg / l

B : Milieu LS + Zeatine 1,5 mg / l

C : Milieu LS + Zeatine 2,2 mg / l

D : Milieu LS+ Zeatine 3,5 mg / l

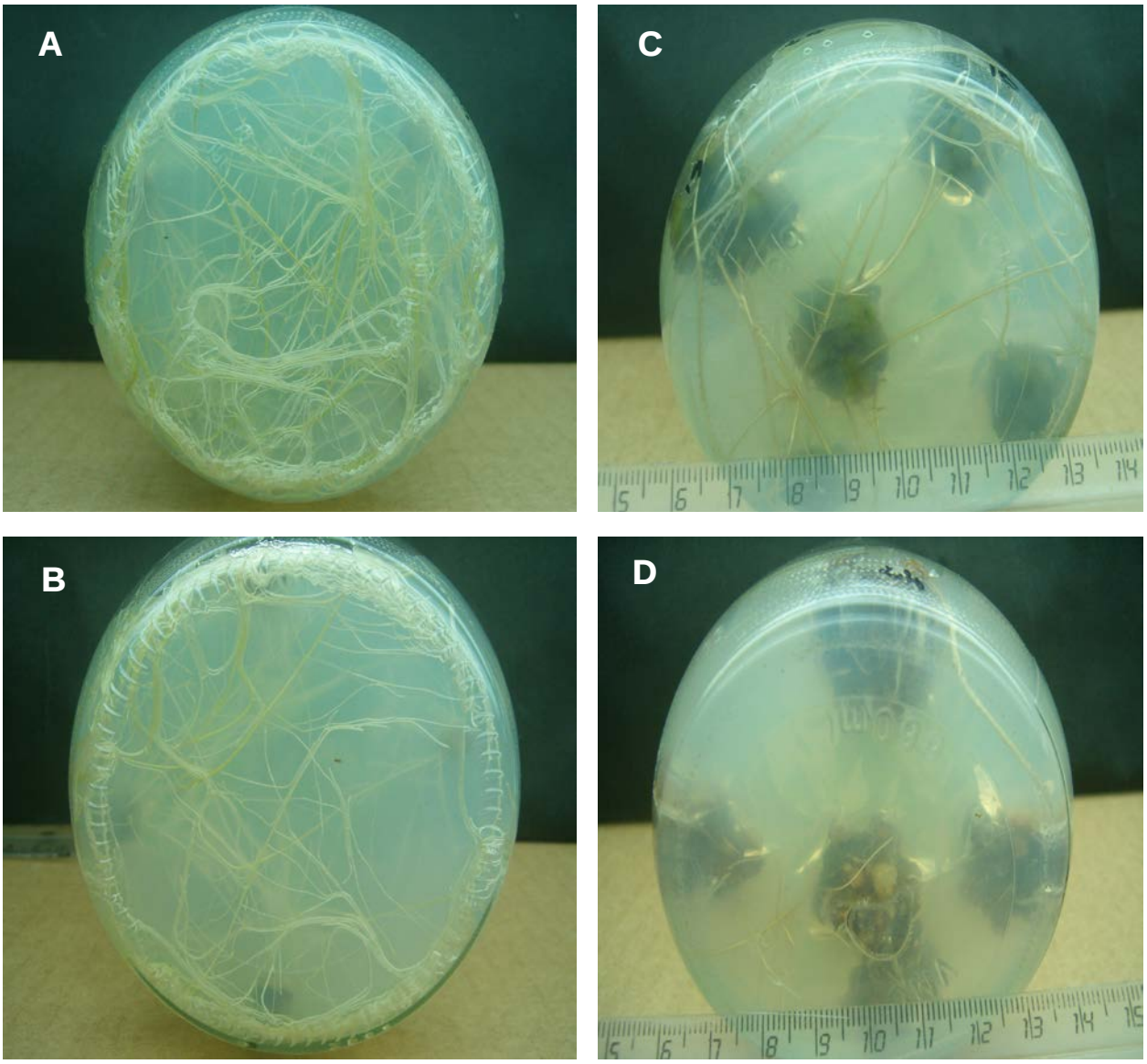


<u>Planche 5</u>: Formation de boutons floraux, d'une fleur et d'un fruit chez la variété Le4 sur le milieu MS

A : Formation de boutons floraux au bout de trois repiquages

B : Formation de fruit au bout d'une dizaine de subcultures

C : Formation de fleur au bout d'une dizaine de subcultures



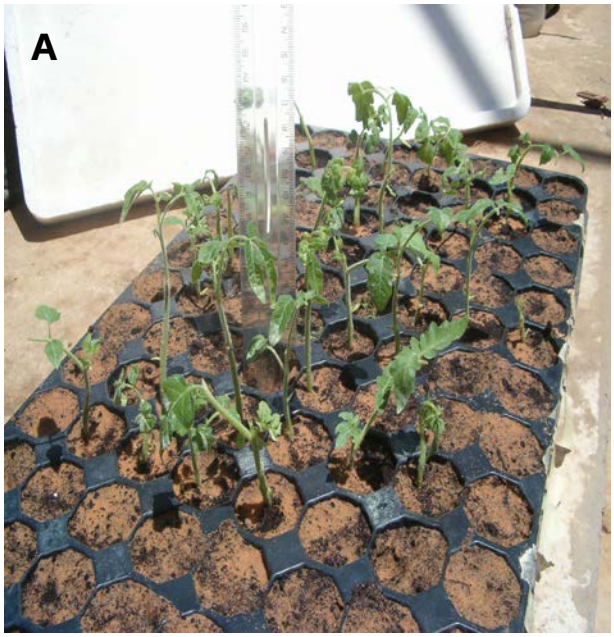
<u>Planche 6</u> : Enracinement de nœuds axillaires après 30 jours de culture sur différents milieux de culture

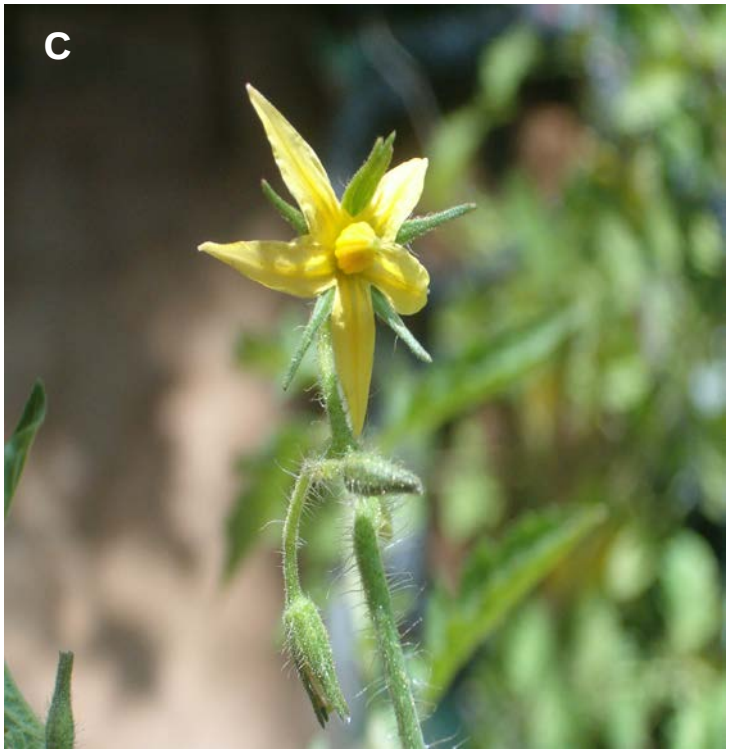
A : Milieu MS sans hormone

B : Milieu LS sans hormone

C : Milieu MS + Kin1 mg / l

D : Milieu MS + BAP 1 mg / l





<u>Planche7</u> : Première acclimatation

A : Plants de tomate des variétés Le1 et Le3 acclimatés en serre

B : Plants de tomate après 15 jours d'acclimatation

C : Plant de tomate en fleurs après 1 mois d'acclimatation

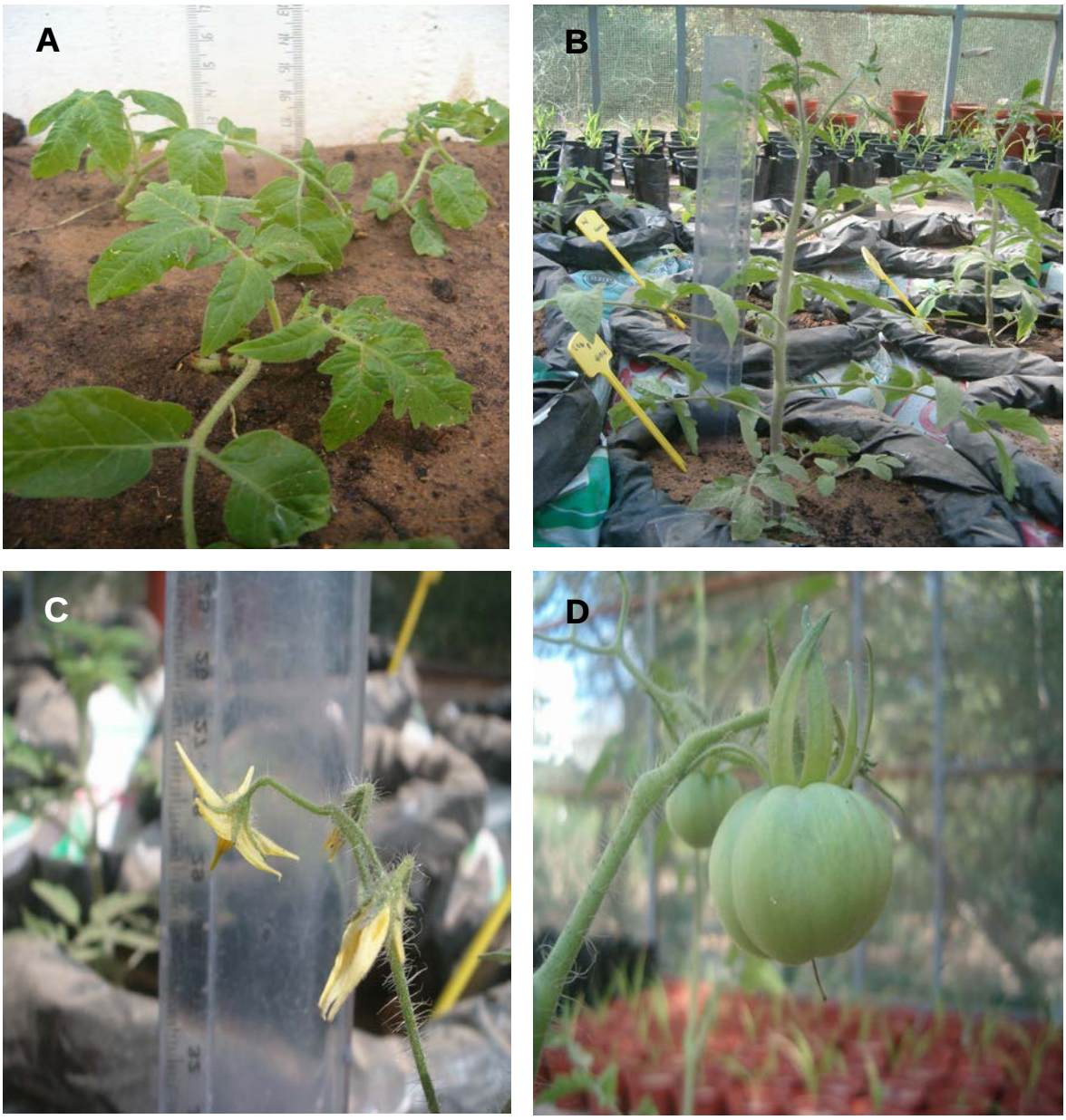


Planche 8 : Deuxième acclimatation

A : Plants de tomate de la variété Le2 acclimatés en serre

B : Plants de tomate des 4 variétés au bout de 20 jours d'acclimatation

C : Plants de tomate de la variété Le4 en fleurs après 1 mois

D : Formation de fruits au bout de 2 mois de culture chez la variété Le2

Planche 9: Fruits mûrs de tomate après trois mois d'acclimatation

A : Tomates de la variété Le4 (tomates cerises)

B : Tomates de la variété Le2 (tomate noire)

C : Tomates de la variété Le1 (tomates cœur de bœuf)

D : Tomates de la variété Le3 (tomate rose de berne)