

50376
1993
296

50376
1993
N° d'ordre 1231
296

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Stéphane DESIRE



**DORMANCE ET GERMINATION DES MICROTUBERCULES DE
POMME DE TERRE (*Solanum tuberosum* L.) PRODUITS *IN VITRO*.
RECHERCHE DE MARQUEURS DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE.**

Soutenue le 21 décembre 1993 devant la Commission d'Examen :

M. J. VASSEUR	Professeur, Université de Lille I.....Président
MME A. BLANC	Maître de Conférences, Université Paris VI.....Rapporteur
M. Y. LE DEUNFF	Professeur, ENSH de Versailles.....Rapporteur
M. W. REUST	Docteur, Station de Changins (Suisse).....Rapporteur
M. J.P. COULLEROT	Maître de Conférences, Université Lille I.....Examineur
M. D. MOLET	Responsable de la station de Beaurains (Arras).....Examineur

AVANT-PROPOS

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au président de ce jury, Monsieur le Professeur J. VASSEUR, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour les conseils qu'il m'a prodigués au cours de ce travail et lors de la rédaction de ce manuscrit.

J'exprime ici ma profonde gratitude à Monsieur J-P. COUILLEROT qui a beaucoup contribué à la mise en place de ce sujet et à son encadrement. Je lui exprime tous mes remerciements pour sa confiance et pour ses conseils au cours de mes travaux de recherche et lors de la rédaction de la thèse.

Je remercie vivement Madame A. BLANC (Université Paris VI), Monsieur le Professeur Y. LE DEUNFF (ENSH Versailles) ainsi que Monsieur W. REUST (Station Fédérale de Recherches agronomiques de Changins, Suisse) d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie vivement Monsieur D. MOLET (F.N.P.P.P.T.) pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Je lui sais gré de m'avoir laissé une grande liberté dans mes activités de recherche et d'avoir accepté d'être l'un des examinateurs de cette thèse.

Ce travail a bénéficié de l'appui financier du Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais à parité avec le G.I.E. des producteurs de Plants de Pommes de terre du Nord de la France. Que ces deux organismes trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance. Je tiens également à remercier Monsieur Y. BEGUE pour l'ensemble de ses démarches accomplies dans le cadre de ce contrat.

Je remercie également le personnel de la Station F.N.P.P.P.T. de Beaurains, où j'ai effectué une partie de mes travaux, en particulier les "Dames de la multiplication *in vitro*", Dominique et Francine, ainsi que Xavier et Dominique (la secrétaire exemplaire) pour leur gentillesse et leur serviabilité. A ces remerciements, je voudrais associer Laurence LAVIEVILLE qui a été l'initiatrice du programme microtubercules et avec qui il a toujours été agréable de collaborer.

Que toutes les personnes du labo (chercheurs, étudiants, stagiaires, personnel technique) soient remerciées pour leur aide, leurs conseils et surtout pour leur bonne humeur qui m'a permis d'effectuer cette thèse dans d'excellentes conditions.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I) LA POMME DE TERRE.....	2
A) GENERALITES.....	2
1)La plante entière.....	2
2)Le tubercule.....	2
B) AGE PHYSIOLOGIQUE DU TUBERCULE.....	3
1)Généralités.....	3
2)Définitions.....	4
3)Age physiologique et marqueurs.....	4
4)Age physiologique et aspects agronomiques.....	6
II) LA DORMANCE.....	7
A) DEFINITION.....	7
B) DORMANCE DE LA POMME DE TERRE.....	9
1)La durée de la dormance.....	9
2)Méthodes pour lever la dormance et inhiber la germination.....	10
3)Les phytohormones et la dormance.....	11
3-1)Contenu en hormones.....	11
3-2)Rôle des hormones.....	12
C) DORMANCE ET VOIE DES PENTOSE.....	12
III) LES GLUCIDES DANS LE TUBERCULE.....	14
A) METABOLISME.....	14
1)Synthèse de l'amidon.....	14
2)Dégradation de l'amidon.....	14
B) EVOLUTION DES GLUCIDES AU COURS DE LA CONSERVATION.....	15
1)Effet variétal.....	15
2)Influence de la maturité.....	15
3)Influence des conditions de conservation.....	16
3-1)La température.....	16
3-2)L'atmosphère de stockage.....	17
4)Influence de l'âge physiologique.....	17

IV) LES POLYAMINES	18
A) METABOLISME	18
1)Putrescine	18
2)Spermidine et spermine.....	18
B) ROLES PHYSIOLOGIQUES	19
1)Polyamines et morphogenèse.....	19
1-1)Rhizogenèse et caulogenèse	19
1-2)Floraison.....	19
1-3)Tubérisation.....	20
1-4)Embryogenèse somatique.....	20
2)Actions des polyamines sur la dormance et la germination.....	21
2-1)Polyamines et dormance	21
2-2)Polyamines et germination.....	22
V) LES PROTEINES.....	22
A) EVOLUTION AU COURS DE LA CONSERVATION.....	22
B) LA PATATINE.....	23
VI) LA CULTURE <i>IN VITRO</i> AU SERVICE DU PLANT DE POMME DE TERRE.....	24
VII) PRESENTATION DES OBJECTIFS.....	27
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	
I) MATERIEL VEGETAL UTILISE	28
II) CULTURE <i>IN VITRO</i> ET CONSERVATION DES MICROTUBERCULES.....	28
A) MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE	28
1)Phase de multiplication	28
2)Phase de microtubérisation.....	30
B) CONSERVATION DES MICROTUBERCULES.....	30

III) ESSAIS DE GERMINATION DES MICROTUBERCULES	30
A) CONDITIONS STANDARDS DE GERMINATION.....	30
B) GERMINATION APRES TRAITEMENT A L'ACIDE GIBBERELLIQUE	32
C) ESSAIS EN SERRE	32
D) ANALYSE DES RESULTATS.....	33
IV) ETUDE DU METABOLISME DES TUBERCULES AU COURS DE LA CONSERVATION	33
A) TECHNIQUES DE DOSAGE DES GLUCIDES	33
1)Extraction et préparation des extraits.....	33
2)Dosage des glucides par HPLC	34
2-1)Appareillage	34
2-2)Paramètres d'utilisation	34
B) TECHNIQUES DE DOSAGE DES POLYAMINES	34
1)Extraction	34
2)Préparation des extraits.....	34
3)Analyse des polyamines dansylées.....	35
C) TECHNIQUES ENZYMATIQUES.....	35
1)Extraction des enzymes.....	35
2)Activités enzymatiques et dosages des protéines	36
2-1)Activités G6PDH et 6PGDH.....	36
2-2)Activités peroxydasiques	36
2-3)Dosages des protéines.....	36
2-4)Présentation des résultats	37
3)Electrophorèse des isoenzymes.....	37
3-1)Confection des gels.....	37
3-2)Conditions de migration	37
3-3)Révélation des systèmes enzymatiques	37
D) L' ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE.....	39
1)Extraction des protéines	39
2)Electrophorèse bidimensionnelle	39
2.1)Electrophorèse de première dimension ou isoélectrofocalisation (IEF)	39
2.2)Electrophorèse de deuxième dimension.....	40
3)Révélation des protéines.....	41
4)Séchage des gels	41

5)Utilisation des gels.....	41
-----------------------------	----

CHAPITRE III : RESULTATS

I) GERMINATION DES MICROTUBERCULES : DE LA RECOLTE	
AUX ESSAIS EN SERRE.....	42
A) ESSAIS DE GERMINATION AU LABORATOIRE.....	42
1)Facteurs influençant la durée de la dormance et la germination.....	42
1-1)Effet géotype et incidence du froid.....	42
1-2)Importance de la durée de tubérisation et du diamètre	
des microtubercules.....	43
1-3)Effet de la concentration en saccharose dans le milieu	
de tubérisation	44
2)Traitements à l'acide gibbérellique	46
B) ESSAIS EN SERRE	49
1)Variété Bintje	49
2)Variété Désirée.....	52
II) RECHERCHE DE MARQUEURS DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE DES	
MICROTUBERCULES CONSERVES A 4°C.....	55
A) PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	55
B) MARQUEURS BIOMETRIQUES.....	55
C) MARQUEURS PHYSIOLOGIQUES	58
1)Evolution des glucides dans les microtubercules au cours de	
la conservation à 4°C.....	58
1-1)Variété Bintje.....	58
1-2)Variété Désirée	59
1-3)Comparaison Bintje et Désirée	60
2)Evolution des polyamines endogènes libres.....	61
3)Activités enzymatiques au cours de la conservation des	
microtubercules.....	62
3-1)Les peroxydases	62
3-2)Les estérases	63
3-3)Enzymes de la voie des pentoses phosphate.....	65
4)Evolution des protéines au cours de la conservation des	
microtubercules.....	66

CHAPITRE IV : DISCUSSION

I) LA DORMANCE ET SA LEVEE.....	71
A) FACTEURS INTRINSEQUES	72
B)FACTEURS EXTRINSEQUES.....	73
II) GERMINATION DES MICROTUBERCULES	78
III) PRODUCTION DE TUBERCULES EN SERRE.....	79
IV) MARQUEURS DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE DES MICROTUBERCULES.....	82
A) LES GLUCIDES	82
B) LES POLYAMINES	86
C) LES ENZYMES	88
D) LES PROTEINES.....	92

CONCLUSIONS.....	96
------------------	----

BIBLIOGRAPHIE.....	99
--------------------	----

ABBREVIATIONS

ABA : acide abscissique
ACC : acide 1-aminocyclopropane carboxylique
ADC : arginine décarboxylase
ADP : adénosine di-phosphate
AIA : acide β -indolylacétique
AMO-1618 : 2-isopropyl-4-diméthylamino-5-méthylphényl-1-pipéridinecarboxylate
méthylchloride
ANA : acide naphtalène acétique
APS : ammonium persulfate
ATP : adénosine tri-phosphate
BAP : benzylaminopurine
CIPC : isopropyl N-(3-chlorophényl) carbamate
CK : cytokinines
DFMA : α -difluorométhylarginine
DFMO : α -difluorométhylornithine
DTT : dithiothreitol
EAPR : Association Européenne de Recherche sur la Pomme de terre
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
Fru : Fructose
GA₃ : acide gibbérellique
GIE : groupement d'intérêt économique
Glc : glucose
G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase
HPLC : chromatographie liquide à haute pression
IEF : isoélectrofocalisation
IPC : isopropyl N-phénylcarbamate
MF : matière fraîche
MS : matière sèche
MTT : bleu de thiazolyl
m/v : masse/volume
NADP⁺ : nicotinamide adénosine di-phosphate
nKat : nano katal (1 nmole de substrat hydolysée par seconde)
ODC : ornithine décarboxylase
PDA : pipérazine di-acrylamide

3PGA : acide 3-phosphoglycérique
6PGDH : 6-phosphogluconate déshydrogénase
PMS : phénazine méthosulfate
PP : pentose phosphate
PUT : putrescine
SAM : S-adénosylméthionine
SAMS : S-adénosylméthionine synthase
SAMDC : S-adénosylméthionine décarboxylase
SDS : sodium dodécylsulfate
SPD : spermidine
SPDS : spermidine synthase
SPM : spermine
SPMS : spermine synthase
TCA : acide trichloroacétique
TEMED : N, N, N', N', tétraméthyl-éthylène diamine
UDP : uridine di-phosphate
UTP : uridine tri-phosphate
UKS : urée, carbonate de potassium, SDS
v/v : volume/volume

INTRODUCTION

Le monde des semences et plants vit à l'heure des biotechnologies. Le plant de Pomme de terre n'échappe pas à la règle, bien au contraire. En effet, la culture *in vitro*, partie intégrante des biotechnologies, a depuis les années 1970 largement contribué à préserver aux producteurs français une position privilégiée sur le marché du plant.

La culture de méristèmes est la première technique développée; couplée à la thermothérapie et à la production en masse par microbouturage, elle est venue apporter une solution à l'éradication des virus.

En 1988, les producteurs de plants lancent un nouveau défi : parallèlement à la production de boutures pour obtenir du plant de prébase des expérimentations sur les microtubercules sont initiées. La région Nord en même temps s'investit dans ce programme en développant la recherche avec les Universités de Lille et d'Amiens.

Les travaux réalisés par L. Lavieville à Amiens ont aboutit à la mise au point d'une méthode performante de microtubérisation *in vitro*. L'aspect production étant bien maîtrisé, un autre obstacle reste à franchir; il s'agit de la physiologie de ce matériel nouveau, en particulier des phénomènes de dormance, de levée de dormance et de germination.

C'est donc ici que s'initie notre travail, à la demande du G.I.E. des Syndicats de Producteurs de Plants de Pommes de terre du Nord de la France. Le premier de nos objectifs a été de définir un certain nombre de critères essentiels à la germination du matériel produit *in vitro*. Ensuite, nous nous sommes intéressés au métabolisme des microtubercules en relation avec les phénomènes de dormance, de levée de dormance, de germination et d'âge physiologique. L'objectif essentiel est de rechercher des marqueurs susceptibles de caractériser un état physiologique optimal pour la germination des microtubercules actuellement produits par le GIE et pour la production de plants homogènes.

I) LA POMME DE TERRE

A) GENERALITES

1) La plante entière

La Pomme de terre appartient à la famille des Solanacées. Les premières pommes de terre introduites en Europe appartenaient à la sous espèce *andigena* de l'espèce *Solanum tuberosum*. Cette sous espèce étant mal adaptée aux conditions climatiques, les sélectionneurs ont créé une autre sous espèce appelée *Solanum tuberosum tuberosum* : plus précoce, elle tubérise pendant l'été lorsque les jours sont longs.

Le cycle complet de la plante est constitué d'une succession d'étapes régies par les lois de variabilité de la durée de dormance, de développement des organes (tiges, racines, feuilles...) et de croissance végétative. Une bonne connaissance de l'ensemble de ces paramètres est indispensable à la culture de la Pomme de terre.

2) Le tubercule

La Pomme de terre possède des tiges souterraines ou stolons pouvant se modifier à leur extrémité pour donner un tubercule. Le tubercule apparaît comme un organe doublement précieux: consommé pour ses qualités nutritives (réserves principalement glucidiques) et gustatives, c'est aussi lui qui permet la conservation et la multiplication des variétés de Pomme de terre d'une année sur l'autre, même si aujourd'hui les méthodes de culture *in vitro* viennent relativiser ce dernier aspect.

Sa composition est la suivante (Rajnachel-Messaï, 1987) : 77,5% d'eau, 19,4% de glucides, 2% de protéines, 0,1% de lipides et 1% de sels minéraux et vitamines, soit pour 100 g consommés, environ 0,34 KJ. Les glucides sont majoritairement représentés par l'amidon (70% de la matière sèche -MS-) des sucres solubles (saccharose, glucose et fructose) et de la cellulose. Les protéines représentent 9% de la MS contre 7,1% pour les protéines du riz blanc ou 10,9% pour celles du grain de maïs. La Pomme de terre se révèle également riche en potassium, en fer, en iode, en magnésium et en vitamines (B1, B2, B5, B6 et surtout C). Donc n'hésitez pas, mangez de la pomme de terre!

Le cycle de développement d'un tubercule se caractérise par une succession de stades, différents du point de vue morphologique ou physiologique.

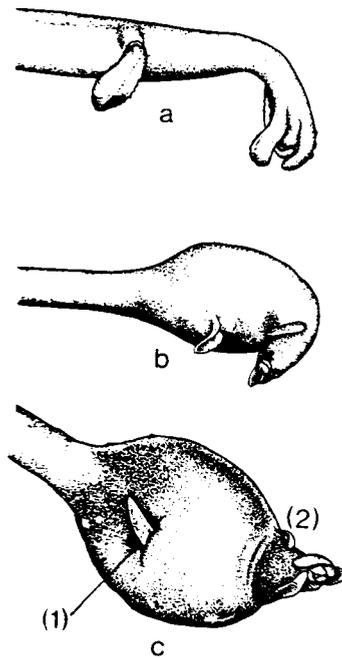


Figure 1 : La formation d'un tubercule : Le stolon avec une écaïlle foliaire et un apex en forme de crochet (a), connaît un renflement dans la partie subapicale (b) qui conduit à la formation du jeune tubercule (c) présentant 2 yeux (1 et 2) au départ (d'après Krijthe, 1946).

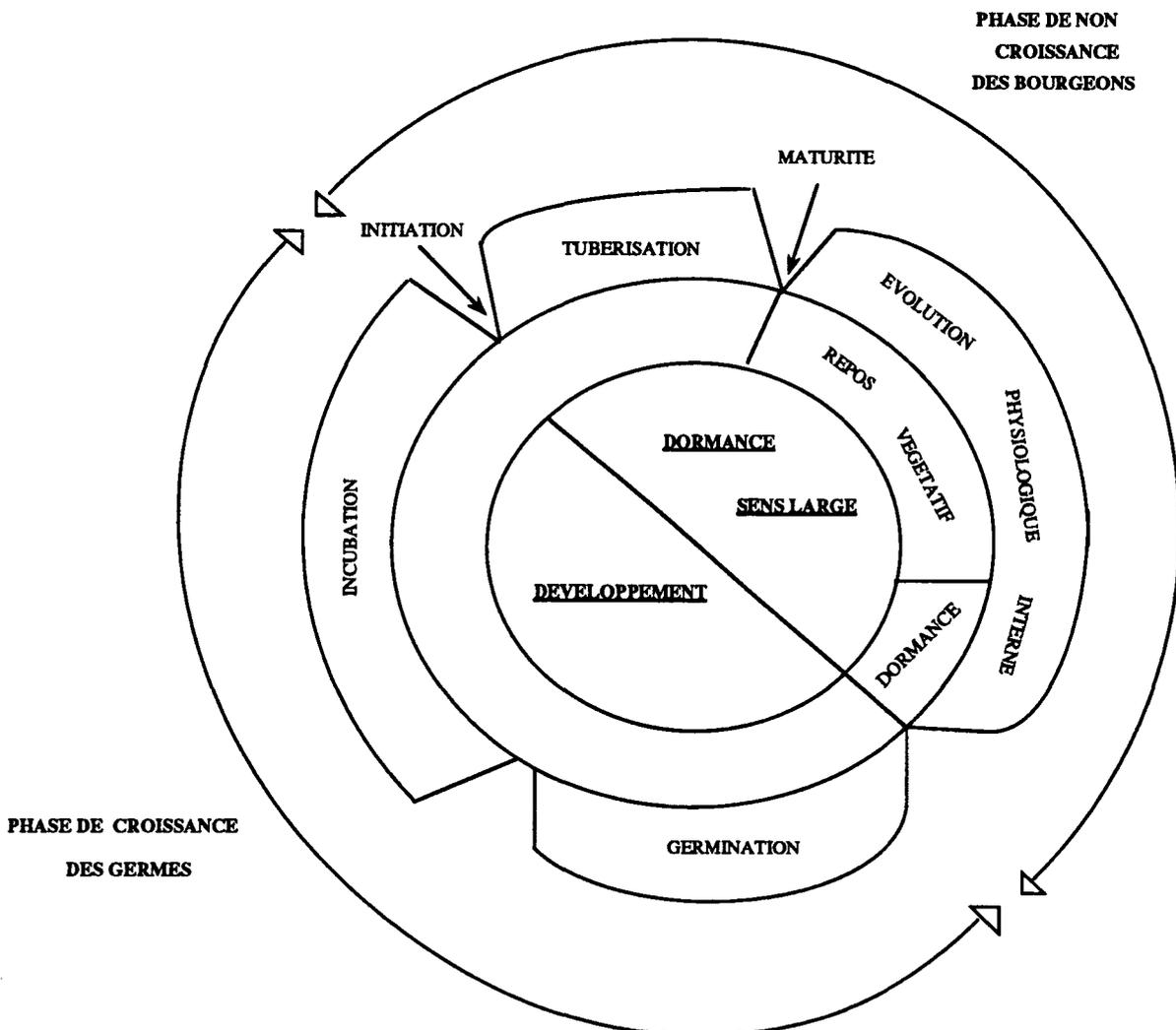


Figure 2 : Les diverses étapes de développement d'un tubercule de Pomme de terre et les événements physiologiques qui en découlent.

parenchyme cortical interne et du parenchyme pérимédullaire. La croissance finale est achevée par une augmentation de volume des cellules parenchymateuses (Peterson et *al.*, 1985).

2- La maturation : elle se caractérise par un arrêt de la croissance. Le tubercule entre en dormance, état dans lequel il se trouve au moment de la récolte.

Au cours du stockage, les tubercules subissent une évolution physiologique interne qui influence le devenir des germes issus des bourgeons situés au niveau des yeux du tubercule (Ducieux et *al.*, 1986).

3- La germination : Dans un premier temps un seul germe se développe, cela traduit concrètement le phénomène de dominance apicale. Ensuite d'autres germes apparaissent (3 ou 4) : c'est vers ce stade que le tubercule est généralement planté.

4- La sénescence : C'est le stade de dégénérescence des tubercules après développement des organes végétatifs.

B) AGE PHYSIOLOGIQUE DU TUBERCULE

1) Généralités

Comme nous venons de le voir, le tubercule parcourt diverses étapes de développement (**figure 2**) dont les stades marquants (Pérennec et Madec, 1980) sont :

- 1- l'initiation sur la plante mère
- 2- la fin du repos végétatif ou entrée des bourgeons en germination
- 3- le stade de tubérisation des germes ou stade d'incubation

Entre les stades 1 et 2 on trouve une phase de non croissance des bourgeons du tubercule : elle se situe pendant toute la période du grossissement et au cours du repos végétatif. Vient ensuite une phase où la croissance des germes a lieu si les conditions de milieu le permettent. La vitesse de germination mesurée, soit par le poids soit par la longueur des germes dans une unité de temps, est d'abord faible dans la période qui suit immédiatement la fin du repos végétatif. Elle augmente ensuite progressivement jusqu'à un maximum puis décroît pour devenir nulle quand les germes tubérisent (phénomène de boulage) (Krijthe, 1958, 1962; Madec et Pérennec, 1962). La dernière phase est caractérisée par l'arrêt de croissance longitudinale des germes et leur croissance radiale.

Age chronologique	Age des tubercules depuis leur formation, exprimé en jours, semaines ou mois, sans prendre en considération les conditions de l'environnement.
Age physiologique	Etat physiologique du tubercule qui exerce une influence sur sa productivité. L'âge physiologique est déterminé par l'âge chronologique et les conditions du milieu pendant la croissance et la conservation.
Dormance	Etat physiologique du tubercule qui ne lui permet pas de germer, même placé dans des conditions naturelles idéales pour la germination (obscurité, température 15-20°C, humidité relative d'environ 90%).
Période de Dormance	<p>Dans la littérature distinction entre:</p> <p>-<u>Repos végétatif</u>: Période pendant laquelle aucune germination n'a lieu sur les tubercules, même conservés dans des conditions idéales à la germination (terme anglais : REST).</p> <p>-<u>Dormance</u>: Période qui suit le repos végétatif lorsque les conditions du milieu peuvent inhiber la croissance des germes. La dormance est achevée lorsque 80% des tubercules présentent un ou plusieurs germes d'au moins 3 mm de longueur (terme anglais : DORMANCY)</p>
Capacité germinative	Pour un lot de tubercules mis pendant 4 semaines à 20°C (80% H.R.) elle est déterminée par la mesure du poids frais des germes par tubercule et la longueur du plus long germe (Krijthe, 1962).
Période d'incubation	Période qui s'étend depuis la germination jusqu'à la formation de tubercules-fils.
Marqueurs d'âge physiologique	Substances qui présentent une évolution parallèle à la germination, au cours du vieillissement des tubercules.

Tableau 1 : Termes et définitions relatifs à l'âge physiologique, établis pour la plupart par l'Association Européenne de Recherche sur la Pomme de terre -EAPR- (d'après Reust, 1986).

boulage) (Krijthe, 1958, 1962; Madec et Pérennec, 1962). La dernière phase est caractérisée par l'arrêt de croissance longitudinale des germes et leur croissance radiale.

La vitesse de cette évolution physiologique dépend des conditions subies par le tubercule et en particulier de la température, au moins après la fin du repos végétatif. Elle est accélérée quand la température de conservation s'élève dans les limites étudiées de 2 à 20°C (Madec et Pérennec, 1955; Madec, 1958; Pérennec et Madec, 1960). Le point important, d'après Pérennec et Madec (1980), c'est que les transformations physiologiques qui conduisent du repos végétatif jusqu'à la tubérisation des germes se réalisent au sein des réserves du tubercule et non dans les bourgeons des yeux ou dans les germes. Elles se font aussi rapidement chez des tubercules dont la croissance des germes est inhibée que chez des tubercules germant normalement; elles ne sont donc pas une conséquence de la germination. Des températures basses de 2 à 4°C n'empêchent pas cette évolution physiologique, mais la ralentissent (Krijthe, 1958, 1962). De cette évolution, qui se déroule progressivement et d'une manière continue, découle la notion d'âge physiologique.

Pour résumer, on peut dire que **l'âge physiologique d'un tubercule de Pomme de terre est la conséquence d'une évolution physiologique** qui s'exprime d'une manière visible par l'influence qu'elle exerce à tout instant sur les processus de croissance et de tubérisation des germes (Pérennec et Madec, 1980).

2) Définitions

Au regard de la diversité des expressions utilisées par les divers pays européens pour définir certaines phases ou états des tubercules (**figure 2**) il s'est avéré nécessaire de mettre au point une terminologie adéquate en relation avec l'âge physiologique des tubercules (Reust, 1986). Le **tableau 1** regroupe ces termes et leur définition.

3) Age physiologique et marqueurs

Les connaissances sur la nature des transformations biochimiques qui se déroulent au cours de l'évolution physiologique du tubercule sont très réduites. Certaines hypothèses ont néanmoins été émises. Ainsi, selon Madec et Pérennec (1969) l'inaptitude à la croissance peut résulter de l'incapacité temporaire du tubercule à fournir certains métabolites. Le fait que l'évolution physiologique du tubercule conduit à la tubérisation des germes selon des processus assez analogues à ceux de la plante (Madec et Pérennec, 1959, 1962) suggère, comme cela a été montré chez la plante (Jolivet, 1969), que des modifications d'équilibre entre diverses substances de croissance (Acide β -

indolylacétique -AIA-, Acide gibbérellique -GA₃-, Acide abscissique -ABA-, cytokinines -CK- ...) pourraient intervenir. Mais il n'est pas exclu que des métabolites majeurs comme les glucides dont la concentration augmente avec l'âge du tubercule, pourraient jouer aussi un rôle (Pérennec et Madec, 1980).

Reust et Aerny (1985) ont suivi l'évolution des teneurs endogènes en saccharose ainsi qu' en acides citrique et malique durant la conservation à 18°C de tubercules de la variété Bintje. Durant la dormance, la teneur en saccharose représente 0,1 à 0,2% de la matière fraîche. Au début de la germination celle-ci diminue très légèrement puis augmente considérablement lors de la phase de croissance rapide des germes. La tubérisation des germes survient lorsque la teneur en saccharose atteint 0,85 à 2% de la matière fraîche des tubercules. Les teneurs en acides citrique et malique se comportent de façon inverse lors du vieillissement du tubercule. En effet durant l'incubation, l'acide citrique diminue et l'acide malique croît pour atteindre 0,5% de la matière fraîche au départ de la tubérisation.

Selon Nowak (1977) l'activité peroxydasique peut être un marqueur de l'âge physiologique. L'auteur constate une diminution de l'activité depuis la récolte jusqu'au mois de décembre et ensuite une augmentation continue jusqu'au mois d'avril qui correspond à la fin de l'expérience.

Selon Van Es et Hartmans (1987b), il est possible de caractériser le vieillissement physiologique des tubercules de semence en utilisant comme paramètres la teneur en matière sèche des seconds germes et l'activité peroxydasique des premiers germes. En effet, selon ces auteurs, l'augmentation de la matière sèche des seconds germes et l'accroissement de l'activité peroxydasique des premiers germes sont en relation avec la diminution de la capacité germinative et de la période d'incubation.

Apelbaum (1984) a montré que la levée de dormance est accompagnée d'une augmentation du taux d'acides nucléiques et de la synthèse protéique. Il suggère que l'ornithine décarboxylase, enzyme de la voie de synthèse des polyamines, pourrait être un bon marqueur de l'âge physiologique. D'autres travaux décrivent le rôle des substances de croissance dans le processus de vieillissement physiologique.

Selon Lindblom (1966) la dominance apicale des tubercules est déterminée par le rapport AIA/GA₃. Moll (1985) retrouve les mêmes résultats : juste après le début de la germination le contenu en GA₃ décroît et en revanche l'activité AIA augmente.

En fait les variations en régulateurs de croissance sont plus souvent décrites en relation avec les phénomènes de repos végétatif et de dormance (Rappaport et Wolf, 1969; Bialek et Bielinska-Czarnecka, 1978; Pérennec et Madec, 1980).

4) Age physiologique et aspects agronomiques

Les résultats obtenus par Madec et Pérennec (1955), Wurr (1975), Reust (1982) et O'Brien et *al.* (1983) peuvent être résumés de la manière suivante : les tubercules physiologiquement âgés germent plus rapidement que ceux plus jeunes. Les plantes présentent également un taux de croissance initial meilleur, un nombre plus important de tiges, une tubérisation plus précoce et une sénescence plus rapide.

Moll (1985) reprenant des travaux similaires mais intégrant l'influence de la taille des germes lors de la plantation arrive à des conclusions différentes. L'augmentation de l'âge physiologique accélère l'émergence mais ne permet pas de diminuer la durée comprise entre l'apparition des plantules et l'initiation de la tubérisation.

Avec du plant physiologiquement jeune, la levée est plutôt lente (Bodlaender et Marinus, 1987) et les plantes relativement petites. Lorsque la durée de conservation est plus longue, la levée est plus rapide et le feuillage plus abondant. La longueur des tiges et leur nombre augmentent parallèlement à l'allongement de la durée de conservation, mais diminuent lorsque les tubercules sont très âgés.

Van der Zaag et Van Loon (1987) montrent qu'une température de conservation de 12°C au lieu de 4°C avance la période où la croissance est maximale pour les variétés Jaerla et Désirée. Cependant pour les 2 variétés une température de conservation plus élevée raccourcit la durée de la croissance maximale et en diminue la vigueur. Lorsque la vigueur est optimale pour une température de conservation de 12°C, celle du plant maintenu à 4°C lui est déjà supérieure.

Pour Caldiz (1991) l'âge physiologique est déterminé par l'origine géographique et les conditions de conservation des tubercules semences. Il peut influencer l'initiation de la tubérisation, le nombre de tiges par plante, la croissance de la plante et le rendement final. Lorsque la durée de la période d'incubation est considérée comme représentative de l'âge physiologique, le rendement final en tubercules présente une corrélation positive avec celui-ci. En revanche Tizio et Tizio (1981) ne retrouvent pas cette corrélation.

En fait, il semble que l'effet de l'âge physiologique des tubercules de semence sur le rendement final en tubercules soit souvent faible (Pérennec et Madec, 1980; Van der Zaag et Van Loon, 1987). Sur la base des résultats de la littérature, on peut supposer que les plants d'âges physiologiques différents sont en réalité souvent au maximum ou près du maximum de la vigueur de croissance. Mais l'explication la plus probable résulte du fait que le processus de tubérisation est la conséquence d'interactions complexes dans lesquelles interviennent plusieurs facteurs par leurs effets sur l'induction de la tubérisation et leurs répercussions sur la durée et l'importance de la croissance (Madec et Pérennec, 1962). En fait, dans la seconde partie du cycle végétatif, d'autres paramètres déterminant le rendement prédominent souvent sur la vigueur de croissance du plant (Madec, 1981).

II) LA DORMANCE

A) DEFINITION

De nombreux bourgeons sont incapables de se développer pendant une certaine période de leur vie, même si les conditions semblent favorables à leur croissance. Pour caractériser cette phase, certains auteurs parlent de période de repos végétatif (Stuart et Milstead, 1934) alors que d'autres utilisent le terme de dormance (Nooden et Weber, 1978).

Selon Emilson (1949) la dormance est la période complète durant laquelle les bourgeons sont incapables de se développer, ceci étant le résultat de facteurs endogènes et/ou exogènes. La période de dormance est donc constituée de 2 phases : la période de repos végétatif et ensuite la période de quiescence.

En revanche dans ses travaux, Burton (1963) ne tient pas compte de la séparation de la phase de dormance de la Pomme de terre en deux stades. De Bottini et *al.* (1982) sont d'ailleurs du même avis. Cependant, pour Hemberg (1985), il semble justifié de distinguer pour les bourgeons de Pomme de terre, le stade de repos végétatif de la période de quiescence qui suit. Lorsque les tubercules sont quiescents ils ne germent pas si la température est trop froide.

En 1978, Burton décrit un bourgeon dormant comme étant un bourgeon incapable de se développer à des températures favorables; la période durant laquelle le bourgeon se trouve dans cet état est nommée période de dormance.

Champagnat (1969), considérant d'une manière générale les semences et les bourgeons, distingue deux types principaux de vie ralentie:

- La dormance : un organe dormant placé dans les conditions les plus favorables à la croissance n'évolue pas, il s'agit d'une inaptitude interne au retour à la vie active.

- La quiescence ou repos végétatif : elle se caractérise par un retour à la vie active dès que les conditions favorables sont réalisées.

Selon Côme et *al.*(1984), la dormance est un phénomène relatif qui va s'exprimer ou non selon les conditions dans lesquelles les semences sont placées. Par exemple les semences de *Bromus rubens* L. fraîchement récoltées sont dormantes. Leur dormance correspond à une incapacité à germer à l'obscurité à des températures supérieures à 15°C, mais elle ne se manifeste pratiquement pas entre 5°C et 15°C (Corbineau et *al.*, 1992).

L'Association Européenne de Recherche sur la Pomme de terre (EAPR) a essayé, en 1986, de définir un certain nombre de termes (**tableau 1**) dont celui de dormance. Suivant qu'il s'agisse d'un état physiologique général de l'organe, décrit par l'EAPR, ou d'un stade précis de la période de dormance, décrit dans la littérature, la définition n'est pas la même.

Les exemples venant témoigner de la grande diversité des définitions attribuées à des termes traduisant souvent un même état physiologique ne manquent pas. D'après Lang (1987), les principaux défauts des termes utilisés jusqu'à maintenant pour décrire un état de dormance sont les suivants :

- ils sont facilement employés à contre-sens
- ils manquent de précision du point de vue physiologique
- les différences sémantiques entre eux sont très faibles (ainsi le dictionnaire Américain Heritage définit dormant comme "inactif, endormi", repos végétatif comme "inactif, endormi" et quiescent comme "inactif, endormi")
- du fait des similitudes sémantiques, ils sont souvent mal traduits
- ils ne sont pas appliqués de manière universelle à toutes les parties des plantes présentant des types similaires de dormance.

Lang (1987) a donc proposé, en collaboration avec d'autres chercheurs, une nouvelle définition au terme dormance. Pour lui, **la dormance est une suspension temporaire de croissance visible de toute structure de la plante contenant un méristème**. Cette définition est complétée par l'emploi de préfixes qui vont permettre de définir plus précisément le type de dormance.

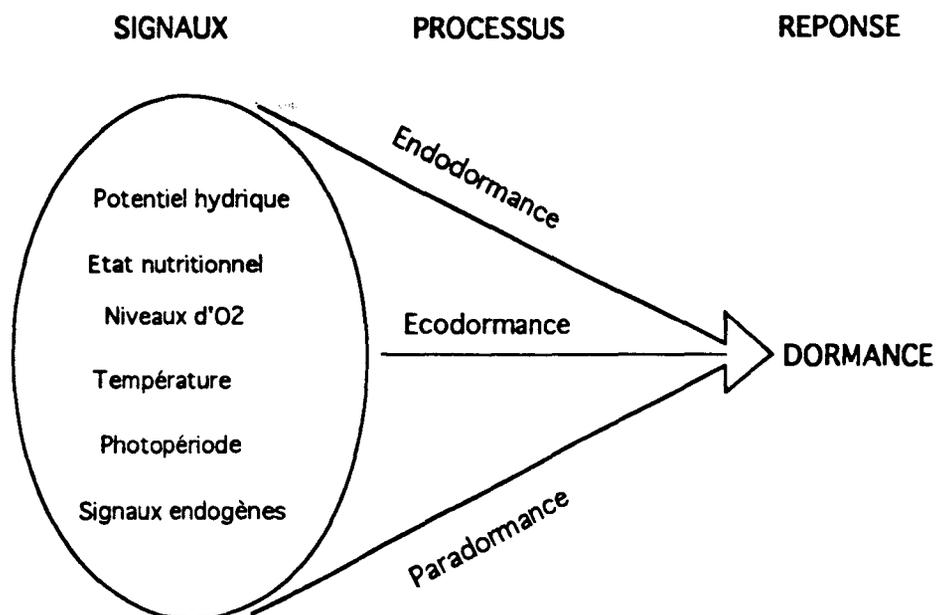


Figure 3 : Signaux et processus impliqués dans le phénomène de dormance.

NIVEAU D'ORGANISATION	TERMINOLOGIE
<p>I. Condition de base: Suspension temporaire de croissance visible de toute structure contenant un méristème</p> <p>II. Régulation initiale par : Facteurs physiologiques dans la structure dormante Facteurs physiologiques dans la plante, dans une structure différente de celle dormante Stress de l'environnement provoquant des réponses non spécifiques</p> <p>III. Facteurs impliqués</p> <p>A. Endodormance</p> <ul style="list-style-type: none"> * Froid * Photopériode * Qualité lumière * Rythmes endogènes <p>B. Paradormance</p> <ul style="list-style-type: none"> * Méristème apical * Téguments * Périoderme * Froid * Photopériode * Qualité lumière <p>C. Ecodormance</p> <ul style="list-style-type: none"> * Température * Eau * Nutrition * Niveaux de CO₂, O₂ 	<p style="text-align: center;">Dormance</p> <p style="text-align: center;">Endodormance</p> <p style="text-align: center;">Paradormance</p> <p style="text-align: center;">Ecodormance</p> <p style="text-align: center;">Endodormance cryogène Endodormance photopériodique Endodormance spectrale Endodormance rythmique</p> <p style="text-align: center;">Paradormance apicale Paradormance tégumentaire Paradormance périodermique Paradormance cryogène Paradormance photopériodique Paradormance spectrale</p> <p style="text-align: center;">Ecodormance thermique Ecodormance hydrique Ecodormance nutritionnelle Ecodormance atmosphérique</p>

Tableau 2 : Proposition d'un système de classification des types de dormance (d'après Lang, 1987).

Pour décrire tous les cas possibles de dormance, un schéma général (**figure 3**) peut être proposé sous forme d'une série de signaux à l'origine de processus physiologiques (endo-, para- et écodormance) conduisant à un état de non croissance de la structure méristématique considérée (dormance). Lang (1987) va jusqu'à proposer un système de classification des types de dormance (**tableau 2**) avec des termes appropriés.

B) DORMANCE DE LA POMME DE TERRE

La principale fonction du tubercule est de survivre pendant une certaine période durant laquelle les conditions sont défavorables à la croissance. Pour satisfaire à cette fonction, le tubercule accumule des réserves (sucres simples et amidon) et produit des bourgeons qui peuvent se développer lorsque les conditions sont favorables à la croissance et former des germes. Pour éviter une croissance prématurée des germes, lorsque les conditions sont temporairement favorables, il existe un mécanisme interne de régulation du potentiel de croissance des germes. Durant la période de dormance, le développement des germes est inhibé par des signaux endogènes; on peut parler dans ce cas, d'après la définition de Lang (1987), d'endodormance.

1) La durée de la dormance

La durée de la dormance dépend principalement du cultivar. Burton (1963) rapporte pour 11 cultivars des périodes de dormance variant de 5 à 14 semaines, à 10°C.

Selon Emilson (1949) le degré de maturité à la récolte est aussi un facteur important de la durée de la dormance. Les petits tubercules (poids moyen de 20 g) du cultivar Majestic restent dormants pendant 19 semaines alors que les plus gros (poids moyen de 100 g) ne le sont que pendant 15 semaines. Krijthe (1962) observe une variation dans la durée de la dormance au sein d'un même lot. Là encore, une des causes de ce phénomène est dû à la taille des tubercules. Reust (1982) retrouve ces résultats mais pour certains cultivars la différence dans la durée de la dormance pour des tailles différentes de tubercules n'est pas significative.

Récemment Van Ittersum (1992c) arrive aux conclusions suivantes :

La variation dans la durée de la dormance au sein d'un lot de tubercules (dépendante également du cultivar) est principalement imputable à la variation existant à l'intérieur d'un lot issu d'une même plante.

	PRODUITS OU TRAITEMENTS	AUTEURS
Maintenir la dormance	<ul style="list-style-type: none"> - AIA , Sel de K de l'ANA - Ester méthylique de l'ANA - Hydrazide maléique - Rayonnements β, γ ou X - Froid - Carbamates (IPC, CIPC) - ABA 	<ul style="list-style-type: none"> - Guthrie (1938 a,b) - Guthrie (1939) - Paterson <i>et al.</i> (1952) - Burton et Hannan (1957) - Lindblom (1970) - Nowak (1977) - Van der Plas (1987)
Lever la dormance	<ul style="list-style-type: none"> - Peler les tubercules - Blessier les tubercules - Humidité et 20 à 35°C - Anaérobiose partielle - 40% O₂+ 20% CO₂ - Ethylène chlorhydrine - Thiocyanate de K ou Na - Thiourée - RINDITE - Glutathion - Bromoéthane + Ethanol - Bromoéthanol - Ethrel + GA₃ - Ethylène - CS₂ et GA₃ - GA₃ - Sectionner les tubercules + trempage dans GA₃ - Sectionner les microtubercules - Courant électrique 	<ul style="list-style-type: none"> - Thornton (1939) - Rappaport et Sachs (1967) - Goodwin (1966) - Thornton (1939) - Reust et Gugerli (1984) - “ “ - Denny (1926) - “ - Denny (1945) - Guthrie (1940) - Coleman et Coleman (1986) - McDonald et Coleman (1988) - Coleman (1983) - Rekha <i>et al.</i> (1983) - Rylski <i>et al.</i> (1974), Minato et Okazawa (1978) - Burton (1978), Chinchilla (1985) - Rappaport (1956), Doorenbos (1958), Timm <i>et al.</i> (1962) - Slomnicki et Rylski (1964) - Ewing <i>et al.</i> (1987) - Kokaçaliskan <i>et al.</i> (1989)

Tableau 3 : Traitements physiques ou chimiques utilisés pour maintenir ou lever la dormance des tubercules de Pomme de terre.

La durée de la dormance d'un lot de tubercules peut être décrite de manière correcte grâce à deux paramètres. Le premier correspond à la fin de la dormance, moment où on atteint 80 % de germination et le second rend compte de la durée de la dormance en prenant en considération le délai pour passer de 10% à 90% de germination.

Dans le cas des microtubercules produits *in vitro*, l'effet cultivar est encore constaté. Ainsi Garner (1986) cite des périodes de dormance exprimées à 19°C, pouvant s'échelonner de 1 à 20 semaines. Les différentes conditions adoptées dans les protocoles de production de microtubercules semblent également aboutir à des caractéristiques physiologiques assez disparates. Hussey et Stacey (1981) obtiennent une germination immédiate des tubercules produits en jours longs (16 h ou 24 h); en revanche ceux induits en jours courts et en présence de BAP germent plus lentement et de façon hétérogène. Abbot et Belcher (1986) ont décrit des observations à l'opposé de celles de Hussey et Stacey pour les mêmes facteurs étudiés (photopériode et BAP). Estrada et *al.* (1986) rapportent que la durée de la dormance est de 60 jours si l'induction de la tubérisation est faite en jours courts mais qu'elle peut atteindre 210 jours si toute la culture se passe à l'obscurité.

2) Méthodes pour lever la dormance et inhiber la germination

Les travaux sur le sujet sont très nombreux; c'est pourquoi nous nous contenterons ici de donner une liste non exhaustive des différents traitements décrits dans la littérature (tableau 3).

Actuellement le traitement à la rindite, mélange d'éthylène chlorhydrine, d'éthylène dichloride et de tétrachlorure de carbone (7/3/1,v/v), est le plus souvent utilisé, même s'il peut présenter une toxicité non négligeable pour l'homme lors de sa réalisation.

Concernant l'action de l'acide gibbérellique, il existe une controverse sur la rupture de la dormance des tubercules de Pomme de terre. En effet, certains auteurs (Rappaport et *al.*, 1957; Tsukamoto et *al.*, 1961; Timm et *al.*, 1962) affirment que la GA₃ favorise la levée de dormance, tandis que d'autres (Doorenbos, 1958; Lascarides, 1967; Marinus et Bodlaender, 1978; De Fernandez et *al.*, 1990) pensent que celle-ci n'accélère la croissance des germes que lorsque les tubercules ne sont plus dormants.

Quoi qu'il en soit, la GA₃ permet de réduire la période de dormance et donc de diminuer le temps de conservation avant plantation.

3) Les phytohormones et la dormance

3-1) Contenu en hormones

De nombreux auteurs suggèrent qu'une balance hormonale est susceptible de réguler la croissance du tubercule.

La concentration en acide abscissique est élevée pendant la dormance mais elle diminue (de 10 à 100 fois) durant la levée de dormance et la croissance des germes (Bielinska-Czarnecka et Bialek, 1976; Korableva et *al.*, 1977). Lorsque les tubercules de plusieurs cultivars conservés à 10°C sont placés à 20°C, le taux initial en ABA est positivement corrélé à la durée de dormance et négativement à l'élongation des germes à 20°C (Coleman et King, 1984). D'autres substances telles que l'acide cafféique et la scopolétine (Korableva et *al.*, 1977) diminuent à la fin de la dormance.

Le régulateur de croissance le plus répandu, jouant un rôle dans la régulation de la dormance, est l'acide gibbérellique. La concentration endogène en GA₃ est généralement basse durant la dormance et augmente avec le début de la croissance des bourgeons (Bielinska-Czarnecka et Bialek, 1976; Bialek et Bielinska-Czarnecka, 1978; Obhidalova et *al.*, 1979). Lorsque les germes sont en croissance active et que les plantules se développent, les teneurs en GA₃ diminuent.

Des changements dans la composition en cytokinines ont également été décrits. A la fin de la période de dormance, quand les germes démarrent leur croissance, la concentration en cytokinines augmente à la base des germes (Korableva et *al.*, 1977; Van Staden et Dimalla, 1978; Minato et *al.*, 1982; Conrad et *al.*, 1983).

Bien que les concentrations en ABA, GA et cytokinines changent de manière significative à la fin de la période de dormance, le problème est de savoir si ces changements sont la cause ou la conséquence de la fin de la dormance.

Les changements de concentration en auxine durant la conservation sont moins nets. D'après Hemberg (1985), l'AIA n'a pas d'influence sur la fin de la dormance mais seulement un effet sur la croissance des germes, quand la dormance est levée. Les germes en croissance produisent de l'AIA qui joue un rôle dans le processus d'élongation cellulaire et qui provoque le phénomène de dominance apicale (Minato et Okazawa, 1978).

Pour certains auteurs (Galston, 1983 ; Davies, 1987), les polyamines auraient un rôle de messenger secondaire, c'est à dire qu'elles serviraient de médiateur aux phytohormones. Les polyamines pourraient intervenir au niveau des modifications de la membrane et avoir une fonction de second messenger, en particulier au cours de la division cellulaire et de la croissance. Chez *Helianthus tuberosus* L. l'activation de la croissance

par les auxines est exercée par l'intermédiaire du contrôle de la biosynthèse des polyamines (Phillips *et al.*, 1987). D'autres exemples sur le rôle possible des polyamines dans les processus de dormance et de germination ont été décrits; ils seront présentés dans la partie consacrée aux polyamines.

3-2) Rôle des hormones

Les effets de la GA₃ sur la mobilisation de l'amidon ont été étudiés par divers groupes de chercheurs. L'application de GA₃ exogène peut augmenter la teneur en sucres réducteurs dans les tissus (Clegg et Rappaport, 1970; Bailey *et al.*, 1978). Cependant les travaux concernant les effets de la GA₃ sur l'activité des enzymes impliquées dans la dégradation de l'amidon conduisent le plus souvent à des résultats contradictoires et les effets sont généralement faibles ou absents (amylase et phosphorylase : Clegg et Rappaport, 1970; amylase : Bielinska-Czarnecka et Bialek, 1977; Bailey *et al.*, 1978; invertase et saccharose synthétase : Lee, 1978).

Au cours de la levée de dormance, le contenu en GA₃ augmente, mais on observe également d'autres changements comme par exemple des modifications dans les propriétés physicochimiques des membranes cytoplasmiques. Durant la dormance, le nombre et l'affinité des sites de fixation de la GA₃ sont moins importants que ceux de l'ABA alors que pendant la germination, la fixation de la GA₃ par le plasmalemme augmente (Ladyzhenskaya *et al.*, 1983).

Les cytokinines ne semblent pas avoir une influence directe sur la levée de dormance mais sont sans doute une condition préalable à l'acquisition d'un potentiel de germination (Minato *et al.*, 1982).

C) DORMANCE ET VOIE DES PENTOSE

La voie des pentoses phosphates (PP) est souvent décrite comme pouvant jouer un rôle central dans les phénomènes de levée de dormance des semences (Roberts, 1969; Simmonds et Simpson, 1972; Roberts, 1973; Hendricks et Taylorson, 1975; Roberts et Smith, 1977). Roberts a été le premier à suggérer que le contrôle de la germination chez certaines semences de graminées est associé à une augmentation du catabolisme glucidique par l'intermédiaire de la voie des PP au détriment de la glycolyse.

Dans la plupart des cas, les méthodes utilisées pour appuyer cette hypothèse sont indirectes. Ainsi, les inhibiteurs respiratoires tels que le KCN, le NaN₃ ou le NH₂OH, qui s'avèrent capables de lever la dormance des semences, sont souvent employés. Ils

sont supposés accroître l'activité de la voie des PP en diminuant la compétition mitochondriale pour l'O₂ (Roberts, 1973; Roberts et Smith, 1977) ou en augmentant l'H₂O₂ nécessaire pour la réoxydation du NADPH, par l'inhibition de l'activité catalasique (Hendricks et Taylorson, 1975).

Une méthode plus directe a consisté à utiliser du ¹⁴CO₂ et à évaluer ensuite le rapport C₆/C₁ (carbone 6 ou 1 du glucose marqué) qui reflète la prédominance de la voie des PP ou de la glycolyse. La Croix et Jaswal (1967) ont montré que la perte de l'état de dormance chez *Prunus cerasus* qui se produit lorsque des graines imbibées sont conservées pendant plusieurs semaines entre 0 et 5°C, est étroitement corrélée à une diminution significative du rapport C₆/C₁ (rapport passant de 0,95 à 0,65) et à une augmentation de la consommation d'O₂.

Simmonds et Simpson (1971) ont suivi le rapport C₆/C₁ dans des embryons isolés d'*Avena fatua*. Pour les embryons isolés de graines matures fraîchement récoltées ou conservées au sec, les échanges gazeux ne sont pas modifiés; en revanche, une baisse significative du rapport C₆/C₁ est constatée chez les embryons isolés de graines conservées au sec. En plus de l'effet de la conservation au sec, les auteurs ont montré qu'un traitement GA₃ diminue également le rapport C₆/C₁ durant les premières heures d'imbibition sans aucun changement au niveau des échanges gazeux. Les mêmes auteurs (1972) montrent que le malonate, un inhibiteur du cycle de Krebs qui rompt la dormance, diminue également le rapport C₆/C₁ durant les 6 premières heures d'imbibition.

Plus récemment l'étude de l'activité d'enzymes clés de ces deux voies métaboliques a été privilégiée. Ainsi de nombreux auteurs ont décrit l'implication de la voie des PP dans la régulation de la dormance des semences par l'étude de l'activité des glucose-6-phosphate (E.C.1.1.1.49) et 6-phosphogluconate dehydrogénases (E.C.1.1.1.44) (Kovacs et Simpson, 1976; Gosling et Ross, 1980; Swamy et al., 1980; Swamy et Sandhyarani, 1986).

Cependant plusieurs articles montrent la non implication de la voie des PP dans la levée de dormance (Sato et Esashi, 1980; Adkins et Ross, 1981; Upadhyaya et al., 1981; Cairns et De Villiers, 1986; Thévenot et al., 1989; Hu et Couvillon, 1990).

Pour les microtubercules de Pomme de terre, aucune étude sur le sujet n'a été décrite dans la littérature.

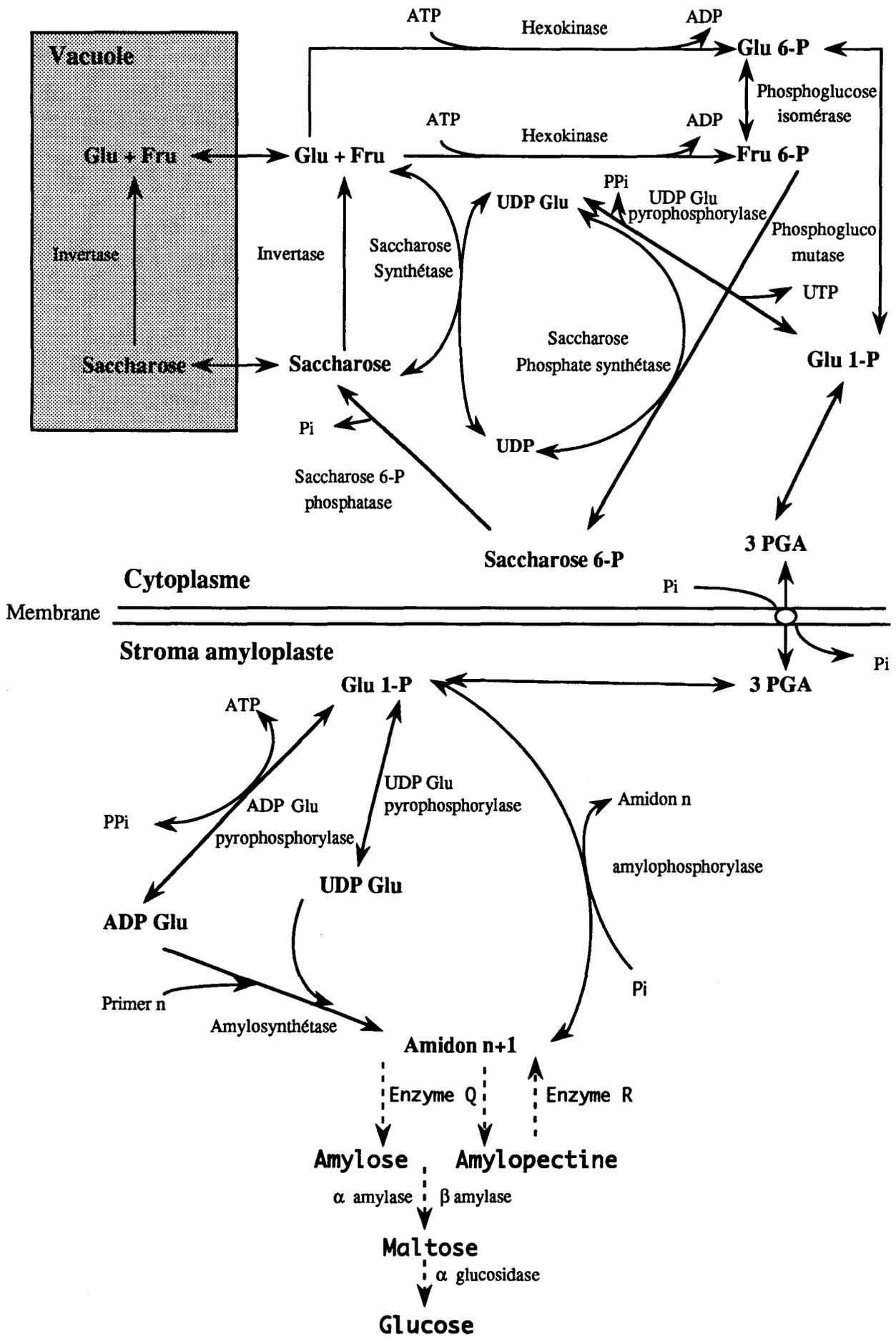


Figure 4 : Les différentes voies métaboliques des glucides simples et de l'amidon chez la Pomme de terre (modifié d'après Mares et al., 1985).

III) LES GLUCIDES DANS LE TUBERCULE

Les glucides représentent 95% de la matière sèche des tubercules. Il apparaît évident que leur métabolisation, durant la tubérisation, la dormance et la germination connaît des fluctuations qui sont le plus souvent le reflet d'un phénomène physiologique. L'étude du métabolisme glucidique permet donc une meilleure compréhension des interconversions entre l'amidon et les sucres (saccharose, glucose et fructose) au cours de l'évolution de la Pomme de terre. Notamment, elle aide à la compréhension des problèmes concernant la physiologie du tubercule.

A) METABOLISME

La **figure 4** résume les différentes voies de synthèse et de dégradation des glucides durant la vie d'un tubercule.

1) Synthèse de l'amidon

La biosynthèse de l'amidon constitue un fait marquant pour le phénomène de tubérisation. Elle est accompagnée d'une inhibition de l'invertase (Blanc, 1979); la conversion du saccharose en glucose et fructose est alors assurée par la saccharose synthétase (Van Es et Hartmans, 1987a). D'autres enzymes voient également leur activité augmenter; ce sont en particulier l'ADP glucose pyrophosphorylase, l'amylosynthétase (Hawker et *al.*, 1979) et l'UDP glucose pyrophosphorylase (Sowokinos, 1976). Concernant l'amylophosphorylase, il existe une polémique. En effet, selon Obata-Sasamoto et Suzuki (1979), elle interviendrait durant les stades précoces de tubérisation alors que pour Sowokinos (1976) seule l'ADP glucose phosphorylase serait impliquée dans la synthèse de l'amidon au cours de ces mêmes stades.

2) Dégradation de l'amidon

La dégradation de l'amidon est utile à deux processus physiologiques:

∞ Le glucose libéré est la source principale d'énergie cellulaire, via la glycolyse, le cycle de Krebs et les chaînes respiratoires (production d'ATP par phosphorylations oxydatives). Le fructose et le glucose sont d'abord convertis en fructose -6P, puis ensuite en fructose 1-6 diphosphate. Les deux enzymes impliquées dans ce dernier processus sont la phosphofructokinase ATP dépendante (Dixon et Ap Rees, 1980a) qui est inactive à basse température (Dixon et *al.*, 1981) et la

phosphofructokinase P_{Pi} dépendante (Carnal et Black, 1979, 1983) qui réalise 80 % des conversions lorsque la température est inférieure à 6°C.

∞ Le glucose est la source principale de carbone lors du processus de germination des tubercules, tant que l'activité photosynthétique n'est pas mise en place.

Au niveau enzymatique les amylases α et β vont rompre les liaisons glucosidiques α 1-4 de la molécule d'amidon. Le maltose formé, sous l'action de l' α -glucosidase est converti en glucose (Dunn, 1974; Nowak, 1977). L'amylophosphorylase, impliquée selon Obata-Sasamoto et Suzuki (1979) dans la synthèse initiale de l'amidon, a un rôle majeur dans la dégradation de l'amidon. Elle catalyse la réaction réversible : $(\text{glucose})_n + n\text{P}_i \rightleftharpoons (\text{glucose}-1\text{P})_n$. La libération de glucose-1P en présence d'UTP donne de l'UDP glucose qui est nécessaire à la formation de saccharose par la saccharose synthétase et la saccharose phosphate synthétase (Pollock et Ap Rees, 1975).

B) EVOLUTION DES GLUCIDES AU COURS DE LA CONSERVATION

1) Effet variétal

Les teneurs en hexoses réducteurs et en saccharose durant le stockage sont liées à la variété (Van Vliet et Schriemer, 1960; Sowokinos, 1973; Samotus et al., 1974). Ces variations considérables entre variétés sont à relier aux processus physiologiques de l'évolution des tubercules (maturation, dormance, germination, sénescence). Actuellement, la recherche de variétés possédant une faible teneur en glucides réducteurs au cours de la conservation présente de nombreux intérêts pour l'industrie de transformation de la pomme de terre. Lorsque les variétés sont connues pour l'accumulation de glucides à basses températures leur conservation est réalisée à 10°C, ce qui évite l'accumulation des glucides réducteurs et le brunissement lors de la cuisson des chips et des frites; toutefois les pertes causées par la germination sont augmentées.

2) Influence de la maturité

La maturité du tubercule est très importante pour le contenu en glucides au début de la période de conservation ainsi que pour les variations de ce contenu durant le stockage. Burton (1966) a montré que les tubercules immatures contiennent davantage de sucres réducteurs et moins de saccharose que les tubercules matures. Les tubercules les plus jeunes physiologiquement accumulent plus rapidement des glucides réducteurs et du

saccharose (Samotus et *al.*, 1974). D'après Wiese et *al.* (1975) le contenu en glucides réducteurs décroît lorsque la taille, le contenu en amidon ou en saccharose du tubercule augmentent.

Chez les tubercules matures, deux facteurs sont favorables à l'accumulation de glucides : les basses températures et l'âge du tubercule.

3) Influence des conditions de conservation

3-1) La température

Lors du stockage à basse température (inférieure à 6°C), l'augmentation des teneurs en sucres réducteurs est accompagnée de celle du saccharose (Burton, 1965; Pollock et Ap Rees, 1975). Isherwood et Burton en 1975 montrent que le froid, l'anaérobiose et l'éthylène chlorhydrique provoquent une mobilisation des glucides : la régulation de l'interconversion amidon-sucres se situant au niveau des membranes. Selon Workman et *al.*(1976), le froid modifierait la perméabilité membranaire de l'amyloplaste.

Bien qu'il existe des différences entre cultivars, le contenu en sucres est généralement maximal après un mois de conservation à 20°C. Ce contenu varie entre 1,3 et 2,3 % dont 40 % de sucres réducteurs (Burton, 1978). Davies et *al.* (1989) ont montré l'existence de relations directes entre la saveur sucrée des tubercules et l'activité invertase responsable de l'hydrolyse du saccharose. Selon Pollock et Ap Rees (1975), le saccharose est synthétisé à 2°C principalement par la voie de la saccharose phosphosynthétase. Ces mêmes auteurs (1975) suggèrent que la labilité au froid des enzymes clés de la glycolyse est responsable de l'inhibition de la glycolyse avec, pour conséquence, l'accumulation d'hexoses phosphates et la synthèse de saccharose. Dixon et Ap Rees (1980b) notent que la phosphofructokinase et la pyruvate kinase sont impliquées dans ce phénomène.

Les processus de mobilisation des sucres solubles et de dégradation de l'amidon lors d'un stockage à basse température (2°C) sont réversibles après reconditionnement des tubercules à 10°C (Isherwood, 1973; Burton, 1975). Cependant, seulement 80% des sucres réducteurs sont à nouveau transformés en amidon, les 20% restant sont utilisés par la respiration (Van Es et Hartmans, 1987a). Seuls les glucides formés à des températures basses peuvent être reconditionnés. Les sucres issus d'une évolution physiologique propre au tubercule (sénescence par exemple) ne le sont pas (Isherwood, 1976; Iritani et Weller, 1978).

Verma *et al.* (1974) ont observé, pour des températures comprises entre 24,7°C et 36,2°C, une augmentation des sucres réducteurs comme dans le cas d'un stockage à basses températures, mais dans une moindre proportion.

3-2) L'atmosphère de stockage

Des concentrations de 5 à 20 % en CO₂ réduisent dans un premier temps la formation de glucides à des températures basses de conservation, mais après quelques mois la formation de glucides est telle que la teneur est supérieure à celle observée dans les tubercules ayant subi une conservation en atmosphère non modifiée (Burton, 1978). Workman *et al.* (1976) signalent que le fait d'augmenter la concentration en CO₂ durant le stockage à 0 et 5°C entraîne également une augmentation des teneurs en sucres réducteurs et en saccharose.

Harkett (1971) a montré que de faibles concentrations en O₂, ou même une anaérobiose totale réduisent l'accumulation des sucres à températures basses.

4) Influence de l'âge physiologique

Le contenu en glucides de tubercules conservés à 10°C (température à laquelle l'accumulation de glucides est négligeable) augmente également après le début de la croissance des germes (généralement 1 à 3 semaines); ces glucides, particulièrement le glucose, sont mobilisés puis transportés vers les jeunes pousses (Dimalla et Van Staden, 1977). Le tubercule fournit les métabolites nécessaires à la croissance des germes et une nette accumulation de glucides dans cet organe source n'est observée que lorsque la production est plus importante que le transport ou que la germination est inhibée.

Nous avons vu dans le chapitre consacré aux marqueurs de l'âge physiologique que le saccharose subit une évolution qui peut être corrélée au stade physiologique du tubercule (Reust et Aerny, 1985). Mikitzel et Knowles (1989a) indiquent que le taux d'amidon hydrolysé, et par conséquent, l'augmentation des glucides solubles, le sont aussi. Le taux de saccharose diminue dans les tubercules âgés; ceci est dû à une conversion moins active du glucose en saccharose et à une hydrolyse croissante du saccharose par l'invertase.

Dans les tubercules de la variété Record stockés à 10°C, Hughes et Fuller (1984) ont mis en évidence l'existence d'un gradient de glucides réducteurs, la partie basale étant plus riche durant la dormance du bourgeon apical.

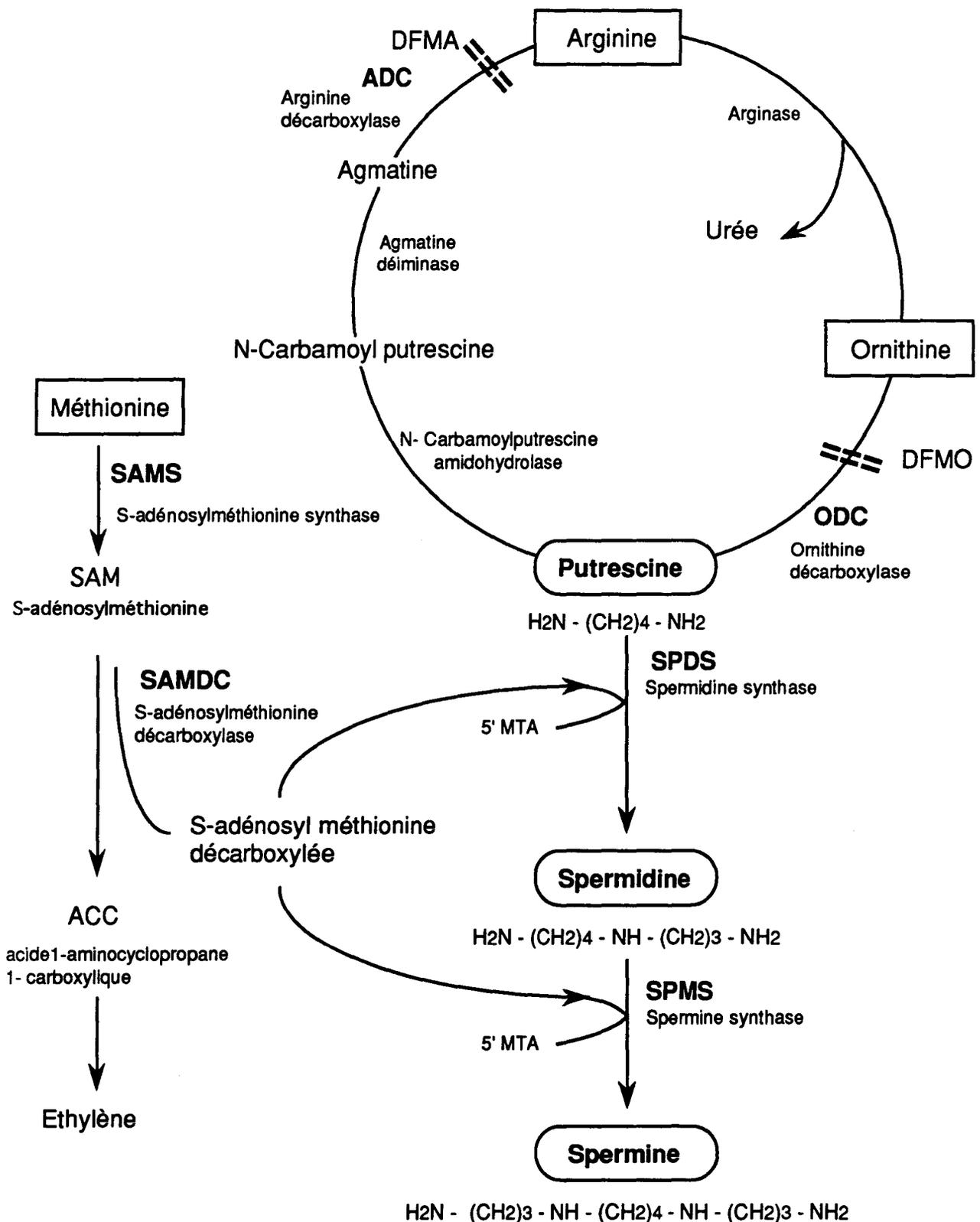


Figure 5: Voies de biosynthèse possibles des polyamines et situation de l'action de quelques inhibiteurs (===) : DFMA (α-DL difluorométhylarginine) et DFMO (α-DL difluorométhylornithine) (modifié d'après Saudemont,1992).

La sénescence du tubercule est caractérisée par la détérioration des membranes de l'amyloplaste qui deviennent perméables aux sucres solubles (glucose et fructose) dont la concentration ne cesse d'augmenter dans le cytoplasme.

IV) LES POLYAMINES

Les polyamines sont très répandues chez les plantes. Parmi celles-ci, la putrescine, la spermidine et la spermine sont le plus souvent décrites dans la littérature.

L'activité biologique des polyamines peut être attribuée principalement à leur caractère polycationique ce qui facilite leur interaction avec les acides nucléiques et les phospholipides membranaires. Néanmoins, le mécanisme par lequel les polyamines affectent la croissance et le développement des plantes n'est pas élucidé actuellement. Il est probable qu'elles sont impliquées dans les processus de synthèse d'ADN, d'ARN et des protéines et elles ont un effet stabilisateur sur les membranes biologiques (Mikitzel et Knowles 1989b).

A) METABOLISME

La **figure 5** résume les différentes voies de biosynthèse des principales polyamines qui feront l'objet de notre étude.

1) Putrescine

Chez les plantes supérieures, 2 voies de synthèse de la putrescine sont connues actuellement (**figure 5**); la voie directe de l'ornithine décarboxylase (ODC) à partir de l'ornithine et la voie de l'arginine décarboxylase (ADC) à partir de l'arginine via l'agmatine (Slocum et *al.*, 1984; Smith, 1985).

2) Spermidine et spermine

La spermidine est formée à partir de la putrescine par addition d'un groupement aminopropyle provenant de la S-adénosylméthionine (SAM) décarboxylée par l'intermédiaire de la spermidine-synthase. La spermine est synthétisée par addition à la spermidine d'un nouveau groupement aminopropyle grâce à la spermine-synthase.

Notons que la SAM est transformée en éthylène via l'acide aminocyclopropane carboxylique (ACC) (Miyazaki et Yang, 1987). La SAM se situe donc sur deux voies de biosynthèse importantes : celle des polyamines et celle de l'éthylène.

B) ROLES PHYSIOLOGIQUES

Les travaux récents ont montré dans la plupart des cas que l'activité des enzymes impliquées dans la biosynthèse des polyamines, ainsi que la teneur de ces mêmes polyamines, sont corrélées avec des processus de divisions cellulaires, de sénescence, de développement ou de morphogénèse.

1) Polyamines et morphogénèse

1-1) Rhizogénèse et caulogénèse

Desai et Mehta (1985) ont mis en évidence une augmentation de la teneur en putrescine avant toute manifestation visible du bourgeonnement ou de la rhizogénèse sur des explants de *Passiflora alata-caerulea*.

A partir de couches minces de Tabac, une augmentation des polyamines (putrescine et spermidine) libres et conjuguées est constatée lors de l'induction et du développement de racines adventives (Torrighiani et al., 1988). Un résultat identique a été obtenu à partir de cellules subépidermiques de Tabac par Tiburcio et al. (1989).

De même, la formation de racines adventives sur des bourgeons de *Prunus avium* L. s'accompagne d'une accumulation de putrescine et de spermidine qui atteint son maximum lorsque les racines sont visibles (Biondi et al., 1990).

1-2) Floraison

En 1986, Rohozinski et al. ont mis en évidence le fait que les polyamines (putrescine, spermidine et spermine) sont des stimulateurs puissants de l'induction florale.

Torrighiani et al. (1987) ont montré à partir de cultures de couches tissulaires minces de Tabac qu'il n'y a pas de différence entre un programme végétatif ou floral au niveau des polyamines endogènes.

Kaur-Sawhney et al. (1988) suggèrent que les polyamines libres sont essentielles à la floraison mais qu'elles ne peuvent pas l'induire à elles seules.

Fiala et al. (1988) ont montré que la teneur en spermidine de l'ensemble bourgeon apical et plateau du bulbe d'*Iris hollandica* décroît brutalement à une température (30°C) favorable à l'induction florale puis remonte dès que l'induction est complète. De plus, si la température (13°C) est défavorable à l'induction il n'y a pas de modification de la teneur en spermidine. D'après ces mêmes auteurs, les variations de putrescine et de

spermidine, ainsi que l'évolution du rapport spermidine/putrescine à 30 et à 13°C peuvent servir de marqueurs lors de l'induction florale.

1-3) Tubérisation

Protacio et Flores (1992) ont employé deux inhibiteurs de la voie de synthèse de la putrescine : le DMFO et le DFMA (**figure 5**) à une concentration de 0,5 mM. La tubérisation d'explants de germes de Pomme de terre mis en culture en présence de DFMO est inhibée à 75 %, en revanche en présence de DFMA, aucune incidence n'est constatée. De plus, il a été possible de réverser totalement l'effet du DFMO en ajoutant de la putrescine dans le milieu de culture. Le même résultat a été obtenu lors du développement des bourgeons axillaires des boutures de Pomme de terre placées à la lumière. Les auteurs concluent que les polyamines formées par la voie de l'ODC sont nécessaires à la formation *in vitro* de tubercules, probablement durant les phases précoces de morphogénèse, lorsque les cellules se divisent activement.

Récemment, Taylor et *al.* (1993) ont mis en évidence une augmentation des teneurs en spermidine et spermine lors des stades initiaux de la tubérisation de la variété de Pomme de terre Record. Concernant la putrescine, il est constaté une chute de sa teneur pendant ces mêmes stades. La SAMDC apparaît être l'enzyme la plus active : en effet, son activité est multipliée par 2,5 durant la phase précédant l'apparition d'un renflement à l'extrémité des stolons. L'activité ODC est plus importante que l'activité ADC, mais elles restent toutes les deux faibles comparées à celle de la SAMDC.

En revanche d'autres travaux récents (Lavieville, 1991) ont montré que l'apport exogène de putrescine, spermidine ou spermine n'a guère d'incidence sur le processus de tubérisation, tant au point de vue du nombre de microtubercules formés qu'au point de vue de leur masse.

1-4) Embryogénèse somatique

Les études ont porté notamment sur des cultures cellulaires de *Daucus carota* L. (Montague et *al.*, 1979; Fienberg et *al.*, 1984; Mengoli et *al.*, 1989; Robie et Minocha, 1989), sur des téguments de graines immatures d'*Hevea brasiliensis* (El Hadrami et *al.*, 1989 a et b), des cultures de pétioles de *Medicago sativa* L. (Meijer et Simmonds, 1988), de cotylédons de *Solanum melongena* L. (Fobert et Webb, 1988) ainsi que de feuilles et de racines de *Cichorium intybus* L. (Saudemont, 1992; Couillerot et *al.*, 1993).

A divers degrés, les polyamines peuvent être mises en relation avec le phénomène d'embryogenèse somatique.

2) Actions des polyamines sur la dormance et la germination

2-1) Polyamines et dormance

Les polyamines exogènes, comme des hormones végétales, sont capables d'accélérer la levée de dormance des semences, en stimulant la synthèse d'ARN et des protéines (Szczołka, 1984; Bagni et Serafini-Fracassini, 1985; Twardowski et Szczołka, 1989).

Le contenu en polyamines endogènes est peu élevé dans les tissus et organes dormants et augmente rapidement au moment de la levée de dormance (Bagni et *al.*, 1981; Kaur-Sawhney et *al.*, 1982; Serafini-Fracassini et *al.*, 1984; Bagni et Serafini-Fracassini, 1985).

Une activité importante des enzymes de biosynthèse des polyamines a été mise en évidence à la fin de la dormance. Cette forte activité accompagne d'ailleurs l'initiation de la germination des tubercules d'*Helianthus tuberosus* et de *Solanum tuberosum*.

L'augmentation de la synthèse des polyamines est l'un des premiers événements à contrôler le début de croissance de tissus dormants (Bagni et *al.*, 1981; Serafini-Fracassini et *al.*, 1984).

Les changements dans le contenu des polyamines et le ratio entre spermidine et putrescine sont de bons indicateurs de changements physiologiques pendant la phase de dormance des bulbes d'*Allium cepa* L. (Matejko et Dahlhelm, 1991). L'augmentation de l'activité de l'ADC et du taux de polyamines correspond à la reprise des divisions cellulaires.

Chez la Pomme de terre la rupture provoquée du repos végétatif du tubercule par la rindite, s'accompagne bien avant l'apparition des germes d'une forte augmentation des teneurs en putrescine, spermidine, tyramine et dopamine du parenchyme de la zone apicale où sont localisés les yeux qui donnent naissance aux germes (Jolivet et *al.*, 1986).

L'accroissement de ces teneurs n'est que temporaire et, exception faite de la dopamine, il est suivi d'une diminution jusqu'à l'apparition des germes.

Les variations importantes des teneurs en putrescine et en spermidine n'ont pas été trouvées au cours de la germination dans les yeux latéraux ou dans les tissus dépourvus d'yeux du tubercule de Pomme de terre (Kaur-Sawhney et *al.*, 1982). Cependant, des

accroissements en ces polyamines ont été observés dans les bourgeons apicaux du tubercule de Pomme de terre (Kaur-Sawhney et *al.*, 1982 ; Bagni et Serafini-Fracassini, 1985) quand la germination a eu lieu.

2-2) Polyamines et germination

Villanueva et *al.* (1978) ont étudié, pendant les stades précoces de la germination, les variations des teneurs en polyamines.

Durant les premières heures de germination il y a dans les graines de *Phaseolus mungo*, *Pisum sativum*, *Tragopogon porrifolius*, *Zea mays* et *Triticum aestivum* une augmentation des teneurs en polyamines endogènes qui s'accompagnent de synthèses d'ARN et de protéines.

Au cours des 24 premières heures de germination, dans l'axe embryonnaire de *Cicer arietinum*, la synthèse d'ARN coïncide avec l'accumulation de spermine et spermidine et celle d'ADN avec l'augmentation de la spermidine et putrescine (Gallardo et *al.*, 1992). Le ratio le plus élevé spermidine/putrescine est observé dans le méristème apical de l'axe embryonnaire, tandis que les accumulations de putrescine sont surtout décelées dans la zone d'élongation.

Récemment Huang et Villanueva (1992) ont montré que l'inhibition de la synthèse des polyamines entraîne une diminution du taux de germination et une faible croissance de la radicule de *Picea abies*. Cependant cette conclusion n'est valable que si l'inhibition affecte simultanément la synthèse de la spermidine et celle de la spermine.

V) LES PROTEINES

Les protéines des semences peuvent être divisées en deux catégories : d'une part les protéines de réserve qui sont accumulées durant le développement et rapidement hydrolysées au cours de la germination de la semence, et d'autre part les protéines "housekeeping" nécessaires au métabolisme cellulaire.

A) EVOLUTION AU COURS DE LA CONSERVATION

Le contenu en protéines et acides aminés dans les tubercules de Pomme de terre est généralement bas (environ 0,3% de la M.S., Burton, 1978). Bien que des variations dans le contenu en protéines et acides aminés aient été décrites, les fluctuations sont plutôt erratiques et dépendantes du cultivar (Van der Plas, 1987). Le contenu en protéines

augmente légèrement vers la fin de la période de dormance (Emilson, 1949; Szalai et Devay, 1957; Levitt, 1954). Cette augmentation est accrue si les tubercules sont transférés de 3 à 26°C pendant 4 jours. Elle est dépendante de l'augmentation de la fraction albumine (fraction soluble dans l'eau) et est suivie d'une baisse lorsque la dormance est achevée.

Guthrie (1940) a montré que l'application exogène de glutathion peut lever la dormance des tubercules de Pomme de terre. En revanche, lors de la levée naturelle de dormance, l'auteur n'observe pas d'augmentation de glutathion endogène. Cependant, Emilson (1949) trouve que le contenu en glutathion, qui est bas dans les tubercules fraîchement récoltés, augmente transitoirement durant la dormance.

Un accroissement dans le contenu en tyrosine (un des composants importants de la mélanine, responsable du noircissement des tissus) a été décrit, tout particulièrement après conservation à des températures basses (Van der Plas, 1987).

La maturation des tubercules est caractérisée par une diminution d'ARN, d'ADN, des polysomes et d'une inactivation progressive du système de synthèse des protéines. Une diminution comparable de la chromatine et de l'ARN polymérase a été observée durant le stockage des tubercules. Lorsque les germes se développent, la quantité d'ARN ribosomal ainsi que la taille du nucléole n'évoluent pas, par contre, l'ARN polymérase augmente de manière considérable.

Le mécanisme de régulation du métabolisme des acides nucléiques reste inconnu. Les phytohormones, qui présentent des variations similaires pour les processus de dormance et de croissance, jouent probablement un rôle dans cette régulation en interférant sur les protéines des chromosomes (Rosenstock et Kahl, 1978).

B) LA PATATINE

Patatine est le nom commun donné à une famille de glycoprotéines de Pomme de terre, identiques d'un point de vue immunologique et d'un poids moléculaire d'environ 40 KDa (Sonnewald et al., 1989). La patatine est codée par une famille de gènes avec un nombre estimé de copies de 10 à 18, selon le cultivar, par génome haploïde (Liu et al., 1991). Elle est présente dans tous les cultivars et représente jusqu'à 40 % des protéines solubles (Racusen et Foote, 1980). En conditions normales, la patatine est exprimée dans les tubercules ou les stolons et dans une moins grande mesure dans les racines (Mignery et al., 1988). Il est possible d'induire la synthèse de patatine dans les tiges et les pétioles en supprimant les tubercules de la plante et les bourgeons axillaires (Paiva et al., 1983)

ou dans les feuilles de plantes cultivées *in vitro* en présence de fortes concentrations en saccharose (Rocha-Sosa et al., 1989).

La patatine est une protéine de réserve, mais elle a néanmoins une fonction enzymatique; elle a une activité lipide-acyl-hydrolase (estérase) (Racusen, 1984; Rosahl et al., 1987; Racusen et Racusen, 1992). Les lipides polaires sont les substrats localisés principalement dans les membranes cellulaires. La fonction cellulaire de la patatine n'est pas connue, mais il semble que les membranes de cellules intactes soient protégées grâce à cette enzyme. En fait, les estérases sont responsables de la dégradation de la plupart des lipides dans les cellules endommagées. Cela peut signifier (Sonnewald et al., 1989) que la patatine est stockée sous forme inactive dans les vacuoles comme une protéine de réserve. Les tubercules de *Solanum berthaultii* contiennent deux types de patatine (Racusen et Racusen, 1992). Le premier est fortement glycosylé et montre une faible activité estérasique, alors que le second est typique de la plupart des cultivars de Pomme de terre, il est pauvre en glucides et présente une forte activité estérasique.

Racusen (1983) a montré que la teneur en patatine par rapport à celle des autres protéines solubles ne change pas pendant une conservation à 4°C de 127 jours.

VI) LA CULTURE *IN VITRO* AU SERVICE DU PLANT DE POMME DE TERRE

La Pomme de terre se reproduit essentiellement par multiplication végétative. A partir des tubercules se développent de nouvelles plantes strictement identiques d'un point de vue génétique à la plante mère.

Du fait de ce mode de propagation, le risque d'utiliser à la base un plant malade, condamne toute la descendance; ainsi, au fil des cycles successifs la transmission par le tubercule de diverses maladies dont les viroses entraîne une dégénérescence des clones.

Après les méthodes traditionnelles de lutte contre les virus (passage par les graines de la plante ou sélection sanitaire clonale), la culture *in vitro* est venue apporter une solution à l'éradication rapide des virus. Notons que le passage par les graines de la plante présente un inconvénient majeur; en effet, du fait de l'hétérozygotie de la Pomme de terre cette méthode entraîne la perte de la variété. Grâce à la culture de méristèmes il est possible aujourd'hui de régénérer des plantes saines, exemptes de virus. Les plantes guéries demeurent néanmoins très sensibles à toute infection virale et les risques sont grands de voir survenir une nouvelle contamination lors de la transplantation au champ.

Là encore les techniques récentes de culture *in vitro* ont permis de résoudre en partie ces problèmes.

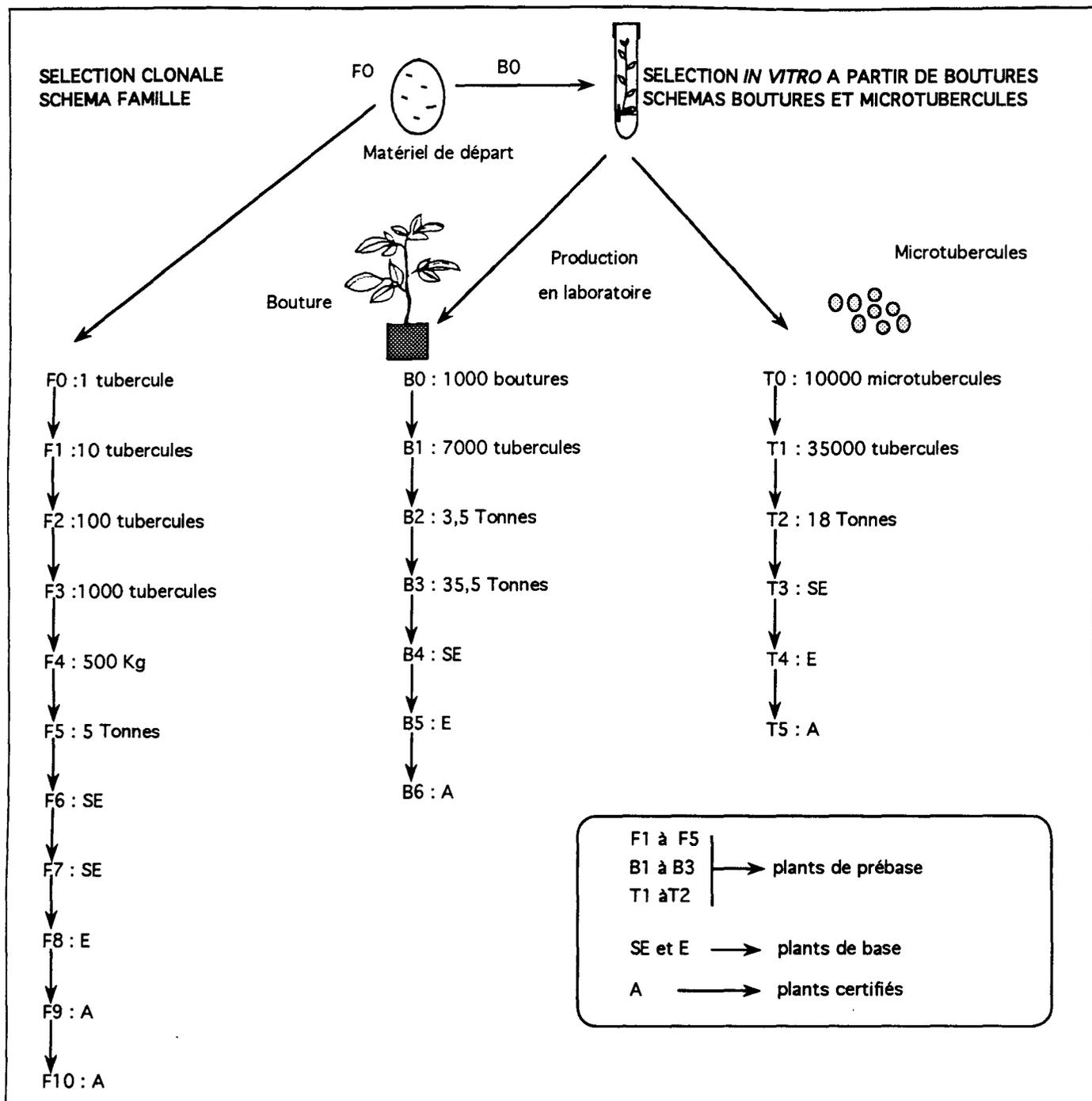


Figure 6 : Les différents schémas de sélection sanitaire du plant français (modifié d'après Molet, 1990).

B : bouture - F : famille - T : tubercule

Les plants sont commercialisés, selon leur âge et leur taux de virose, en quatre classes :

SE : superélite - E : élite - A : classe A - B : classe B

F0, B0 et T0 représentent respectivement le tubercule, les boutures et les microtubercules utilisés comme matériel de départ à la sélection sanitaire.

⇨ Le microbouturage *in vitro* :

D'une manière générale, dans le cas de la Pomme de terre, le microbouturage consiste à exciser les noeuds composés d'une portion de tige avec une feuille et un bourgeon axillaire et à les mettre en culture (Nozeran et *al.*, 1977; Hussey et Stacey, 1981).

⇨ La microtubérisation *in vitro* :

Ce système de tubérisation *in vitro* a fait l'objet de nombreux travaux, mais son utilisation au niveau industriel est récente (Wang et Hu, 1982). Il offre une alternative à la production de boutures.

Ces deux techniques permettent aujourd'hui la production de façon industrielle de plants de prébase. Ainsi, la réduction du nombre de passages au champ par rapport à ceux effectués en multiplication végétative classique diminue les risques d'infection.

La **figure 6** résume les différents schémas de sélection sanitaire du plant français. La voie traditionnelle consiste à créer une famille à partir d'un tubercule indemne de maladies, que l'on multiplie pendant quelques années selon des normes très strictes. Ainsi, il faut attendre 9 à 10 ans pour commercialiser du plant certifié de classe A.

L'intégration dans les schémas de sélection sanitaire des techniques de culture *in vitro* autorise aujourd'hui une multiplication extrêmement rapide du plant. Le plant de classe A est produit en 6 ans (B6) à partir de boutures et seulement 5 ans (T5) à partir des microtubercules. De plus, pour les premières phases de production (matériel B0 et T0), la culture est réalisée en milieu protégé (laboratoire et serre). En effet, la culture des boutures ou des microtubercules issus d'*in vitro* est réalisée dans des serres protégées des insectes ("insect-proof") la première année.

Contrairement aux boutures qui doivent subir une période de sevrage en serre (**planche 1**), les microtubercules peuvent être utilisés directement. Ils présentent en outre d'autres avantages. La culture échelonnée au cours de l'année permet une production très importante, leur taille (3-8 mm) facilite le stockage et le transport et enfin leur mise en culture peut être mécanisée.

Les travaux concernant la physiologie du microtubercule sont peu nombreux et ceci est, actuellement, sans doute le seul frein à son utilisation de manière plus répandue. Le GIE de Beaurains produit néanmoins actuellement environ 80000 microtubercules par an.

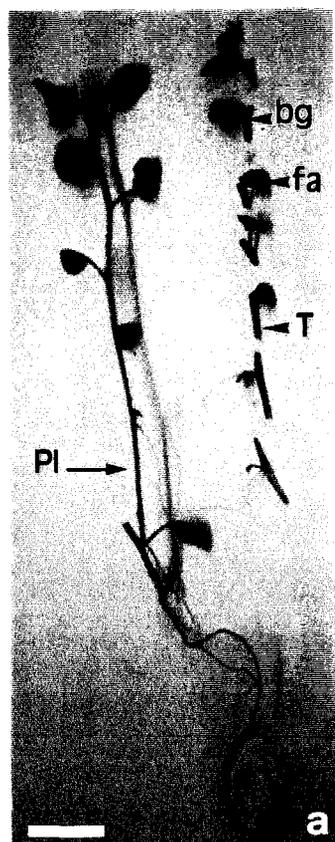


Planche 1 : Phase de sevrage des boutures. Les plantes axéniques (PI) sont sectionnés (a) au niveau des entre-nœuds; les boutures comprenant une portion de tige (T), le bourgeon axillaire (bg) et la feuille axillante (fa) sont ensuite placées dans des mini-mottes remplies de terreau pour subir une phase de sevrage en serre (b) (barre = 2 cm).

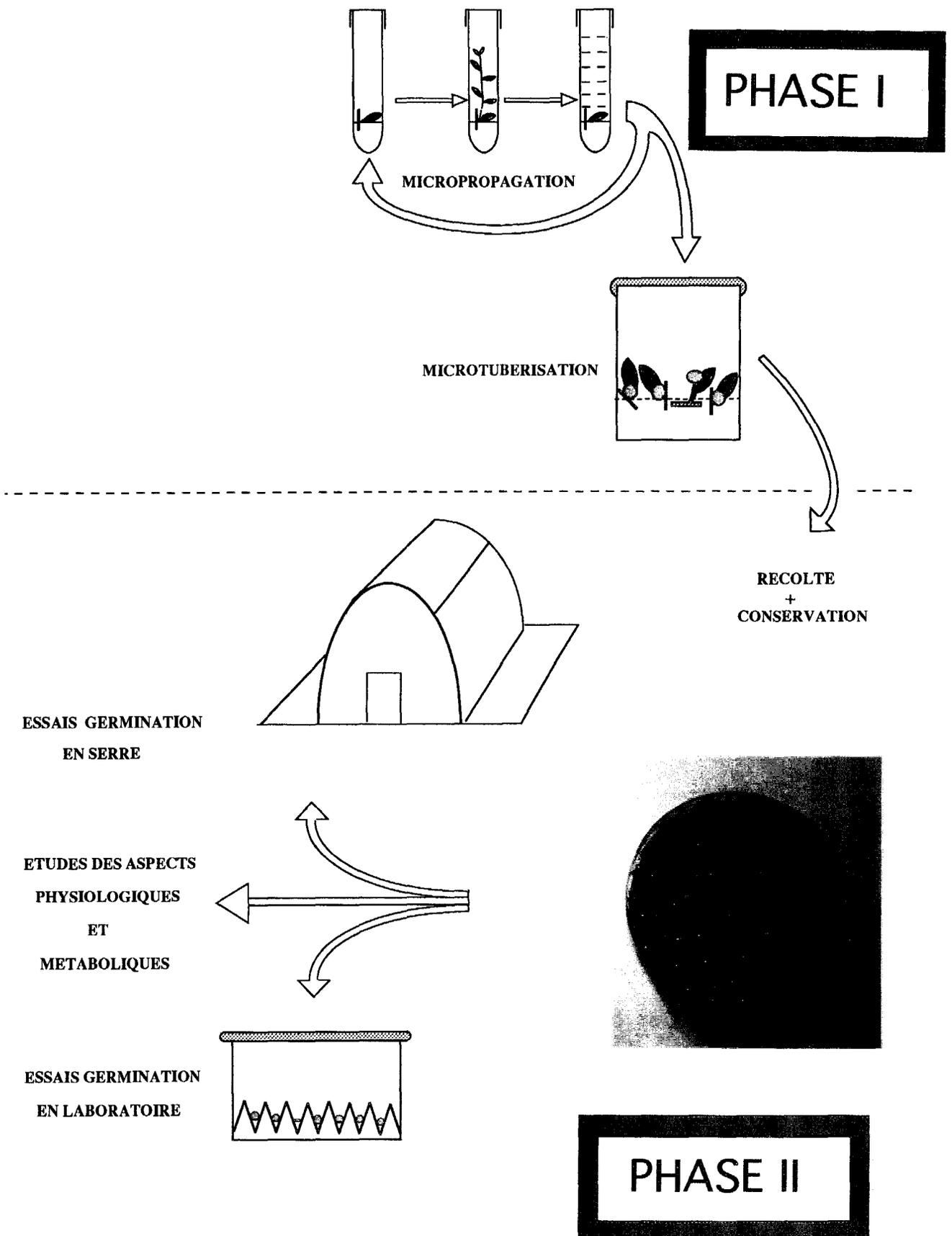


Figure 7: La production en masse de microtubercules (phase I) et l'étude physiologique après récolte (phase II) : deux objectifs nécessaires à l'utilisation de ce matériel dans les schémas de sélection sanitaire du plant français.

VII) PRESENTATION DES OBJECTIFS

Notre travail a eu pour objectif de participer au protocole de multiplication *in vitro* de microtubercules mis en place par le GIE des Syndicats de Producteurs de plants de Pommes de terre et de lui fournir les connaissances physiologiques de base nécessaires à la compréhension des mécanismes de tubérisation et de germination. Initié sur la base d'une complémentarité scientifique entre les Universités d'Amiens et de Lille, il s'est articulé de la manière suivante :

- A l'Université d'Amiens : Laurence Lavieville a mis au point une méthode rapide, simple, efficace et rentable, d'obtention *in vitro* de microtubercules (**figure 7**, phase I).

- A l'Université de Lille : j'ai initié une étude relative à la physiologie des microtubercules après récolte dont les principaux aspects sont résumés sur la **figure 7** (phase II).

	Utilisation	Maturité
BINTJE	Consommation	Demi-précoce
BRETTOR	Féculière	Demi-tardive
DESIREE	Consommation	Demi-tardive

Tableau 4 : Caractéristiques des variétés de Pomme de terre utilisées au cours notre étude.

Macroéléments	mg ^l ⁻¹	mM
NH ₄ NO ₃	1650	20,6
KNO ₃	1900	18,6
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440	3
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370	1,5
KH ₂ PO ₄	170	1,25
Microéléments	mg ^l ⁻¹	μM
KI	0,83	5
H ₃ BO ₃	6,2	100
MnSO ₄ , 4H ₂ O	22,3	100
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,6	30
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25	1,0
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025	0,1
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025	0,1
Fer chélaté	mg ^l ⁻¹	μM
Na ₂ -EDTA	37,3	100
FeSO ₄ , 6 H ₂ O	27,8	100
Eléments organiques	mg ^l ⁻¹	μM
Myo-inositol	100	1100
Glycine	2	2,7
Acide nicotinique	0,5	4
Pyridoxine HCl	0,5	2,1
Thiamine HCl	0,1	0,3

Tableau 5 : Bases minérales et organiques de Murashige et Skoog (1962).

I) MATERIEL VEGETAL UTILISE

Nous avons utilisé dans nos travaux 3 variétés qui sont décrites dans le **tableau 4**.

La variété Brettor a été utilisée uniquement pour les essais germination, en particulier pour l'étude de l'influence de traitements gibbérelliniques sur la dormance des microtubercules. Ces microtubercules ont été fournis par L. LAVIEVILLE.

Pour les variétés Bintje et Désirée, des boutures axéniques produites par le G.I.E. des Syndicats de Producteurs de Plants de Pommes de terre du Nord sont multipliées au laboratoire à Lille, avant d'être utilisées pour la tubérisation.

Donc, pour la quasi-totalité des expériences, les microtubercules ont été produits par nos soins suivant des conditions standards.

II) CULTURE *IN VITRO* ET CONSERVATION DES MICROTUBERCULES

A) MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE

1) Phase de multiplication

Le milieu standard est constitué des éléments minéraux et organiques de Murashige et Skoog (1962) dont la composition est décrite dans le **tableau 5**. Ce milieu auquel on ajoute 20 g l⁻¹ de saccharose est ajusté à pH 5,6 avant autoclavage et addition de 6 g l⁻¹ d'agar bactériologique (Type E).

Pour la micropropagation, des fragments de tiges contenant chacun un noeud sont ensemencés dans des tubes (25x150 mm) contenant 10 ml de milieu. Ils s'obtiennent en sectionnant les plantes axéniques au niveau des entre-noeuds et comportent une portion de tige de 1,5 cm de longueur, le bourgeon axillaire et la feuille axillante (**planche 2**).

Les microboutures sont placées en chambres climatisées à une température de 24±1°C et soumises pendant 16 heures à un éclairage artificiel (tubes néons type Daylight 50 μmoles m⁻² s⁻¹). Après 5 semaines de culture les boutures ont régénéré une plante entière comportant environ 8 noeuds. Elles sont alors utilisées soit pour une nouvelle phase de micropropagation soit pour une phase de microtubérisation.

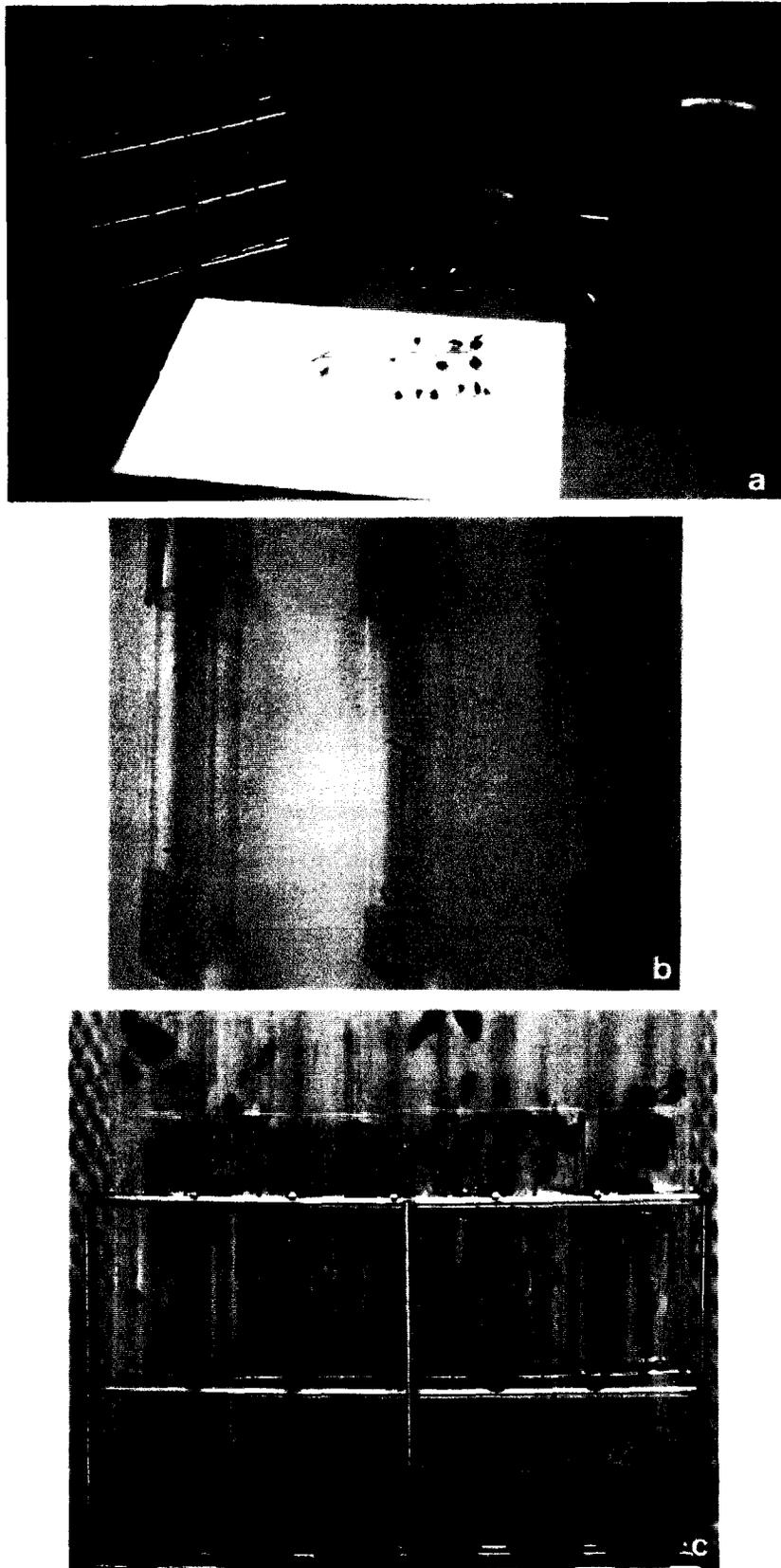


Planche 2 : Phase de multiplication des boutures axéniques. Les plantes sont sectionnées au niveau des entre-noeuds (a) et ensuite les noeuds sont ensemencés dans des tubes sur milieu solide (b). Après 5 semaines de nouvelles plantes, comprenant en moyenne 8 noeuds, sont régénérées (c).

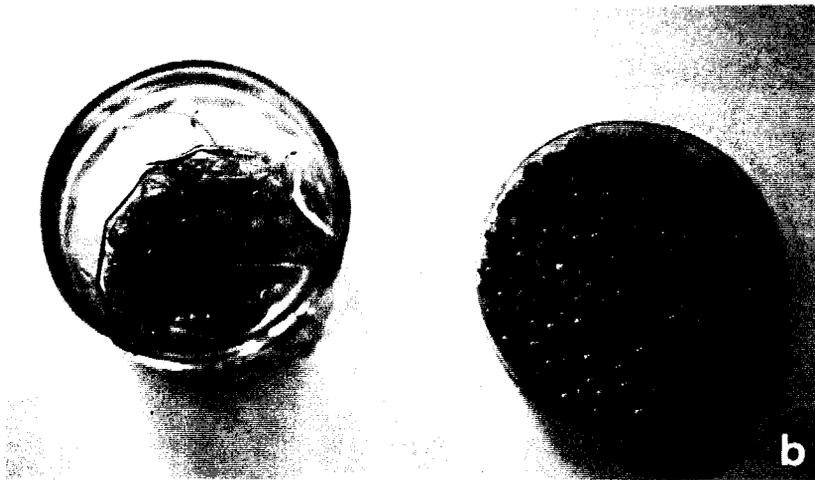
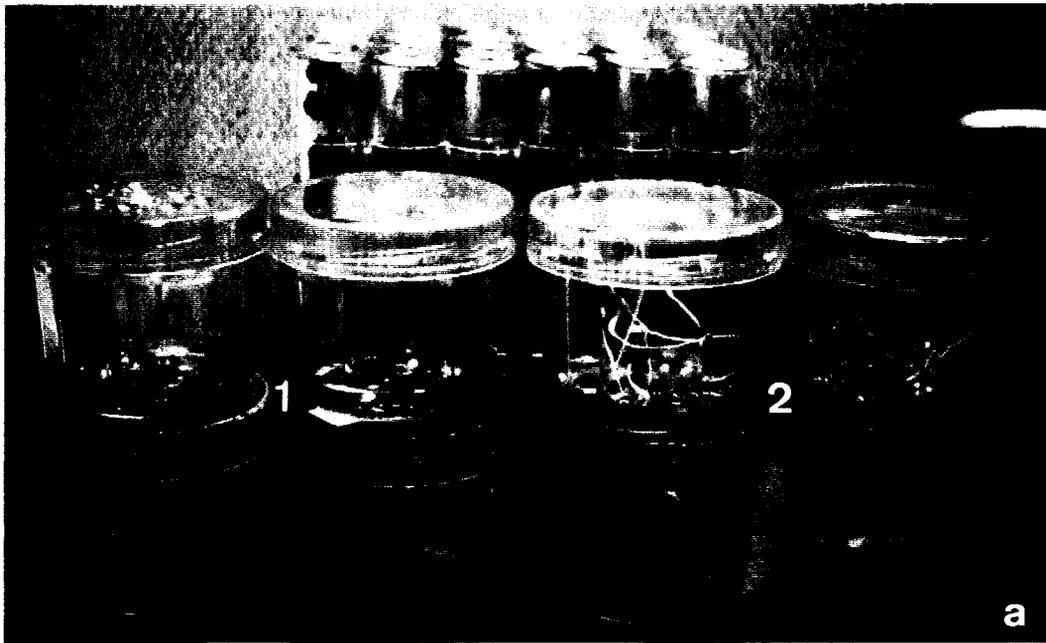


Planche 3 : Microtubercules observés sur les boutures nodales après 15 (**a₁**) et 40 jours (**a₂** et **b**) de culture en milieu liquide dans des bocaux. Les microtubercules après récolte sont placés dans des boîtes de Pétri (**b** et **c**) et stockés à 4 °C à l'obscurité.

2) Phase de microtubérisation

Le milieu utilisé pour la production de microtubercules est sensiblement identique à celui décrit précédemment pour la phase de micropropagation. Les macroéléments de Murashige et Skoog sont réduits de moitié, la quantité de saccharose est multipliée par 4 (80gl⁻¹) et l'agar est supprimé puisque la culture s'effectue en milieu liquide.

Les cultures sont réalisées en bocaux (70x100 mm) dans lesquels sont ensemencés 25 boutures nodales pour 20 ml de milieu liquide (**planche 3 a et b**).

Les conditions standards de microtubérisation sont fixées par le maintien des cultures durant 40 jours, à 19°C et à l'obscurité (LAVIEVILLE, 1991). Les différents stades de tubérisation *in vitro* des boutures nodales sont décrits sur la **planche 4**.

B) CONSERVATION DES MICROTUBERCULES

Après 40 jours de culture les microtubercules sont récoltés manuellement puis déshydratés pendant 8 heures sous une hotte à flux laminaire. Cette phase facilite la conservation ultérieure. En effet les microtubercules perdent par la suite beaucoup moins d'eau et de ce fait les risques de moisissures sont réduits.

Les microtubercules sont ensuite placés dans des boîtes de Pétri (**planche 3 b et c**) scellées au parafilm[®] et stockés à 4°C à l'obscurité pendant une durée de 1 à 60 semaines.

III) ESSAIS DE GERMINATION DES MICROTUBERCULES

A) CONDITIONS STANDARDS DE GERMINATION

Les lots de 50 microtubercules sont disposés sur un ruban de germination (**planche 5 a**). Ce ruban de germination est placé dans une boîte plastique Sercobox[®] au fond de laquelle se trouve du coton hydrophile humidifié avec de l'eau déminéralisée. L'humidité relative à l'intérieur des boîtes est de l'ordre de 95 %. L'ensemble est maintenu à l'obscurité, à 19°C. Le pourcentage de microtubercules germés est calculé après 3 semaines. De même la masse de matière fraîche des germes produits est mesurée après 21 jours. Ces deux paramètres sont essentiels pour l'étude des différentes phases physiologiques de la vie d'un microtubercule.

D'autres essais de germination sur des microtubercules sont réalisés en modifiant les conditions de culture; ces modifications seront précisées lors de l'étude des résultats.

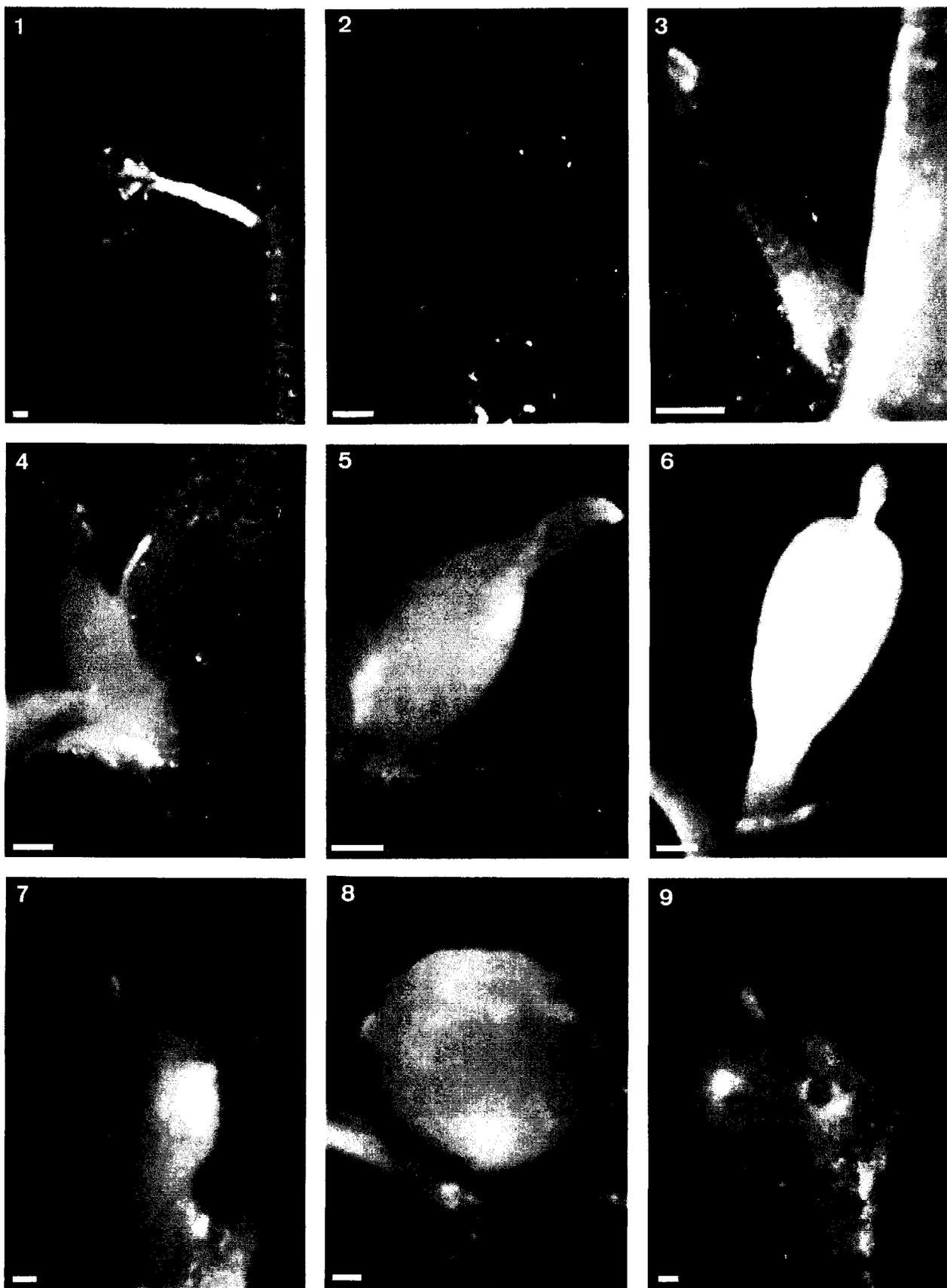


Planche 4 : Différents stades de tubérisation *in vitro* des boutures nodales. L'explant initial (1) est placé en milieu liquide; le bourgeon axillaire peu visible après 3 jours (2) commence à tubériser après 5 jours (3). Du 6^{ème} au 8^{ème} jour (4, 5 et 6) le microtubercule s'allonge, dès le 10^{ème} jour (7) il présente une forme arrondie et les lenticelles apparaissent vers le 12^{ème} jour (8). Après 40 jours (9) de culture les microtubercules sont récoltés. (barre = 0,5 mm).

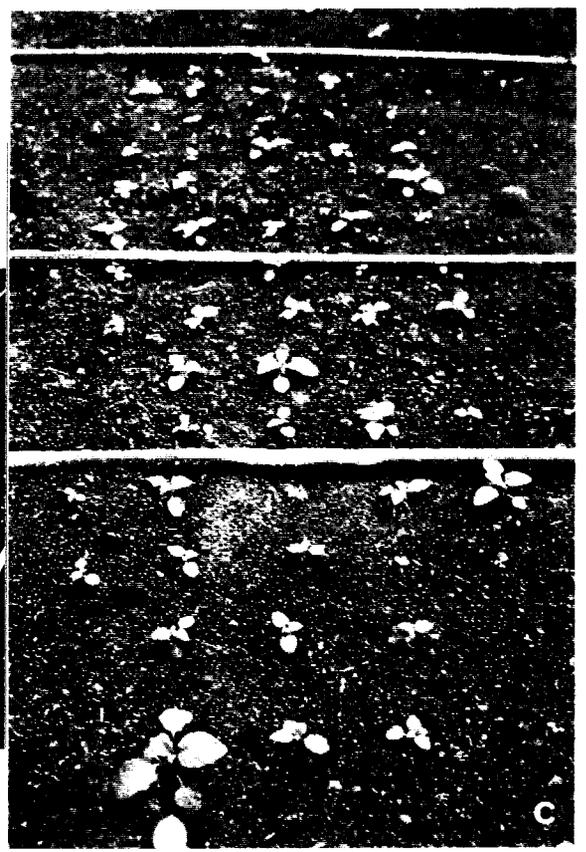
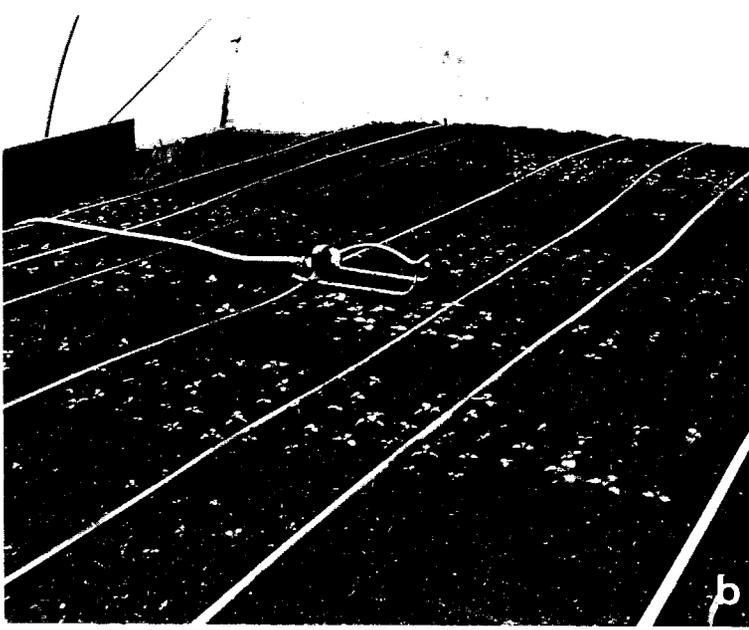


Planche 5 : Essais de germination des microtubercules au laboratoire (a) sur ruban de germination et en serre "insect-proof" (b et c) (barre = 5 mm).

B) GERMINATION APRES TRAITEMENT A L'ACIDE GIBBERELLIQUE

Pour l'ensemble des essais GA₃ le protocole expérimental est le suivant: Dès leur récolte ou après conservation au froid pendant des temps variables les microtubercules sont immergés pendant 5 minutes dans 50 ml d'une solution aqueuse à 25°C et de molarité connue en GA₃. Un lot témoin est lui aussi immergé pendant 5 minutes dans de l'eau à 25°C. Ensuite les microtubercules sont séchés sur papier filtre et disposés sur le ruban de germination décrit précédemment.

Pour les essais avec de la GA₃ radioactive, le protocole est celui appliqué par Couillerot (1993). La solution utilisée contient 58 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ de GA₃ marquée en position 1, 7, 12 et 18 avec du ¹⁴C (activité spécifique de 518 KBq mmol⁻¹; Radiochemical Centre Amersham U.K.).

C) ESSAIS EN SERRE

Une partie du matériel produit a permis la réalisation d'essais en serre (**planche 5 b et c**) avec des conditions climatiques non contrôlées. Contrairement aux germinations réalisées au laboratoire pour lesquelles les facteurs trophiques et climatiques sont régulés, les essais répartis chez les producteurs de plant ont permis d'appréhender d'une manière plus pragmatique l'évolution des microtubercules et les aspects agronomiques qui en découlent.

Pratiquement, les microtubercules sont plantés manuellement avec une densité de 100 par m² et une profondeur de 3 cm. Lors de la mise en terre, les germes présents sur les microtubercules ne sont pas retirés. La levée des jeunes plantules (émergence) est analysée après 3 et 6 semaines de culture. Les serres "insect-proof" sont divisées en petites parcelles d'un mètre carré. Chaque parcelle représente un essai particulier. Pour chaque facteur étudié au moins 3 répétitions sont réalisées.

D) ANALYSE DES RESULTATS

La comparaison de résultats pour l'étude de l'influence d'un facteur donné nous a conduit à utiliser des paramètres statistiques.

+ Test de Student :

Ce test est utilisé pour comparer des moyennes. Par exemple, la comparaison entre 2 moyennes m_1 et m_2 d'échantillons de taille N_1 et N_2 dont les variances estimées sont S_1^2 et S_2^2 s'effectue en calculant le rapport R : $R = m_1 - m_2 / (S_1^2/N_1 + S_2^2/N_2)^{1/2}$.

La valeur seuil suivie est la valeur de la distribution de Student de degré de liberté $N_1 + N_2 - 2 = n$ notée $t_n \%$.

+ Coefficient de variation :

Pour évaluer la variabilité des données, nous avons souvent utilisé le coefficient de variation CV : $CV \% = \text{écart-type} / \text{moyenne} \times 100$.

IV) ETUDE DU METABOLISME DES TUBERCULES AU COURS DE LA CONSERVATION

A) TECHNIQUES DE DOSAGE DES GLUCIDES

1) Extraction et préparation des extraits

Les glucides simples (monosaccharides et oligosaccharides de degré de polymérisation $DP < 7$) sont solubles dans l'alcool contrairement aux polysaccharides qui précipitent.

Les microtubercules (500 mg) sont broyés dans un Potter en présence d'éthanol 80 % à température ambiante. Après 2 centrifugations successives à 10 000 g pendant 20 min, les surnageants sont évaporés sous vide à 40° C et l'extrait sec est repris par 1 ml d'eau bidistillée.

Les extraits renferment 1 mg de sorbitol; celui-ci constitue le témoin interne. Après dessalage sur Bio-Gel P-6DG (BIORAD) et filtration sur Millipore® (0,45 μm), l'extrait est injecté à raison de 3 répétitions pour chaque échantillon.

2) Dosage des glucides par HPLC

2-1) Appareillage

L'identification et le dosage des glucides dans les extraits sont effectués par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) au moyen d'une colonne Waters Sugar Pak 1 (diamètre intérieur = 6,5 mm, longueur 300 mm). C'est une colonne à microparticules à échange d'ions Ca^{2+} . La phase mobile est de l'eau bidistillée additionnée de 200 mg l^{-1} d'azide de sodium (NaN_3) pour éviter le développement de microorganismes dans la colonne. Les glucides sont détectés par un réfractomètre différentiel (KNAUER) qui mesure en continu la différence d'indice de réfraction entre les glucides et la phase mobile. Le réfractomètre est connecté à un système d'enregistrement (enregistreur intégrateur DELSI ENICA 10).

2-2) Paramètres d'utilisation

Les paramètres d'utilisation sont établis de la manière suivante : le débit de la phase mobile, délivré par une pompe SHIMADZU LC-6A est fixé à $0,6 \text{ ml min}^{-1}$, la température de la colonne à 85°C . L'atténuation de l'enregistreur est fixée à 8.

B) TECHNIQUES DE DOSAGE DES POLYAMINES

1) Extraction

Le matériel végétal, après pesée, est broyé dans un Potter dans de l'acide perchlorique à 5% (HClO_4), à raison de 1 ml d' HClO_4 pour 10 mg de MF.

Après une extraction d'une heure à 4°C puis centrifugation à $9000 \text{ rpm min}^{-1}$ pendant 20 min à 4°C , les extraits sont congelés et conservés à -20°C dans des tubes Eppendorf.

2) Préparation des extraits

La méthode utilisée est celle décrite par Smith et Davies (1985). Le 1,7 - diaminoheptane sert de témoin interne. Il est ajouté à l'extrait au début de la réaction à raison de 50 μl d'une solution mère à 0,02 mM.

On met en présence 400 μl de chlorure de dansyl (1 - diméthylamino-naphtalène-5-sulphonylchloride) en solution dans de l'acétone (5 mg ml^{-1} d'acétone), 200 μl de carbonate de sodium saturé et 200 μl d'extrait végétal.

ORIGINE	PRODUITS
BIO-RAD	Ampholines, acrylamide, pipérazine diacrylamide et persulfate d'ammonium
MERCK	Acide orthophosphorique et acide acétique
PROLABO	Acétone, glycine, soude, sodium dodécyl sulfate et urée
SIGMA	Autres produits

Tableau 6 : Origine des produits utilisés au cours des techniques enzymologiques et électrophorétiques.

Après homogénéisation au vortex, on laisse incuber 16 heures à 24°C. Le chlorure de dansyl restant en excès est éliminé en ajoutant 100 µl de proline (100 mg ml⁻¹). Après homogénéisation, on laisse incuber 30 min.

Les polyamines dansylées sont extraites dans 0,5 ml de toluène et homogénéisées 30 s à 2000 tours min⁻¹ sur un vortex. La phase organique est récupérée puis évaporée sous un courant d'azote[®]. L'extrait sec est ensuite repris dans 1 ml de méthanol bidistillé puis filtré (Millipore HV, 45 µm) avant d'être analysé.

3) Analyse des polyamines dansylées

L'analyse des polyamines dansylées nécessite l'utilisation d'un fluorimètre. Le système employé est un ensemble SPECTRA PHYSICS composé d'une pompe ternaire SP 8800, d'un intégrateur Chromjet et d'un fluorimètre Linear Fluo LC 304. La colonne C18 Spherisorb ODS 2 (250 x 4,6 mm, 5 µm de granulométrie) est placée dans un four thermostaté à 30°C.

La détection se fait avec une longueur d'onde d'excitation de 365 nm, une longueur d'onde d'émission de 510 nm et une sensibilité de 0,1 A.U.F.S. L'analyse dure 45 min et le gradient d'éluion est le suivant: t=0 MeOH 60%, t=27 MeOH 100%, t=35 MeOH 100%, t=40 MeOH 60%, t=45 MeOH 60%. Le débit est de 0,8 ml min⁻¹.

C) TECHNIQUES ENZYMATIQUES

Les techniques enzymatiques et électrophorétiques nécessitent l'emploi de produits spécifiques. Les références de ces produits n'étant pas toutes les mêmes nous précisons dans le **tableau 6** leur origine. Les réactifs non mentionnés dans le tableau proviennent de chez SIGMA.

1) Extraction des enzymes

Pour l'extraction, 300 mg de microtubercules frais sont broyés pendant 1 min à 0°C dans un mortier contenant 3 ml de tampon Tris-HCl (Tris 0,1 M, pH 7,5; β-Mercapto-ethanol 4mM; EDTA-Na₂ 1mM; KCl 10mM et MgCl₂.6H₂O 10mM) additionné de 100 mg de Polyclar AT.

L'extrait est ensuite centrifugé à 32 000g pendant 15 min à 2°C. Le surnageant est filtré à l'aide d'une mèche de gaze. L'extrait ainsi obtenu est utilisé soit pour les mesures d'activités enzymatiques et dosages de protéines soit pour l'électrophorèse. Les extraits sont conservés à -70° C jusqu'à leur utilisation.

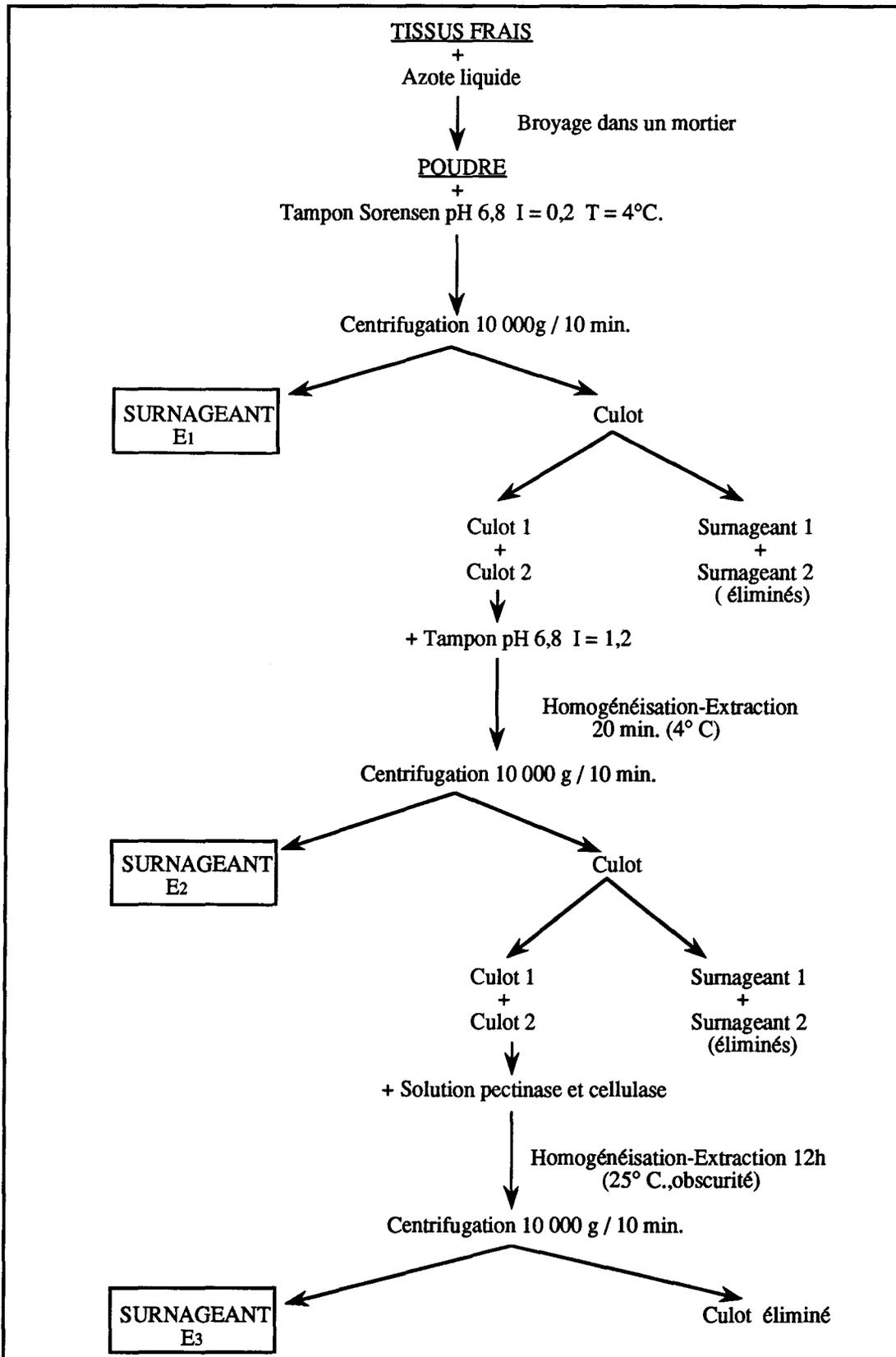


Figure 7 bis : Protocole d'extraction des peroxydases solubles (E1), liées de façon ionique (E2) et de façon covalente (E3) (D'après LEGRAND, 1987).

Pour les peroxydases solubles, liées de façon ionique ou de façon covalente, nous avons appliqué le protocole d'extraction (**figure 7 bis**) mis au point par LEGRAND (1987).

2) Activités enzymatiques et dosages des protéines

2-1) Activités G6PDH et 6PGDH

Les activités enzymatiques sont déterminées en utilisant la technique de Glock et McLean (1953). Cette technique vise à éliminer l'interférence possible de l'activité 6PGDH lors de la détermination de l'activité de la G6PDH. Dans un premier temps on détermine l'activité de la 6PGDH puis celle des deux enzymes avec un mélange réactionnel contenant les deux substrats.

Pour obtenir l'activité réelle de la G6PDH, il suffit ensuite de soustraire l'activité calculée avec la 6PGDH à celle obtenue en présence des substrats.

Pratiquement, l'activité de la 6PGDH est mesurée en suivant l'augmentation initiale de l'absorbance à 340 nm, associée à la réduction du NADP^+ , du mélange réactionnel contenant du tampon Tris-HCl 0,2M (pH 7,5), NADP^+ 0,98mM, 6PG 3,15mM et 50 μl d'extrait enzymatique dans un volume total de 1 ml. La réaction est initiée en ajoutant l'extrait enzymatique. En ce qui concerne l'activité G6PDH, au mélange réactionnel précédemment cité on ajoute du G6P 6,3mM et on effectue ensuite la mesure.

La différence entre les taux initiaux de réduction du NADP^+ des deux cinétiques est utilisée pour calculer l'activité de la G6PDH.

2-2) Activités peroxydasiques

L'activité peroxydasique est mesurée par spectrophotométrie à 25°C à partir d'un mélange contenant le peroxyde d'hydrogène à 0,2 % comme substrat, du gaïacol à 1 % comme donneur d' e^- et du tampon phosphate K-Na (1/15 M, pH 6,1).

L'activité est déterminée en suivant la formation du tétragaïacol à 420 nm pendant 5 min.

2-3) Dosages des protéines

La concentration en protéines des extraits est mesurée avec la solution commerciale Biorad selon la méthode de Bradford (1976). La courbe étalon est établie avec de la sérum albumine bovine. A 1 μg de protéine correspond une DO_{595} de 0,06.

Produits	Quantité en ml
Acrylamide (30%) + Bisacrylamide(1%)	26,6
Tampon TBE	10
Persulfate d'Ammonium (APS à 10%)	0,8
N,N,N',N'-Tétraméthyl - éthylènediamine (TEMED)	0,08
H ₂ O	qsp 100

Tableau 7 : Composition des gels de séparation

Produits	Quantité
Acrylamide (30%) + Bisacrylamide(1%)	2,66 ml
Tris HCl 1,25 M pH=6,8	2,0 ml
APS à 10%	0,26 ml
TEMED	5,0 µl
H ₂ O	qsp 20 ml

Tableau 8 : Composition des gels de concentration

2-4) Présentation des résultats

Les résultats présentés par la suite sont les moyennes obtenues à partir de 3 expériences différentes, elles-mêmes le résultat de 3 répétitions à partir de chaque extrait. Les résultats sont exprimés en nKat mg⁻¹ de protéines (\pm erreur standard à la moyenne; 0,05).

3) Electrophorèse des isoenzymes

3-1) Confection des gels

- Le gel de séparation :

Après sa confection, le gel à 8 % (**tableau 7**) est coulé entre deux plaques de verre de 180x160 mm. Afin d'aplanir la surface on ajoute du butanol saturé en eau.

- Le gel de concentration :

Il permet un regroupement des protéines et de ce fait favorise une migration simultanée. Pratiquement, après avoir placé le peigne de 1,5 mm d'épaisseur entre les plaques de verre on coule le gel à 4 % (**tableau 8**).

3-2) Conditions de migration

Les plaques fixées sur leur support sont placées dans la cuve contenant le tampon de migration composé de TBE (Tris 0,89 M, Acide borique 0,89 M et EDTA-Na₂ 0,026 M) dilué au 1/10^{ème}. La quantité de protéines déposée dans chaque puits est de 75 μ g. La migration s'effectue pendant 30 min à 100 V et ensuite pendant 3 heures à 350 V.

3-3) Révélation des systèmes enzymatiques

Les réactions de coloration des différents systèmes enzymatiques sont inspirées de Vallejos (1983).

PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE (6PGDH)

Solution de coloration

Tris-HCl 0,1 M pH 7,5	100 ml
MgCl ₂ , 6H ₂ O 1 M	1 ml
Acide 6-P Gluconique	20 mg

NADP ⁺	15 mg
Bleu de thiazolyl (MTT)	20 mg
Phénazine méthosulfate (PMS)	4 mg

Procédé : Préparer la solution juste avant le début de l'incubation, qui doit être faite à l'obscurité et 30°C pendant 24 heures.

GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (G6PDH)

Solution de coloration

Tris-HCl 0,1 M pH 7,5	100 ml
MgCl ₂ , 6H ₂ O 1 M	1 ml
Glucose-6-P	20 mg
NADP ⁺	15 mg
Bleu de tétrazolium nitreux (NBT)	20 mg
PMS	4 mg

Procédé : Incuber le gel à l'obscurité et 30°C pendant 24 heures.

ESTERASES

Solution de coloration

α + β naphthyl acétate de sodium 20 mg dans 2 ml d'acétone

Tris-HCl 0,2 M pH 7,5	4 ml
Fast blue RR salt	50 mg
H ₂ O	94 ml

Procédé : Incuber à l'obscurité et 37°C pendant 1 heure.

PEROXYDASES

Solution de coloration

Tris-HCl 0,2 M pH 7,6	100 ml
Hanker yats Reagent	200 mg
H ₂ O ₂ à 30 % vol.	500 μ l

Procédé : Incuber à l'obscurité et 37°C pendant 40 minutes.

Produits	Concentration	Quantité
Sodium Dodécyl Sulfate (SDS)	1,25 %	0,625 g
Ampholines pH 3,5 à 9,5	2 %	800 µl
pH 5 à 7	1,6 %	200 µl
	0,4 %	
Triton X 100 (10%)	2 %	10 ml
Urée	9,5 mM	28,5 g
Carbonate de Potassium K ₂ CO ₃	5 mM	0,345 g
Dithiothreitol (DTT)	0,5 %	0,25 g
H ₂ O		qsp 50 ml

Tableau 9 : Composition du tampon de solubilisation "UKS" (Zivy, 1986)

ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

Préparation des protéines

est réalisée selon le protocole décrit par Hilbert & un mortier, en présence d'azote liquide, le matériel de précipitation des protéines préconisé par Zivy (TCA) 10% (m/v), β -mercaptoéthanol 0,07% (v/v) dans de l'acétone froide (matière fraîche).

Après précipitation des protéines à -20°C pendant 45 min, l'extrait est centrifugé (30 000 g, 20 min, 4°C). Afin d'éliminer l'excès de TCA le culot est repris dans 2 ml de β -mercaptoéthanol à 0,07 % (v/v) dans de l'acétone froide puis homogénéisé et remis à précipiter à -20°C pendant 45 min.

Après centrifugation (30 000 g, 20 min, 4°C) on renouvelle l'opération précédente mais cette fois les protéines sont mises à précipiter 12 heures à -20°C . Après une nouvelle centrifugation le culot est placé sous une hotte afin d'évaporer l'acétone résiduelle.

Le culot protéique séché est repris dans du tampon de solubilisation "UKS" (tableau 9) à raison de $60\ \mu\text{l}\ \text{mg}^{-1}$. Après 2 heures, une centrifugation (30 000 g, 20 min, 22°C) permet de recueillir les protéines dans le surnageant. Elles sont alors conservées à -70°C jusqu'à leur utilisation en électrophorèse.

2) Électrophorèse bidimensionnelle

Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de 2 paramètres indépendants :

- la charge électrique au cours de la focalisation électrique des protéines
- la masse moléculaire au cours de la migration en gel SDS.

2.1) Électrophorèse de première dimension ou isoélectrofocalisation (IEF)

Elle génère un gradient de pH dans un support d'acrylamide en soumettant des ampholines (molécules renfermant un grand nombre de résidus polyamino-polycarboxyliques) à un champ électrique. Sous l'action du courant électrique, une protéine migrera dans ce gradient jusqu'à sa position d'équilibre où sa charge nette s'annule. Cette position correspond à son point isoélectrique (pH_i).

Produits	Quantité
Urée	10 g
Acrylamide (30%) + Pipérazine diacrylamide (PDA, 0,8%)	2,5 ml
H ₂ O ultrapure	6 ml
Triton X 100 (10%)	2ml
Ampholines pH 3,5 à 9,5	700 µl
pH 5 à 7	300 µl

Tableau 10 : Composition des gels de première dimension (modifié d'après Boyer, 1992).

Produits	Quantité
Acrylamide (30%) + PDA (0,8%)	51,9 ml
Tris HCl 1,5 M pH=8,8	31,9 ml
H ₂ O ultrapure	35,9 ml
TEMED	24 µl
APS à 10 %	276 µl

Tableau 11 : Composition des gels de deuxième dimension.

L'isofocalisation est réalisée en gels cylindriques préparés dans des tubes en verre de 1,5 mm de diamètre interne. Ces tubes sont placés dans une éprouvette dans laquelle on ajoute la solution d'acrylamide (**tableau 10**). Le remplissage des tubes s'effectue par capillarité en complétant l'éprouvette avec de l'eau.

Après 1 heure de polymérisation, 16 tubes sont récupérés et montés avec le système de fixation de la cuve Protean II (Biorad). Le haut des gels est complété par 20 μ l de tampon de solubilisation (**tableau 9**) puis 20 μ l de tampon de solubilisation dilué au demi.

Les solutions d'électrodes sont de l'acide phosphorique 10 mM à l'anode et de la soude 20 mM à la cathode. Afin d'éliminer le CO₂ préjudiciable à la formation du gradient, la solution de NaOH est dégazée pendant une heure.

Une préfocalisation d'une heure est réalisée pour permettre l'établissement du gradient de pH dans le gel (3W, voltage limité à 1200 V, intensité non limitée). Ensuite, les échantillons protéiques auxquels on a ajouté 1 à 2 μ l de bleu de bromophénol, sont déposés (15 μ l).

L'isofocalisation est effectuée avec les mêmes paramètres que la préfocalisation pendant 17 h. La séparation est terminée en soumettant les gels à une tension de 1500 V, pendant 30 min.

Après migration, les gels sont démoulés puis stockés à -70° C dans 500 μ l de tampon d'équilibration Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 contenant du SDS à la concentration de 2,3 % (m/v) et additionné de 50 μ l d'une solution de bleu de bromophénol à 0,05 % (m/v).

2.2) Electrophorèse de deuxième dimension

Le SDS se fixe sur les chaînes polypeptidiques des protéines et leur confère la même charge électrique. De ce fait, on l'utilise pour séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire.

Après confection du gel de séparation à 15 % (**tableau 11**), celui-ci est coulé entre deux plaques de verre de 180x160 mm. On dépose ensuite délicatement le gel d'IEF au sommet de la trame d'acrylamide. Les plaques sont fixées sur leur support puis l'ensemble est placé dans la cuve contenant le tampon de migration de Laemmli (1970) modifié par Hochstrasser et *al.* (1988). Sa composition est la suivante: Tris 6 g l⁻¹ ; Glycine 28,8 g l⁻¹ ; SDS 1 g l⁻¹. Les conditions de migration sont de 350 V limitant.

Lorsque le front de migration (bleu de bromophénol) est arrivé à l'extrémité de la plaque, les gels sont démoulés et placés au moins une heure dans 200 ml d'un mélange éthanol à 50 % et acide acétique à 12 % additionné de 100 μ l de formaldéhyde. Ce traitement permet la précipitation des protéines dans le gel ce qui les rend insolubles.

Étapes	Solutions	Durée du traitement
Fixation	50 % éthanol 12 % acide acétique 0,05 % formaldéhyde (37%) H ₂ O qsp 100 %	Minimum 1 heure
Lavages	50 % éthanol + 50 % H ₂ O	3 X 20 minutes
Prétraitement	Na ₂ S ₂ O ₃ , 5H ₂ O : 0,2 g l ⁻¹	1 minute
Rinçages	H ₂ O	3 X 20 secondes
Imprégnation	AgNO ₃ : 1 g l ⁻¹ + formaldéhyde (37%) : 0,75 ml l ⁻¹	20 minutes
Rinçage	H ₂ O	20 secondes
Développement	Na ₂ CO ₃ : 60 g l ⁻¹ Na ₂ S ₂ O ₃ , 5H ₂ O : 4 mg l ⁻¹ + formaldéhyde (37%) : 0,5 ml l ⁻¹	10 minutes
Lavage	H ₂ O	20 secondes
Arrêt	50 % éthanol 12 % acide acétique H ₂ O qsp 100 %	10 minutes
Lavage	50 % éthanol + 50 % H ₂ O	minimum 20 minutes

Tableau 12 : Étapes de la révélation des protéines par coloration argentique, d'après Blum et *al.*, (1987).

3) Révélation des protéines

Les protéines sont révélées par coloration argentique selon la méthode de Blum et *al.* (1987).

Le protocole détaillé dans le **tableau 12** comprend trois étapes principales:

- Prétraitement du gel par le thiosulfate : il permet d'améliorer la sensibilité et le contraste de la coloration.

- Imprégnation argentique : elle permet la formation des complexes protéines-nitrate d'argent qui sont indissociables contrairement à ceux formés entre l'argent et le gel de polyacrylamide. L'addition de formaldéhyde est indispensable pour le contraste et la sensibilité de la coloration.

- Révélation argentique : elle est en fait amorcée par un faible volume (10 ml) de révélateur qui est remplacé ensuite par 150 ml du même produit.

La révélation stoppée, les gels rincés peuvent être conservés à 4°C pendant plusieurs semaines avant séchage.

4) Séchage des gels

Les gels sont placés dans une solution de glycérol à 7 % pendant 5 à 10 min pour éviter le craquellement lors du séchage. Ensuite ils sont disposés entre deux feuilles de cellophane et mis dans le sécheur de gels (modèle 543, Biorad).

5) Utilisation des gels

L'analyse comparée des profils protéiques a été réalisée par utilisation de 3 gels par stade étudié. Seules les différences claires et reproductibles ont été répertoriées. La présence ou l'absence d'un spot pour le profil protéique d'un stade relativement à un autre est considérée comme traduisant une différence qualitative. Les différences de taille et d'intensité entre spots communs à deux stades indiquent des différences quantitatives entre ces stades. La variation quantitative pour un spot est estimée relativement aux spots adjacents, afin de limiter les interférences pouvant résulter de différences de coloration ou de légères différences en quantité de protéines.

L'analyse visuelle est complétée par l'outil informatique à l'aide d'un scanner Microtek Color/Gray connecté à un ordinateur Macintosh II Ci (logiciel Image v. 1.36).

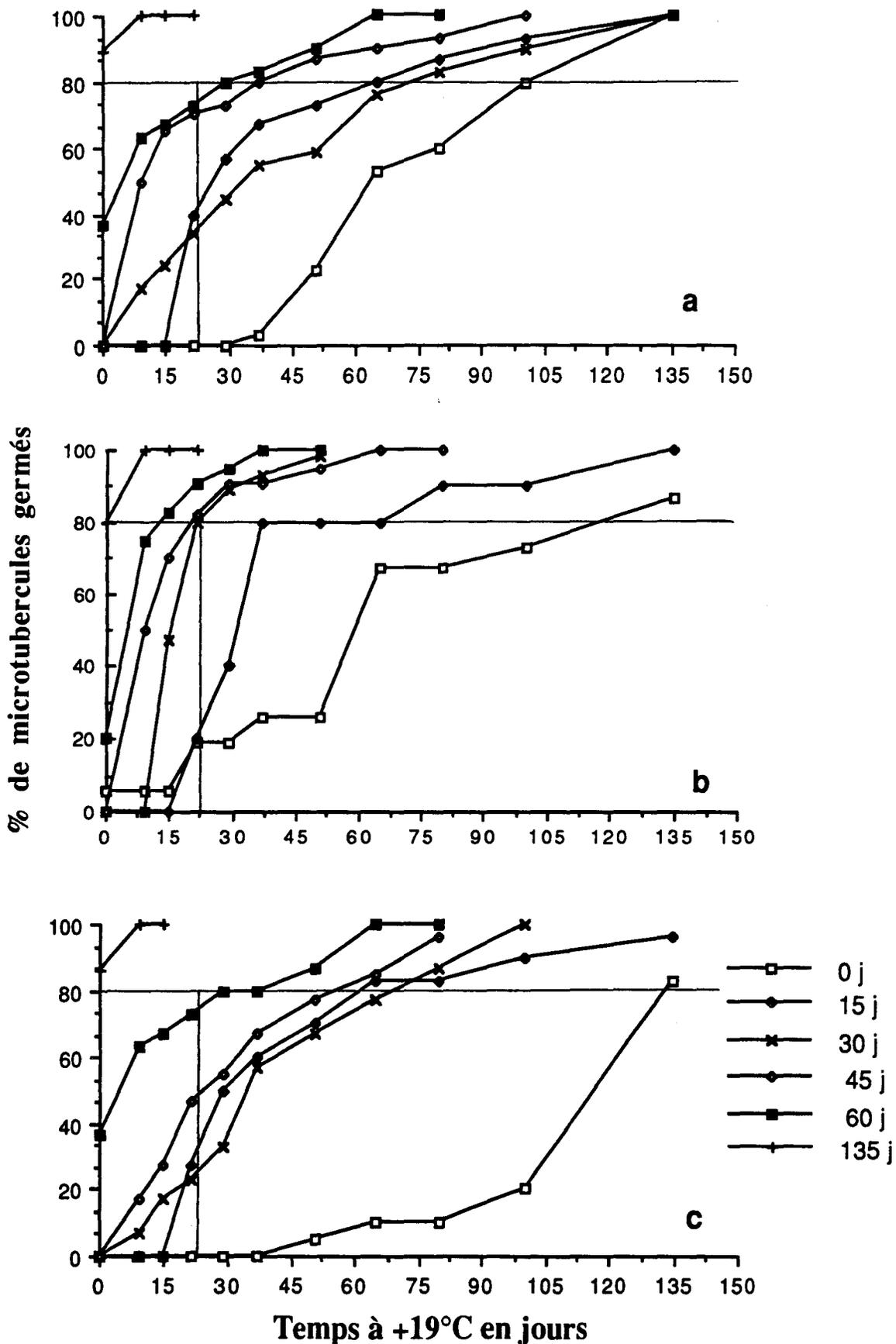


Figure 8 : Effet d'un traitement séquentiel à 4°C sur la germination de 3 clones de la variété Brettor. a : clone BT 27, b : clone BT 55, c : clone BT 67. Dans chaque cas, après récolte, 50 microtubercules sont laissés de 0 à 135 jours à 4 °C puis sont cultivés à 19 °C.

I) GERMINATION DES MICROTUBERCULES : DE LA RECOLTE AUX ESSAIS EN SERRE

A) ESSAIS DE GERMINATION AU LABORATOIRE

1) Facteurs influençant la durée de la dormance et la germination

1-1) Effet génotype et incidence du froid

Au sein d'une population de boutures on peut distinguer parfois des clones dont l'origine est définie par le prélèvement de méristèmes sur des tubercules différents. L'expérience suivante a été initiée par L. Lavieville au laboratoire de la station de Beaurains, où pour la variété Brettor, des boutures de 3 clones (BT 27, BT 55 et BT 67) âgées de 4 semaines ont été mises à tubériser pendant 40 jours. Aucun effet clone n'a été mis en évidence en ce qui concerne les capacités de tubérisation de la variété Brettor (Lavieville, 1991). Cela nous a conduit à rechercher un effet clone sur l'aptitude à germer des microtubercules. Parallèlement nous avons tenté d'évaluer l'effet d'un traitement séquentiel à 4°C sur la germination. Les temps de conservation à 4°C sont de 0, 15, 30, 45, 60 et 135 jours.

Les microtubercules placés directement à 19°C après la récolte présentent dans les trois cas (**figure 8**) une germination hétérogène; ainsi dès 45 jours, une partie (28 % pour le clone BT 55, **fig. 8 b**) a déjà germé, mais il faut au moins attendre 135 jours pour atteindre les 80 % . En revanche, plus le temps de conservation au froid est important plus la germination est rapide et homogène. Dans tous les cas on constate qu'il faut plus de 60 jours à 4°C pour espérer obtenir 80 % de germination dans un délai de 21 jours (**figure 9**). Cependant lorsque le temps de conservation à 4°C est de 135 jours, la majorité (80 à 90 %) des microtubercules est déjà germée au moment du transfert à 19°C.

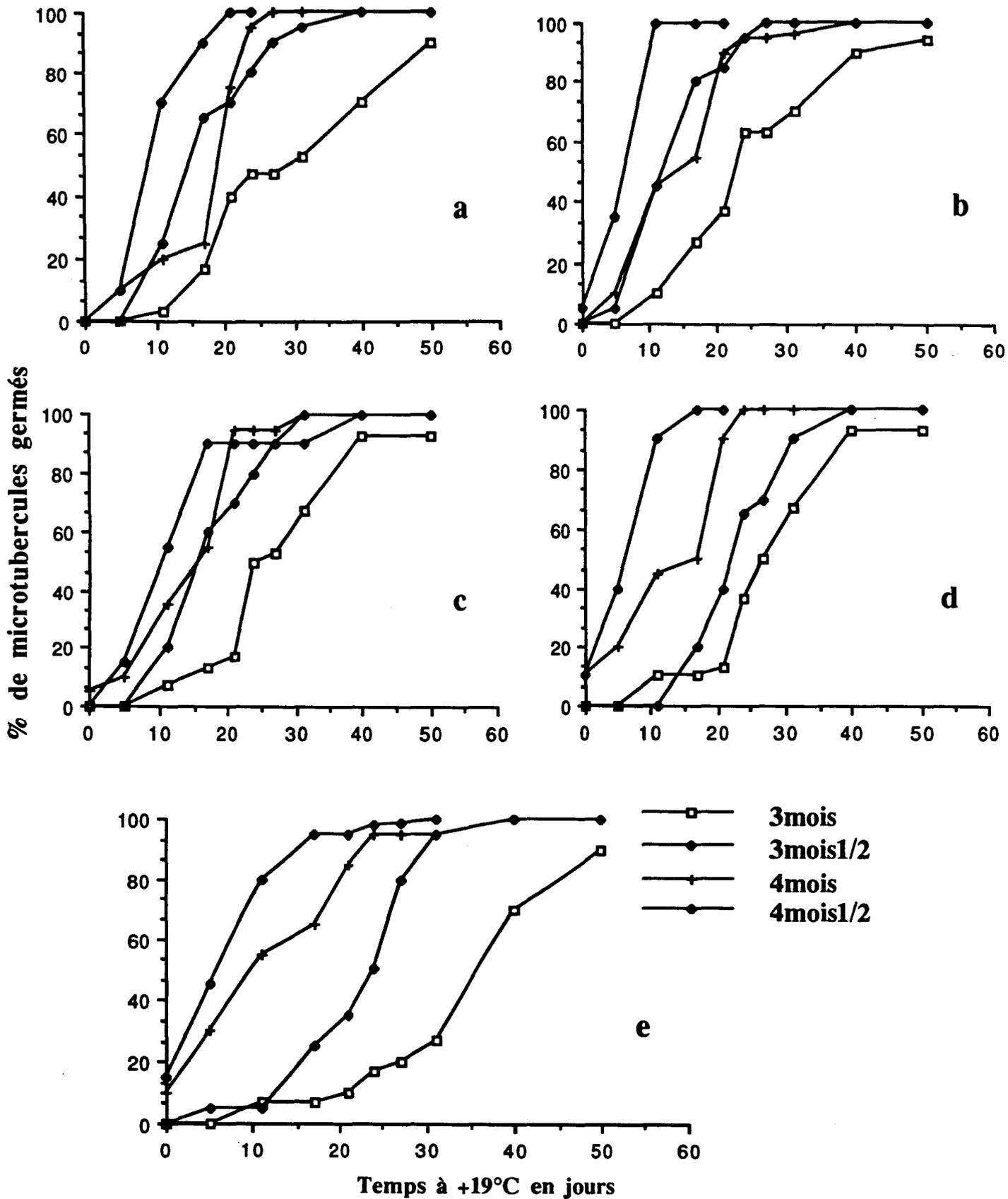


Figure 10 : Germination à 19 °C de lots de 50 microtubercules de la variété Bintje récoltés après 6 (a), 7 (b), 8 (c), 9 (d) et 10 (e) semaines de tubérisation : effets de la durée (3, 3^{1/2}, 4 ou 4^{1/2} mois) de conservation à 4 °C.

Si l'effet clone n'a pas été mis en évidence en ce qui concerne les capacités de tubérisation, il semble clair, en revanche, que la germination des microtubercules est affectée par l'origine des microtubercules (**figure 9**). Ainsi, dans le cas d'une conservation de 30 jours à 4°C, le temps pour obtenir 80 % de germination peut varier de 22 jours (BT 55) à 70 jours (BT 27). Cette différence de 48 jours est la plus grande observée; elle est nettement moins importante pour les lots conservés moins de 15 jours à 4°C ou plus de 60 jours à 4°C.

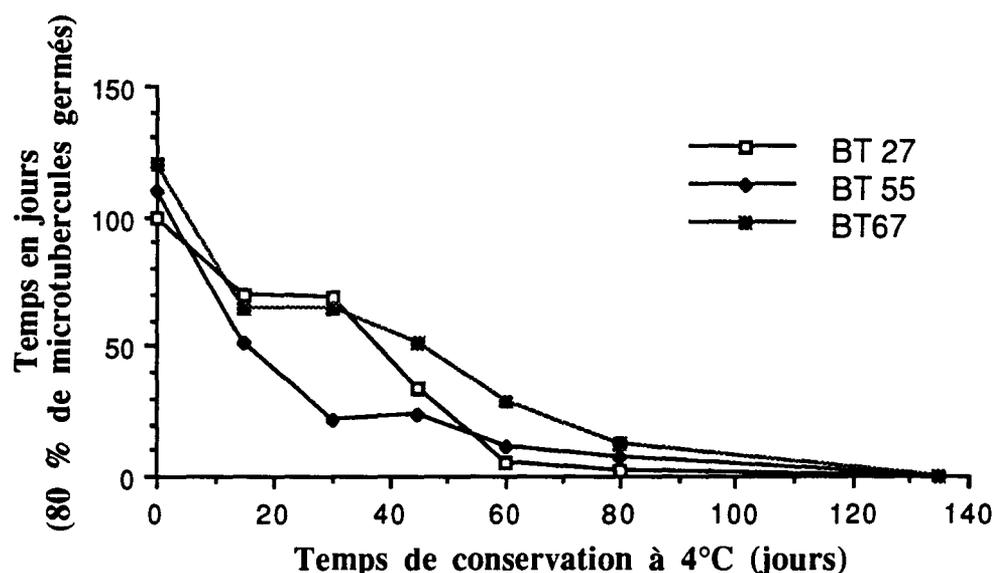


Figure 9 : Relation entre la durée de conservation à 4°C et le temps nécessaire pour obtenir 80 % de microtubercules germés à partir de 3 clones (27-55-67) de la variété Brettor après le transfert à 19°C. L'expérience a été réalisée sur 50 microtubercules qui ont été laissés pendant 0 à 135 jours à 4°C après récolte.

1-2) Importance de la durée de végétation, de la durée de conservation à 4°C et du diamètre des microtubercules

Afin d'étudier l'incidence de la durée de végétation sur la germination ultérieure, nous avons produit 5 lots de microtubercules correspondant à 6, 7, 8, 9 ou 10 semaines de culture en condition standard. Chaque lot comprenant deux fractions calibrées est conservé pendant 3, 3^{1/2}, 4 ou 4^{1/2} mois à 4°C. La culture à 19°C donne les résultats suivants (**figures 10, 11 et 12**):

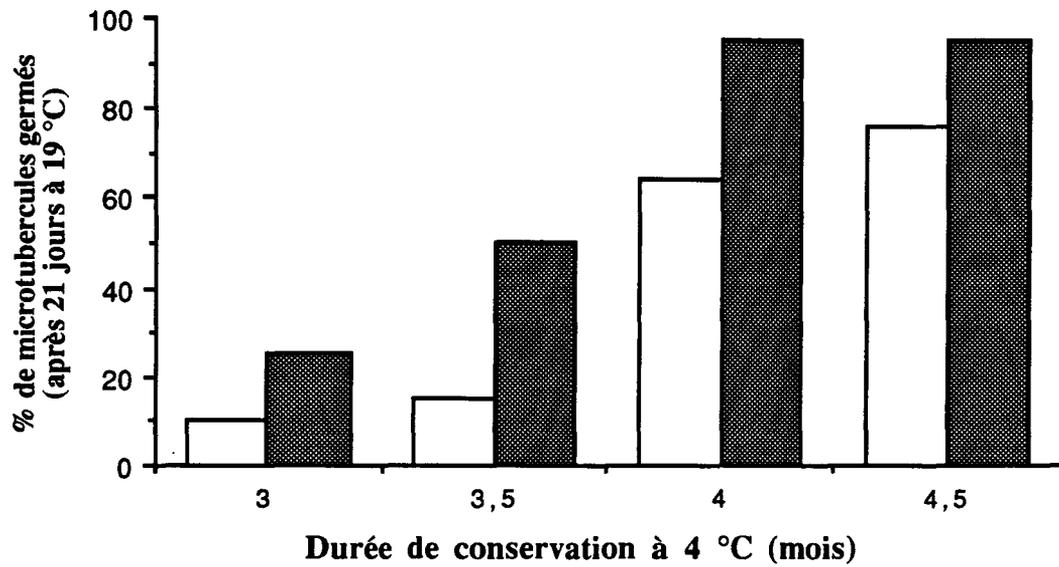


Figure 11 : Influence de la taille des microtubercules (□ Série 2-4 mm, ■ Série 4-6 mm) sur le pourcentage de microtubercules germés à 19 °C d'un lot de 50 microtubercules de la variété Bintje récoltés après 6 semaines de tubérisation puis conservés pendant 3, 3 1/2, 4 et 4 1/2 mois à 4 °C.

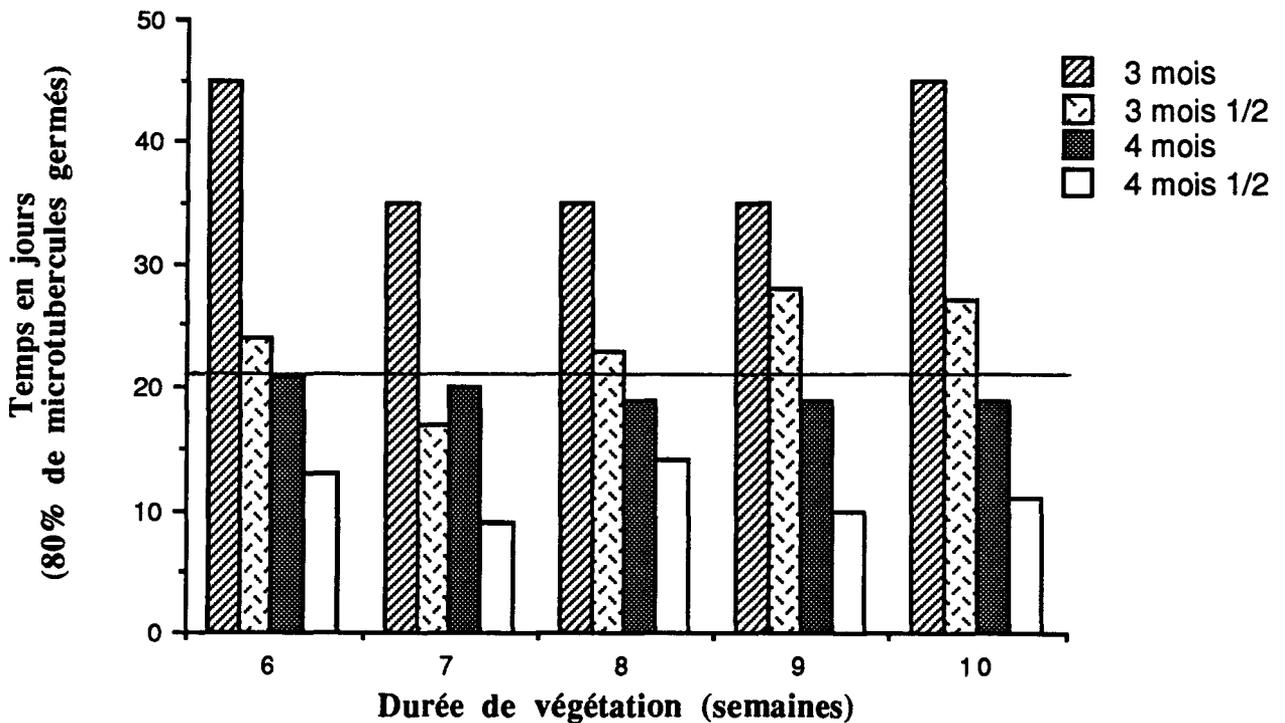


Figure 12 : Influence de différents âges des microtubercules (6, 7, 8, 9 ou 10 semaines) pour obtenir 80 % de microtubercules germés à 19 °C de lots de 50 microtubercules de la variété Bintje conservés pendant 3, 3 1/2, 4 et 4 1/2 mois à 4 °C.

Quel que soit l'âge physiologique des microtubercules exprimé par la durée de végétation, la germination est toujours d'autant plus rapide que le temps passé à 4°C est important (**figure 10**). La conclusion reste la même qu'il s'agisse des microtubercules de gros diamètre (4-6 mm) ou de petit diamètre (2-4 mm), avec néanmoins une germination plus rapide pour le gros diamètre (**figure 11**). Ainsi dans le cas d'une durée de végétation de 6 semaines (durée habituellement utilisée) après 4 mois à 4°C puis culture pendant 21 jours à 19°C, nous avons respectivement 95 et 57 % de germination pour le gros et le petit diamètre; ces résultats sont identiques pour 4^{1/2} mois à 4° C.

La durée de végétation pour l'obtention des microtubercules ne semble pas influencer notablement la germination de ces derniers après leur conservation à 4°C (**figure 12**). Ainsi pour 4 mois de conservation à 4°C le temps nécessaire à l'obtention de 80% de germination reste identique (20 ou 21 jours) lorsque l'on considère les microtubercules produits en 6, 7, 8, 9 ou 10 semaines de culture. Dans les autres cas les conclusions sont les mêmes avec néanmoins une variation plus importante, en particulier pour 3 mois à 4°C où un décalage de 10 jours dans la germination peut être observé. On reste en dessous du seuil des 21 jours pour obtenir 80 % de germination seulement lorsque la durée de conservation à 4°C est au moins égale à 4 mois. La dormance est donc levée, quelle que soit la durée de la végétation, si les tubercules ont été conservés pendant au moins 4 mois à 4°C.

1-3) Effet de la concentration en saccharose dans le milieu de tubérisation

Les résultats concernant la tubérisation *in vitro* de plusieurs variétés de Pomme de terre ont montré une corrélation positive entre la dose de saccharose présente dans le milieu et la masse moyenne des microtubercules produits (Lavieville, 1991). D'autre part, nous avons mis en évidence un effet de la taille des microtubercules sur la germination au laboratoire et en serre. Ces résultats nous ont conduit à augmenter la dose habituelle de saccharose (80 g l⁻¹) présente dans le milieu de tubérisation afin de vérifier si l'augmentation de la concentration en saccharose pouvait avoir une incidence sur la dormance et la germination des microtubercules.

Trois lots de microtubercules de la variété Désirée ont été obtenus avec des concentrations en saccharose de 80, 100 et 140 g l⁻¹. L'expérimentation a été réalisée 2 fois avec un nombre minimal de 100 microtubercules par essai de germination. Les lots ont été conservés 10, 13, 17 et 21 semaines à 4°C et ensuite le pourcentage de tubercules germés à 19°C a été suivi durant 4 semaines.

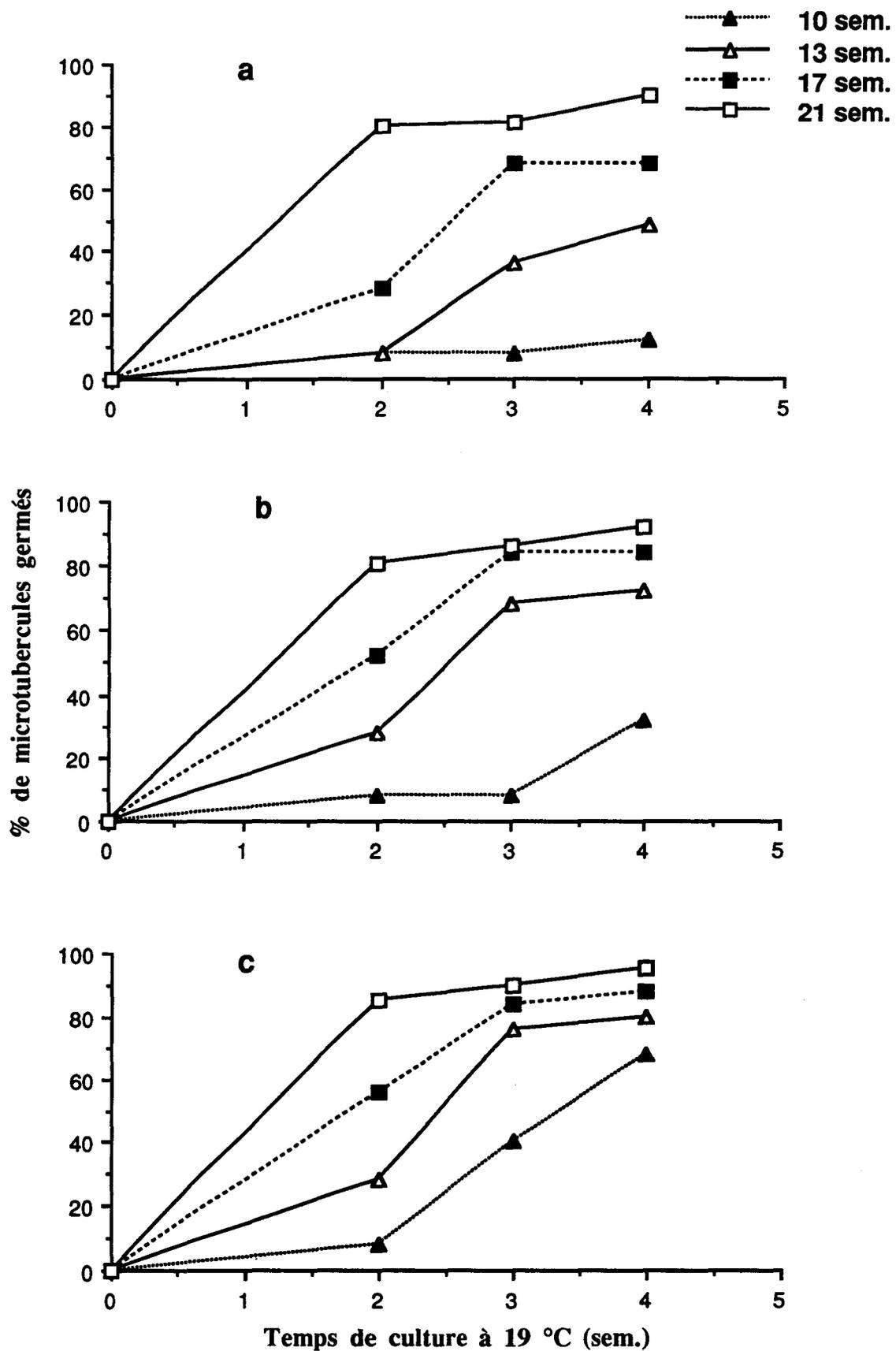


Figure 13 : Influence des concentrations en saccharose utilisées durant la phase de tubérisation (a : 80 g l⁻¹, b : 100 g l⁻¹ et c : 140 g l⁻¹) sur la germination à 19°C des microtubercules de la variété Désirée. Après tubérisation, les microtubercules récoltés sont conservés pendant 10, 13, 17 ou 21 semaines à 4°C.

Pour les trois concentrations en saccharose, le pourcentage de microtubercules germés est d'autant plus élevé que la durée de stockage à 4°C est longue (figure 13). Il est à noter que pour la concentration de 80 g l⁻¹, le temps pour obtenir 80% de germination est de 21 semaines de conservation à 4°C, et 2 semaines à 19°C (fig. 13 a), il n'est plus respectivement que de 17 et pratiquement de 13 semaines à 4°C, et 3 semaines à 19°C, pour les concentrations de 100 et 140 g l⁻¹ (fig. 13 b et c). En augmentant la concentration en saccharose de 80 à 140 g l⁻¹, il est ainsi possible de réduire d'environ 7 semaines la durée de la dormance.

Les différences entre les pourcentages de microtubercules germés, observées pour les trois concentrations en saccharose sont d'autant moins marquées que le temps de conservation à 4°C est long (figure 14). Ainsi pour 13 semaines de conservation à 4°C (fig. 14 b) et surtout 17 semaines (fig. 14 c) les courbes de germination pour les concentrations de 100 et 140 g l⁻¹ sont identiques. Après 21 semaines à 4°C les 3 courbes de germination sont similaires (fig. 14 d) : l'effet concentration en saccharose n'est plus décelable.

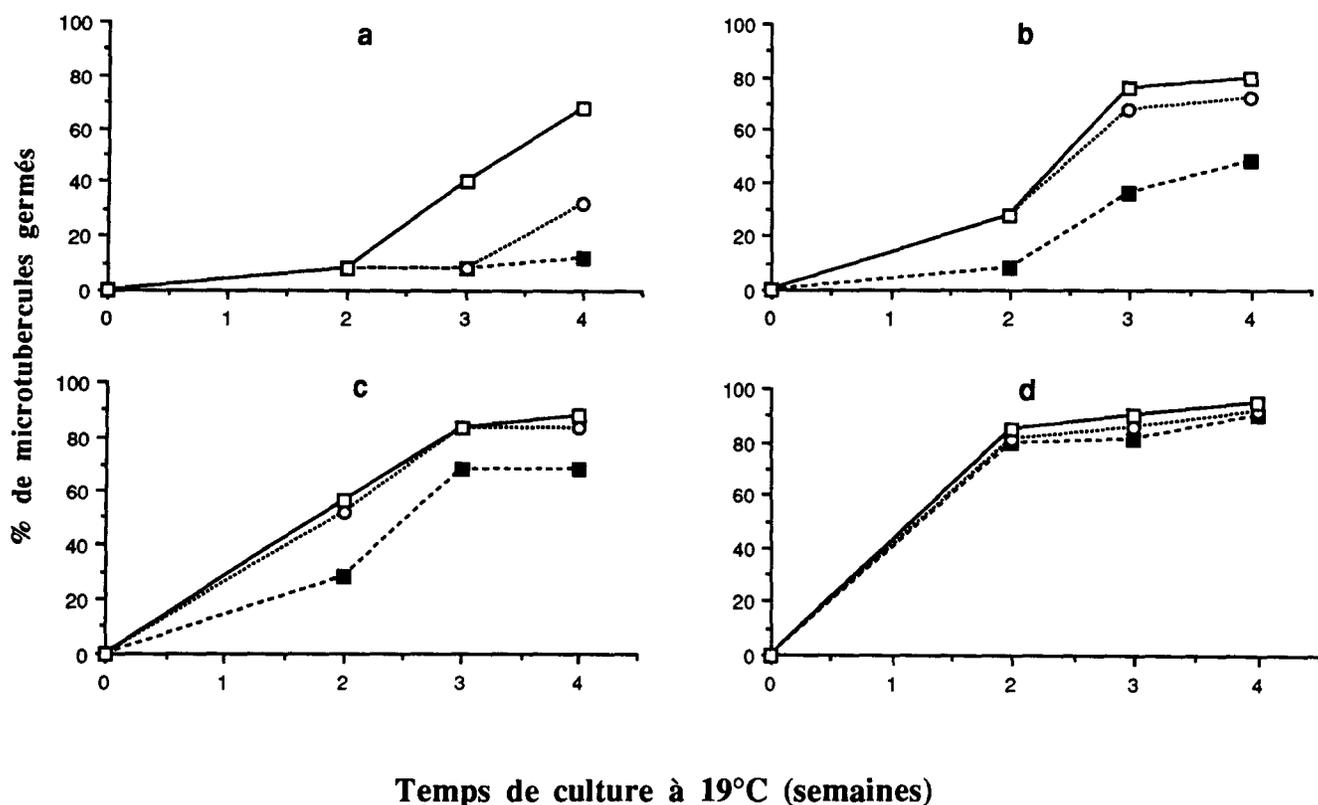


Figure 14 : Effet de la concentration en saccharose (80 g l⁻¹ -■-, 100 g l⁻¹ -○- et 140 g l⁻¹ -□-) et du temps de conservation à 4°C (a : 10 sem., b : 13 sem., c : 17 sem. et d : 21 sem.) sur la germination à 19°C des microtubercules de la variété Désirée.

Une comparaison des masses moyennes qui ne sont pas notablement différentes pour chaque lot de microtubercules testé montre que les différences de germination ne sont pas dues à une augmentation de la masse de matière fraîche (**tableau 13**) et donc du calibre des microtubercules en fonction de la concentration en saccharose. En revanche, les différences de teneurs en MS entre chaque concentration en saccharose sont très nettes et ceci se traduit également par des concentrations en glucides solubles par rapport à la MF qui varient, en particulier pour la concentration en saccharose de 80 g l⁻¹. Une concentration importante en glucides solubles par rapport à la MS est surtout décelée dans le cas d'une concentration en saccharose de 100 g l⁻¹.

Concentration en saccharose en g l ⁻¹	80	100	140
Masse moyenne des microtubercules en mg de MF	116	113	120
Pourcentage de MS / MF	15,7	22,1	25,3
Pourcentage de glucides solubles / MF	1,1	1,9	1,8
Pourcentage de glucides solubles / MS	7,1	8,4	7,3

Tableau 13 : Masse moyenne (en mg), pourcentage de MS et de glucides solubles par rapport à la MF et de glucides solubles par rapport à la MS des microtubercules de la variété Désirée en fonction de la concentration en saccharose dans le milieu de tubérisation.

2) Traitements à l'acide gibbérellique

La production des microtubercules en 1989 fut tardive; compte tenu des premiers résultats relatifs à la germination et au temps de conservation nécessaire pour espérer obtenir une bonne levée, nous avons dû mettre au point rapidement un traitement permettant de raccourcir la durée de la dormance. L'action de l'acide gibbérellique sur la rupture de la dormance des tubercules de Pomme de terre n'est pas prouvée, mais cette hormone permet cependant de réduire le temps de conservation avant plantation (Marinus et Bodlaender, 1978; De Fernandez et *al.*, 1990). C'est pourquoi, d'un commun accord avec la station de Beaurains, nous avons réalisé une série de traitements visant à définir les conditions et surtout les doses à utiliser pour traiter les microtubercules en 1989.

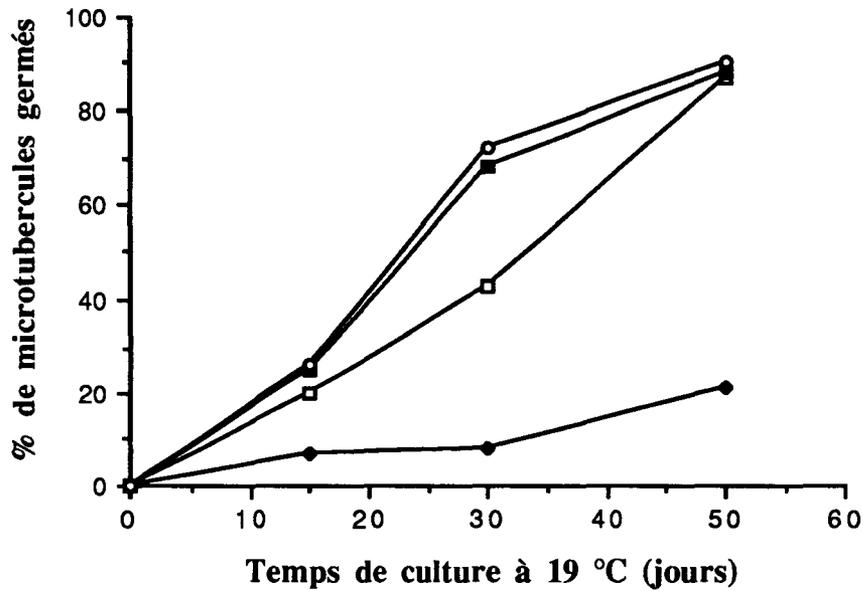


Figure 15 : Influence du traitement à la GA₃ sur la germination à 19°C de microtubercules (var. Brettor) conservés préalablement 7 sem. à 4°C. Les microtubercules sont immergés pendant 5 min. dans l'eau (-◆-) ou dans différentes solutions de GA₃ (-□- 10⁻⁵ M, -■- 10⁻⁴ M et -○- 10⁻³ M).

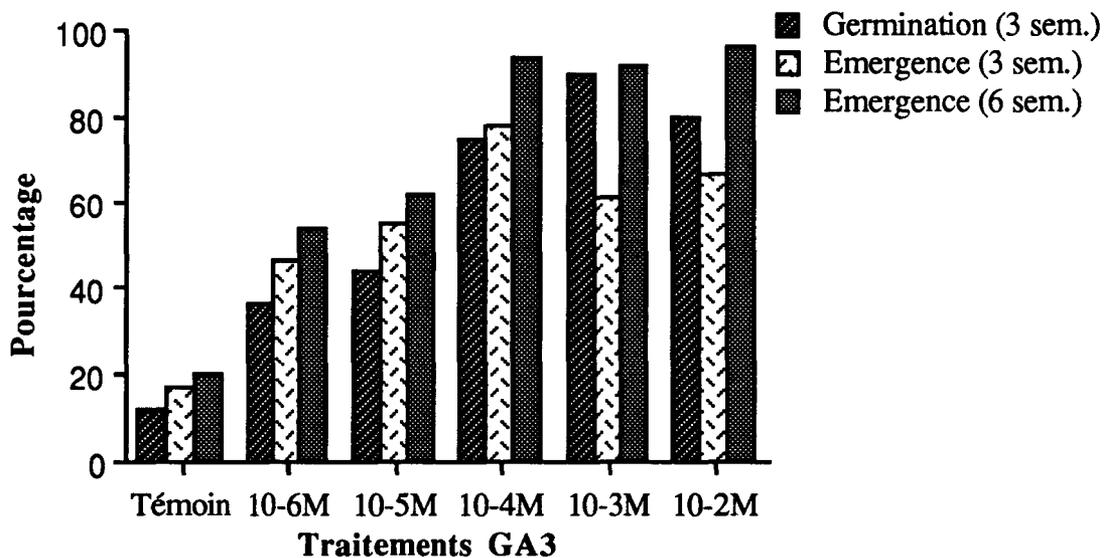


Figure 16 : Influence du traitement à la GA₃ sur la germination au laboratoire à 19°C et l'émergence en serre de microtubercules (var. Brettor) conservés préalablement 14 sem. à 4°C. Le pourcentage de microtubercules ayant germés est repertorié après 3 semaines, date à laquelle les microtubercules sont plantés. Le pourcentage de plantules apparues (émergence) est observé après 3 et 6 semaines de culture en serre.

La première série d'expériences a consisté à utiliser trois concentrations en GA₃ (10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M, 10⁻³ M) et à effectuer un suivi de la germination des microtubercules (var. Brettor).

On constate pour les trois traitements, par comparaison avec le témoin eau (**figure 15**), un effet stimulateur de la GA₃ sur la germination. La stimulation est d'ailleurs d'autant plus importante que la concentration en GA₃ est élevée. En effet pour 10⁻³ M la germination est plus rapide et donc plus homogène. Ceci est très net vis à vis du témoin, mais cette différence encore importante par rapport à 10⁻⁵ M n'existe pratiquement plus lorsqu'on compare 10⁻³ M à 10⁻⁴ M. Notons que dans tous les cas au bout de 21 jours les 80 % de germination ne sont pas atteints puisque pour le témoin nous avons seulement 8 % et que dans le meilleur des cas (10⁻³ M) on atteint tout juste 50 %.

On peut donc considérer que le traitement GA₃ dans le cas présent, accélère la germination mais ne permet pas de lever la dormance de tous les microtubercules.

Afin de compléter ces résultats préliminaires, une seconde série d'expériences a été réalisée en étendant la gamme de GA₃ utilisée. La **figure 16** traduit les différences de germination en laboratoire et d'émergence en serre des microtubercules, en relation avec le traitement effectué. En ce qui concerne la germination au laboratoire, là encore la concentration en GA₃ de 10⁻³ M donne les meilleurs résultats, puisqu'après 21 jours on atteint 90 % de microtubercules germés. Néanmoins pour 10⁻⁴ M et 10⁻² M le pourcentage voisin de 80 % est tout à fait acceptable. Pour les plus faibles concentrations, 10⁻⁵ M et 10⁻⁶ M, la germination n'est que partielle. Les microtubercules se trouvent encore dans leur phase de dormance.

Pour l'émergence en serre, les conclusions restent sensiblement les mêmes. Il est tout de même important de noter que pour 10⁻³ M et 10⁻² M le pourcentage de plantules ayant émergé après 21 jours est inférieur au pourcentage de microtubercules germés, observé pour les mêmes lots, au laboratoire. Ceci s'explique par le fait que, dans ces deux cas, les germes étant plus développés, une proportion non négligeable subit des dommages lors de la mise en terre. Ceci se traduit donc par un retard à la levée. Cette explication est renforcée par une observation des plantules après 6 semaines; en effet pour les trois concentrations (10⁻⁴ M, 10⁻³ M et 10⁻² M), le pourcentage de plantules ayant émergé est de 90 %.

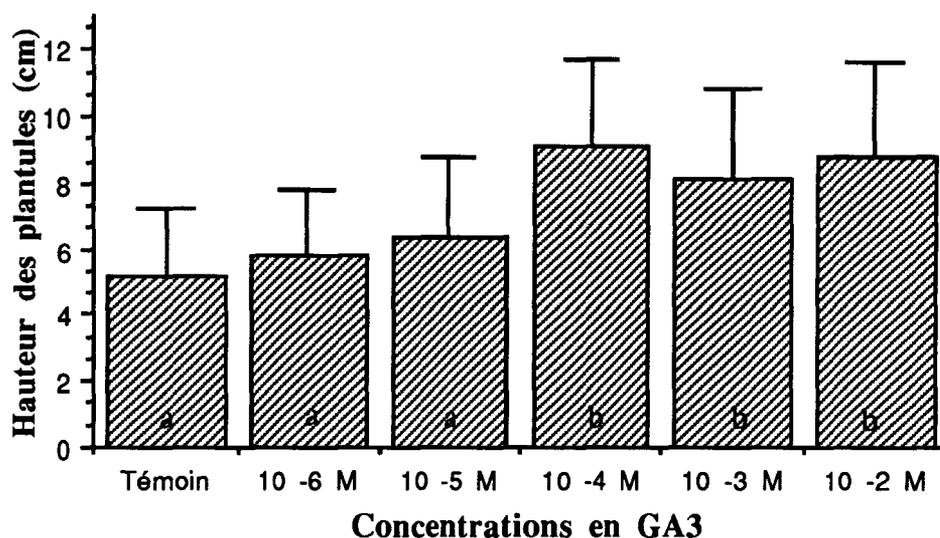


Figure 17 : Influence du traitement à la GA₃ (voir **figure 16**) sur la hauteur des plantules (var. Brettor) après 2 mois et demi en serre. Moyenne \pm écart-type (n=50). Les lettres identiques traduisent des différences non significatives.

	Témoin	GA ₃
% de microtubercules germés ^a	48,4	95,3
Longueur germes (mm) ^b	11,3 \pm 7,4	25,4 \pm 3,1

Tableau 14 : Influence du traitement GA₃ sur la germination à 19°C de microtubercules (var. Désirée) conservés préalablement 3 mois et demi à 4°C.

Pour les deux expériences :

a = 31 microtubercules

b = Moyenne \pm ES 0,05; n =16

Afin d'étudier l'influence du traitement gibbérellinique sur la croissance, une mesure de la hauteur des plantules a été réalisée après 2 mois et demi de culture en serre (**figure 17**). Un test de Student effectué sur 50 plantules nous permet de confirmer que la GA₃ utilisée à une concentration supérieure ou égale à 10⁻⁴ M, par rapport à un témoin, agit très significativement (valeur calculée = 6,33 > t_{5%}⁵⁰ = 2,025) sur la croissance des plantules en augmentant la taille de celles-ci.

Pour les deux séries d'expériences réalisées, les concentrations en GA₃ de 10⁻³M et 10⁻⁴M permettent d'obtenir les meilleurs résultats en ce qui concerne la germination en laboratoire ou en serre et la croissance des plantules. La concentration de 10⁻³M ne présentant pas une stimulation significativement supérieure à celle de 10⁻⁴M et les effets d'un tel traitement sur le rendement étant méconnu, nous avons donc retenu la concentration de 10⁻⁴M pour traiter les microtubercules en 1989.

La GA₃, en favorisant la germination des microtubercules, semble ne pas se limiter uniquement à l'activation de voies métaboliques et enzymatiques. En effet, la morphologie des plantules étant modifiée en présence de GA₃ on peut supposer que la molécule est métabolisée puis transportée jusque dans les parties aériennes.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé de la ¹⁴C-GA₃. Le **tableau 14** (Couillerot, 1993) rapporte les résultats relatifs à la germination des microtubercules (var. Désirée) après 21 jours à 19°C.

Pour le témoin après 3 semaines à 19°C, nous avons seulement 48,4 % de germination. En revanche, pour le lot traité pendant 5 minutes avec de la ¹⁴C-GA₃ (20 000 ppm), on constate une germination de 95,3 % et une nette augmentation de la longueur des germes.

L'analyse de la radioactivité au cours de l'expérience conduit aux résultats suivants :

- La radioactivité dans chaque microtubercule juste après trempage représente 0,003 % de la radioactivité totale soit 6 µg de GA₃.
- Trois semaines après, 0,25±0,04 % de cette radioactivité est détectée dans les germes.

Les profils de radioactivité obtenus après chromatographie sur couche mince (Couillerot, 1993) ont montré les résultats suivants :

- L'essentiel de l'activité due au ¹⁴C coïncide au R_f de la GA₃.
- Environ 56 % et 42 % de la ¹⁴C-GA₃ a été trouvée respectivement dans les microtubercules et dans les tiges. Ces valeurs représentent encore 3360 ng de GA₃ dans chaque microtubercule et 6,3 ng dans le germe.

Nombre de tubercules récoltés par m²

Masse de tubercules récoltés (g m⁻²)

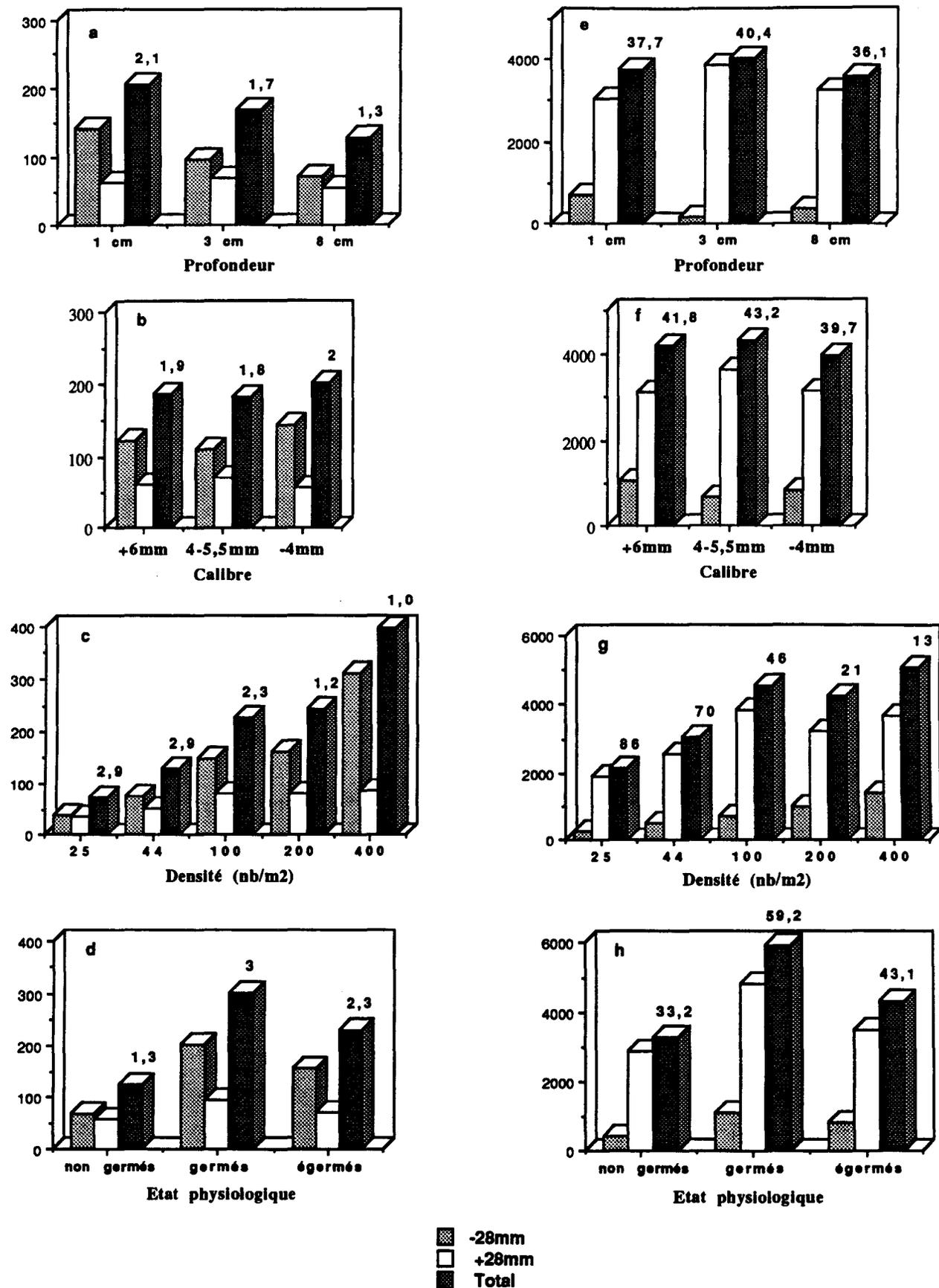


Figure 18 : Influence de la profondeur (a et e) et de la densité (c et g) de plantation, du calibre (b et f) et de l'état physiologique (d et h) des microtubercules de la variété Bintje sur le nombre (a, b, c et d) et la masse (e, f, g et h) de tubercules récoltés par m². Les ratios nombre et masse sont inscrits au dessus de chaque colonne.

B) ESSAIS EN SERRE

1) Variété Bintje

+ Récolte 1989

Au printemps 1989 quelques 30000 microtubercules sont produits par le GIE de Beaurains et répartis dans les serres des différents syndicats. En même temps les premiers essais sont réalisés en étroite collaboration avec la station de Beaurains dans plusieurs serres "insect-proof".

Une bonne conduite de la culture des microtubercules passait par la réponse à des questions simples telles que : quel diamètre choisir, quelle densité et quelle profondeur de plantation privilégier et quel stade physiologique recommander? Afin d'approfondir ces sujets, une première série d'expérimentations a été mise en place avec des tubercules de la variété Bintje.

Trois répétitions sont effectuées avec un minimum de 100 microtubercules pour chaque essai. Pour l'ensemble des essais, la densité et la profondeur de plantation sont respectivement de 100 m⁻² et de 3 cm. Les résultats sont exprimés en terme de rendement en fin de culture, soit sous forme de nombre de tubercules produits soit sous forme de masse (en g) de tubercules récoltés par m².

La **figure 18** résume les résultats obtenus avec les microtubercules de la variété Bintje. Le nombre de tubercules récoltés de moins de 28 mm de diamètre (minitubercules) est dans tous les cas expérimentaux plus important que le nombre de plus de 28 mm (**fig. 18 a,b,c et d**). La conclusion est totalement inversée si on compare les rendements en terme de masse de tubercules produits (**fig. 18 e, f,g et h**).

-Profondeur (**fig. 18 a et e**)

L'effet profondeur se traduit par une baisse très sensible du rendement total lorsque la profondeur augmente; ceci est dû principalement à la diminution du nombre de tubercules de moins de 28 mm de diamètre qui passe de 142 m⁻² pour 1 cm à 71 m⁻² pour 8 cm de profondeur. La production de tubercules, exprimée en grammes par m², reste la même quelle que soit la profondeur de plantation.

-Calibre (**fig. 18 b et f**)

Qu'il s'agisse de tubercules de plus de 6 mm, de moins de 4 mm ou compris entre 4 et 5,5 mm le rendement reste constant et ceci quelle que soit la façon de l'exprimer (nombre ou masse).

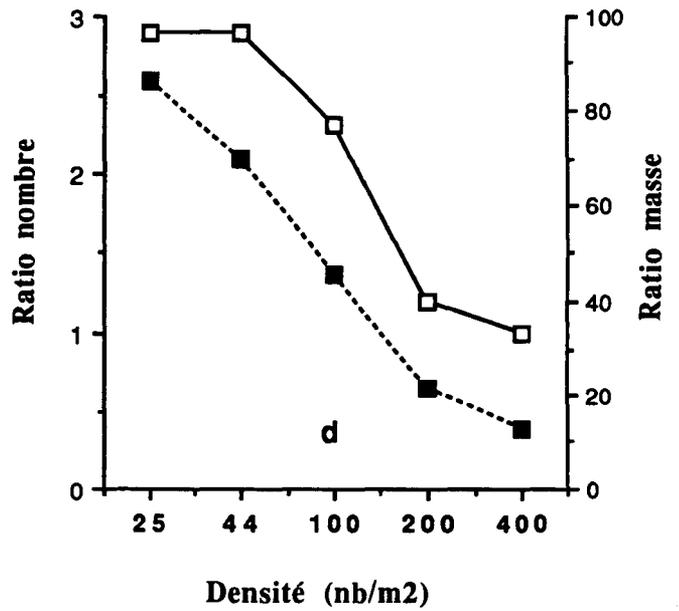
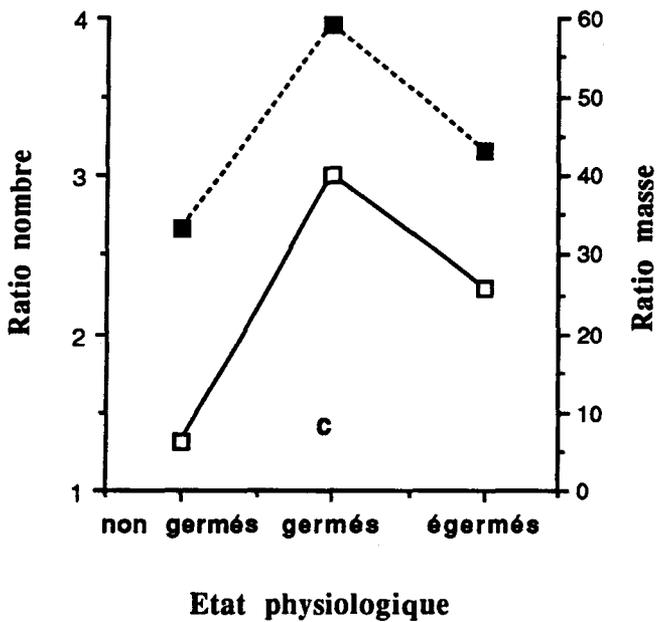
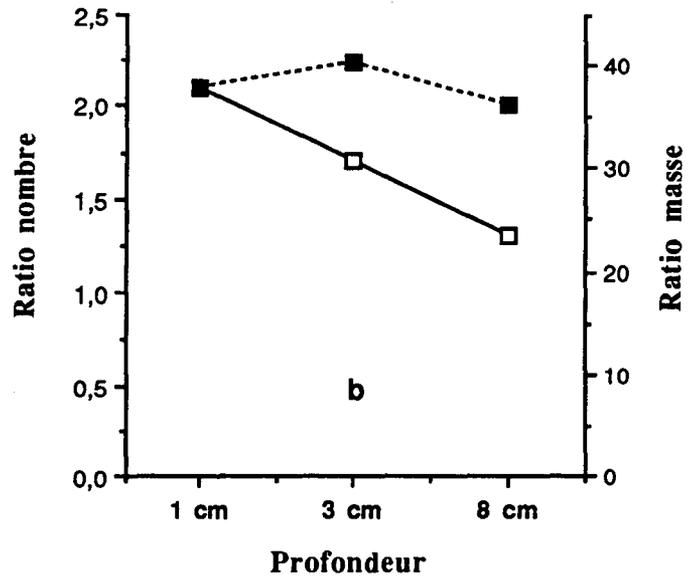
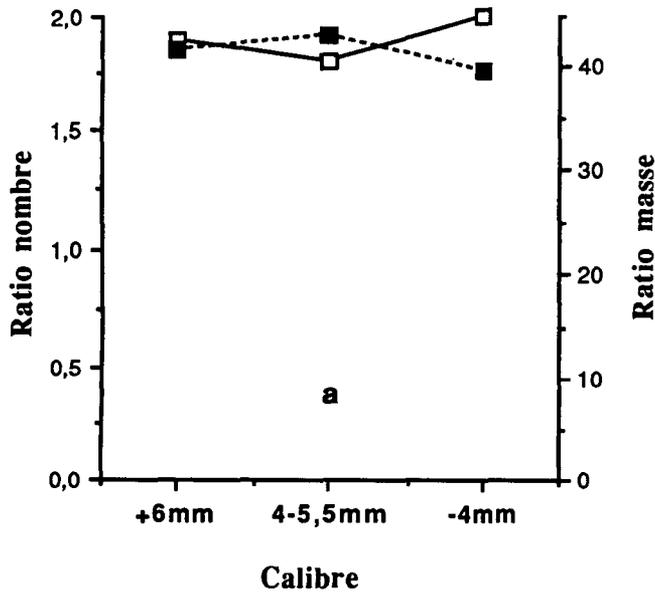


Figure 19 : Evolution des ratios nombre (-□-) et masse (-■-) de tubercules récoltés / nombre de microtubercules plantés pour la variété Bintje en fonction du calibre (a), de la profondeur (b) de la densité (d) de plantation et de l'état physiologique des microtubercules (c).

-Densité (fig. 18 c et g)

Plus la plantation est dense, plus le nombre et la masse de tubercules récoltés sont importants. Une augmentation de la densité du peuplement s'accompagne obligatoirement d'une augmentation du nombre de microtubercules mis en terre par m^2 et dans ce cas, il paraît plus judicieux de raisonner en fonction du ratio nombre de tubercules récoltés/nombre de microtubercules plantés. Nous avons respectivement pour une densité de 25, 44, 100, 200 et 400 m^{-2} un ratio de 2,9; 2,9; 2,3; 1,2 et 1. Une forte densité (400 m^{-2}) comparée à une faible densité (25 m^{-2}) donne donc un rendement global plus important, 400 tubercules récoltés au m^2 au lieu de 72, mais le nombre de tubercules produit par plante est trois fois plus important (2,9 au lieu de 1) dans le cas d'une faible densité.

-Etat physiologique des microtubercules (fig. 18 d et h)

Les microtubercules germés au moment du semis donnent les meilleurs rendements. Les microtubercules égermés, du fait de la longueur du germe au moment de la plantation et surtout ceux non germés produisent un nombre moins important de tubercules et une masse totale plus réduite.

L'analyse des ratios nombre et masse de tubercules récoltés / nombre de microtubercules plantés (figure 19) nous permet d'arriver aux conclusions suivantes : La densité de plantation et l'état des microtubercules au moment du semis sont les paramètres pour lesquels la plus grande variation du ratio nombre et du ratio masse est observée (fig. 19 c et d). Ainsi, le coefficient de variation pour le ratio nombre est de 32 % dans le cas de l'état physiologique des microtubercules et de 40 % dans le cas de la densité. Ces coefficients de variation ne sont plus respectivement que de 19 % et 4 % pour la profondeur et le calibre. Notons d'ailleurs que le coefficient de variation pour le ratio poids en ce qui concerne la profondeur n'est que de 5 % ; le nombre de tubercules récoltés diminue lorsque la profondeur de semis augmente (fig. 19 b) mais en revanche la masse produite reste constante, les tubercules produits en profondeur sont donc plus gros.

Bien que la densité de plantation soit un paramètre important puisque source d'une grande variation du rendement total, l'état physiologique des microtubercules au moment du semis apparaît être encore plus important. Pour une densité de 100 m^{-2} les ratios nombre et masse des tubercules germés sont supérieurs aux ratios des tubercules égermés et surtout non germés (fig. 19 c). Ils sont d'ailleurs supérieurs à tous les autres ratios (calibre, profondeur et densité).

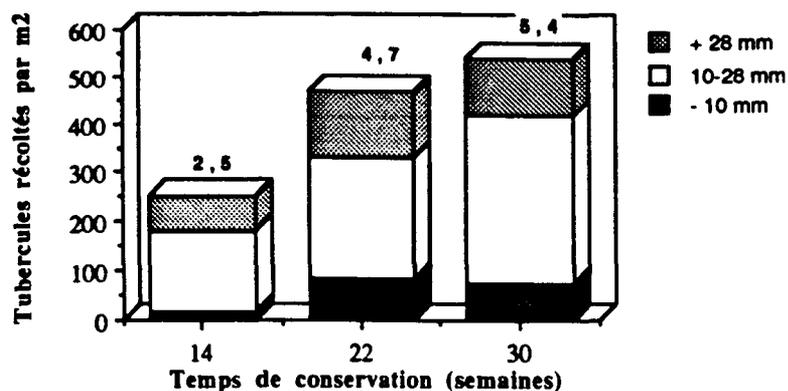


Figure 20 : Influence du temps de conservation à 4°C (semaines) des microtubercules (var. Bintje) sur le rendement en tubercules par m² pour 3 calibres (+ 28 mm, 28-10 mm et - 10 mm). Les ratios nombre de tubercules récoltés/nombre de microtubercules plantés sont inscrits au dessus de chaque colonne.

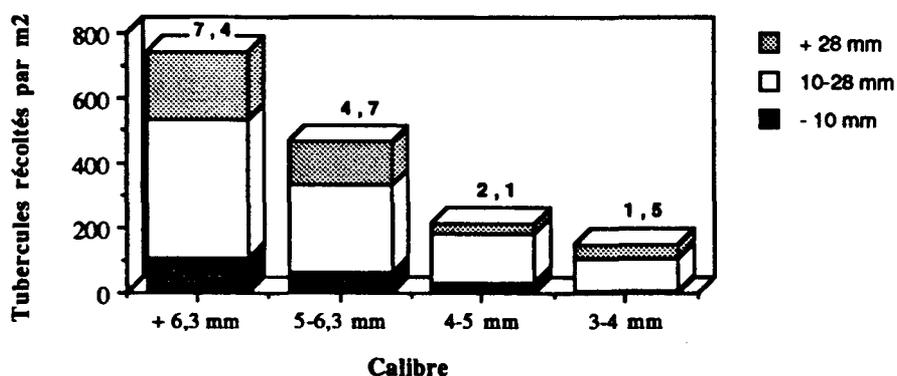


Figure 21 : Tubercules récoltés par m² pour 3 calibres (+ 28 mm, 28-10 mm et - 10 mm) en fonction du diamètre des microtubercules (var. Bintje), âgés de 30 semaines lors de la mise en terre. Les ratios nombre de tubercules récoltés/nombre de microtubercules plantés sont inscrits au dessus de chaque colonne.

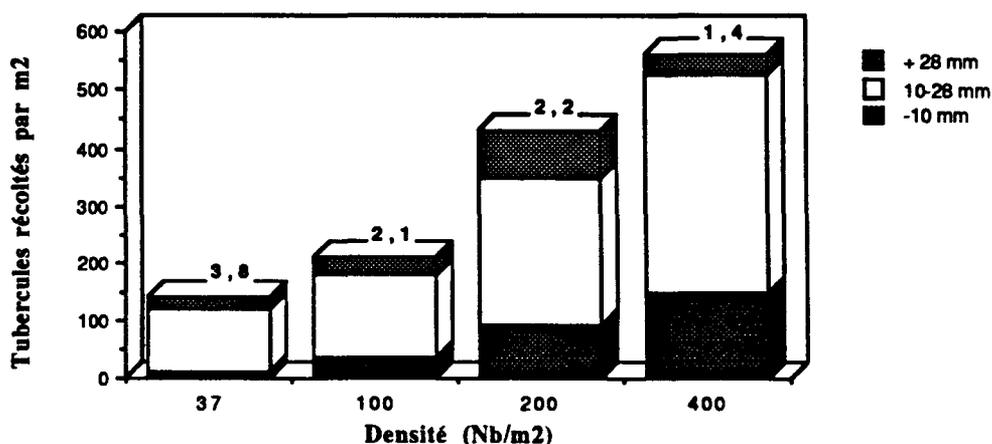


Figure 22 : Influence de la densité de plantation de microtubercules âgés de 30 semaines (var. Bintje) sur le rendement en tubercules par m² pour 3 calibres (+ 28 mm, 28-10 mm et - 10 mm). Les ratios nombre de tubercules récoltés/nombre de microtubercules plantés sont inscrits au dessus de chaque colonne.

Le ratio de 3 tubercules récoltés pour 1 microtubercule semé qui est le maximum atteint au cours de l'expérimentation reste faible comparé aux ratios obtenus avec les boutures (en moyenne 5,5 tubercules récoltés par bouture plantée).

+Récolte 1990

En 1990 la commande de microtubercules a été doublée par rapport à 1989 et les essais en serre ont été poursuivis afin de vérifier les résultats et les hypothèses établis en 1989. La variété Bintje, pour laquelle la production de microtubercules était la plus importante, a une nouvelle fois été retenue pour nos essais.

L'influence de l'âge des microtubercules sur le rendement a été mise en évidence (**figure 20**). Ainsi, pour 14 semaines de conservation à 4°C avant semis, 250 tubercules sont récoltés par m² (ratio de 2,5), pour 22 et 30 semaines nous avons respectivement 470 et 540 tubercules récoltés par m². Le ratio est multiplié par 2,16 lorsque la conservation à 4°C est augmentée de 16 semaines (30 au lieu de 14). Notons que le ratio obtenu pour 30 semaines (5,4) est bien supérieur à celui atteint au cours des essais en serre en 1989 (3 au maximum avec des microtubercules germés). L'âge des microtubercules est bien un élément déterminant dans le rendement final de la culture.

Un effet calibre a également été mis en évidence (**figure 21**) au cours de l'expérimentation pour des microtubercules âgés de 30 semaines. Plus le diamètre des microtubercules mis en terre est important plus le rendement est grand. Pour les diamètres supérieurs à 6,3 mm, compris entre 5 et 6,3 mm, 4 et 5 mm et 3 et 4 mm nous avons respectivement un ratio de 7,4; 4,7; 2,1 et 1,5. Le coefficient de variation est de 59 %, la différence entre les petits calibres (3-4 mm) et les gros calibres (supérieurs à 6,3 mm) est très importante.

Les essais densité de plantation des microtubercules âgés de 30 semaines (**figure 22**) donnent les mêmes résultats que ceux obtenus en 1989. Une forte densité (400 m⁻²) comparée à une faible densité (37 m⁻²) donne un rendement global plus important : 560 tubercules récoltés par m² au lieu de 141, mais le nombre de tubercules produits par plante est environ trois fois plus important (3,8 au lieu de 1,4) dans le cas d'une faible densité.

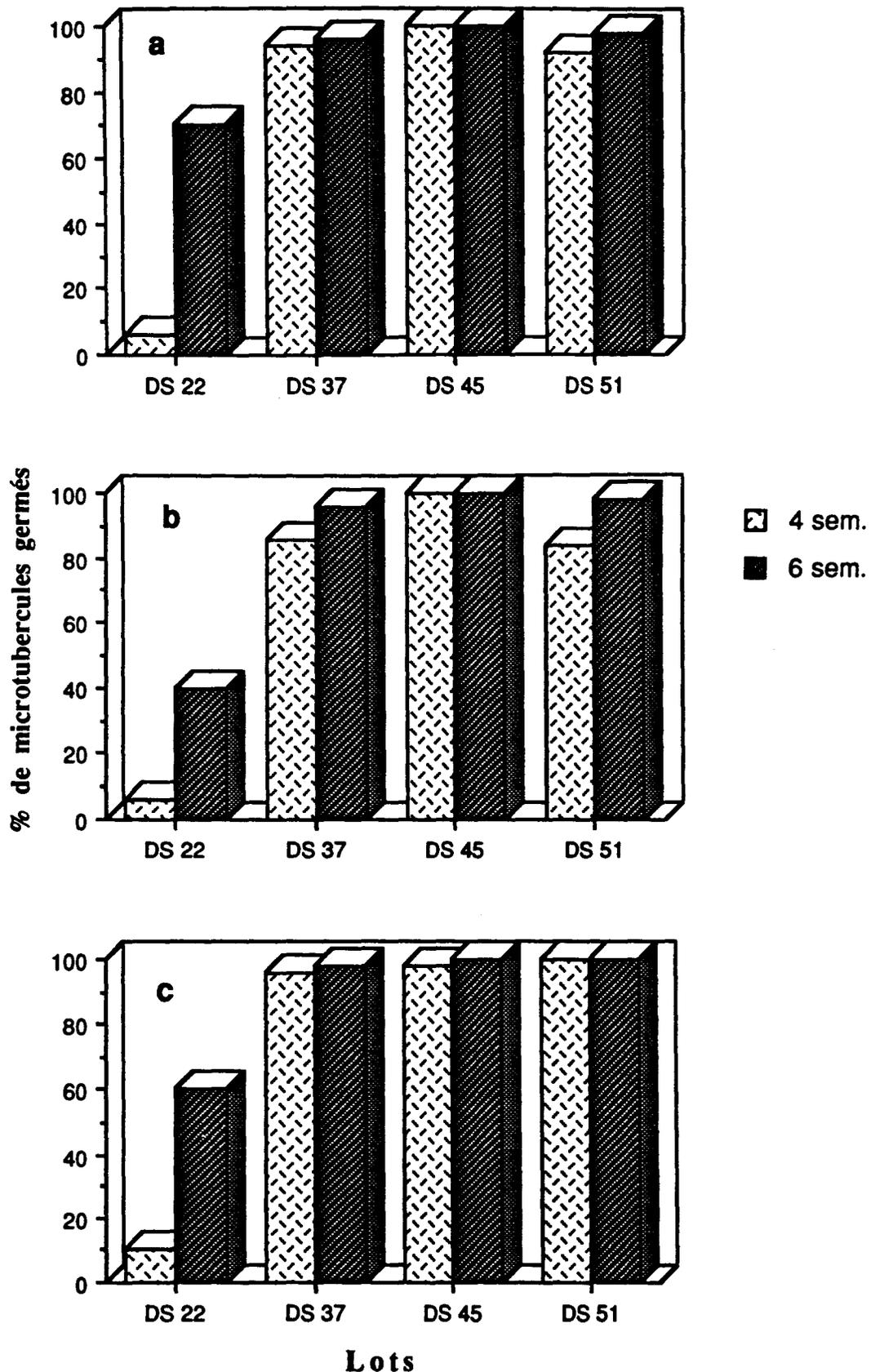


Figure 23 : Effet de la durée de conservation à 4°C des microtubercules de la variété Désirée sur le pourcentage de microtubercules germés. La capacité de germination est évaluée après 4 ou 6 semaines de culture en serre. Trois tailles de microtubercules ont été utilisées : a (7mm), b (8mm) et c (9mm). Les lots DS 22, DS 37, DS 45 et DS 51 correspondent respectivement à 22, 37, 45 et 51 semaines de conservation à 4°C avant la plantation.

2) Variété Désirée

+ Récolte 1991

Dans le protocole expérimental suivant, 4 lots de microtubercules ont été produits. Après leur récolte ils ont été conservés à 4°C pendant 22, 37, 45 ou 51 semaines puis ensuite plantés simultanément en serre insect-proof en mai 1991. Notons que pour chaque lot, nous avons séparé 3 calibres différents correspondant à un diamètre de 7, 8 ou 9 mm. Chaque expérimentation est réalisée sur des parcelles de 0,5 m².

Pour chaque lot et chaque calibre les conditions de culture ont été identiques. Les différences observées au niveau de la germination, de la croissance, de la tubérisation et du rendement traduisent l'effet plant pour les conditions de culture et le climat rencontrés au cours de l'expérimentation.

- Germination

A l'exception du lot DS 22, la germination observée après 4 ou 6 semaines (**figure 23**) est tout à fait satisfaisante. Dans tous les cas, nous sommes au dessus du seuil des 80 % et après 6 semaines nous atteignons presque systématiquement les 100%. Quel que soit le calibre considéré, les conclusions restent les mêmes. Le lot DS 22 n'a été conservé que 22 semaines à 4°C et les problèmes de germination observés s'expliquent d'une part par le fait que certains microtubercules présentent encore une dormance et d'autre part par une croissance relativement faible de l'ensemble du lot.

- Rendement

+ Nombre de tubercules récoltés

Plus le temps de conservation à 4°C est important, plus le rendement est élevé et ceci, pour les 3 calibres de microtubercules (**fig. 24 a,b et c**), exception faite du lot 8 DS 45 qui présente un rendement supérieur avec, en particulier, une augmentation dans les calibres 15-28 mm, 35-45 mm et supérieur à 45 mm. L'observation du nombre de tubercules récoltés (**tableau 15**) nous montre les résultats suivants:

Le rendement total est le même pour les microtubercules de 7 et 8 mm puisque nous avons respectivement 990 et 1015 tubercules récoltés. En revanche, ce nombre est nettement moins élevé dans le cas des microtubercules de 9 mm puisque nous n'avons que 766 tubercules à la récolte. Cette diminution de rendement est due à une forte chute dans les calibres compris entre 45 et moins de 15 mm de diamètre. Par contre pour les calibres supérieurs à 45 mm nous avons une nette augmentation lorsque la taille des

Nombre de tubercules par 0,5 m²

Masse de tubercules (Kg/0,5 m²)

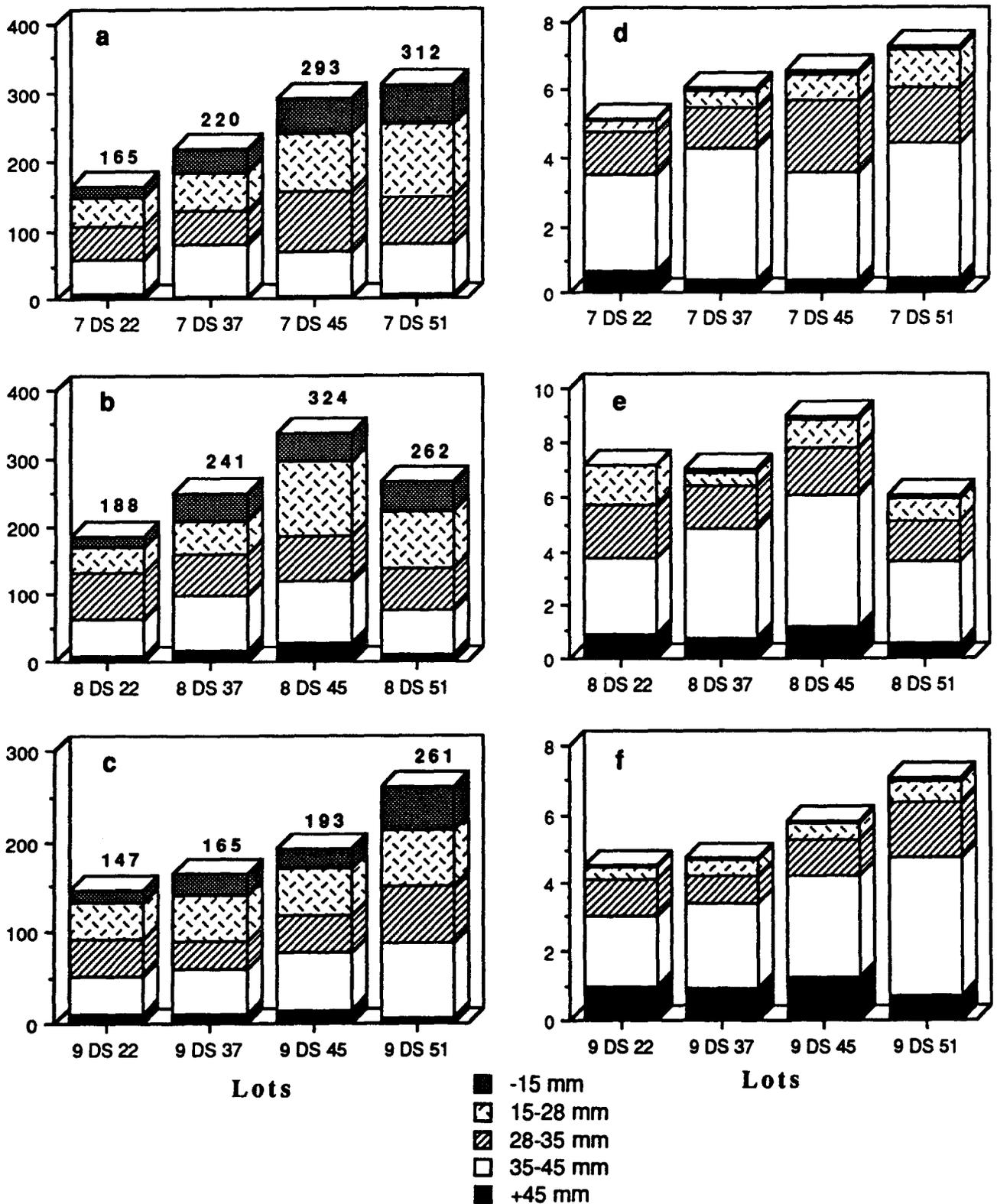


Figure 24 : Influence de la durée de conservation à 4 °C des microtubercules de la variété Désirée sur le rendement en nombre (a,b et c) et en masse (d,e et f) de tubercules récoltés, pour 3 diamètres de départ : a et d (7 mm), b et e (8 mm), c et f (9 mm). Le nombre total de tubercules récoltés par 0,5 m² pour chaque lot et chaque calibre est indiqué au dessus des colonnes. Les lots DS 22, DS 37, DS 45 et DS 51 correspondent respectivement à 22, 37, 45 et 51 semaines de conservation avant plantation.

microtubercules de départ augmente. Ainsi, on passe de 20 tubercules récoltés pour un calibre de 7 mm à 43 tubercules pour un calibre de 9 mm.

La répartition des différents calibres pour les tubercules récoltés reste sensiblement la même, que l'on considère les microtubercules de 7, 8 ou 9 mm (**tableau 15**). En effet le pourcentage de chaque calibre par rapport au total produit reste relativement constant, hormis pour les tubercules supérieurs à 45 mm. Notons que 82 % des tubercules récoltés ont leur diamètre compris entre 15 et 45 mm.

Nombre de tubercules récoltés pour différents calibres et (%) par rapport au total						
Diamètre des microtubercules	+ 45 mm	35-45 mm	28-35 mm	15-28 mm	- 15 mm	Total
7 mm	20 (2%)	273 (28%)	252 (25%)	284 (29%)	161 (16%)	990
8 mm	35 (3%)	295 (29%)	263 (26%)	282 (28%)	140 (14%)	1015
9 mm	43 (6%)	233 (30%)	174 (23%)	209 (27%)	107 (14%)	766

Tableau 15 : Rendement en nombre de tubercules récoltés par 0,5 m² pour 5 calibres (+ 45 mm, 35-45, 28-35, 15-28 et - 15 mm) en fonction du diamètre (7, 8 ou 9 mm) des microtubercules plantés de la variété Désirée. Le pourcentage respectif de chaque calibre par rapport au total est indiqué entre parenthèses dans le tableau.

+ Masse de tubercules récoltés

Là encore, plus le temps de conservation à 4°C est important plus le rendement (Kg pour 0,5 m²) est élevé (**fig. 24 d, e et f**). Le lot 8 DS 45 ayant un plus grand nombre de tubercules récoltés présente également une masse totale à la récolte supérieure aux autres lots. Les conclusions concernant la masse totale et la répartition par calibre de tubercules récoltés en fonction du diamètre (7, 8 ou 9 mm) des microtubercules plantés restent les mêmes (**tableau 16**). Les tubercules ayant leur diamètre compris entre 15 et 45 mm représentent 87 % de la masse totale produite.

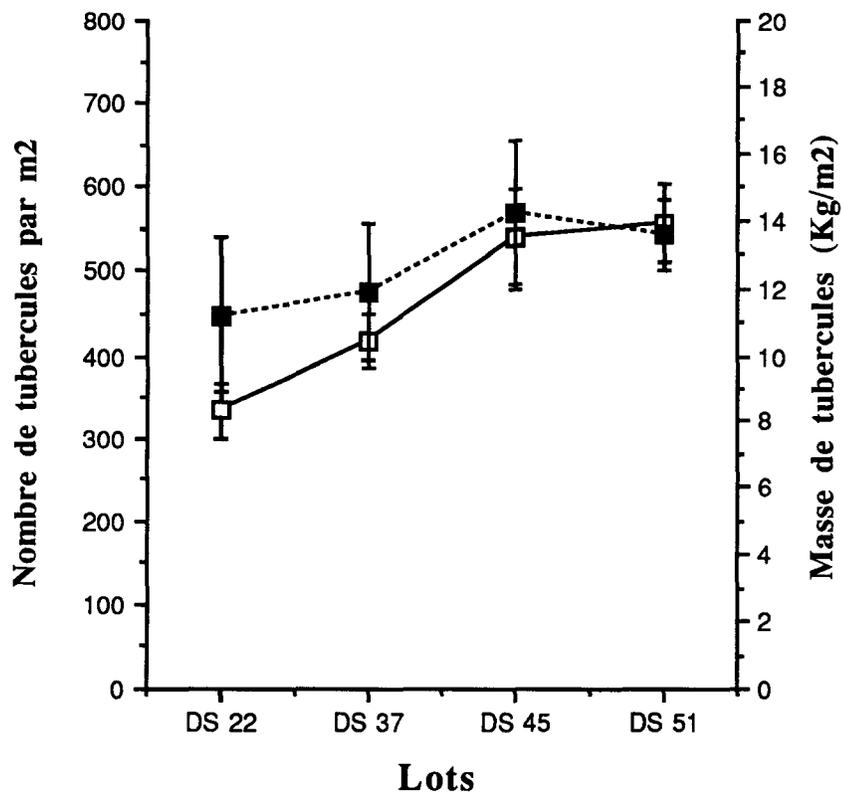


Figure 25 : Effet de la durée de conservation à 4 °C des microtubercules de la variété Désirée sur le nombre (-□-) et la masse (-■-) de tubercules récoltés par m² en serre insect-proof. DS 22, DS 37, DS 45 et DS 51 représentent respectivement des lots conservés 22, 37, 45 et 51 semaines à 4°C avant la plantation. Chaque point expérimental correspond à la moyenne des résultats obtenus avec 3 lots différents de microtubercules (\pm écart-type).

Masse de tubercules récoltés (Kg pour 0,5 m ²) pour différents calibres et (%) par rapport au total						
Diamètre des microtubercules	+ 45 mm	35-45 mm	28-35 mm	15-28 mm	- 15 mm	Total
7 mm	1,86 (7%)	13,9 (55%)	6,2 (25%)	2,7 (11%)	0,36 (2%)	25,1
8 mm	3,28 (11%)	15,1 (52%)	6,7 (23%)	3,8 (13%)	0,36 (1%)	29,3
9 mm	3,85 (18%)	11,6 (52%)	4,5 (20%)	2 (9%)	0,25 (1%)	22,2

Tableau 16 : Rendement en masse de tubercules récoltés (Kg pour 0,5 m²) pour 5 calibres (+ 45 mm, 35-45, 28-35, 15-28 et - 15 mm) en fonction du diamètre (7, 8 ou 9 mm) des microtubercules plantés de la variété Désirée. Le pourcentage respectif de chaque calibre par rapport au total est indiqué entre parenthèses dans le tableau.

La **figure 25** résume l'influence de l'âge physiologique des lots de microtubercules au moment de la plantation, sur le rendement total en nombre et en masse de tubercules récoltés par m² pour les 3 diamètres (7, 8 et 9 mm) confondus. Le nombre total de tubercules récoltés augmente lorsque le temps de conservation à 4°C est plus important. Dans le cas de DS 22, les faibles rendements obtenus s'expliquent par des retards à la levée, une mauvaise émergence des plantules (**figure 23**) et par conséquent un système végétatif moins important. En revanche, pour DS 37, DS 45 et DS 51 les germinations ont été très homogènes, pour tous les microtubercules semés la levée a été quasi-totale. Les différences obtenues, en particulier entre DS 37 et DS 45 et DS 37 et DS 51 s'expliquent par l'influence du microtubercule mère et de la plantule produite sur l'évolution ultérieure des plantes soumises à des conditions culturales strictement identiques.

Les lots DS 45 et DS 51 donnent des résultats très proches avec une légère baisse pour DS 51 en ce qui concerne la masse totale produite. Le ratio, nombre de tubercules récoltés/nombre de microtubercules semés est respectivement de 5,5 et 5,4 pour DS 51 et DS 45. Il n'est plus que de 4,1 pour DS 37 et seulement 3,3 pour DS 22.

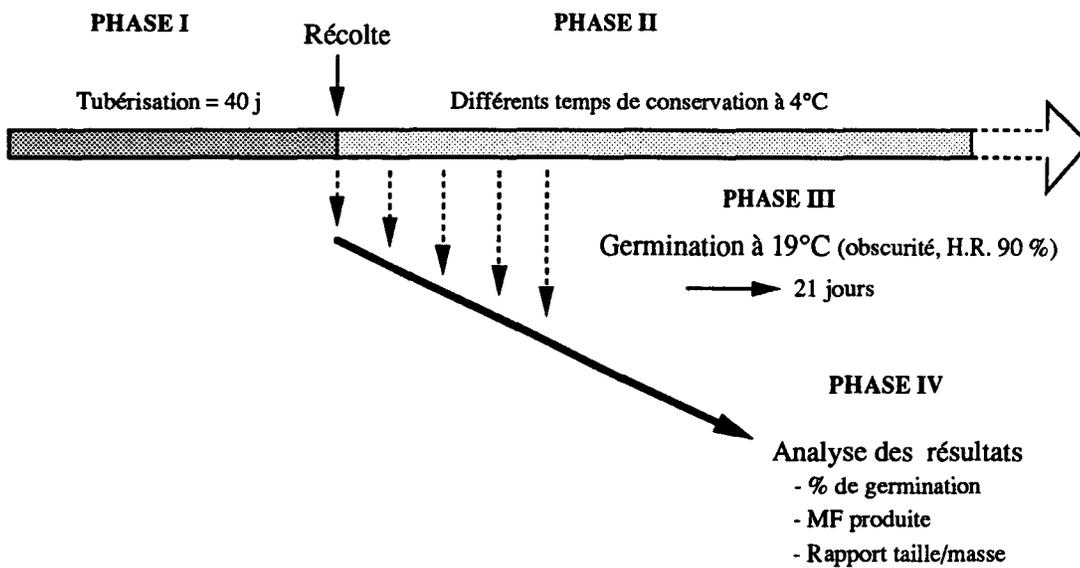


Figure 26 : Les différentes étapes expérimentales des essais de germination au laboratoire. (H.R. : humidité relative)

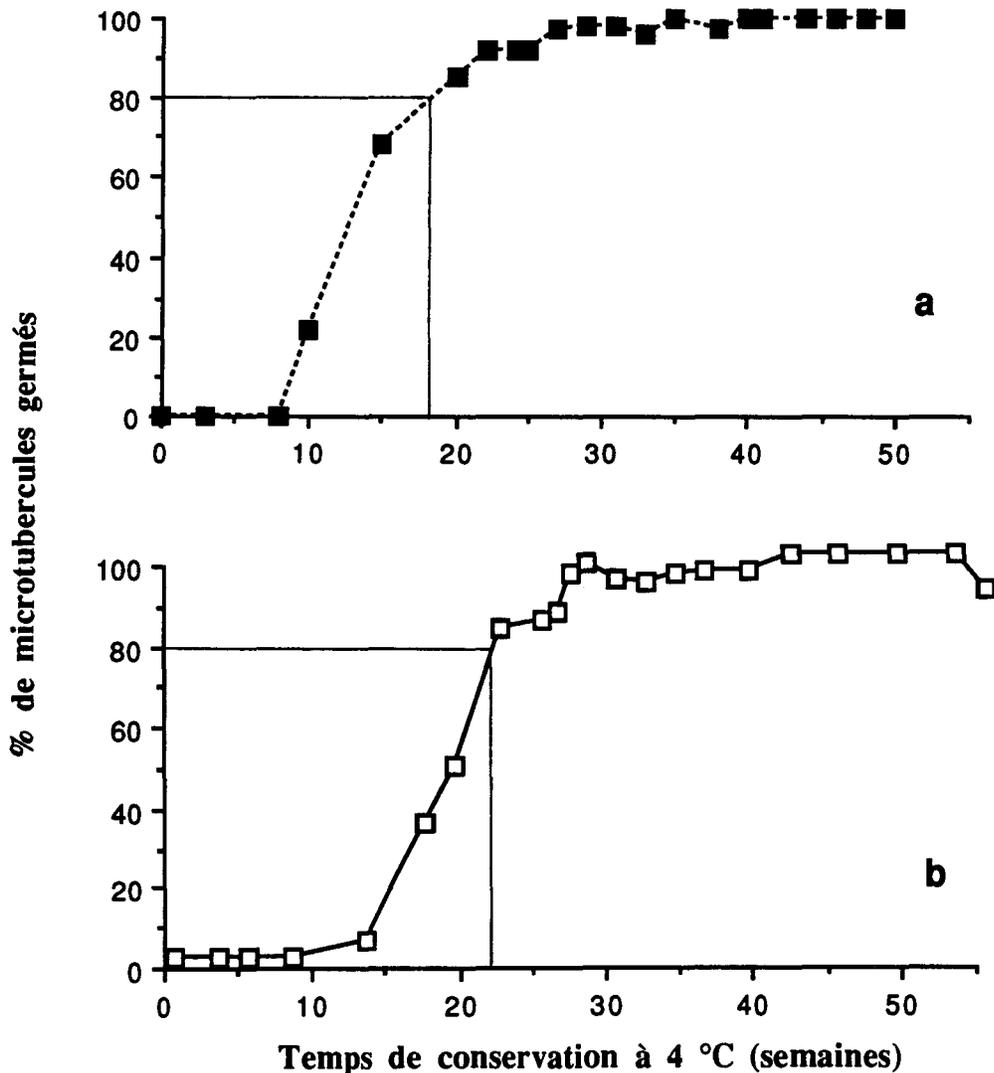


Figure 27 : Evolution du pourcentage de microtubercules germés pour les variétés Bintje (a) et Désirée (b) après 3 semaines à 19°C et pour différents temps de conservation à 4°C.

II) RECHERCHE DE MARQUEURS DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE DES MICROTUBERCULES CONSERVES A 4°C

A) PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le premier de nos objectifs pour ces deux variétés a été de définir un certain nombre de paramètres physiologiques en relation avec l'âge des microtubercules pour des conditions parfaitement définies.

La **figure 26** résume les différentes étapes de notre expérimentation. La première consiste à produire des microtubercules en quantité importante et suivant un protocole rigoureusement constant. Après 40 jours de tubérisation la récolte est réalisée puis les microtubercules sont conservés à 4°C, à l'obscurité pendant des temps variables (0 à 55 semaines) (phase II). La 3^{ème} étape voit la mise en place des essais germination toujours suivant un protocole très précis et l'analyse des résultats réalisée après 3 semaines de culture à 19°C (phase IV).

B) MARQUEURS BIOMETRIQUES

La réponse en terme de germination n'est pas la même selon qu'il s'agisse de la variété Bintje ou Désirée (**figure 27**). Les microtubercules de Bintje sont plus précoces: ainsi pour 10 semaines de conservation à 4°C dans le cas de Bintje, on atteint 22 % de tubercules germés contre seulement 2 % pour Désirée. Cette différence acquise dès le début de la germination est conservée par la suite puisque, pour obtenir 80 % de germination en 21 jours à 19°C, il faut 18 et 22 semaines respectivement.

La dormance pour la variété Bintje est donc totalement levée après 18 semaines de conservation à 4°C, alors que pour la variété Désirée il faut attendre 4 semaines supplémentaires. Le temps pour passer de 10 à 90 % de microtubercules germés, qui peut être utilisé comme critère d'évaluation de la durée de dormance d'un lot de microtubercules, est de 13 semaines pour les 2 variétés.

Le suivi de la croissance des germes exprimée par leur matière fraîche a été réalisé sur chaque lot de 100 microtubercules (**figure 28**). Pour les 2 variétés, on constate un décalage entre le début de la germination et la production effective de germes ayant une vigueur de croissance importante. Il est intéressant de noter que ce décalage est d'ailleurs un peu plus important pour la variété Bintje (13 semaines) que pour la variété Désirée (10 semaines). En revanche, la production de matière fraîche augmente plus rapidement chez

Bintje que chez Désirée. Le coefficient directeur de la droite de régression est de 165 pour Bintje et de 91 pour Désirée. Après 40 semaines à 4°C pour Bintje on obtient 4500 mg de germes produits en 3 semaines à 19°C contre 2800 mg pour Désirée. Le maximum de MF est atteint après 46 et 53 semaines respectivement. Ensuite la MF des germes décroît, ceci étant certainement dû à l'état physiologique des microtubercules. En effet, dans certains cas et en particulier pour la variété Désirée, l'allongement de la période de conservation au froid provoque une tubérisation secondaire (phénomène de boulage pour 1/5 des microtubercules à 55 semaines).

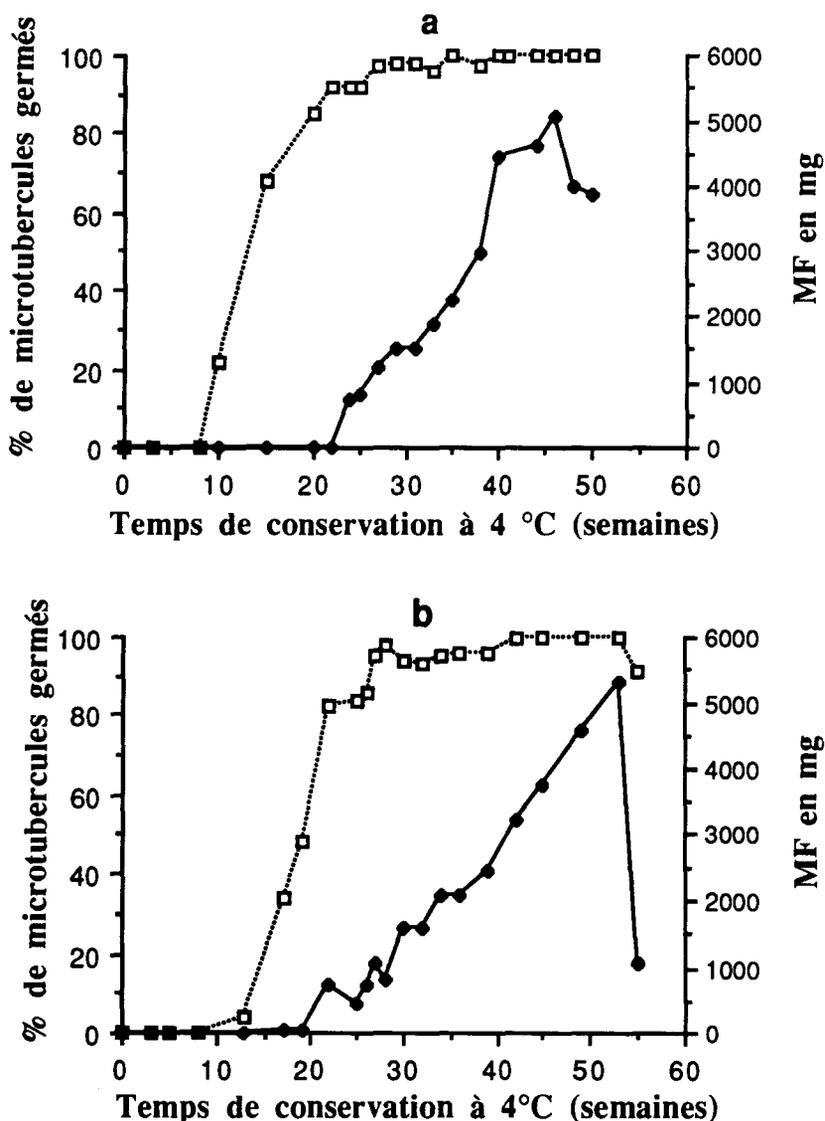


Figure 28 : Evolution du pourcentage de tubercules germés (-□-) et de la croissance (-◆-) des germes produits (en mg de MF) par 100 microtubercules pour les variétés Bintje (a) et Désirée (b) après 3 semaines de culture à 19°C et pour différents temps de conservation à 4°C.

Parallèlement à la mesure de la quantité de matière fraîche produite, nous avons calculé un rapport intégrant la masse initiale des microtubercules et la taille des germes produits (la masse des germes n'étant pas assez élevée pour être retenue au cours de notre expérience). Ce rapport taille du germe/masse du microtubercule, traduisant une vigueur de germination, est comparé pour les deux variétés à la matière fraîche pendant le même temps (figure 29).

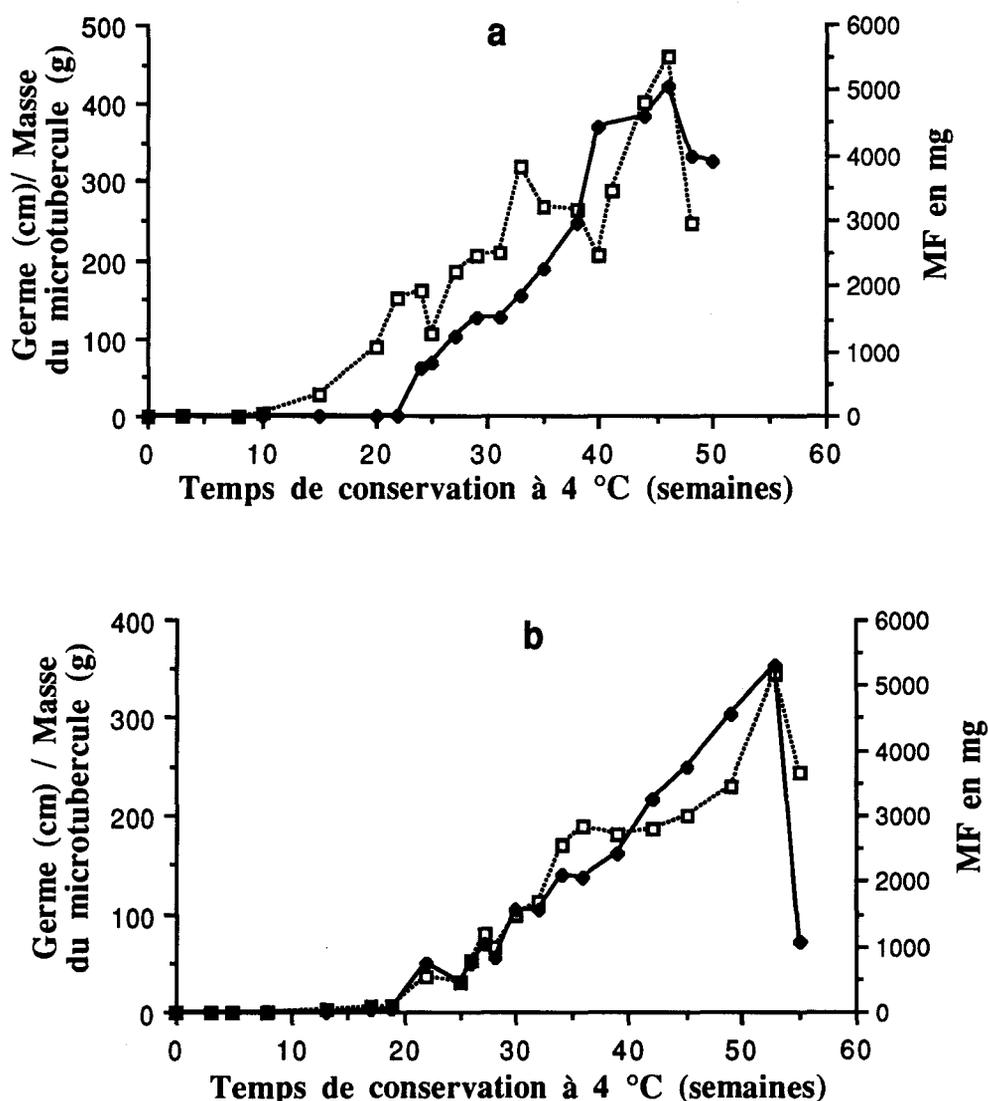


Figure 29 : Comparaison de la masse de matière fraîche (-◆-) de germes produite par 100 microtubercules en 3 semaines à 19°C et du rapport moyen (-□-) taille du germe (cm) / masse du microtubercule (g), pour différentes durées de conservation à 4°C, pour les variétés Bintje (a) et Désirée (b).

Pour la variété Désirée, le rapport suit exactement l'évolution de la matière fraîche (fig. 29 b): dans ce cas ces deux modes d'expression traduisent de la même façon la

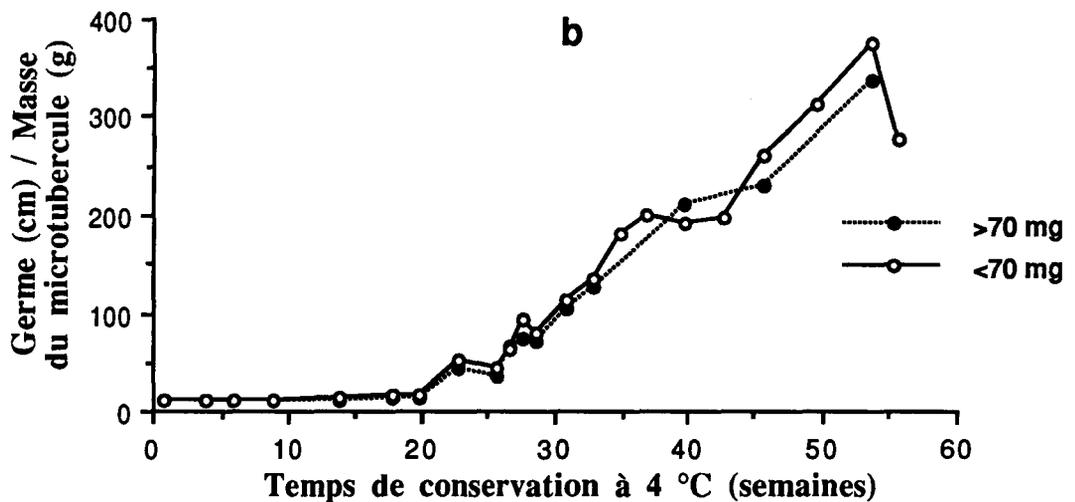
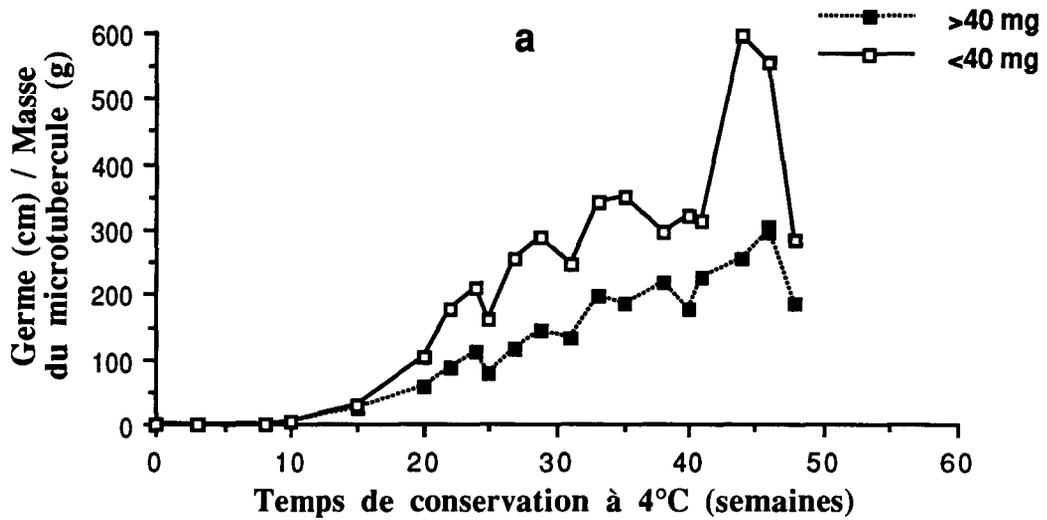


Figure 30 : Influence de la masse (en mg MF) des microtubercules sur le rapport taille du germe/masse du microtubercule pour les variétés Bintje (a) et Désirée (b). Les conditions expérimentales sont celles décrites dans la figure 29.

vigueur de germination des microtubercules. Néanmoins, la différence de production de matière fraîche entre la 53^{ème} et la 55^{ème} semaine est considérable (environ 5 fois moins) alors que cette diminution est bien moins marquée lorsqu'il s'agit du rapport taille/masse. Ce second paramètre permet de pondérer l'effet petit calibre (ou masse) des microtubercules, observé en particulier pour de longues périodes de conservation à 4°C. En effet, les microtubercules ayant un calibre de 4 mm à la récolte après un an à 4°C ont subi une déshydratation qui peut sans doute interférer avec leur état physiologique et conduire à une croissance réduite des germes.

Pour la variété Bintje (**fig. 29 a**), l'évolution du rapport taille/masse n'est pas similaire à celle de la matière fraîche. En effet, le rapport augmente régulièrement à partir de la 22^{ème} semaine et jusqu'à la 46^{ème} semaine; par contre, la masse de matière fraîche croît dès la 10^{ème} semaine. Cette augmentation de la masse de germes produits se poursuit jusqu'à la 46^{ème} semaine, mais de façon irrégulière, avec en particulier, une baisse vers la 40^{ème} semaine. Ces différences trouvent une explication dans la répartition des masses pour les deux variétés étudiées. Ainsi pour Bintje (**fig. 30 a**) on constate pour des masses supérieures à 40 mg une augmentation plus faible, en particulier pour de longues durées de conservation, que pour des masses inférieures à 40 mg. Pour la variété Désirée où la masse moyenne (70 mg) des microtubercules est supérieure à celle de Bintje (40 mg), on n'observe pas de différence pour les microtubercules de masse inférieure ou supérieure à 70 mg (**fig. 30 b**).

C) MARQUEURS PHYSIOLOGIQUES

1) Evolution des glucides dans les microtubercules au cours de la conservation à 4°C (figure 31).

1-1) Variété Bintje

La teneur en saccharose chez la variété Bintje (**fig. 31 a**) fluctue de manière importante au cours de la conservation à 4°C. La première constatation est une nette chute de sa concentration dans les semaines qui suivent la récolte où elle passe de 13,5 à 5 mg g⁻¹ MF au cours des 4 premières semaines. A partir de la 8^{ème} semaine elle retrouve son niveau initial, puis, après une nouvelle diminution, la teneur en saccharose oscille entre 7 et 11 mg g⁻¹ MF entre la 9^{ème} et la 31^{ème} semaine avec 2 pics, l'un à 21 et l'autre à 27 semaines. Entre la 31^{ème} et la 40^{ème} semaine la concentration en saccharose chute de 9 à 2,2 mg g⁻¹ MF pour finalement augmenter nettement après la 40^{ème} semaine (21mg g⁻¹ MF après 53 semaines).

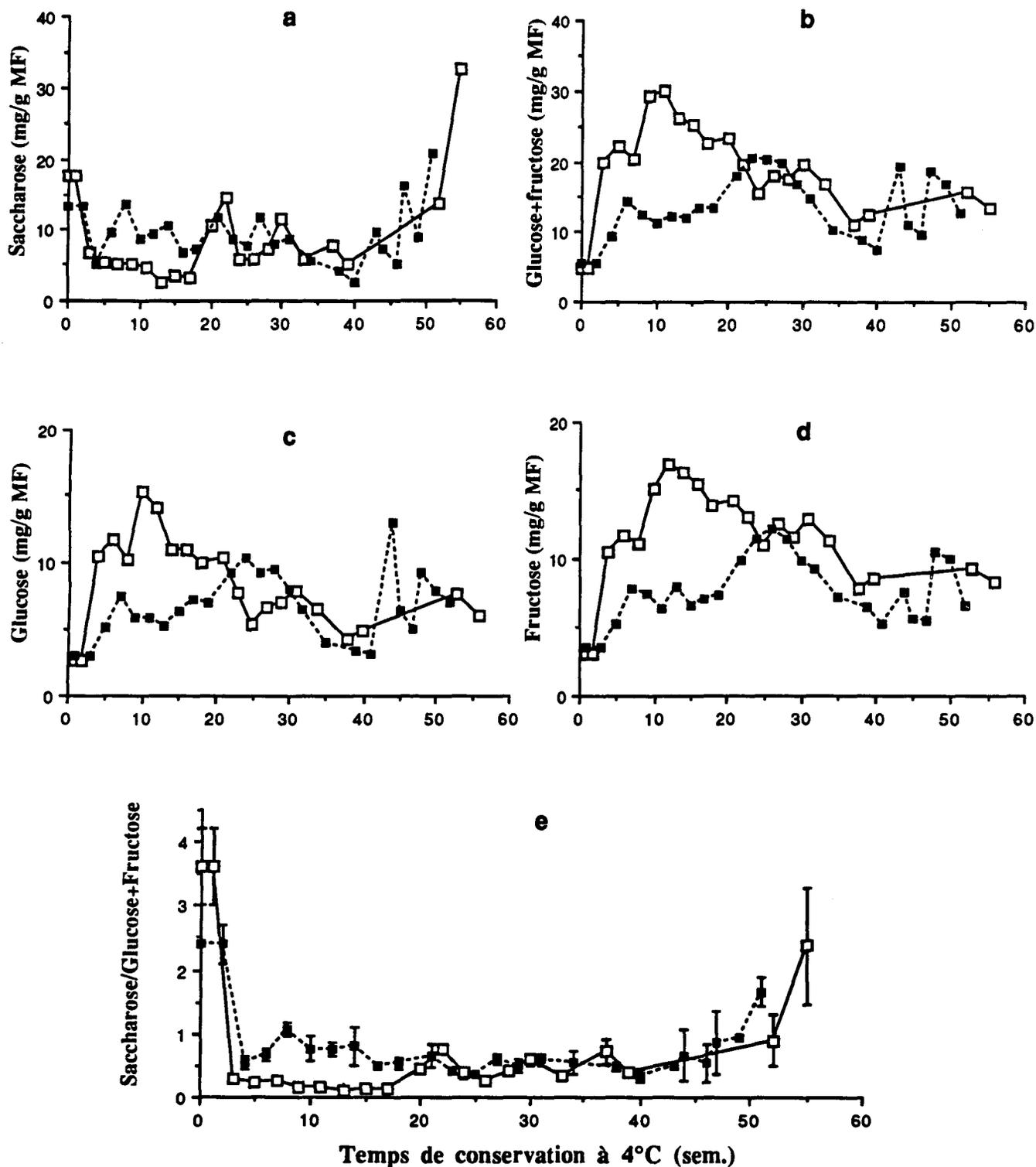


Figure 31 : Evolution des glucides solubles (a,b,c et d) et du rapport saccharose/glucose+fructose (e) au cours de la conservation à 4°C des microtubercules de la variété Bintje (-■-) et de la variété Désirée (-□-).

a, b, c et d : moyenne de 9 répétitions comprenant 5 microtubercules dans chaque cas

e : moyenne ± écart-type (n=9)

Le glucose et le fructose évoluent de manière similaire au cours de la conservation à 4°C (**fig. 31 c et d**), c'est pourquoi nous nous contenterons ici d'analyser la courbe traduisant les variations de ces deux glucides réunis (**fig. 31 b**). Dès la 2^{ème} semaine de conservation la teneur augmente (multipliée par 2,3 à la 6^{ème} semaine) puis reste stable jusqu'à la 18^{ème} semaine où là, elle connaît à nouveau une augmentation (x1,6) pour former un pic entre la 18^{ème} et la 34^{ème} semaine avec un maximum situé aux alentours de la 25^{ème} semaine. Après 40 semaines, le glucose et le fructose ont tendance à s'accumuler de nouveau avec des fluctuations qui sont dues à la croissance des germes.

Le suivi du rapport saccharose/glucose+fructose en fonction du temps de conservation à 4°C nous permet de quantifier simplement la forme prédominante de glucide disponible dans le tubercule. On constate au départ un rapport en faveur du saccharose (**fig. 31 e**), forme sous laquelle le glucide est ajouté dans le milieu de culture. Très rapidement une partie de ce saccharose est hydrolysée pour former du glucose et du fructose, ceci se traduit sur la courbe par une diminution très importante du rapport qui passe de 2,4 à 0,55 en 4 semaines. Après 6 semaines une légère augmentation avec un maximum à la 8^{ème} semaine correspond à une accumulation de saccharose et à une teneur en glucose et fructose relativement stable. Après 15 semaines et jusqu'à la 40^{ème} semaine le rapport saccharose/glucose+fructose reste voisin de 0,5; la concentration en saccharose est donc la même que celle en glucose et fructose. A partir de la 40^{ème} semaine, le rapport augmente progressivement traduisant le fait que l'accumulation de saccharose est plus importante que celle du glucose et du fructose (3 fois plus importante à 50 semaines).

1-2) Variété Désirée

Comme précédemment, une forte diminution de la teneur en saccharose est constatée durant les premières semaines de conservation à 4°C (**fig. 31 a**). En revanche, cette diminution contrairement à la variété Bintje se poursuit régulièrement jusqu'à la 17^{ème} semaine, moment où le saccharose commence à s'accumuler dans les tubercules. L'accumulation atteint un maximum vers la 22^{ème} semaine puis la teneur est voisine de 7 mg g⁻¹ MF jusqu'à la 40^{ème} semaine. Après 40 semaines on constate une très nette accumulation puisque la teneur en saccharose est pratiquement multipliée par 6 en 16 semaines (32,5 mg g⁻¹ MF après 55 semaines).

Le glucose et le fructose évoluent de manière très similaire. Après seulement 2 semaines à 4°C leur teneur augmente de manière considérable dans les microtubercules, cette accumulation de glucides réducteurs se poursuit d'ailleurs pendant une dizaine de

semaines pour atteindre un maximum (30 mg g⁻¹ MF) vers la 12^{ème} semaine. Les concentrations en glucose et fructose diminuent progressivement de la 12^{ème} à la 40^{ème} semaine puis se stabilisent aux alentours de 15 mg g⁻¹ MF après la 40^{ème} semaine.

L'évolution du rapport saccharose/glucose+fructose peut être résumée en 3 points :

- Chute très importante après 2 semaines à 4°C
- Augmentation à partir de la 17^{ème} semaine puis légères variations entre la 20^{ème} et la 40^{ème} semaine
- Considérable augmentation après 40 semaines et jusqu'à 55 semaines.

1-3) Comparaison Bintje et Désirée

Pour les deux variétés, l'évolution des glucides solubles durant les 4 premières semaines de conservation à 4°C est très similaire. En effet la teneur en saccharose diminue (**fig. 31 a**) alors que celle du glucose + fructose (**fig. 31 b**) augmente, ceci se traduit par une très forte baisse du rapport (**fig. 31 e**). Ensuite un effet variétal est mis en évidence, en particulier entre la 5^{ème} et la 25^{ème} semaine de conservation. Ainsi pour la variété Bintje la teneur en saccharose est plus importante et moins stable, en revanche l'accumulation de glucose et de fructose est plus rapide et surtout quantitativement plus importante chez la variété Désirée. Ces résultats se traduisent assez clairement par une différence du rapport saccharose/glucose+fructose. Après 25 semaines pour les deux variétés l'évolution des glucides solubles est quasi-identique ce qui se traduit par un rapport voisin de 0,5 jusqu'à la 46^{ème} semaine puis par une nette augmentation ensuite.

En conclusion, on peut dire que l'accumulation de glucides réducteurs, au cours du stockage, dépend essentiellement de la variété et que l'évolution de ces mêmes glucides en relation avec l'état physiologique (dormance et levée de dormance) des microtubercules est sans doute masquée par l'effet du froid. Le seul processus physiologique qui peut être associé à une évolution des glucides (augmentation de saccharose) est la germination qui se produit après 40 semaines à 4°C.

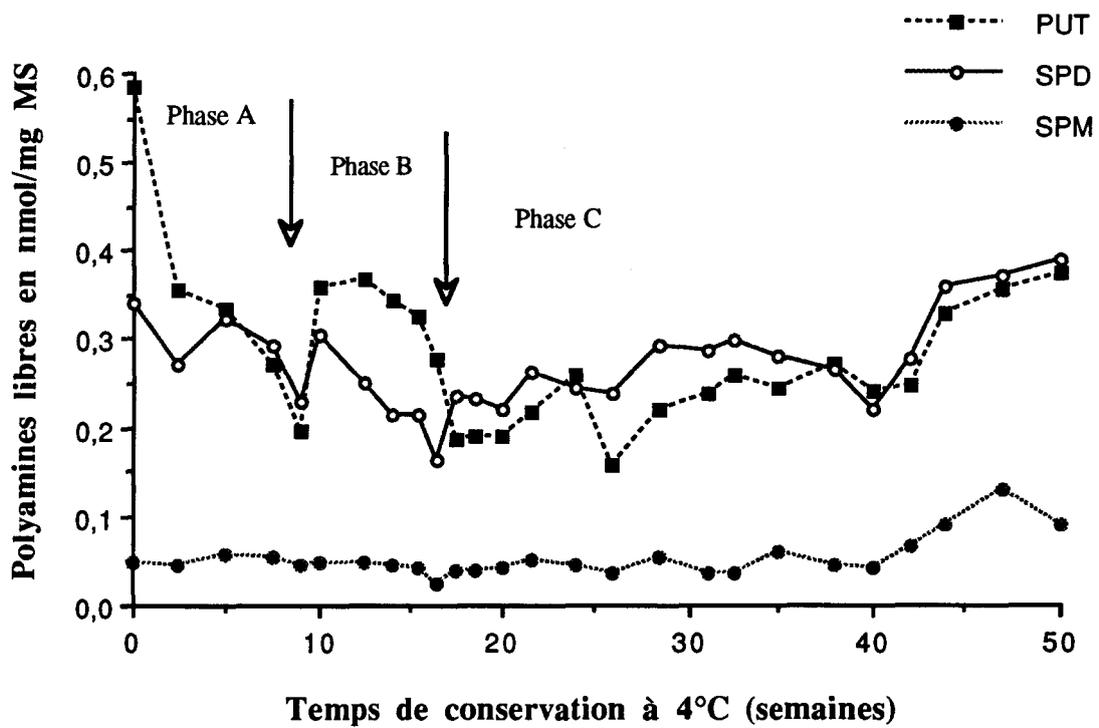


Figure 32 : Evolution des polyamines endogènes libres, putrescine (PUT), spermidine (SPD) et spermine (SPM) dans les microtubercules de la variété Désirée au cours de la conservation à 4°C. Chaque point expérimental correspond à la moyenne des résultats obtenus à partir de 2 extraits effectués sur 2 lots de microtubercules.

2) Evolution des polyamines endogènes libres

Les dosages sont effectués en cinétique, depuis la récolte jusqu'à 50 semaines de conservation à 4°C. Deux lots de microtubercules de la variété Désirée sont étudiés : ils diffèrent uniquement par leur date de production. Pour chaque lot, deux répétitions de la cinétique sont réalisées; le dosage s'effectuant lorsque tous les échantillons ont été obtenus par lyophilisation et conservation à -20°C.

Au cours de la conservation à 4°C, la putrescine et la spermidine sont quantitativement les polyamines les plus importantes (**figure 32**). La concentration en spermine est toujours plus faible que celles de la putrescine et de la spermidine et n'est pas modifiée de façon importante au cours de la conservation, exception faite de l'augmentation régulière de sa teneur à partir de 40 semaines. La concentration de la putrescine passe de 0,59 à 0,20 nmoles mg⁻¹ MS durant les 9 premières semaines de conservation à 4°C (phase A). Il est à noter que la phase A correspond à une phase de dormance des microtubercules pendant laquelle aucune germination n'est observée à 19°C. La teneur en putrescine présente un pic entre la 10^{ème} et la 17^{ème} semaine de conservation (phase B) avec un maximum situé à la 13^{ème} semaine, c'est à dire au moment où les premières germinations sont visibles à 19°C. Après 18 semaines (phase C) sa teneur reste stable durant 4 semaines environ puis connaît à nouveau une légère augmentation avec un maximum de 0,26 nmoles mg⁻¹ MS pour 24 semaines, puis une baisse pour atteindre 0,16 nmoles mg⁻¹ MS à 26 semaines. Ensuite, la teneur augmente régulièrement, jusqu'à la fin de la période de conservation (multipliée par 2,3) parallèlement à l'accroissement de la vigueur de germination. La concentration en spermidine présente une évolution parallèle à celle de la putrescine avec en général des variations d'une moins grande amplitude.

Une comparaison des dosages effectués dans les 2 lots de microtubercules pour chacune des polyamines met en évidence une variabilité de la concentration en polyamines endogènes (**fig. 33 a, b et c**). Par exemple, la concentration en putrescine pour le lot 1 décroît de manière moins importante jusqu'à la 9^{ème} semaine et présente ensuite un pic plus réduit par rapport au lot 2 (**fig. 33 a**). Des différences sont également constatées entre 20 et 30 semaines. Ainsi le lot 1, avec une valeur anormalement basse à la 26^{ème} semaine, présente des teneurs en putrescine plus importantes que le lot 2.

L'évolution de la spermidine pour les 2 lots (**fig. 33 b**) présente des différences moins importantes avec, néanmoins, pour quelques dosages (5, 24, 26, 40 et 41 semaines) des concentrations qui ne sont pas identiques. Au niveau de la spermine (**fig. 33 c**) le lot 2 présente 2 pics (5 et 35 semaines) qui n'ont pas été détectés chez le lot 1.

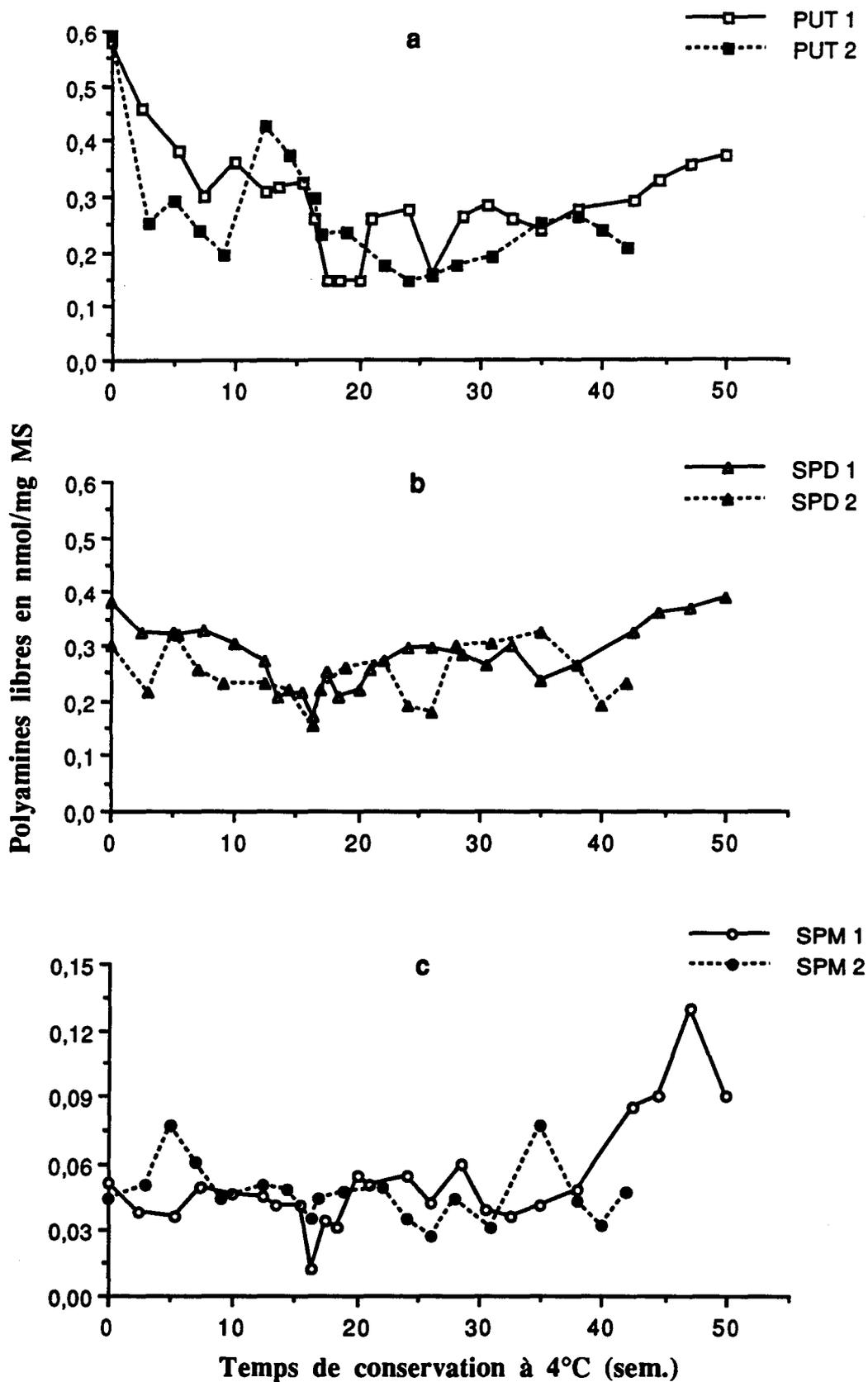


Figure 33 : Comparaison de l'évolution de chacune des polyamines endogènes libres dans 2 lots différents (1 et 2) de microtubercules de la variété Désirée, conservés à 4°C : putrescine (a), spermidine (b) et spermine (c).

En conclusion, on peut dire que le contenu en polyamines libres, en particulier de la putrescine, diminue durant la période où aucune germination n'est visible et augmente au moment où les premières germinations sont observées. De même, il existe une corrélation entre la vigueur de germination et la teneur en polyamines, après 20 semaines. Les changements dans le contenu en polyamines sont donc des marqueurs reflétant les changements physiologiques pendant les phases de dormance, de levée de dormance et de germination des microtubercules.

3) Activités enzymatiques au cours de la conservation des microtubercules

3-1) Les peroxydases

Au cours de la conservation à 4°C, les peroxydases connaissent des variations d'activité (figure 34).

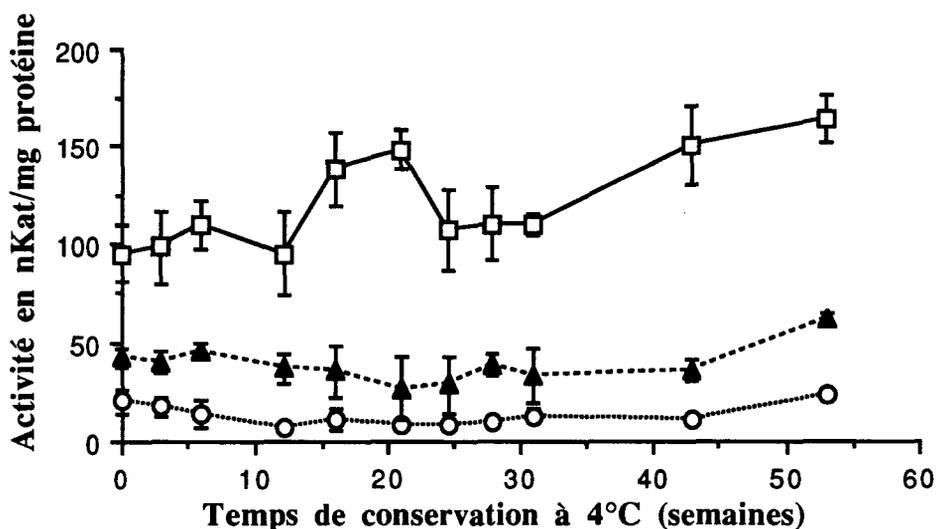


Figure 34 : Evolution des peroxydases solubles (□), covalentes (▲) et ioniques (○) dans les microtubercules de la variété Désirée au cours de la conservation à 4°C. Chaque point expérimental correspond à la moyenne des résultats obtenus à partir de 2 extraits effectués sur 2 lots de microtubercules.

Les variations sont détectées principalement au niveau des peroxydases solubles qui voient leur activité former un pic entre la 12^{ème} et la 24^{ème} semaine de conservation à 4°C, avec un maximum entre la 16^{ème} et la 21^{ème} semaine (environ 150 nKat mg⁻¹ protéine). Notons que ce maximum correspond à la fin de la période de dormance. Entre la 24^{ème} et la 31^{ème} semaine l'activité est stable puis connaît ensuite une augmentation

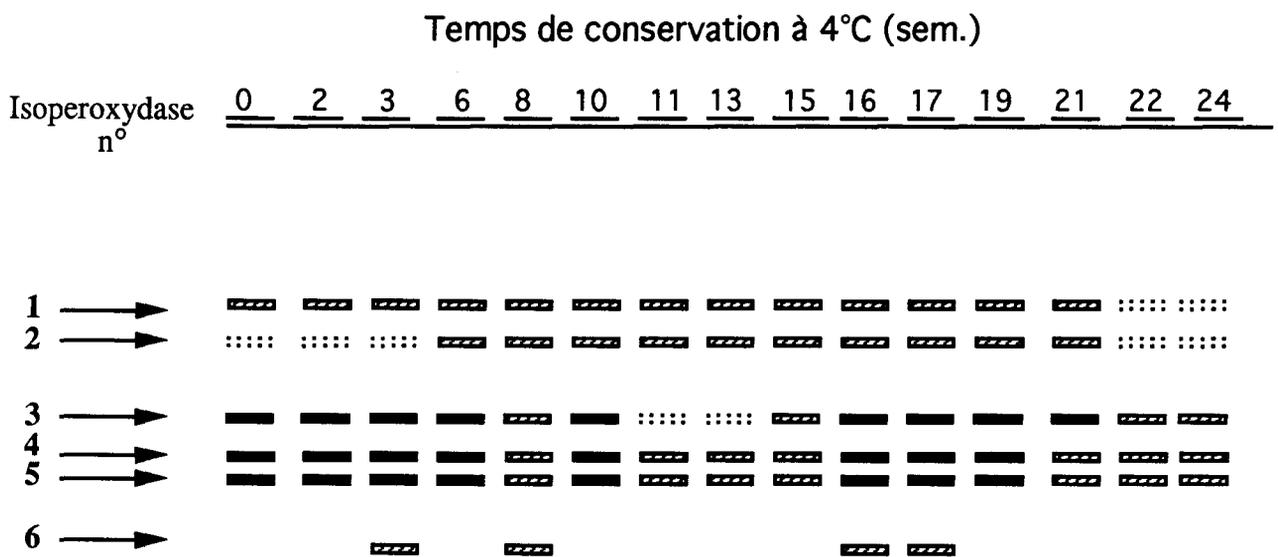


Figure 35 : Profil électrophorétique des isoperoxydases anodiques des microtubercules de la variété Désirée au cours de la conservation à 4°C.

régulière pour atteindre 170 nKat mg⁻¹ protéine après 53 semaines de conservation à 4°C. Cette augmentation d'activité en fin de période de conservation est corrélée à l'augmentation de la vigueur germinative. L'augmentation d'activité est également décelable au niveau des peroxydases covalentes et ioniques.

L'analyse des profils électrophorétiques des isoperoxydases montre la présence de 6 isoenzymes anodiques (**figure 35**) durant la conservation à 4°C. L'intensité des isoperoxydases évolue au cours du temps. Ainsi, l'isoperoxydase 1 n'est plus discernable à 22 et 24 semaines. C'est également le cas de l'isoperoxydase 2 qui n'est observable qu'au delà de 3 semaines de conservation à 4°C. L'isoperoxydase 6 a une forte intensité pour 3, 8, 16 et 17 semaines et est quasi-inexistante pour les autres temps. Les isoperoxydases 3, 4 et 5 sont dans tous les cas présentes avec une intensité maximale, en particulier pour l'isoperoxydase 3, pour 16, 17, 19 et 21 semaines, période qui correspond d'ailleurs au maximum du pic d'activité observée par dosage (**figure 34**).

Les résultats obtenus nous permettent, pour la variété Désirée, d'établir une relation entre une augmentation de certaines activités isoperoxydasiques telle que la bande 3 et un temps de conservation à 4°C. Ainsi la période de 16 à 21 semaines de conservation est caractérisée par une augmentation de l'activité des peroxydases solubles et par l'intensification d'une isoenzyme (isoperoxydase 3). Au niveau physiologique cette phase correspond à la fin de la période de dormance. Notons qu'après 30 semaines l'activité des peroxydases augmente régulièrement.

Ainsi, l'augmentation de l'activité peroxydasique témoigne de la fin de la dormance et de l'augmentation de la vigueur germinative.

3-2) Les estérases

La patatine, principale protéine de réserve des tubercules pour laquelle aucun rôle physiologique n'a définitivement été attribué, présente une forte activité estérasique (lipide-acyl hydrolase). C'est pourquoi nous avons pensé que l'étude des estérases méritait toute notre attention.

La révélation simultanée des α et β estérases anodiques (**figure 36**) montre la présence de 3 ou 4 isoenzymes suivant les cas, pour les α estérases (isoestérases 1, 2, 3 et 4, de couleur brune sur les gels d'acrylamide) et de 3 isoenzymes pour les β estérases (isoestérases 5, 6 et 7, de couleur rose sur les gels d'acrylamide).

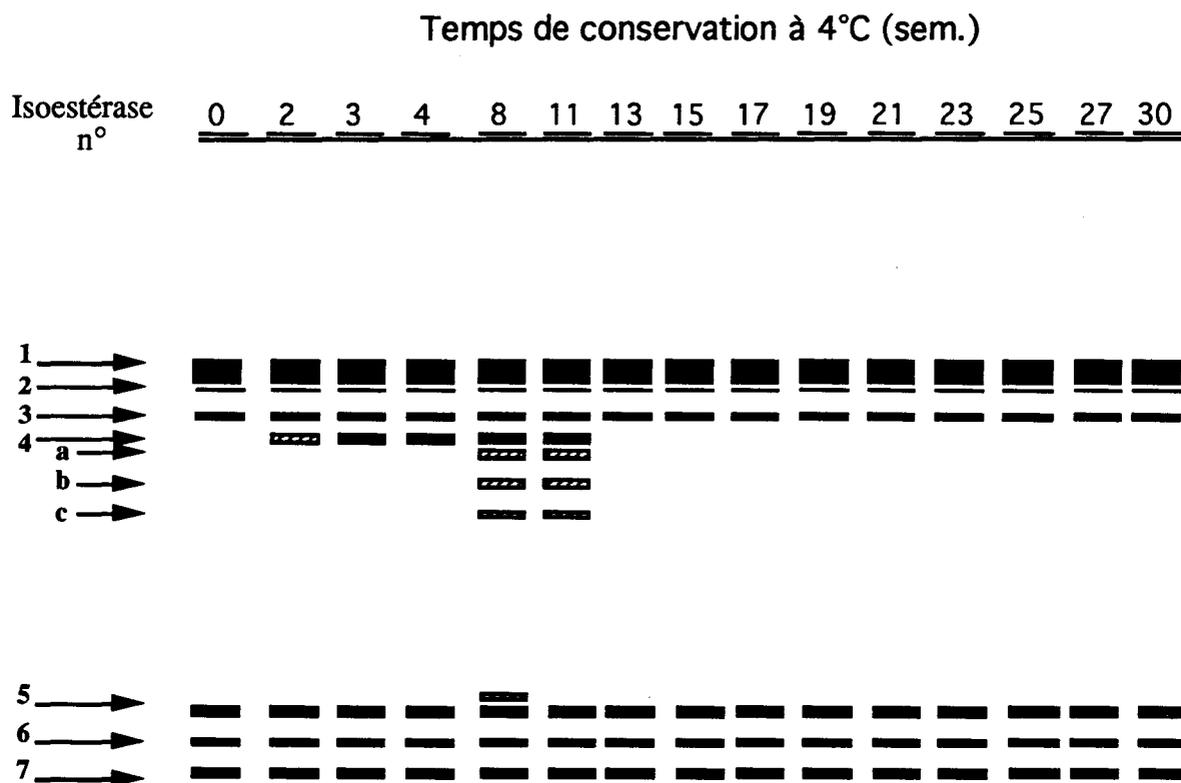


Figure 36 : Profil électrophorétique des estérases α et β dans les microtubercules de la variété Désirée au cours de la conservation à 4°C.

Pour les β estérases, aucune modification n'est observée au cours de la conservation à 4°C, si ce n'est pour 8 semaines la présence d'une isoenzyme supplémentaire. En revanche, pour les α estérases il est possible de distinguer 2 phases bien distinctes en relation avec le nombre d'isoenzymes. De la 2^{ème} à la 11^{ème} semaine de conservation 4 isoestérases sont observables. Pour 8 et 11 semaines il est même possible de distinguer 3 isoestérases supplémentaires (isoestérases 4a, 4b et 4c).

L'étude des estérases durant les 30 premières semaines de conservation à 4°C des microtubercules de la variété Désirée nous a permis de mettre en évidence l'expression d'une isoestérase α (isoestérase 4) détectable dès la 2^{ème} semaine et qui disparaît vers la 11^{ème} semaine. La phase de dormance des microtubercules pendant laquelle aucune germination n'est observée à 19°C est donc caractérisée par la présence d'une isoestérase

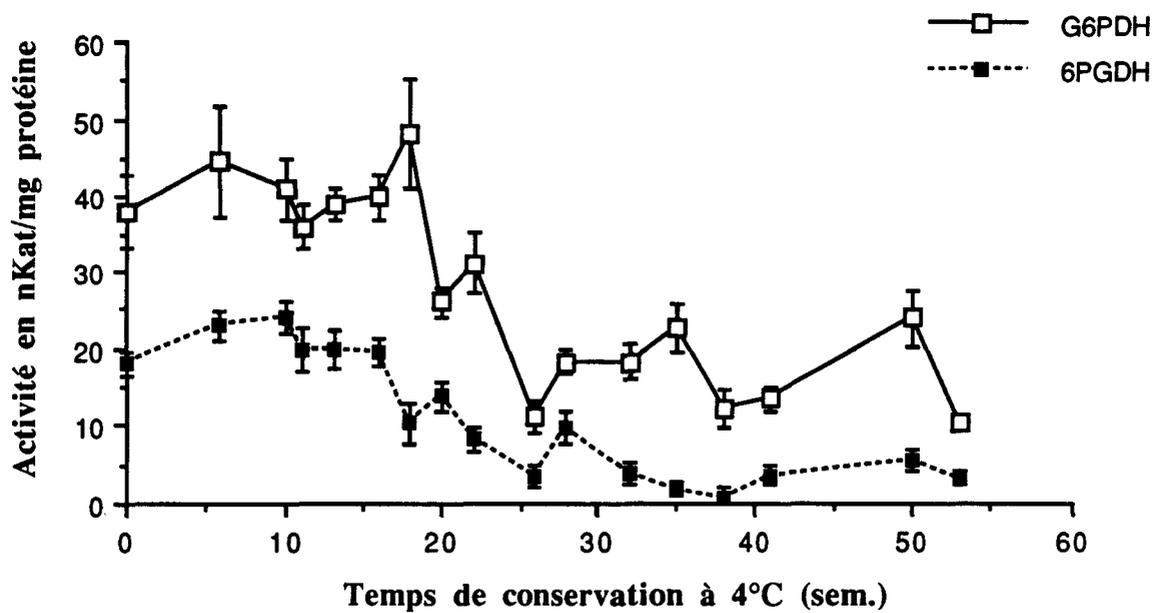


Figure 37 : Evolution des activités G6PDH (□) et 6PGDH (■) dans les microtubercules de la variété Désirée au cours de la conservation à 4°C. Chaque point expérimental correspond à la moyenne des résultats obtenus à partir de 2 extraits effectués sur 2 lots de microtubercules.

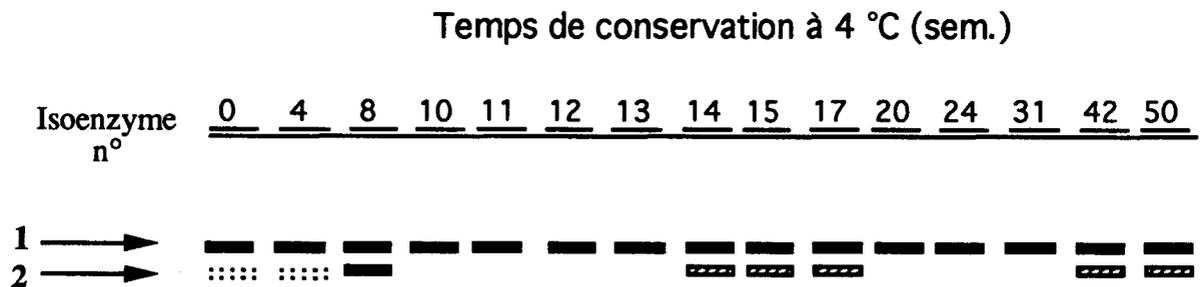


Figure 38: Profil électrophorétique de la G6PDH dans les microtubercules de la variété Désirée au cours de la conservation à 4°C.

supplémentaire. Lorsque les microtubercules commencent à germer cette isoestérase n'est plus détectée. L'absence ou la présence de cette isoestérase α constitue donc un bon marqueur de l'aptitude à germer ou non des microtubercules.

3-3) Enzymes de la voie des pentoses phosphate

Les dosages sont effectués en cinétique, depuis la récolte jusqu'à 53 semaines de conservation à 4°C.

Au cours de la cinétique l'activité de la 6PGDH est toujours plus faible que celle de la G6PDH (**figure 37**). L'analyse de la **figure 37** qui traduit l'évolution des activités enzymatiques d'extraits issus de microtubercules non lyophilisés avant dosage, met en évidence une activité, en particulier G6PDH, relativement élevée durant les 18 premières semaines de conservation à 4°C. Après la 18^{ème} semaine l'activité décroît considérablement pour atteindre une valeur qui est divisée par 3,6 pour la G6PDH et 6,5 pour la 6PGDH par rapport à la moyenne des 16 premières semaines. Après une légère augmentation de l'activité des deux enzymes vers 28 semaines, l'activité G6PDH reste relativement constante autour d'une moyenne de 17 nKat mg⁻¹ protéine, alors que celle de la 6PGDH chute d'abord jusqu'à la 38^{ème} semaine (0,7 nKat mg⁻¹) pour ensuite augmenter jusqu'à la fin de la période de conservation.

L'analyse des profils électrophorétiques de la G6PDH met en évidence la présence de deux isoenzymes (**figure 38**) durant la conservation à 4°C. L'intensité des isoenzymes est étroitement corrélée à l'activité mesurée (**figure 37**); ainsi l'isoenzyme 2 n'est visible que pour des temps de conservation de 8,14,15,17, 42 et 50 semaines.

Au cours de la conservation à 4°C, les activités G6PDH et 6PGDH évoluent en relation avec l'âge physiologique des microtubercules; d'une manière générale les activités sont élevées durant les 20 premières semaines avec deux maxima, l'un aux alentours de la 8^{ème} et l'autre de la 17^{ème} semaine. Ceci se traduisant d'ailleurs au niveau des profils électrophorétiques par la présence d'une isoenzyme supplémentaire (isoenzyme 2). Le premier maximum précède la phase où les premières germinations sont observées et le second se produit juste avant la fin de la période de dormance des microtubercules. Les 20 premières semaines correspondent à la durée de la dormance des microtubercules; cette phase de dormance est donc caractérisée par une activité élevée des enzymes de la voie des pentose phosphates. Après 20 semaines, les activités sont plus réduites, avec néanmoins la présence de la bande 2 pour des temps de conservation de 42 et 50 semaines.

4) Evolution des protéines au cours de la conservation des microtubercules

L'électrophorèse bidimensionnelle des protéines en conditions dénaturantes, technique hautement résolutive, nous permet de suivre l'évolution de plusieurs centaines de polypeptides extraits des microtubercules de Pomme de terre (variété Désirée) au cours de leur conservation à 4°C. Les cartes polypeptidiques des différents stades étudiés sont effectuées en cinétique depuis la date de récolte des microtubercules (S0) jusqu'à 25 semaines de conservation (S25). Cette période comprend les phases de dormance et de levée de dormance des microtubercules. Ainsi, nous avons caractérisé les différences qualitatives et quantitatives au cours des divers stades physiologiques des microtubercules. Pour tous les stades étudiés (notés S avec un chiffre en indice représentant la durée exprimée en semaines de conservation à 4°C) les polypeptides sont répartis de façon homogène dans une gamme de pH allant de 3,5 à 9 avec des masses moléculaires comprises entre 10 et 120 kD. Chaque profil polypeptidique, correspondant à un stade donné de conservation à 4°C est comparé au stade précédent afin de mettre en évidence les modifications protéiques susceptibles d'être impliquées dans les phénomènes de dormance et de levée de dormance.

Les effets de la conservation à 4°C des microtubercules sont de 4 types :

- augmentation de la concentration de certains polypeptides (symbolisée sur les figures par ▲)
- diminution de la concentration de certains polypeptides (symbolisée par ▽ sur le profil du stade précédent)
- apparition de nouveaux polypeptides (symbolisée par ○)
- disparition de polypeptides (symbolisée par □ sur le profil du stade précédent)

Les variations du nombre total de protéines durant les 25 semaines de conservation à 4°C sont limitées. En effet, l'analyse des profils polypeptidiques révèle la présence de 1229 polypeptides lors de la récolte, 1236 après 2 semaines de conservation à 4°C, 1234 jusqu'à la 9^{ème} semaine, 1235 de la 10^{ème} à la 17^{ème}, 1233 de la 18^{ème} à la 24^{ème} et 1235 à partir de la 25^{ème} (tableau 17).

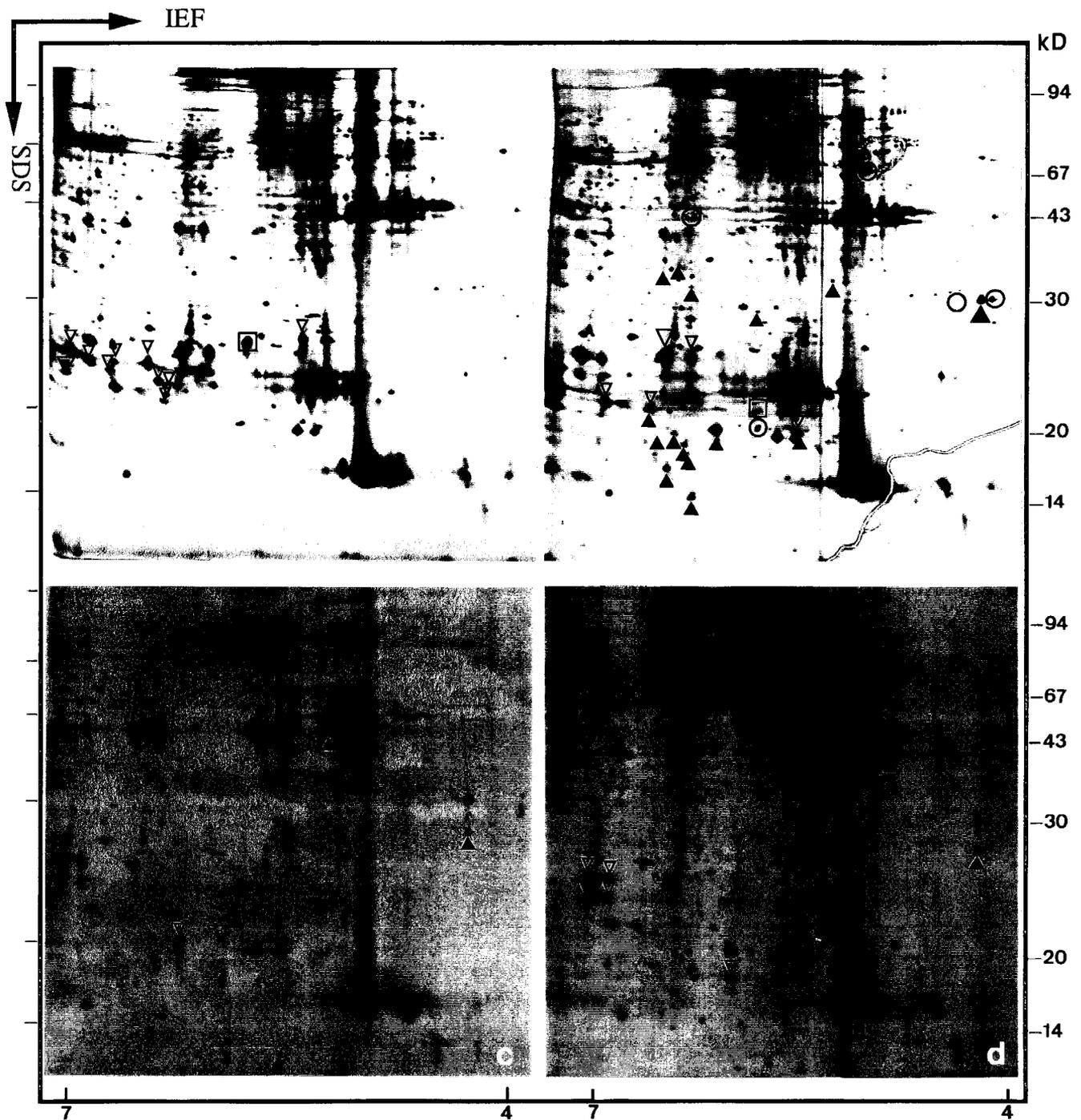


Figure 39 : Electrophorégrammes bidimensionnels des protéines extraites à partir de microtubercules de la variété Désirée; (a) microtubercules au moment de la récolte (S0); microtubercules conservés à 4°C pendant : (b) 2 semaines (S2); (c) 4 semaines (S4); (d) 6 semaines (S6).

Les diminutions et augmentations de la concentration en polypeptides sont respectivement représentées par ▽ et ▲ , les disparitions et apparitions par □ et ○. Les polypeptides voisins peuvent être regroupés à l'intérieur d'un même symbole. Les chiffres à droite indiquent les masses moléculaires en kD.

La conservation à 4°C des microtubercules de la variété Désirée est accompagnée de modifications quantitatives et qualitatives dans les cartes polypeptidiques (**tableau 17**).

Semaine \ Nb protéines	S0	S2	S4	S6	S9	S10	S12	S13	S17	S18	S20	S25
Total	1229	1236	1234	1234	1234	1235	1235	1235	1235	1233	1233	1234
Disparition		2	2	0	0	0	0	0	0	2	0	1
Apparition		9	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2
Augmentation		15	4	5	3	4	0	6	0	2	0	1
Diminution		13	8	1	5	11	2	2	4	3	1	2

Tableau 17 : Evolution du nombre de protéines au cours de la conservation à 4°C des microtubercules de la variété Désirée.

Après 2 semaines de conservation à 4°C, 2 polypeptides ne sont plus détectés, 9 nouveaux polypeptides sont visualisés, 15 voient leur concentration augmentée alors que 13 voient leur concentration diminuée par rapport au stade précédent S0 (**fig. 39 a et b**). Après 4 semaines, 2 nouveaux polypeptides ont disparu, 4 voient leur concentration augmentée et 8 voient leur concentration diminuée (**fig. 39 b et c**). De la 4^{ème} (S4) à la 9^{ème} semaine (S9) le nombre total de polypeptides reste constant. Seules des variations quantitatives ont pu être mises en évidence. Ainsi après 6 semaines (S6), 5 polypeptides voient leur concentration augmentée et 1 polypeptide voit sa teneur diminuée (**fig. 39 c et d**) par rapport au stade précédent (S4). Au stade S9, 3 polypeptides voient leur concentration augmentée alors que 5 voient leur concentration diminuée par rapport à S6 (**fig. 39 d et 40 a**). A la 10^{ème} semaine (S10), 1 nouveau polypeptide est détecté, 4 voient leur concentration augmentée et 11 voient leur concentration diminuée (**fig. 40 a et b**) par rapport à S9.

De la 10^{ème} (S10) à la 17^{ème} semaine (S17) seuls des changements d'ordre quantitatif sont constatés. A la 13^{ème} semaine (S13) 6 polypeptides voient leur concentration augmentée par rapport à S12 (**fig. 40 c et d**). Alors que 2 polypeptides voient leur concentration diminuée à la 12^{ème} semaine (S12), 2 autres polypeptides sont accumulés en quantité moindre à S13 et 4 à S17 (**fig. 40 c, d et 41 a**).

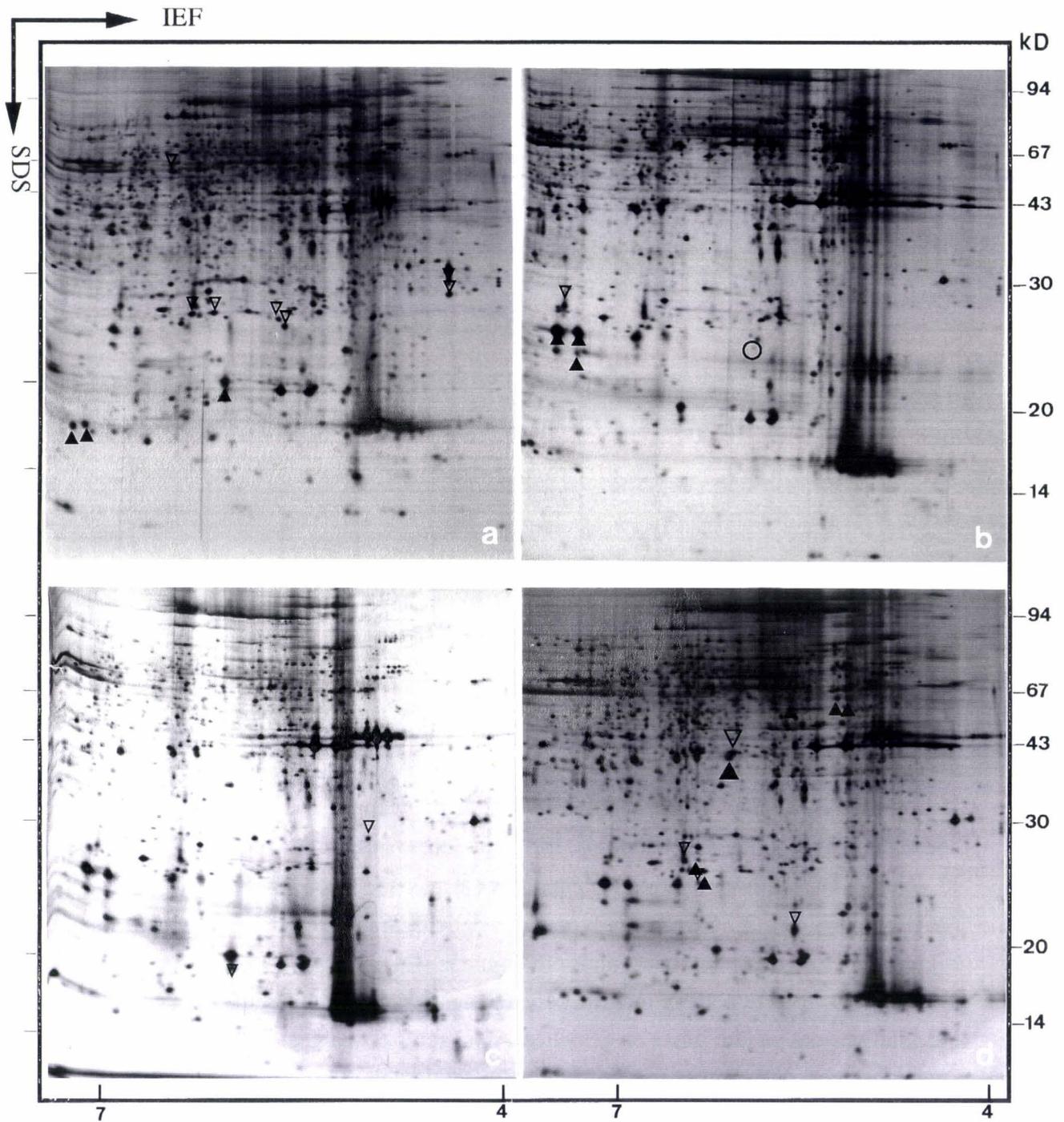


Figure 40 : Electrophorégrammes bidimensionnels des protéines extraites à partir de microtubercules de la variété Désirée; microtubercules conservés à 4°C pendant : (a) 9 semaines (S9); (b) 10 semaines (S10); (c) 12 semaines (S12); (d) 13 semaines (S13).
 Les diminutions et augmentations de la concentration en polypeptides sont respectivement représentées par ∇ et ▲ , les disparitions et apparitions par ◻ et ○. Les chiffres à droite représentent les masses moléculaires en kD.

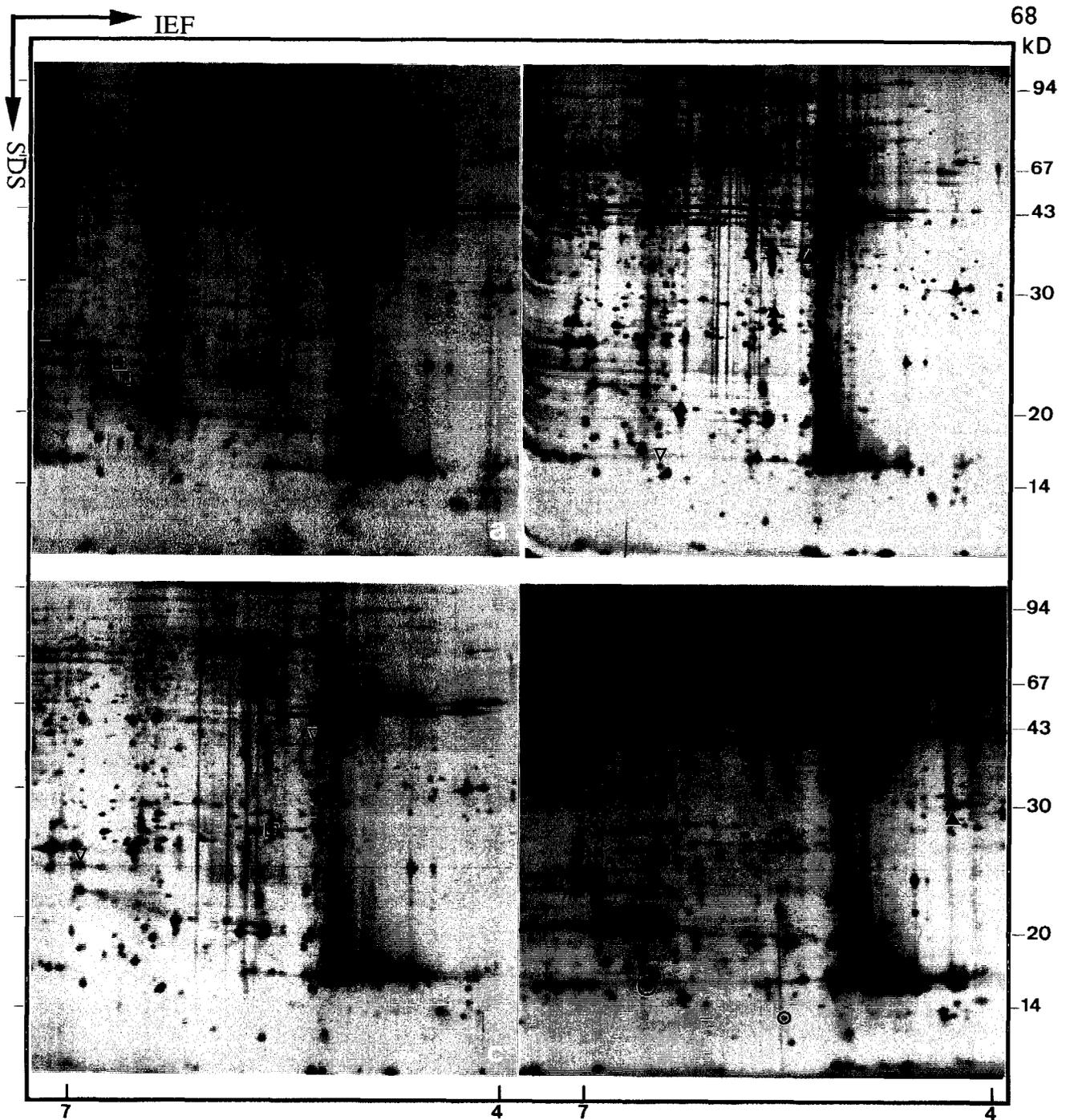


Figure 41 : Electrophorégrammes bidimensionnels des protéines extraites à partir de microtubercules de la variété Désirée; microtubercules conservés à 4°C pendant : (a) 17 semaines (S17); (b) 18 semaines (S18); (c) 20 semaines (S20); (d) 25 semaines (S25).

Les diminutions et augmentations de la concentration en polypeptides sont respectivement représentées par ▽ et ▲ , les disparitions et apparitions par □ et ○. Les chiffres à droite indiquent les masses moléculaires en kD.

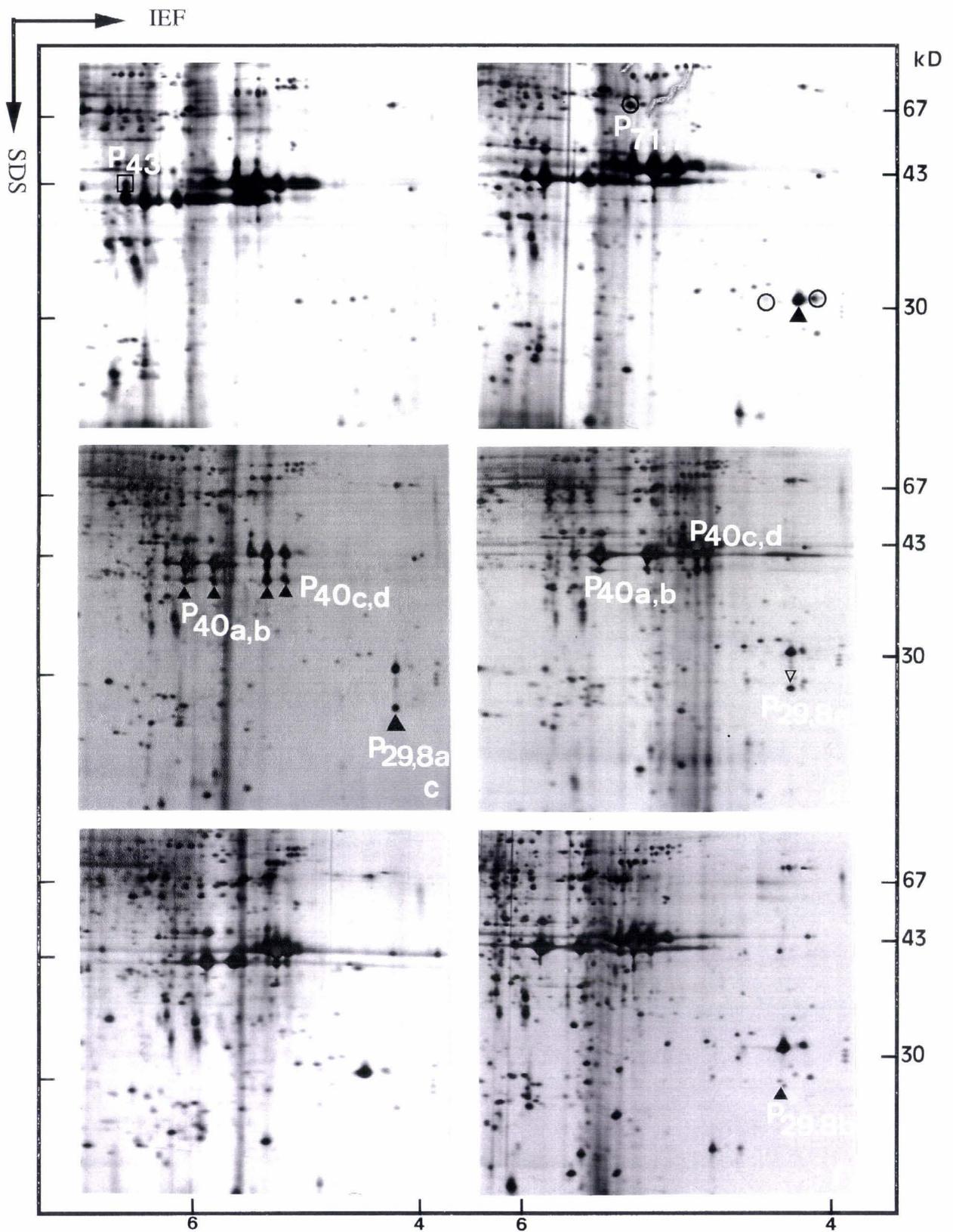


Figure 42 : Electrophorégrammes bidimensionnels des protéines extraites à partir de microtubercules de la variété Désirée. La zone présentée se situe dans une gamme de masse moléculaire allant de 25 à 80 kD et dans une gamme de pH allant de 3,5 à 6,5 unités de pH. (a) microtubercules au moment de la récolte (S0); microtubercules conservés à 4 °C pendant : (b) 2 semaines (S2); (c) 6 semaines (S6); (d) 9 semaines (S9); (e) 10 semaines (S10); (f) 18 semaines (S18).

Les diminutions et augmentations de la concentration en polypeptides sont respectivement représentées par ∇ et \blacktriangle , les disparitions et apparitions par \square et \circ . Les chiffres à droite indiquent les masses moléculaires en kD.

A la 18^{ème} semaine (S18), 2 polypeptides ne sont plus détectés, 2 voient leur concentration augmentée et 3 voient leur concentration diminuée (**fig. 41 a et b**). A la 20^{ème} semaine (S20) nous avons 1 polypeptide dont la concentration diminue par rapport à S18 (**fig. 41 b et c**). A la 25^{ème} semaine (S25), 1 polypeptide n'est plus détecté alors que 2 apparaissent, 2 voient leur concentration diminuée et 1 voit sa teneur augmentée par rapport à S20 (**fig. 41 c et d**).

D'une manière générale on peut dire que les modifications des cartes protéiques, au cours de la conservation de 25 semaines à 4°C des microtubercules, sont assez peu nombreuses. La plupart d'entre elles se produisent d'ailleurs en début de période de conservation : 48 % des modifications sont en effet détectées à la 2^{ème} et 4^{ème} semaine. Les disparitions et apparitions de polypeptides après 2 semaines à 4°C représentent 58 % du total.

Une zone se situant dans une gamme de masse moléculaire allant de 25 à 80 kD et dans une gamme de pH allant de 3,5 à 6,5 unités pH a retenu plus particulièrement notre attention (**figure 42**). La lettre P représente un polypeptide d'intérêt particulier et le chiffre en indice la masse moléculaire (en kD).

Après 2 semaines (S2) de conservation à 4°C, 4 polypeptides P_{71,7}, P_{31a}, P_{31b} et P_{31c} apparaissent dans les microtubercules; en revanche, un seul polypeptide (P₄₃) disparaît (**fig. 42 a et b**). L'autre fait marquant est l'importante augmentation de la concentration d'un polypeptide P_{31d} (**fig. 42 b**). Ce polypeptide, peu détecté au moment de la récolte, augmente en concentration après 2 semaines à 4°C et reste abondant durant toute la phase de conservation des microtubercules au froid. Après 6 semaines (S6) à 4°C, 5 nouveaux polypeptides P_{40a}, P_{40b}, P_{40c}, P_{40d} et P_{29,8a} (**fig. 42 c**) voient leur concentration augmentée de manière considérable. Ces polypeptides présentent une forte concentration jusqu'à la 9^{ème} semaine (**fig. 42 d**) et diminuent ensuite très fortement. Parallèlement à cette augmentation de concentration, après la 2^{ème} semaine, on constate une nette diminution en concentration d'un groupe de polypeptides P₄₄ d'une masse moléculaire d'environ 44 kD (**fig. 42 b et c**).

Après 10 semaines (**fig. 42 e et f**), aucune modification ne se produit au niveau des polypeptides cités précédemment. Un seul polypeptide P_{29,8b} (**fig. 42 f**) voit sa concentration augmentée à partir de la 18^{ème} semaine (S18).

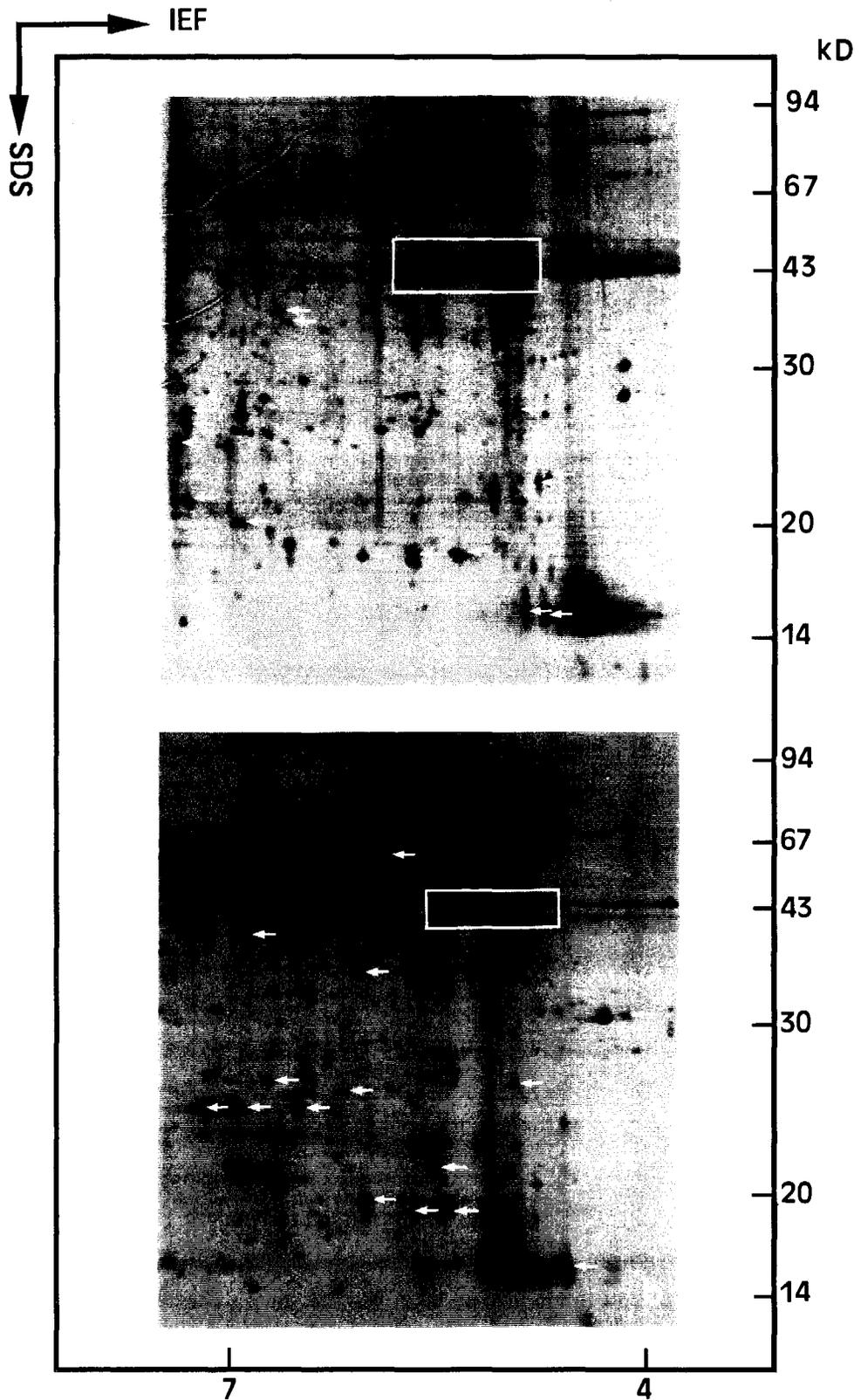


Figure 43 : Electrophorégrammes bidimensionnels des protéines extraites à partir de microtubercules de la variété Bintje (a) et Désirée (b) après 12 semaines à 4°C. Les flèches indiquent des différences quantitatives ou qualitatives entre les 2 variétés. Les rectangles regroupent des polypeptides situés dans une gamme de masse moléculaire allant de 40 à 45 kD. Les chiffres à droite représentent les masses moléculaires en kD.

Deux constatations importantes ressortent de l'analyse des profils polypeptidiques. D'une part le polymorphisme observé est limité lorsqu'il s'agit d'extraits protéiques issus d'une même variété pour des stades différents de conservation à 4°C et d'autre part il est considérable lorsque 2 variétés sont comparées (**figure 43**).

Les variations quantitatives et qualitatives des protéines sont abondantes entre les variétés Bintje (**fig. 43 a**) et Désirée (**fig. 43 b**). Les plus importantes se situent au niveau de polypeptides situés dans une gamme de masse moléculaire allant de 40 à 45 kD et dans une gamme de pH allant de 5 à 6 unités pH. En effet, le nombre de polypeptides détectés visuellement dans cette zone est de 23 pour la variété Bintje et de seulement 13 pour la variété Désirée. De nombreuses autres différences sont aisément visualisées (**figure 43**). L'électrophorèse bidimensionnelle nous paraît donc être un bon outil pour l'identification des 2 variétés de Pomme de terre.

I) LA DORMANCE ET SA LEVEE

La définition actuelle de la dormance d'un tubercule de Pomme de terre correspond à un état physiologique pour lequel la croissance des germes est impossible même sous des conditions idéales de germination (obscurité, 15-20°C et une humidité relative élevée) (Reust, 1986).

Van Ittersum (1992c) considère que la fin de la dormance est atteinte lorsque 80% des tubercules ont germé, ce qui nécessite de préciser le délai, qu'il nomme paramètre d'étendue de la durée de la dormance, pour passer de 10 à 90% de germination.

Les tubercules obtenus en champs pour les deux variétés étudiées (Bintje et Désirée) sont connus pour présenter des durées de dormance différentes. Ainsi Bintje, classée dans les variétés à dormance moyenne (comprise entre 95 et 115 jours), a une dormance de 109 jours (16 sem.), alors que Désirée a une dormance longue de 134 jours (19 sem.) (Van Ittersum et Scholte, 1992b). Cette durée de dormance est exprimée en nombre de jours après destruction des parties aériennes de la plante. Lorsque la durée de la dormance est exprimée en nombre de jours après l'initiation des tubercules, Van Ittersum et Scholte (1992a) rapportent une période de 191 jours de dormance à 18°C (27,3 sem.) pour la variété Désirée et une durée de 26 jours pour passer de 10 à 90 % de germination.

Après leur récolte, les microtubercules que nous obtenons *in vitro* présentent respectivement une durée de dormance de 18 et 22 semaines pour Bintje et Désirée (**figure 27**). En revanche, 13 semaines sont nécessaires pour passer de 10 à 90 % de germination chez les 2 variétés. Dans le cadre de nos travaux, l'initiation de la tubérisation s'effectue 7 jours après le début de la culture et la récolte est réalisée 5 semaines après l'initiation. Dans ce schéma, les microtubercules de la variété Désirée présentent donc une période de dormance, exprimée en nombre de jours après l'initiation de la tubérisation, de 27 semaines (22 + 5), ce qui correspond exactement aux résultats décrits précédemment sur des tubercules de la même variété mais obtenus en champs. Chez la variété Bintje, la durée de la dormance exprimée de la même manière est donc de 23 semaines (18 + 5). La similitude des durées de dormance pour des tubercules obtenus *in vitro* (27 sem.) ou en champs (27,3 sem.) laisse penser que **notre matériel possède un programme génétique de régulation du phénomène de dormance très proche de celui des tubercules classiques.**

A) FACTEURS INTRINSEQUES

Le temps nécessaire pour passer de 10 à 90 % de germination qui est de 13 semaines pour nos microtubercules (**figure 27**) est plus important que celui décrit par Van Ittersum et Scholte (1992a) qui est de 4 semaines. Cela traduit une plus grande hétérogénéité de notre matériel. Une des causes de **variation de la durée de dormance** au sein d'un lot de pommes de terre est la **taille des microtubercules** (**figure 11**). Chez la variété Bintje, nous avons montré qu'un lot de microtubercules de 2-4 mm de diamètre présentait une durée de dormance supérieure de 20 jours à celle des microtubercules d'un diamètre de 4-6 mm. Emilson (1949) et Krijthe (1962) ont déjà montré que la durée de la dormance de tubercules de 40-50 mm est inférieure de 4 semaines à celle de tubercules de 28-35 mm. Plus récemment, Reust (1982) a également montré que d'une manière générale, les tubercules de gros calibre ont une dormance moins importante que ceux de petit calibre. Dans notre modèle d'étude, le diamètre des microtubercules varie de 3 à 6 mm. Malgré la faible différence de taille au sein des lots, nous avons chez les 2 variétés une variation de la durée moyenne de dormance de 13 semaines. Ces résultats sont en faveur d'un calibrage plus fin. En effet, si on souhaite obtenir des **lots beaucoup plus homogènes vis à vis de la durée de la dormance** il serait souhaitable de **regrouper les microtubercules ayant un même diamètre** avec, par exemple, des différences à l'intérieur des lots n'excédant pas 0,5 mm de diamètre.

Concernant les facteurs relatifs à l'explant, lors de la tubérisation *in vitro*, Lavieville (1991) a mis en évidence 3 paramètres essentiels : l'âge de la feuille, la concentration endogène en réserves glucidiques et la surface foliaire. Les noeuds situés en position médiane, avec de longues feuilles qui contiennent de fortes teneurs en assimilats photosynthétiques, sont donc ceux possédant la plus grande capacité à tubériser. Ceci se traduit d'une part, par une augmentation du nombre de microtubercules produits et d'autre part, par un poids moyen plus important.

Au cours de notre expérimentation, pour des raisons de quantité de matériel il ne nous a pas été possible de travailler uniquement avec les noeuds situés en position médiane. De ce fait, on peut attribuer une partie de la variabilité dans la durée de la dormance à ce phénomène.

Afin de limiter les paramètres pouvant interférer avec la physiologie des microtubercules, nous nous sommes fixés des conditions strictes de production. Ainsi, l'effet clone a été supprimé en partant de boutures d'une seule origine génotypique; ces boutures ont ensuite été multipliées au cours de nos travaux pour la production en masse

de microtubercules. Notons que la durée de dormance des microtubercules produits à différents moments de l'année reste constante pour une variété donnée.

Le temps de tubérisation, compris entre 6 et 10 semaines, n'a pas d'influence sur la durée de la dormance des microtubercules de la variété Bintje.

B) FACTEURS EXTRINSEQUES

Indépendamment du facteur variétal, les différentes conditions adoptées dans les protocoles de production des microtubercules semblent aboutir à des caractéristiques physiologiques assez disparates. Les conditions photopériodiques sont le plus souvent invoquées par les auteurs. Ainsi, Hussey et Stacey (1981) obtiennent une germination immédiate des microtubercules produits en jours longs (16 ou 24 h); en revanche, ceux induits en jours courts et en présence de BAP germent plus lentement et de façon hétérogène. Estrada *et al.* (1986) signalent que si l'induction est faite en jours courts, la manifestation de dormance (tubercules stockés à 4°C) est de 60 jours, mais atteint 210 jours lorsque toute la culture se passe à l'obscurité.

Suite à ces travaux sur les tubercules semences, récoltés immatures, Van Ittersum (1992b) montre que les effets des conditions de culture sur la durée de la dormance des tubercules sont limitées. Par exemple, des apports d'azote après l'initiation des tubercules ainsi que des intensités lumineuses faibles durant les dernières semaines de grossissement des tubercules réduisent la durée de la dormance d'une semaine au maximum. Les hautes températures appliquées durant la croissance ont un effet qui dépend du cultivar et la photopériode n'a pas d'effet significatif sur la dormance. Tant que les tubercules sont attachés au reste de la plante, l'influence des conditions de culture sur la durée de la dormance est limitée.

Les résultats concernant les effets des conditions de culture sur la durée de la dormance des tubercules de Pomme de terre sont très différents suivant le matériel utilisé. Les microtubercules sont obtenus *in vitro* à partir d'un noeud isolé comprenant une portion de tige et une feuille axillaire, l'ensemble étant placé dans un milieu liquide à l'obscurité. Les tubercules semences obtenus en champs sont formés après développement d'une plante entière; de ce fait, les effets des conditions de culture se répercutent d'abord sur le comportement de la plante qui, sous forme de signaux, pourra modifier la physiologie des tubercules. *In vitro*, le noeud doit être beaucoup plus sensible aux modifications de l'environnement et de ce fait, la physiologie du microtubercule plus influençable.

⇒ Effet de la concentration en saccharose

En augmentant la concentration en saccharose de 80 à 140 gl^{-1} lors de la phase de tubérisation il est possible de réduire de 6 semaines la durée de la dormance des microtubercules de la variété Désirée.

Lavieville (1991) a montré une corrélation positive entre la dose de saccharose présente dans le milieu et la masse moyenne des microtubercules. De son côté, Van Ittersum (1992c) arrive à la conclusion que la relation entre la durée de la dormance et le poids du tubercule dépend du cultivar et, dans le cas de la variété Désirée, il ne semble pas y avoir une relation évidente.

Au cours de notre expérimentation, les lots utilisés ne présentent pas de différences significatives du poids moyen des microtubercules. En revanche, les différences de pourcentage de MS par rapport à la MF (**tableau 13**) entre chaque concentration en saccharose sont très importantes (15,7 pour 80 gl^{-1} au lieu de 25,3 pour 140 gl^{-1}) et ceci se traduit également par une plus faible composition en glucides solubles, exprimée en pourcentage de la MF, dans le cas d'une concentration en saccharose de 80 gl^{-1} .

L'effet du saccharose se traduit principalement sur la réduction de la durée de dormance (**figure 14**). En effet, pour obtenir 80 % de germination après 3 semaines à 19°C, 21 semaines à 4°C sont nécessaires pour une concentration de 80 gl^{-1} , en revanche il ne faut plus que 17 et 15 semaines respectivement pour 100 et 140 gl^{-1} . Après 21 semaines à 4°C, la germination pour les 3 concentrations en saccharose est strictement identique : aucun effet n'est décelable; la vitesse et le taux de germination sont les mêmes.

A notre connaissance, l'influence de la nutrition glucidique sur la durée de la dormance n'a pas été décrite dans la littérature. Van Ittersum (1992a) rapporte une diminution de la durée de la dormance de 5 à 8 jours pour des tubercules obtenus à partir de plantes cultivées en champ lorsque de l'azote est ajouté durant la culture. Il existe donc une similitude avec nos travaux : **en modifiant la nutrition azotée ou glucidique il est possible de modifier la physiologie des tubercules en faveur d'une diminution de la durée de la dormance.**

Selon Van der Plas (1987), la dormance des tubercules de Pomme de terre est sans doute sous le contrôle d'une balance hormonale entre des substances inhibitrices (ABA) et des substances promotrices (GA et CK). Krauss (1985) constate qu'un apport continu d'azote conduit à une faible teneur endogène en ABA et une forte concentration en gibbérellines dans les tiges. Une interruption de l'apport azoté augmente la concentration en ABA et diminue celle en GAs, ce qui provoque alors la tubérisation. Un nouvel apport d'azote conduit à une baisse de la teneur en ABA et une augmentation des GAs

principalement dans les tiges, peu dans les tubercules; cet apport est souvent accompagné par une croissance secondaire des tubercules. L'activité des cytokinines augmente lorsque les teneurs en azote sont importantes (Sattelmacher et Marschner, 1978; Darrall et Wareing, 1981). Vincent et Roberts (1977) ainsi que Hilhorst (1990) ont montré que l'azote exogène peut stimuler la germination des semences de plusieurs espèces en modifiant la synthèse ou la sensibilité aux GAs.

Il semble possible que l'azote puisse raccourcir la durée de la dormance directement ou indirectement du fait de son action sur la balance hormonale dans les tubercules. De la même manière, on peut supposer que le saccharose est capable de modifier la balance hormonale et de ce fait lever plus rapidement la dormance. Van den Berg *et al.* (1991) ont utilisé le système de boutures nodales pour étudier les changements hormonaux et glucidiques dans les microtubercules sous des conditions inductrices de croissance (35°C, feuille enlevée) et sous des conditions favorables à la formation des tubercules (20°C, feuille enlevée). Après section de la feuille axillaire, le taux d'ABA diminue significativement dans les tubercules et pour les deux traitements. Ce taux reste bas lorsque les conditions induisent une nouvelle croissance; en revanche, dans l'autre cas, il connaît à nouveau une augmentation. Les glucides connaissent également une augmentation lorsque les conditions sont favorables à la croissance. Les changements au niveau des teneurs en ABA et en glucides se produisent avant toute manifestation visible de changements morphologiques, mais les différences au niveau des glucides sont les premières observées.

Les glucides, dans notre expérience pourraient donc être responsables directement ou indirectement par l'intermédiaire des régulateurs de croissance, de la diminution de la période de dormance.

↔ Influence de la température de conservation

Une conservation à 4°C, avant transfert à 19°C, est favorable à la levée de dormance et à la germination des microtubercules et ceci quels que soient les temps de tubérisation retenus et l'origine génotypique des explants mis en culture. Dans tous les cas **plus le temps de conservation à 4°C est important plus la germination est rapide et homogène.**

De nombreux auteurs ont montré que la durée de la dormance de tubercules de Pomme de terre peut être raccourcie par une conservation de quelques semaines à basses températures (0-5°C) avant stockage à des températures favorables à la croissance des

germes (Emilson, 1949; Allen et *al.*, 1978; Harkett, 1981; Van Loon, 1983; Turnbull et Hanke, 1985). Nos travaux sont en accord avec ces résultats. Ainsi, chez la variété Brettor, il est possible de réduire de 31 jours en moyenne la durée de la dormance en conservant les microtubercules pendant 15, 30, 45 ou 60 jours à 4°C avant transfert à 19°C, au lieu de les laisser à 19°C en permanence (**figure 9**).

Le froid permet de raccourcir la durée de la dormance mais lorsque **la durée de conservation devient plus importante, il a un effet inverse en inhibant la germination** juste après la levée de dormance. Par exemple, pour des microtubercules de la variété Bintje conservés durant 3 ou 3 mois et demi à 4°C, la dormance est de 130 jours en moyenne, elle passe à 142 et 148 jours respectivement pour des microtubercules conservés 4 et 4 mois et demi à 4°C (**figure 12**). Dans ce cas, la durée de la dormance à 4°C est allongée, mais en revanche, la germination des microtubercules est beaucoup plus homogène (**figure 10**) et plus rapide (**figures 11 et 12**) après transfert à 19°C. Ces résultats sont en accord avec ceux de Van Loon (1987) qui a montré que les plants conservés à 12°C lèvent plus lentement et de manière plus irrégulière que ceux conservés à 4°C.

La qualité de la germination est un élément essentiel dans la conduite de la culture des microtubercules en serre; de ce fait, **il est préférable d'avoir une durée de dormance plus importante pour une germination beaucoup plus homogène.**

Van Ittersum et Scholte (1992b) ont toutefois montré qu'il est possible de réduire la dormance de tubercules semences récoltés immatures en conservant ceux-ci à une température de 28°C au lieu de 18°C. Chez les 20 variétés étudiées, un prétraitement de 20 jours à 28°C a permis de raccourcir de 2 à 3 semaines la durée de la dormance. De même, une réduction de 2 semaines a été observée après un prétraitement de 20 jours à 2°C chez les variétés ayant une durée de dormance importante, ainsi que chez quelques unes ayant une dormance courte .

Une conservation à basse température est favorable à la levée de dormance et à la germination des microtubercules obtenus *in vitro*, en revanche, l'utilisation de températures de stockage supérieures à 25°C semble ne pas pouvoir s'envisager avec ce type de matériel. En effet, les microtubercules ont un calibre moyen proche de 5 mm et de ce fait, afin d'éviter les risques de déshydratation, la conservation à des températures voisines de 25°C doit être réalisée sous une atmosphère très riche en humidité. Malheureusement, les hautes températures en milieu humide sont très fréquemment propices aux développements de champignons et bactéries, surtout pour un matériel obtenu dans un milieu très riche en éléments minéraux et en saccharose. L'idéal serait d'effectuer la conservation en milieu stérile.

⇒ Traitement à l'acide gibbérellique

L'emploi d'un traitement gibbérellinique pour favoriser la germination des tubercules de Pomme de terre a souvent été décrit dans la littérature. L'objet de nos travaux a d'abord été, dans un premier temps, la mise au point d'un protocole expérimental simple permettant de fournir aux producteurs de plant, des microtubercules capables de germer correctement. Ensuite, nous avons tenté de comprendre comment l'acide gibbérellique peut favoriser la germination et surtout le développement des germes.

Lors de la première série d'expériences, les microtubercules de la variété Brettor sont conservés 7 semaines à 4°C avant traitement à l'acide gibbérellique et, malgré un trempage dans une solution à 10^{-4}M ou 10^{-3}M , on atteint seulement 50 % de germination (**figure 15**) après 21 jours à 19°C. Dans la seconde série d'expériences, le temps préalable de conservation à 4°C est de 14 semaines; dans ce cas, après 21 jours à 19°C, pour les mêmes concentrations en GA_3 , on atteint ou dépasse les 80 % de germination (**figure 16**). Ces expériences réalisées avec les microtubercules de la variété Brettor nous permettent de confirmer certains résultats rapportés dans la littérature, en particulier de vérifier que la GA_3 ne permet pas de lever la dormance (Turnbull et Hanke, 1985) mais simplement de stimuler la germination en fin de période de dormance (Mioduszewka et Bielinska-Czarnecka, 1984).

Le traitement gibbérellinique se répercute sur la croissance des plantules. Dans le cas des microtubercules de la variété Brettor, la GA_3 utilisée à une concentration supérieure ou égale à 10^{-4}M , par rapport à un témoin, agit très significativement sur la croissance des plantules en augmentant la taille de celles-ci (**figure 17**). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Chinchilla (1985) qui montrent que la GA_3 réduit la période de dormance et favorise la formation de germes très allongés sur des tubercules classiques.

Selon Van Hiele (1961) ainsi que Marinus et Bodlaender (1978), l'application de GA_3 sur les tubercules entraîne une augmentation du nombre de germes et du nombre de tiges ainsi qu'un accroissement de la quantité de tubercules de petit calibre. Concernant l'émergence, le nombre de tubercules initiés et le rendement final, les conclusions de Marinus et Bodlaender (1978) ne sont pas en accord avec celles de Van Hiele (1961). Guinazu et *al.* (1988) rapportent des retards de tubérisation après un tel traitement. De ce fait, nous avons préféré retenir pour notre protocole la concentration de 10^{-4}M qui est la concentration la plus faible présentant néanmoins un effet significatif sur la réduction de la période de dormance.

L'emploi de GA₃ ¹⁴C (Couillerot, 1993) montre qu'une faible quantité (0,003 %) de la radioactivité totale est incorporée dans les microtubercules. Cependant, les profils de radioactivité obtenus après chromatographie sur couche mince montrent qu'environ 50 % de cette GA₃ ¹⁴C est encore présente après 21 jours. A cette date, 6,3 ng de GA₃ ¹⁴C sont présents dans les germes, ce qui représente plus de 1 ng mg⁻¹ de matière fraîche. Dans les microtubercules, il reste 3360 ng de GA₃ ¹⁴C qui sont susceptibles d'être transportés vers les germes et d'affecter le développement de la plante. **L'acide gibbérellique est donc incorporé au métabolisme de la plante** et de ce fait, il n'est pas exclu qu'il puisse modifier certains phénomènes physiologiques comme le métabolisme des glucides.

II) GERMINATION DES MICROTUBERCULES

Lorsque la dormance est levée, les germes se développent. La vitesse de germination mesurée, soit par la masse, soit par la longueur des germes dans une unité de temps, est d'abord faible; elle augmente ensuite progressivement jusqu'à un maximum puis décroît pour devenir nulle quand les germes incubés tubérisent. Parallèlement à l'augmentation de la vigueur germinative, la dominance apicale devient de moins en moins marquée; ceci se traduit par l'apparition d'un nombre de plus en plus élevé de germes par tubercule et une formation de plus en plus précoce de ramifications latérales et de stolons sur les germes (Pérennec et Madec, 1980).

Chez les microtubercules des variétés Bintje et Désirée, la production de matière fraîche (MF) est faible durant la phase où le taux de germination passe de 10 à 90 % . Après cette période, qui correspond d'ailleurs à **la fin de la période de dormance** de la totalité des lots de microtubercules, **la production de MF augmente**, traduisant ainsi une **augmentation de la vigueur de germination (figure 28)**. Cet accroissement de MF produite en 3 semaines est d'ailleurs plus rapide (x1,8) chez la variété Bintje que chez la variété Désirée. Le maximum est atteint après 46 semaines chez Bintje contre 53 semaines chez Désirée. Ces différences de vigueur de germination dans le temps sont en accord avec les paramètres de maturité des variétés. En effet, la variété Désirée a une maturité semi-tardive et ceci se traduit par une augmentation de la vigueur de germination au cours du temps plus réduite par comparaison avec la variété Bintje qui a une maturité semi-précoce.

Hartmans et Van Loon (1987) trouvent pour des tubercules de la variété Désirée que le maximum de capacité germinative se situe après 300 jours (43 sem.) de conservation à 4°C, soit environ 10 semaines avant celui observé avec les microtubercules obtenus *in vitro*. L'utilisation par ces auteurs de tubercules de gros diamètre (40-45 mm) pourrait

être une des explications à cette différence. Van der Zaag et Van Loon (1987) rapportent également que chez les tubercules de la variété Désirée conservés à 12°C, le maximum de capacité germinative est atteint environ 80 à 100 jours plus tôt qu'à 4°C. La vigueur de croissance du plant conservé à 4°C est cependant toujours plus élevée que celle du plant maintenu à 12°C. Notons d'ailleurs que chez les 2 variétés étudiées (Jaerla et Désirée), les auteurs ont montré que lorsque les températures de conservation sont plus élevées, l'intensité et la durée de croissance maximale diminuent.

Au cours de l'augmentation de la vigueur germinative il nous a été possible d'observer une baisse de la dominance apicale qui s'est traduite par la production, chez la variété Désirée, de 1 ou 2 germes supplémentaires par microtubercule. En revanche, chez la variété Bintje, la baisse de la dominance apicale ne s'est jamais traduite par une augmentation du nombre de germes mais seulement par une augmentation des ramifications axillaires sur le germe. Après être passée par un maximum, la vigueur germinative décroît chez les 2 variétés (Bintje et Désirée) avec un effet particulièrement prononcé chez les microtubercules de la variété Désirée qui présentent, comme pour des tubercules classiques (Krijthe, 1962; Madec et Pérennec, 1962), un phénomène de boulage (1/5 des microtubercules à 55 semaines). Aucune tubérisation n'est observée sur les germes de la variété Bintje. Les microtubercules de la variété Désirée ont un calibre moyen supérieur à ceux de la variété Bintje; ceci pourrait être une explication aux différences observées au niveau de la dominance apicale et du phénomène de boulage.

L'évolution du rapport taille du germe produit/poids du microtubercule est comparable chez la variété Désirée à la quantité de MF produite en 3 semaines (**figure 29**). Dans ce cas, l'un ou l'autre de ces deux paramètres peut être utilisé pour traduire la vigueur germinative. Par contre, chez la variété Bintje, la comparaison est seulement possible lorsque la masse des microtubercules est supérieure à 40 mg. Notons que c'est toujours le cas pour les microtubercules de la variété Désirée qui ont une masse moyenne de 70 mg.

III) PRODUCTION DE TUBERCULES EN SERRE

En 1989, les premiers essais en serre avec des microtubercules sont réalisés en collaboration avec le GIE des producteurs de plant de Pomme de terre du Nord. Quatre paramètres ont retenu notre attention au début des travaux. Il s'agit de la profondeur et de la densité de plantation, du calibre et de l'âge physiologique des microtubercules.

Pour les trois profondeurs de plantation étudiées (1, 3 et 8 cm), le rendement final, exprimé en masse de tubercules récoltés, reste le même (figure 18 e). Le seul effet constaté est un changement dans la répartition des calibres de tubercules récoltés. Lorsque la profondeur augmente, le nombre de tubercules de moins de 28 mm de diamètre diminue (divisé par 2 lorsque la profondeur passe de 1 à 8 cm) et celui de plus de 28 mm reste constant. Le nombre total de tubercules diminuant et la masse totale étant constante, cela signifie que la masse moyenne de chaque tubercule est augmentée.

La densité de plantation des microtubercules va influencer le nombre et la taille des tubercules récoltés en serre. En effet, plus la plantation est dense, plus le nombre et la masse totale de tubercules récoltés sont importants; de ce fait la masse moyenne des microtubercules est plus faible. Ainsi en 1989, nous avons obtenu, à la récolte, chez la variété Bintje, une masse moyenne par tubercule de 32 g pour une densité de 25 par m² contre seulement 13 g pour une densité de 400 par m² (figure 18 c et g). Le producteur de Plant de Pomme de terre peut donc orienter sa récolte en faisant varier la densité du semis. S'il souhaite produire des minitubercules ayant un diamètre de 10 à 25 mm pour un poids de 1,5 à 5 g (Molet, 1988) il lui faut augmenter la densité, accentuant la compétition entre chaque plante et limitant ainsi les calibres.

En 1989, aucun effet calibre n'a été mis en évidence. Le nombre et la masse de tubercules récoltés sont restés constants pour les 3 diamètres utilisés (figure 18 b et f). En fait, il semble que d'autres paramètres aient pu interférer sur le rendement final puisque dans tous les cas, nous avons un ratio, nombre de tubercules récoltés/nombre de microtubercules plantés, très faible (1,9 en moyenne). L'un de ces paramètres semble être l'état physiologique du microtubercule au moment de la plantation. En effet, le ratio obtenu (3) avec des microtubercules germés lors de la plantation est bien plus important et de ce fait, lors de l'expérience sur les calibres, les conditions optimales n'étaient pas satisfaites pour les microtubercules. En 1990, le ratio obtenu avec des microtubercules ayant un diamètre supérieur à 6,3 mm est de 7,4; dans cette expérience on peut considérer que seul un effet calibre est mis en évidence. Ainsi, plus le diamètre des microtubercules mis en terre est important plus le rendement est important (figure 21). La différence entre les petits calibres (3-4 mm) et les gros calibres (supérieurs à 6,3 mm) est très importante, nous avons un coefficient de variation de 59 %. L'effet calibre responsable d'une grande variation dans le rendement peut s'expliquer de deux manières différentes. La première est une conséquence de l'état physiologique du matériel au moment de la plantation. En effet, nous avons montré que la durée de la dormance est corrélée à la taille des microtubercules (figure 11); de ce fait on peut

supposer que la vigueur germinative est modifiée de la même manière et que le rendement final est tributaire de ce facteur. La deuxième est une conséquence directe de la taille des microtubercules. En effet, lorsque le diamètre augmente, le pool de réserves en particulier glucidiques, est plus important et pourrait être ainsi plus favorable au développement de la plante et au rendement final.

Cette dernière hypothèse semble ne plus être valable dans le cas de tubercules classiques de taille plus importante. En effet O'Brien et Allen (1992) ont montré que les petits tubercules semences ($12,5 \pm 2,5$ g) produisent en général plus de tiges et de tubercules et donnent un rendement meilleur que les gros tubercules ($37 \pm 2,5$ g) pour une densité de plantation équivalente. Nous avons également montré chez la variété Désirée que des microtubercules de 9 mm de diamètre donnent un rendement total moins important que des microtubercules de 7 et 8 mm de diamètre.

Au cours de nos essais en serre nous avons pu vérifier **l'importance de l'âge physiologique sur plusieurs aspects agronomiques**. Le premier d'entre eux est la germination des microtubercules. Nous avons confirmé les résultats de Vakis (1986) qui a montré que plus les plants sont âgés physiologiquement plus la germination est rapide. Ces résultats respectent la logique; en effet, lorsque les microtubercules sont physiologiquement jeunes, ils sont soit encore dormants, soit dans une phase de vigueur de germination peu importante. Ensuite, lorsqu'ils vieillissent la vigueur germinative augmente et par conséquent la germination est plus rapide. Le second aspect concerne le rendement final en tubercules. Chez la variété Bintje le rendement final, exprimé en nombre de tubercules récoltés au m^2 passe de 250 à 470 puis à 540 pour des microtubercules conservés respectivement 14, 22 et 30 semaines à $4^\circ C$ (**figure 20**). On peut supposer qu'il est même possible d'augmenter ce rendement puisque 30 semaines ne représentent pas le temps de conservation correspondant à la vigueur de germination maximale, le maximum se situant aux alentours de la 45^{ème} semaine.

Chez la variété Désirée, le rendement final est augmenté lorsque l'âge des microtubercules est plus important. Nous obtenons 330, 410, 540 et 550 tubercules par m^2 pour des microtubercules âgés respectivement de 22, 37, 45 et 51 semaines (**figure 24**). A 22 semaines, les microtubercules sortent juste de leur état de dormance; la vigueur germinative est très faible et ceci se manifeste par des retards importants de germination qui est d'ailleurs très hétérogène. Après 37 semaines, la vigueur est plus élevée et ceci se traduit par une nette augmentation du rendement. Pour 45 et 51 semaines de conservation on se trouve très près de la valeur maximale de vigueur; c'est pourquoi les rendements sont très semblables.

IV) MARQUEURS DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE DES MICROTUBERCULES

A) LES GLUCIDES

Pour les variétés Bintje et Désirée, l'évolution des glucides réducteurs et du saccharose au cours de la conservation à 4°C des microtubercules n'est pas la même (**figure 31**). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Samotus et *al.* (1974) qui ont mis en évidence **une relation entre l'accumulation de glucides à basse température et le cultivar étudié**. Néanmoins, il est possible de dégager un certain nombre de points communs pour les deux variétés au cours de la conservation à 4°C. Ces similitudes peuvent être d'ailleurs dues à la température de stockage ou à l'évolution physiologique des microtubercules.

Le premier de ces points communs concerne l'augmentation des teneurs en glucose+fructose et surtout la baisse de la teneur en saccharose durant les 4 premières semaines à 4°C. Cette évolution est sans doute une conséquence de la stimulation de l'activité invertasique par le froid qui favorise ainsi la formation de glucides réducteurs à partir du saccharose (Pressey et Shaw, 1966). Soulignons le fait que dans la littérature, pour des tubercules obtenus classiquement le contenu en saccharose ne diminue jamais durant les premières semaines de conservation à basses températures. Il s'agit, dans le cas des microtubercules, d'un phénomène particulier qui est sans doute le résultat de la culture sur un milieu riche en saccharose (80 g^l-1 au départ). La teneur en saccharose (environ 1,8 % de la MF) des microtubercules au moment de la récolte vient d'ailleurs confirmer cette hypothèse. Linneman et *al.* (1985) rapportent pour des tubercules de la variété Bintje obtenus par voie traditionnelle, une teneur en saccharose proche de 0,14 % de la MF; dans le cas des microtubercules obtenus *in vitro*, le contenu en saccharose est multiplié par plus de 10. En revanche, pour les glucides réducteurs, les teneurs aux alentours de 0,4 % de la MF sont les mêmes.

Le second des points communs concerne l'évolution quasi identique des glucides solubles après 25 semaines de conservation à 4°C pour les deux variétés. Ceci se traduit par un rapport saccharose / glucose + fructose voisin de 0,5 jusqu'à la 46^{ème} semaine et qui connaît une nette augmentation ensuite. Après 25 semaines, pour les deux variétés, le pourcentage de germination après transfert des microtubercules à 19°C est proche de 100 et la vigueur de germination se trouve dans sa phase croissante. Selon Van Es et Hartmans (1987a), la teneur en saccharose reste relativement constante alors que celle en glucides réducteurs des tubercules de la variété Bintje conservés à 4°C augmente

considérablement pendant la période où la vigueur de germination progresse, depuis la sortie de dormance jusqu'à une valeur maximale. Dans nos microtubercules, pour les deux variétés, la teneur en saccharose est effectivement stable jusqu'à la 40^{ème} semaine mais ensuite elle présente une nette augmentation qui est très certainement une conséquence de la germination des microtubercules et qui correspond d'ailleurs au maximum de la vigueur germinative. Après 55 semaines de conservation à 4°C, la teneur en saccharose continue de croître pour les deux variétés. Après cette période, on constate au niveau physiologique une chute de la vigueur de germination. Dans le cas de la variété Désirée pour laquelle la teneur en saccharose représente 3,2 % de la MF après 55 semaines on constate un phénomène de boulage qui touche environ 1/5^{ème} des microtubercules mis à germer. Le même phénomène n'a pas été mis en évidence chez la variété Bintje. Les teneurs en glucides réducteurs en revanche n'augmentent pas et ceci pour les deux variétés, elles ont même tendance à diminuer de la 25^{ème} semaine à la 40^{ème} semaine puis elles se stabilisent ensuite.

La germination est associée à la mobilisation des glucides (Van Es et Hartmans, 1987a) suite à une dégradation de l'amidon. Des observations en microscopie montrent que la dégradation des amyloplastés débute généralement dans la partie basale du tubercule. A partir de là les sucres sont transportés sous forme de saccharose jusqu'à la partie apicale et au germe, puis sont ensuite hydrolysés, au moins une partie, en glucose et fructose. Bailey *et al.* (1978) ont montré que les taux de sucres réducteurs dans les tubercules de Pomme de terre (cv. Majestic) augmentent d'environ 8 fois durant le stockage d'octobre à mai; l'augmentation la plus nette se situant après la levée de dormance au mois de décembre. Cette augmentation peut être supprimée en enlevant les germes qui apparaissent. Pour ces auteurs, l'association entre l'apparition des germes, leur développement et l'augmentation de la teneur en sucres réducteurs dans les tissus est clairement démontrée.

Chez les microtubercules des 2 variétés laissés à 4°C, nous notons que des germes apparaissent aux environs de la 30^{ème} semaine et leur développement est inhibé pendant une dizaine de semaines; leur croissance est lente à partir de la 40^{ème} semaine. Au cours de cette évolution physiologique, la teneur en sucres réducteurs n'augmente pas; elle a plutôt tendance à diminuer après l'apparition des germes et ceci pour les deux variétés. Donc, contrairement à ce qui a été montré par plusieurs auteurs, l'initiation de la germination ne provoque pas une augmentation des teneurs en sucres réducteurs. L'inhibition de la croissance des germes due à la température pourrait être une explication de ce phénomène; elle pourrait être comparée à une suppression des germes qui, comme l'ont montré Hughes et Fuller (1984) pour la variété Record, conduit à la diminution de la

teneur en sucres réducteurs. A partir de la 40^{ème} semaine, l'inhibition de la croissance n'est pas suffisante pour empêcher l'accumulation de glucides (glucose, fructose et saccharose) qui, d'après les mêmes auteurs, se trouve sous le contrôle de la croissance des germes.

L'effet variétal concernant l'accumulation de glucides réducteurs et de saccharose est particulièrement marqué entre la 4^{ème} et la 25^{ème} semaine de conservation à 4°C. Chez la variété Désirée, la quantité de glucides réducteurs augmente très rapidement durant les 11 premières semaines de conservation à 4°C et la teneur passe de 0,4 % à 3,1 % de la MF. Par contre, pour la variété Bintje l'accumulation de glucose et de fructose est beaucoup plus lente; il faut attendre 24 semaines pour atteindre le maximum qui est d'ailleurs moins important puisqu'il représente 2,1 % de la MF. Pour le saccharose, l'évolution pour les 2 variétés est inversée par rapport à l'accumulation de glucides réducteurs. Ainsi la variété Bintje accumule très rapidement du saccharose alors que pour la variété Désirée, la teneur augmente seulement après 18 semaines à 4°C.

L'accumulation de glucides réducteurs dans les tubercules de Pomme de terre à des températures basses est sous la dépendance de plusieurs facteurs (Pollock et Ap Rees, 1975) :

∞ La modification des membranes des amyloplastés à basse température conduit à une augmentation de la perméabilité et donc à une plus grande mobilité des enzymes de dégradation (Isherwood, 1976).

∞ L'augmentation, induite par le froid, de l'activité invertasique stimule la formation de glucides réducteurs à partir du saccharose (Pressey et Shaw, 1966).

∞ La réduction de l'utilisation de ces glucides par la glycolyse (Dixon et Ap Rees, 1980b) favorise l'accumulation de saccharose, glucose et fructose. Ces auteurs ont d'ailleurs montré que l'accumulation d'hexoses phosphates précède celle de saccharose suite au transfert des tubercules de Pomme de terre à de basses températures. Ce blocage de la glycolyse est dû en partie à la labilité de certaines enzymes au froid. Les travaux récents de Bredemeijer et *al.* (1991) ont montré que l'accumulation de saccharose et de glucides réducteurs dans les tubercules de la variété Bintje pendant le stockage à 2°C se produit de manière concomitante à la diminution de l'activité de la phosphofructokinase, enzyme de la glycolyse responsable de la conversion du fructose 6-phosphate en fructose 1,6-biphosphate.

La compréhension du mécanisme d'accumulation des glucides à basses températures passe donc par l'étude de plusieurs systèmes enzymatiques impliqués dans les phénomènes décrits précédemment. La comparaison de variétés présentant une réponse différente doit également être prise en compte. Les variétés Bintje et Désirée pourraient être retenues puisqu'elles ne réagissent pas de la même manière au cours de la conservation à 4°C. Néanmoins, certains travaux de sélection (Van Es et Hartmans, 1987a), en croisant *Solanum phureja* ou *goniocalyx* avec d'autres variétés de *Solanum tuberosum*, ont permis la création de 22 lignées qui, pour la plupart, présentent une diminution du taux de glucides réducteurs lors d'un stockage de 7 mois à 4°C. L'étude des systèmes enzymatiques de ces lignées pourrait également apporter des réponses relatives aux mécanismes responsables de l'accumulation de glucides.

Les microtubercules produits *in vitro*, comme les tubercules obtenus par voie traditionnelle, **présentent une accumulation de glucides à basses températures**. Cette accumulation est quantitativement la même. Pour les tubercules de la variété Bintje, Bredemeijer et *al.* rapportent pour un stockage à 2°C une accumulation de $1,81 \pm 0,32$ % et $0,64 \pm 0,05$ % de la MF respectivement pour les glucides réducteurs et le saccharose. Dans le cas des microtubercules, l'accumulation en saccharose est de 2,1 % et celle en glucides réducteurs de 0,9 % de la MF.

Ces résultats nous amènent à penser que **la physiologie du microtubercule issu d'*in vitro* est comparable à celle d'un tubercule** et que l'étude du contrôle de l'accumulation de glucides aux basses températures pourrait désormais être envisagée sur ce nouveau matériel qui présente de nombreux avantages par rapport aux tubercules classiques. Outre la taille, rappelons que les paramètres tels que la température, l'éclairage, la nutrition sont totalement contrôlés lors de la production alors que pour des tubercules cultivés en champs, ces paramètres peuvent fluctuer considérablement d'une année sur l'autre.

En conclusion, on peut affirmer que **l'accumulation des glucides dans les microtubercules de Pomme de terre au cours de la conservation à 4°C dépend de la variété et que cette accumulation est telle quelle ne permet pas de mettre en évidence une relation avec les différentes phases physiologiques**. Seule la germination qui se produit après 40 semaines est associée à une forte augmentation de saccharose.

B) LES POLYAMINES

∞ Relations avec l'âge physiologique des microtubercules

Les polyamines endogènes libres dans les microtubercules de la variété Désirée au cours de la conservation à 4°C connaissent **des changements quantitatifs** pouvant être mis en relation avec **l'âge physiologique des microtubercules**. La comparaison des courbes traduisant l'évolution des polyamines endogènes libres (**figure 32**) avec les courbes de germination à 19°C des microtubercules et de production de MF sous forme de germes (**figure 28 b**) nous permet de mettre en évidence plusieurs faits importants pouvant caractériser 3 phases distinctes :

+ Phase A : Les concentrations en **spermidine** et surtout **putrescine diminuent** durant les 9 premières semaines de conservation à 4°C qui correspondent à **une phase de dormance des microtubercules** pendant laquelle aucune germination n'est observée à 19°C.

+ Phase B : Les teneurs en **putrescine augmentent** (maximum à la 13^{ème} semaine) au moment où **les premières germinations sont visibles** sur les microtubercules placés à 19°C (on passe de 0 à 33 % de microtubercules germés). Cette augmentation de la teneur en putrescine est liée à la phase initiale de levée de dormance puisque, dès la 11^{ème} semaine, la putrescine a déjà augmenté alors que le pourcentage de germination est proche de 0. Dans ce cas, on peut affirmer que l'accroissement de la teneur en putrescine libre n'est pas une conséquence des premières germinations puisqu'elle précède toute apparition de germes.

+ Phase C : **Une nouvelle augmentation des teneurs en putrescine et spermidine**, de la 20^{ème} semaine jusqu'à la fin de la période de conservation des microtubercules, est **corrélée à l'accroissement de la vigueur de germination**. En effet, durant cette période, plus le temps de conservation à 4°C est grand, plus la production de germes est importante et l'augmentation du potentiel germinatif se traduit au niveau métabolique par un accroissement du contenu en polyamines libres, surtout en fin de période de conservation lorsque la vigueur germinative est maximale.

∞ Rôles possibles des polyamines

Nos résultats sur l'évolution des polyamines endogènes libres en relation avec la levée de dormance sont en accord avec ceux relevés dans la littérature.

Selon plusieurs auteurs (Bagni *et al.*, 1981; Kaur-Sawhney *et al.*, 1982, Serafini-Fracassini *et al.*, 1984; Bagni et Serafini-Fracassini, 1985), le contenu en polyamines endogènes est peu élevé dans les tissus et organes dormants et augmente rapidement au moment de la levée de dormance. Les dosages réalisés sur les microtubercules ont mis en évidence une forte diminution de la teneur en putrescine durant les 9 premières semaines de conservation à 4°C, période pendant laquelle aucune germination n'est obtenue et qui correspond donc à une phase de dormance. Il est cependant important de noter qu'au moment de la récolte, la concentration en putrescine libre est de 0,59 nmoles mg⁻¹ de MS et que cette concentration est la plus importante détectée dans les microtubercules. Toutefois, à la récolte, les microtubercules sont incapables de germer; donc, dans notre cas, la phase de dormance n'est pas totalement caractérisée par un contenu en polyamines endogènes peu élevé.

Il est connu que la putrescine s'accumule dans de nombreux tissus végétaux en réponse à des agressions comme l'augmentation de la pression osmotique (Flores et Galston, 1982). La forte teneur en putrescine à la récolte pourrait donc être la cause d'un stress provoqué, soit lors de la période de tubérisation, en particulier par la concentration en saccharose qui est de 80 g l⁻¹ dans le milieu au début de la culture, soit au moment de la récolte, lors de la séparation du tubercule de la bouture nodale. La chute de la teneur en putrescine pourrait être due soit à une immobilisation de la putrescine libre sous une forme liée, soit à une dégradation par les diamines oxydases, soit enfin à une utilisation par la cellule.

A partir de la 9^{ème} semaine, les teneurs en putrescine et dans une moindre mesure en spermidine connaissent une augmentation rapide qui se manifeste pendant plusieurs semaines pour la putrescine et seulement transitoirement pour la spermidine. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Jolivet *et al.* (1986) pour lesquels une forte augmentation des teneurs en putrescine, spermidine, tyramine et dopamine dans le parenchyme de la zone apicale a été mise en évidence suite à une rupture provoquée de la dormance du tubercule de Pomme de terre par la rindite. L'augmentation des teneurs en polyamines libres se manifeste très précocement, bien avant l'acquisition de l'aptitude à germer de la totalité des microtubercules. Lorsque les microtubercules sont aptes à germer

(phase B) vers la 18^{ème} semaine de conservation à 4°C les teneurs des polyamines chutent.

Selon Bagni *et al.* (1981) et Serafini-Fracassini *et al.* (1984), la synthèse des polyamines est l'un des premiers évènements contrôlant le début de la reprise des divisions cellulaires. Dans le cas de la levée de dormance des microtubercules de Pomme de terre, nous pouvons dire que **l'augmentation du contenu en polyamines, en particulier de la putrescine, est antérieure à toute manifestation de la germination.** Celle-ci se produisant suite à une réactivation métabolique, on peut supposer que les polyamines sont impliquées dans les processus initiaux de la reprise d'activité cellulaire. De ce fait, comme dans le cas des bulbes d'*Allium cepa* L. (Matejko et Dahlhelm, 1991) **les changements dans le contenu des polyamines peuvent être considérés comme des indicateurs de changements physiologiques pendant la phase de dormance des microtubercules de Pomme de terre.**

Après 20 semaines, il existe une corrélation entre la vigueur de germination et la teneur en polyamines. En effet **plus le temps de conservation est important**, dans la limite des 50 semaines, **plus la quantité de germes produits** durant 21 jours à 19°C **est grand** et parallèlement, **plus les teneurs en polyamines libres sont fortes.** Ceci est en accord avec les travaux de Huang et Villanueva (1992) qui ont montré que la synthèse des polyamines entraîne une augmentation du taux de germination et surtout favorise la croissance de la racine de la graine de *Picea abies*.

C) LES ENZYMES

∞ Activité peroxydasique

Les peroxydases sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques (Gaspar *et al.*, 1973). Ainsi, Ruiz-Nieto *et al.* (1990) ont récemment utilisé les profils électrophorétiques des isoperoxydases pour identifier plus de 50 variétés de Pomme de terre.

Au cours de nos travaux, nous avons suivi l'activité enzymatique des peroxydases ainsi que l'évolution des isoperoxydases anodiques dans les microtubercules de la variété Désirée au cours de leur conservation à 4°C, afin de vérifier s'il existe une relation entre les peroxydases et les phénomènes de dormance, de levée de dormance et de vigueur de germination.

Durant la dormance, alors que l'activité peroxydasique reste stable (**figure 34**), des changements sont observés au niveau des isoperoxydases qui s'intensifient lorsque la période de conservation au froid augmente (**figure 35**). Sur ce point nous sommes en accord avec les travaux de Tao et Khan (1976) qui ont mis en évidence une augmentation de l'intensité de certaines isoenzymes au cours de la stratification d'embryons de Poirier. En revanche, nos résultats sont en contradiction avec ceux obtenus chez le Topinambour (Gaspar et *al.*, 1973), chez lequel l'activité peroxydasique est plus importante durant la dormance. Selon les mêmes auteurs, la levée de dormance par le froid, la stimulation de la croissance axiale par l'AG₃ ou la stimulation de la croissance radiale (tubérisation) par la kinétine causent une rapide diminution de l'activité peroxydasique totale et une diminution de l'intensité de la plupart des isoperoxydases cathodiques. De même, une induction de dormance par l'AMO-1618 augmente l'activité peroxydasique. Notre étude s'étant limitée aux peroxydases anodiques, il serait également fort intéressant d'observer ce qui se passe au niveau des peroxydases cathodiques.

Avec les microtubercules de la variété Désirée, l'activité peroxydasique totale augmente au cours de la levée de dormance: elle est maximale après 22 semaines, stade qui correspond à la fin de la période de dormance. On peut expliquer cette évolution de l'activité peroxydasique en suggérant qu'au cours de la levée de dormance des dégradations se produisent au niveau des membranes, incluant des flux d'ions, la formation de radicaux libres et de peroxydes créant une sorte de stress d'oxydation qui peut être résolu par une activité peroxydasique accrue. Après 30 semaines, la vigueur de germination augmente et parallèlement l'activité peroxydasique croît. Van Es et Hartmans (1987b) ont également mis en évidence une relation entre l'activité peroxydasique des germes de tubercules de Pomme de terre et leur capacité germinative.

En conclusion, on peut donc dire que l'activité peroxydasique globale est le reflet de l'évolution physiologique des microtubercules; la levée de dormance et l'augmentation de la vigueur germinative s'accompagnent d'une activité peroxydasique plus intense.

⇒ Activité estérasique

Le suivi des profils électrophorétiques des isoestérases α et β au cours de la conservation à 4°C des microtubercules de la variété Désirée nous a permis de distinguer la période de dormance de la phase de levée de dormance. En effet, la phase de dormance se caractérise par la présence d'une isoestérase α supplémentaire (**figure 36**).

Les estérases sont responsables de la dégradation de la plupart des lipides polaires qui sont principalement localisés dans les membranes cellulaires; de ce fait on peut penser que l'isoestérase α mise en évidence spécifiquement durant la dormance joue un rôle important au niveau de la structure membranaire des cellules. Pétel et *al.* (1992,1993) ont montré chez le Topinambour (*Helianthus tuberosus* L.) que la levée de dormance est liée, au moins partiellement, aux changements dans la composition en phospholipides des membranes du plasmalemmes. Dans le cas des microtubercules de Pomme de terre on peut affirmer que **des changements au niveau des estérases se produisent durant la levée de dormance**; aussi il serait intéressant d'étudier ce qui se passe au niveau de la composition phospholipidiques des membranes.

La patatine possède une activité estérasique (Racusen, 1984; Rosahl et *al.*, 1987; Racusen et Racusen, 1992); de plus il semble que les membranes soient protégées grâce à cette enzyme (Sonnewald, 1989). Ces résultats nous laissent penser que l'isoestérase α mise en évidence durant la dormance pourrait être une glycoprotéine comme la patatine.

∞ Activité de la voie des pentoses

De nombreux auteurs ont décrit l'implication de la voie des pentoses phosphates (PP) dans la régulation de la dormance des semences par l'étude de l'activité des glucose-6-phosphate et 6-phosphogluconate deshydrogénases (Kovacs et Simpson, 1976; Gosling et Ross, 1980; Swamy et *al.*, 1980; Swamy et Sandhyarani, 1986).

La première constatation concernant l'étude des 2 premières enzymes de la voie des pentoses phosphates réside dans le fait que la G6PDH présente une activité plus importante que la 6PGDH (**figure 37**). Le contraire est plus souvent décrit dans la littérature : ainsi, chez l'Avoine (Kovacs et Simpson, 1976; Adkins et Ross, 1981; Upadhyaya et *al.*, 1981) ou chez l'Arachide (Swamy et Sandhyarani, 1986), l'activité 6PGDH est prédominante. Thévenot et *al.* (1989) soulignent le fait que dans tous les cas il s'agit de semences sèches. Par contre, lorsqu'ils étudient des embryons de Pommier non séchés, ils obtiennent une activité G6PDH plus élevée que celle de la 6PGDH. Pour ces auteurs, le niveau relatif de l'activité de ces 2 enzymes doit dépendre du taux d'hydratation du tissu étudié. En accord avec l'hypothèse de Thévenot et *al.* (1989), nous avons une activité G6PDH supérieure à celle de la 6PGDH pendant toute la période de conservation à 4°C des microtubercules qui sont des organes fortement hydratés.

L'activité des 2 enzymes est relativement élevée durant les 20 premières semaines de conservation au froid. Cette période comprend la phase de dormance et la phase de levée de dormance puisque nous avons vu que chez la variété Désirée, les microtubercules ne sont plus dormants après 22 semaines de conservation à 4°C. Cette fin de dormance correspond d'ailleurs au minimum d'activité des 2 enzymes; ce minimum se poursuit quelques semaines avant d'augmenter lorsque la germination se produit.

Une augmentation des activités G6PDH et 6PGDH a été observée durant la levée de dormance du Noisetier (Gosling et Ross, 1980) et de l'Arachide (Swamy et Sandhyarani, 1986) mais selon Thévenot et *al.* (1989), les conditions expérimentales utilisées par ces auteurs n'excluent pas que l'augmentation des activités enzymatiques soit due en partie à la germination. Dans notre cas, les fortes activités observées durant la levée de dormance ne sont certainement pas une conséquence de la germination puisque celle-ci ne se produit qu'après 30 semaines de conservation à 4°C. Chez l'embryon de Pommier, avant l'imbibition, il n'existe pas de différence significative entre les taux d'activité de la G6PDH et 6PGDH d'embryons dormants ou non dormants (Thévenot et *al.*, 1989); en revanche, chez les microtubercules dormants, l'activité 6PGDH et surtout G6PDH sont plus importantes que chez les microtubercules dont la dormance est levée.

Avec notre matériel, l'activité de ces 2 enzymes peut être considérée comme un bon marqueur de dormance et de levée de dormance. Une forte activité G6PDH est également observée au delà de 35 semaines de conservation à 4°C, mais cette fois-ci, elle est sans doute une conséquence de la germination. Adkins et Ross (1981) attribuent l'augmentation de l'activité des enzymes de la voie des pentoses trouvée par Gosling et Ross (1980) au traitement au froid et non spécifiquement à la levée de dormance. Il est légitime de se poser la question car nous savons que les basses températures sont favorables au blocage de la glycolyse du fait de la labilité de certaines enzymes au froid (Dixon et Ap Rees, 1980b), en particulier de la phosphofructokinase (Bredemeijer et *al.*, 1991).

Dans le cas des microtubercules de la variété Désirée, même si une partie de l'activité peut être imputable à une inhibition de la glycolyse à basse température, cela ne suffit pas à expliquer le fait que l'activité soit maximale pendant la période de levée de dormance et minimale lorsque celle-ci est totalement levée.

La plupart des travaux sur le rôle de la voie des pentoses phosphates suggèrent que cette voie a deux fonctions majeures : la première consiste à produire du NADPH nécessaire à de nombreuses réactions de réduction, et la seconde à fabriquer de nombreux

intermédiaires pour la voie elle-même, tels que des composés à 5 et 4 carbones qui sont également à la base de nombreux processus biosynthétiques. Son rôle exact dans la germination des semences n'est pas connu, mais il semble plus probable (Roberts et Smith, 1977) que la production d'intermédiaires comme les riboses joue un rôle important.

Il semble que la voie des pentoses phosphates soit impliquée lors de la levée de dormance des microtubercules de Pomme de terre et une étude concernant la régulation des enzymes pourrait sans doute apporter des éléments de réponse à la compréhension du mécanisme.

D) LES PROTEINES

Des travaux portant sur l'évolution des polypeptides dans les microtubercules de Pomme de terre au cours de la conservation à 4°C sont inexistantes à notre connaissance. De ce fait, notre démarche constitue une approche nouvelle d'étude du phénomène de dormance et de levée de dormance.

Du fait de l'interprétation visuelle des gels, les différences quantitatives entre les différents stades ont pu être sous-estimées. La présence ou l'absence d'un spot peuvent résulter d'une variation quantitative en dessous du seuil de détection visuel. Le déplacement d'un spot n'est pas obligatoirement le résultat d'une variation touchant un gène de structure lui-même, mais peut résulter de la modification d'un processus de maturation post-traductionnel (Steinberg et al., 1977). De plus, pour des spots fortement saturés, il est difficile d'estimer l'importance d'une variation quantitative.

En prenant en compte ces considérations, nos résultats (**tableau 17**) montrent que les différences quantitatives sont bien plus importantes que les différences qualitatives.

Quoiqu'il en soit, dans les 2 cas, les variations quantitatives et qualitatives sont le reflet de régulations dans la biosynthèse des protéines. Ces régulations peuvent intervenir aux diverses étapes de la protéosynthèse :

- Transcription (promoteurs, séquences régulatrices, RNA polymérase...)
- Maturation (épissage), transport et dégradation des ARN
- Traduction (initiation, élongation et terminaison)
- Maturation des protéines (existence d'un précurseur, assemblage des protéines multimériques, glycosylation, phosphorylation...), transport et dégradation plus ou moins spécifique de certaines protéines.

La diminution ou l'augmentation de la quantité d'un polypeptide peut résulter d'un ou de plusieurs de ces mécanismes de régulations cellulaires.

Les changements dans les cartes protéiques des microtubercules suggèrent des modifications dans l'expression des gènes au cours de la conservation à 4°C conduisant à l'aptitude à germer des microtubercules, c'est à dire à la perte de l'état de dormance. Les modifications se produisent, pour la plupart d'entre elles, en début de période de conservation. En effet, les disparitions et apparitions de polypeptides après 2 semaines à 4°C représentent 58 % du total. Ces changements sont à attribuer aux différents stress subis par les microtubercules au moment de la récolte (rupture des corrélations avec la bouture nodale, déshydratation) et lors de la conservation (température). Les nouvelles protéines pourraient correspondre à des protéines de stress, et les protéines qui disparaissent seraient le résultat de la suppression des corrélations entre le microtubercule et la bouture nodale.

Récemment, Hance et Bevington (1992) ont montré que des protéines spécifiques sont exprimées à 15°C dans les cotylédons d'*Acer saccharum*, mais sont absentes dans les embryons conservés à 4°C. L'expression de ces protéines est donc inhibée durant la stratification à 4°C et pendant la levée de dormance. Les auteurs suggèrent que certaines de ces protéines peuvent être associées à l'inhibition de la croissance de l'axe embryonnaire par l'intermédiaire des cotylédons.

Dans le cas des microtubercules de Pomme de terre, la non expression à 4°C de certaines protéines présentes au moment de la récolte, ne conduit pas à une aptitude à la germination des microtubercules puisque la dormance n'est totalement levée qu'après 22 semaines.

L'expression accrue ou réduite de certaines protéines pourrait être le reflet de l'augmentation ou de la diminution d'activités enzymatiques en relation avec la température de conservation ou de l'évolution physiologique interne du microtubercule conduisant à la perte de l'état de dormance. L'activité invertasique est stimulée à basses températures (Pressey et Shaw, 1966); de ce fait, on peut supposer que le taux d'expression de la protéine est accru. Inversement l'activité de la phosphofructokinase étant diminuée (Bredemeijer, 1991), le taux d'expression polypeptidique doit être réduit. Nous avons également montré que d'autres enzymes voient leur activité évoluer au cours de la conservation; citons en particulier les estérases et la G6PDH pour lesquelles une isoenzyme supplémentaire a été détectée à certains stades. Néanmoins, il faut émettre une réserve car le polymorphisme observé par électrophorèse bidimensionnelle est

apparemment moins important que celui observé par électrophorèse monodimensionnelle d'enzymes purifiées; ceci a été illustré par les études de protéines de Blé (Zivy et *al.*, 1983). Selon Klose (1982), les enzymes sont en général présentes en quantités trop faibles pour être détectées sur une électrophorèse bidimensionnelle. D'autres auteurs ont montré qu'une forte majorité des protéines révélées sont des protéines membranaires, notamment chloroplastiques (Granier et *al.*, 1986). D'après Mc Conkey (1982), une grande partie des protéines considérées comme solubles font partie de structures fragiles détruites au cours de l'extraction. Les protéines révélées sur un gel bidimensionnel ne représenteraient donc qu'une minorité d'enzymes, alors que la majorité des protéines abondantes seraient de type structural (Sieffert, 1988).

Trois groupes de polypeptides (**fig. 42 c**), ayant chacun une masse moléculaire identique et apparaissant sous la forme de spots successifs alignés dans la dimension horizontale d'IEF sont observés, soit sur tous les profils polypeptidiques (1 groupe de 44 kD et 1 groupe de 42 kD) soit spécifiquement à certains stades de conservation à 4°C (1 groupe de 40 kD présent de la 4^{ème} à la 9^{ème} semaine). A l'intérieur de chaque groupe, les polypeptides diffèrent dans leur pHi (5-6); ils peuvent correspondre à des isoformes polypeptidiques et seraient le résultat de l'expression de différents allèles d'un même gène, de différents gènes d'une famille multigénique, ou encore de la maturation post-traductionnelle différente d'une même protéine (Hilbert, 1989).

Nous n'avons pas identifié ces groupes de polypeptides, mais étant donné leur importante concentration et les résultats publiés dans la littérature (Sonnewald et *al.*, 1989; Racusen, 1984; Racusen et Racusen, 1992), on peut penser qu'ils correspondent à une famille de glycoprotéines nommée plus communément patatine. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'extraire ces groupes de polypeptides et de vérifier s'il s'agit bien de la patatine en utilisant des anticorps. La présence de 3 groupes de polypeptides différents dans leur masse moléculaire pourrait s'expliquer par l'importance du niveau de glycosylation. Racusen et Racusen (1992) ont déjà montré chez *Solanum berthaultii* la présence de deux types de patatine; l'une est une forme fortement glycosylée montrant d'ailleurs une faible activité estérasique, et l'autre est une forme faiblement glycosylée mais présentant une forte activité estérasique.

Ces résultats sont à mettre en relation avec ceux obtenus sur les activités estérasiques au cours de la conservation à 4°C des microtubercules. En effet, nous avons mis en évidence la présence d'une isoestérase supplémentaire à partir de la 2^{ème} semaine jusqu'à la 11^{ème} semaine de conservation à 4°C, et parallèlement, une augmentation de la concentration du groupe de polypeptides P40 qui pourrait correspondre à une forme de

patatine faiblement glycolysée ayant une forte activité estérasique. Après avoir confirmé grâce à des anticorps que le groupe de polypeptides correspond à la patatine il faudrait vérifier s'il possède une activité estérasique.

Deux autres polypeptides, **P_{31d}** (fig. 42 b) et **P_{29,8a}** (fig. 42 c) **apparaissent abondamment au cours de la conservation à 4°C des microtubercules**. P_{31d} est détecté dès la 2^{ème} semaine et reste important durant toute la phase de conservation incluant les stades de dormance et de levée de dormance. **P_{29,8a} est détecté de manière spécifique après 4 semaines (fig. 39 c) à 4°C et reste présent jusqu'à la 9^{ème} semaine; cette date correspondant d'ailleurs à la fin de la complète inaptitude à germer des microtubercules.**

L'identification de ces 2 polypeptides pourrait sans doute nous renseigner sur leur rôle au cours de la conservation à 4°C des microtubercules. Pour cela, d'autres techniques peuvent être utilisées en complément de l'électrophorèse bidimensionnelle (Damerval et *al.*, 1993). Ainsi, après purification du polypeptide, le séquençage permettrait de comparer avec des séquences disponibles dans les bases de données et d'identifier éventuellement la protéine.

L'utilisation de l'électrophorèse monodimensionnelle des protéines a déjà été décrite pour l'identification variétale de la Pomme de Terre (Ruiz-Nieto et *al.*, 1989, 1990). De même, l'emploi de nombreux systèmes enzymatiques a servi à la classification génétique de 74 variétés de Pomme de Terre (Martinez-Zapater et Oliver, 1984; Oliver et Martinez-Zapater, 1985). Par contre, l'électrophorèse bidimensionnelle n'a pas été employée à notre connaissance chez la Pomme de Terre comme support d'identification variétale.

Nos résultats obtenus avec les variétés Bintje et Désirée nous permettent de penser que cette technique grâce à sa haute résolution permettant de visualiser plus de mille polypeptides (environ 1200 avec notre technique) et couplée à l'outil informatique **pourrait être utilisée de manière efficace pour l'identification variétale.**

En conclusion, les résultats obtenus nous permettent **d'établir une relation entre la présence de plusieurs polypeptides et la phase de non germination des microtubercules**. La purification de ces polypeptides pourraient permettre la fabrication d'anticorps qui serviraient de tests immunologiques capables de différencier les stades physiologiques.

CONCLUSIONS

Après la mise au point d'une méthode performante de tubérisation *in vitro* par L. Lavieville, nos travaux permettent de définir les paramètres physiologiques nécessaires à la conservation et surtout à la germination des microtubercules.

Les microtubercules produits *in vitro*, comme les tubercules issus de plantes cultivées en champs, sont dormants lors de la récolte. Dans les deux cas la durée de la dormance est la même; elle est respectivement de 18 et 22 semaines pour les variétés Bintje et Désirée. Ces résultats nous laissent penser que notre matériel possède un programme génétique de régulation du phénomène de dormance très proche de celui des tubercules classiques. De ce fait, les microtubercules constituent un matériel de choix pour toute investigation de nature fondamentale concernant l'étude de marqueurs spécifiques de levée de dormance.

Nos travaux montrent également que l'état physiologique du microtubercule à la récolte est susceptible d'influencer les événements relatifs à la levée de dormance et à la germination. L'apport glucidique durant la phase de tubérisation est un facteur capable de modifier la physiologie des microtubercules et par la même de faire varier la durée de la dormance; ainsi, nous avons mis en évidence un effet positif de fortes concentrations en saccharose (100 et 140 gl^{-1}) sur la diminution de la durée de dormance. Un autre paramètre intrinsèque aux microtubercules est déterminant : il s'agit de la taille de ces derniers qui est une des causes de variations de la durée de dormance au sein d'un lot de microtubercules. Un fin calibrage est donc conseillé pour une bonne conduite de la culture des microtubercules.

Les conditions de conservation s'avèrent également primordiales pour le devenir des microtubercules. Ainsi, nous avons pu constater qu'une température de stockage de 4°C est tout à fait adaptée à notre matériel; en évitant la déshydratation, elle est peu propice aux contaminations fongiques et surtout elle favorise la rapidité et l'homogénéité de germination. Les résultats obtenus avec l'acide gibbérellique (GA_3) sont conformes à ceux décrits par Marinus et Bodlaender (1978) ou par De Fernandez et *al.* (1990) avec des tubercules classiques; la GA_3 ne permet pas de lever la dormance mais simplement de stimuler la germination en fin de période de dormance. Nous avons également mis en évidence une action positive de la GA_3 sur la croissance des plantules du fait de son incorporation au métabolisme de la plante.

Les essais en serre ont eu pour but l'étude de l'impact des facteurs tels que la profondeur et la densité de semis, la taille des microtubercules et l'âge physiologique, sur la germination et le rendement final en tubercules. Les trois profondeurs de semis étudiées (1, 3 et 8 cm) n'ont pas permis de modifier le rendement final. La densité, en revanche, permet d'influencer le nombre et la taille des tubercules récoltés en serre; une forte densité (400 par m²) est favorable à la production de minitubercules. Nous avons montré que plus le diamètre des microtubercules est important plus le rendement est élevé, au moins pour des tailles comprises entre 3 et 7 mm. Notre attention s'est également portée sur le fait que plus les plants sont âgés physiologiquement plus la germination est rapide et surtout plus le rendement final en tubercules est élevé.

Le suivi de la germination des microtubercules ainsi que les mesures biométriques concernant la croissance des germes nous ont permis de définir trois phases physiologiques bien distinctes. La première correspond à la phase pendant laquelle aucune germination n'est observée. La seconde phase se poursuit jusqu'au moment où on atteint 80% de microtubercules germés; c'est à dire jusqu'à la fin de la dormance des microtubercules. La troisième et dernière phase est caractérisée par un accroissement régulier de la vigueur de germination.

L'importance de l'âge physiologique sur l'évolution des microtubercules lors de leur mise en terre est clairement montrée, c'est pourquoi nous avons recherché des marqueurs biochimiques, susceptibles de caractériser les phases physiologiques précédemment citées et capables de nous renseigner sur les potentialités du matériel au moment du semis. La recherche de tels marqueurs nous permet également de mieux comprendre au point de vue fondamental les mécanismes complexes impliqués lors des processus de dormance, de levée de dormance et de germination.

Les glucides, du fait de leur importance dans la composition de la pomme de terre, ont en premier retenu notre attention. Leur évolution nous permet de dire que les microtubercules produits *in vitro*, comme les tubercules obtenus par voie traditionnelle, présentent une accumulation de glucides simples à basse température. Cette accumulation de glucides est d'ailleurs dépendante de la variété étudiée. Ces résultats nous permettent de conclure que l'évolution des glucides dans les microtubercules au cours de la conservation à 4°C n'est pas corrélée aux différentes phases physiologiques.

Les polyamines endogènes libres dans les microtubercules de la variété Désirée au cours de la conservation à 4°C connaissent des changements quantitatifs pouvant être mis en relation avec l'âge physiologique des microtubercules. Ainsi les concentrations en

spermidine et surtout putrescine diminuent durant la première phase physiologique, où aucune germination n'est observée à 19°C. La teneur en putrescine forme un pic entre la 9^{ème} et 18^{ème} semaine de conservation, période où les premières germinations sont visibles. Enfin, l'augmentation des teneurs en putrescine et spermidine, de la 20^{ème} semaine jusqu'à la fin de la période de conservation des microtubercules est corrélée à l'accroissement de la vigueur germinative. On peut supposer que les polyamines sont impliquées dans les processus initiaux de la reprise d'activité cellulaire; de ce fait, les changements dans le contenu des polyamines sont d'intéressants indicateurs de modifications physiologiques au cours des phases de dormance et de levée de dormance des microtubercules. Après la levée de dormance, plus la quantité de germes produits est grande plus les teneurs en polyamines sont fortes.

L'étude de systèmes enzymatiques nous a également permis de relier les phases physiologiques à des évolutions biochimiques. L'activité peroxydasique s'intensifie lorsque la levée de dormance se produit et quand la vigueur germinative augmente. La présence d'une isoestérase supplémentaire jusqu'à la 9^{ème} semaine de conservation constitue un bon marqueur de la phase de non germination des microtubercules. L'activité des deux premières enzymes de la voie des pentoses phosphates (G6PDH et 6PGDH) est relativement élevée durant les 20 premières semaines de conservation au froid des microtubercules de la variété Désirée. La fin de cette période, correspondant à la fin de la dormance, coïncide avec le minimum d'activité des 2 enzymes. La voie des pentoses phosphates semble donc impliquée dans le processus de levée de dormance des microtubercules.

L'analyse des cartes protéiques nous a permis de suivre l'évolution de plus de mille polypeptides au cours de la conservation à 4°C des microtubercules de la variété Désirée. Les changements sont peu nombreux; les différences quantitatives sont bien plus importantes que les différences qualitatives. Néanmoins, il nous a été possible de détecter pendant la phase de non germination des microtubercules plusieurs polypeptides qui pourraient être purifiés et qui pourraient, grâce à la fabrication d'anticorps être à la base de tests immunologiques permettant de différencier les stades physiologiques. Aucune protéine ne semble en revanche impliquée directement dans le processus de germination, cela semble indiquer que la capacité à germer n'est pas due à un facteur particulier mais à une interaction de plusieurs facteurs.

Les essais réalisés avec les variétés Bintje et Désirée nous permettent de penser que l'électrophorèse bidimensionnelle pourrait également être une technique utilisable pour l'identification variétale.

- ABBOT A.J. and BELCHER A.R., 1986, Potato tuber formation *in vitro*. In : Plant Tiss. Cult. and its Agric. Applic., Withers L.A. and Alderson P.G. eds., Butterworths, **11**, 113-122.
- ADKINS S.W. and ROSS J.D., 1981, Studies in wild oat seed dormancy. II. Activities of pentose phosphate pathway dehydrogenases, *Plant Physiol.*, **68**, 15-17.
- ALLEN E.J., BEAN J.N. and GRIFFITH R.L., 1978, Effects of low temperature on sprout growth of several potato varieties, *Potato Research*, **21**, 249-255.
- APELBAUM A., 1984, Polyamines as possible indicators of physiological age of potato tubers. Rapport de la réunion de la section Physiologie de l'EAPR, Helsinki, *Potato Research*, **27**, 307-320.
- BAGNI N. and SERAFINI-FRACASSINI D., 1985, Involvement of polyamines in the mechanism of break of dormancy in *Helianthus tuberosus*, *Bull. Soc. bot. Fr.*, **132** (1), 119-125.
- BAGNI N., TORRIGIANI P. and BARBIERI P., 1981, Effect of various inhibitors of polyamine synthesis on the growth of *Helianthus tuberosus*, *Med. Biol.*, **59**, 403-409.
- BAILEY K.M., PHILLIPS I.D.J. and PITT D., 1978, The role of buds and gibberellin in dormancy and the mobilization of reserve materials in potato tubers, *Ann. Bot.*, **42**, 649-657.
- BIALEK K. and BIELINSKA-CZARNECKA M., 1978, Gibberellin pattern in potato tubers in relation to cultivar specificity and weather conditions, *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.*, **26**, 505-512.
- BIELINSKA-CZARNECKA M. and BIALEK K., 1976, Endogenous growth regulators in potato dormancy and sprouting, *Acta Univ. Copernici N., Nauki Mat. Prz.*, **37**, 67-70.
- BIELINSKA-CZARNECKA M. and BIALEK K., 1977, Amylase and acid phosphatase activity in potato tubers treated with gibberellic acid and stored at 2°C and 8°C, *Acta Agrobotanica*, **30**, 95-101.
- BIONDI S., DIAZ T., IGLESIAS I., GAMBERINI G. and BAGNI N., 1990, Polyamines and ethylene in relation to adventitious root formation in *Prunus avium* shoot cultures, *Physiol. Plant.*, **78**, 474-483.
- BLANC A., 1979, Relation entre l'avance de la tubérisation de germes de Pomme de terre cultivés *in vitro* sous l'effet d'un traitement thermique et la modification de l'activité invertase, *C.R. Acad. Sc. Paris*, **289**, 279-282.
- BLUM H., BEIER H. and GROSS H.J., 1987, Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis*, **8**, 93-99.



BODLAENDER K.B.A. and MARINUS J., 1987, Effect of physiological age on growth vigour of seed potatoes of two cultivars . 3 . Effect on plant growth under controlled conditions, *Potato Research* , **30**, 423-440.

BOYER C., 1992, Modifications de la biosynthèse des protéines au cours des stades précoces de l'embryogenèse somatique chez le *Cichorium* hybride "474", DEA, UTC de Compiègne, 49 pages.

BRADFORD M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.

BREDEMEIJER G.M.M., BURG H.C.J., CLAASSEN P.A.M. and STIEKEMA W.J., 1991, Phosphofructokinase in relation to sugar accumulation in cold-stored potato tubers, *J. Plant Physiol.*, **138**, 129-135.

BURTON W.G., 1963, Concepts and mechanisms of dormancy. In : *The growth of the potato*, J.D. Ivins and F.L. Milthorpe eds., Butterworths, London, 17-41.

BURTON W.G., 1965, The sugar balance in some British potato varieties during storage. I. Preliminary observations, *Eur. Potato J.*, **8**, 80-91.

BURTON W.G., 1966, *The Potato : a survey of its history and of factors influencing its yield, nutritive value quality and storage*. In : *The Potato*, Veenman ed., Wageningen, Netherlands, 382 pages.

BURTON W.G., 1975, The immediate effect of gamma irradiation upon the sugar content of potatoes previously stored at 2, 4, 5, 6, 10 and 15,5 °C, *Potato Research*, **18**, 109-115.

BURTON W.G., 1978, Post-harvest behaviour and storage of potatoes. In : *Applied biology*, III, Coaker T.H. ed., Academic press, London, **3**, 86-228.

BURTON W.G. and HANNAN R.S., 1957, Use of γ -radiation for preventing the sprouting of potatoes, *J. Sci. Fd. Agric.*, **12**, 707-715.

CAIRNS A.L.P. and DE VILLIERS O.T., 1986, Physiological basis of dormancy breaking in wild oat (*Avena fatua* L.) seed by ammonia, *Weed Research* , **26** , 365-374.

CALDIZ D.O., 1991, Influence of origin and storage system on physiological age, crop growth and tuber yield of seed potato (*Solanum tuberosum*), *Indian J. Agri. Sci.*, **61** (1), 1-6.

CARNAL N.W. and BLACK C.C., 1979, Pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase, a new glycolytic enzyme in pineapple leaves, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **86**, 20-26.

- CARNAL N.W. and BLACK C.C., 1983, Phosphofructokinase activities in photosynthetic organisms, *Plant Physiol.*, **72**, 150-155.
- CHAMPAGNAT P., 1969, Dormance des semences et des bourgeons. Dans : Croissance, morphogénèse et reproduction, Champagnat P. ed., Masson et Cie, Paris, 193-217.
- CHINCHILLA C.M., 1985, Efecto de la temperatura de almacenamiento y de algunas sustancias químicas en la interrupción del reposo de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. Atzimba, *Agron. Costarr.*, **9** (2), 187-191.
- CLEGG M.D. and RAPPAPORT L., 1970, Regulation of bud rest in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). VI. Biochemical changes induced in excised potato buds by gibberellic acid, *Plant Physiol.*, **45**, 8-13.
- COLEMAN W.K., 1983, An evaluation of bromoethane for breaking tuber dormancy in *Solanum tuberosum* L., *Amer. Potato J.*, **60**, 161-167.
- COLEMAN W.K. , COLEMAN S.E., 1986, The effects of bromoethane and ethanol on potato (*Solanum tuberosum*) tuber sprouting and subsequent yield responses, *Amer. Potato J.*, **63**, 373-378.
- COLEMAN W.K. and KING R.R., 1984, Changes in endogenous abscissic acid, soluble sugars and proline levels during tuber dormancy in *Solanum tuberosum* L., *Amer. Potato J.*, **61**, 437-449.
- COME D., LENOIR C. et CORBINEAU F., 1984, La dormance des céréales et son élimination, *Seed Sci. Technol.*, **12**, 629-640.
- CONRAD K., ADAM G. and ZSCHIESCHE M., 1983, Relation between t-RNA-cytokinin and free cytokinin in injured storage tissues, *Postdamer Forsch Paed Hochsch Karl Liebknecht, Potsdam, Naturwiss R.*, **35**, 179-188.
- CORBINEAU F., BELAID D. and COME D., 1992, Dormancy of *Bromus rubens* L. seeds in relation to temperature, light and oxygen effects, *Weed Research*, **32**, 303-310.
- COUILLEROT J.P., 1993, Effects and distribution of ¹⁴C-gibberellic acid after application to stored potato microtubers, *Phyton*, **54**, 67-73.
- COUILLEROT J.P., DECOUT E., WARNOT F., DUBOIS J. et VASSEUR J., 1993, Evolution des polyamines libres en relation avec la source carbonée et l'embryogénèse somatique chez un *Cichorium* hybride, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **316** (III), 299-305.

- DAMERVAL C., DE VIENNE D., ZIVY M., TARROUX P. and VINCENS P., 1993, Electrophorèse bidimensionnelle des protéines, *Biofutur*, **123**, 3-18.
- DARRAL N.M. and WAREING P.F., 1981, The effect of nitrogen nutrition on cytokinin activity and free amino acids in *Betula pendula* Roth. and *Acer pseudoplatanus* L., *J. Exp. Bot.*, **32**, 369-379.
- DAVIES P.J., 1987, The plant hormones : their nature, occurrence, and functions. In : Plant hormones and their role in plant growth and development, Davies P.J. ed., Martinus Nijhof, Boston, **1**, 1-11.
- DAVIES H.V., JEFFERIES R.A. and SCOBIE L., 1989, Hexose accumulation in cold- stored tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) : The effects of water stress, *J. Plant Physiol.* , **134** , 471-475.
- DE BOTTINI G.A., DE BOTTINI R. and TIZIO R., 1982, Physiology of dormancy in potato tubers as related to levels of endogenous regulators, *Phyton*, **42** (1), 115-121.
- DE FERNANDEZ O.S., BORGO R. et TIZIO R., 1990, Rupture de la dormance de tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) : effets des blessures, de l'acide gibbérellique, de la kinétine et des traitements combinés de ces deux régulateurs de croissance, *C.R. Soc. Biol.*, **184**, 259-268.
- DENNY F.E., 1926, Second report on the use of chemicals for hastening the sprouting of dormant tubers, *Amer. J. Bot.*, **13**, 386-395.
- DENNY F.E., 1945, Synergistic effects of three chemicals in the treatment of dormant potato tubers to hasten germination. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **14**, 1-14.
- DESAI H.V. and MEHTA A.R., 1985, Changes in polyamine during shoot formation, root formation, and callus induction in cultured *Passiflora* leaf discs, *J. Plant Physiol.*, **119**, 45-53.
- DIMALLA G.G. and VAN STADEN J., 1977, Apical dominance and utilization of carbohydrates during storage of potato tubers, *Ann. Bot.*, **41**, 387-391.
- DIXON W.L. and AP REES T., 1980 a, Carbohydrate metabolism during cold-induced sweetening of potato tubers, *Phytochem.*, **19**, 1653-1656.
- DIXON W.L. and AP REES T., 1980 b, Identification of the regulatory steps in glycolysis in potato tubers, *Phytochem.*, **19**, 1297-1301.
- DIXON W.L., FRANKS F. and AP REES T., 1981, Cold-lability of phosphofructokinase from potato tubers, *Phytochem.*, **20**, 969-972.

- DOORENBOS J., 1958, Effect of gibberellic acid on sprouting of potatoes, *Neth. J. Agric. Sci.*, **6**, 267-270.
- DUCREUX G., ROSSIGNOL L. et ROSSIGNOL M., 1986, La pomme de terre, *La Recherche*, **174**, 36-47.
- DUNN G., 1974, A model for starch breakdown in higher plants, *Phytochem.*, **13**, 1341-1346.
- EL HADRAMI I., CARRON M.P. et D'AUZAC J., 1989 a, Variabilité clonale du potentiel embryogène chez *Hevea brasiliensis* ; relations avec les polyamines (PA) et les peroxydases (PO) des cals, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **308** (III), 299-305.
- EL HADRAMI I., MICHAUX-FERRIERE N., CARRON M.P. et D'AUZAC J., 1989 b, Les polyamines, facteur limitant possible de l'embryogenèse somatique chez l'*Hevea brasiliensis*, *C.R. Acad. Sci. Paris*, **308** (III), 205-211.
- EMILSON B., 1949, Studies on the rest period and dormant period in the potato tuber, *Acta Agriculturae Suecana*, **3**, 189-284.
- ESTRADA R., TOVAR P. and DODDS J.H., 1986, Induction of *in vitro* tubers in a broad range of potato genotypes, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **3**, 3-10.
- EWING L.L. , Mc MURRY S.E. and EWING E.E., 1987, Cutting as a method of breaking dormancy in microtubers produced *in vitro*, *Amer. Potato J.*, **64**, 329-332.
- FIALA V. , LE NARD M., QUEROU Y. et JOLIVET E., 1988, La spermidine, marqueur moléculaire de l'induction florale chez le bulbe d'*Iris hollandica*, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **306** (III), 579-582.
- FIENBERG A.A., CHOI J.H., LUBICH W.P. and SUNG Z.R., 1984, Developmental regulation of polyamine metabolism in growth and differentiation of carrot culture, *Planta*, **162**, 532-539.
- FLORES H.E. and GALSTON A.W., 1982, Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography, *Plant Physiol.*, **69**, 701-706.
- FOBERT P.R. and WEBB D.T., 1988, Effects of polyamines, polyamine precursors, and polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis from eggplant (*Solanum melongena*) cotyledons, *Can. J. Bot.*, **66**, 1734-1742.
- GALLARDO M., BUENO M., ANGOSTO T., GALLARDO E. and MATILLA A.J., 1992, Free polyamines in *Cicer arietinum* seeds during the onset of germination, *Phytochem.*, **31** (7), 2283-2287.

GALSTON A.W., 1983, Polyamines as modulators of plant development, *BioScience*, **33**, 382-387.

GARNER N., 1986, Studies of dormancy in microtubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) grown *in vitro*, IAPTC Congress (Minneapolis) Abst., 287.

GASPAR T., TEPPAZ-MISSON C. and COURDUROUX J.C., 1973, Isoperoxydases in Jerusalem Artichoke in relation to tuberization and dormancy, *Biologia Plantarum*, **15** (5), 339-345.

GLOCK G.E. and McLEAN P., 1953, Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver, *Biochem. J.*, **55**, 400-407.

GOODWIN P.B., 1966, The effect of water on dormancy in the potato, *Eur. Potato J.*, **9** (2), 53-63.

GOSLING P.G. and ROSS J.D., 1980, Pentose phosphate metabolism during dormancy breakage in *Corylus avellana* L., *Planta*, **148**, 362-366.

GRANIER F., THIELLEMENT H., AMBARD-BRETEVILLE F. and REMY R., 1986, Subcellular localization of some wheat polypeptides revealed by two-dimensional electrophoresis, *Electrophoresis*, **7**, 476-479.

GUINAZU M., ABDALA G. and TIZIO R., 1988, Effect of free and conjugated gibberellins on roots of potato cuttings treated with CCC ((2-chloroethyl) trimethylammonium chloride) in relation to tuber formation, *J. Plant Physiol.*, **132**, 725-730.

GUTHRIE J.D., 1938 a, Effect of ethylene thiocyanohydrin, ethyl carbamine and indoleacetic acid on the sprouting of potato tubers, *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **9**, 265-272.

GUTHRIE J.D., 1938 b, Inducing "dormancy" in potato tubers with potassium naphthaleneacetate and breaking it with ethylene chlorohydrin, *Science*, **88**, 86.

GUTHRIE J.D., 1939, Inhibition of the growth of buds of potato tubers with the vapor of the methyl ester of naphthaleneacetic acid, *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **10**, 325-328.

GUTHRIE J.D., 1940, Role of glutathione in the breaking of the rest period of buds by ethylene chlorohydrin, *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **11**, 261-270.

HANCE B.A. and BEVINGTON J.M., 1992, Changes in protein synthesis during stratification and dormancy release in embryos of sugar maple (*Acer saccharum*), *Physiol. Plant.*, **86**, 365-371.

- HARKETT P.J., 1971, The effect of oxygen concentration on the sugar content of potato tubers stored at low temperature, *Potato Research*, **14**, 305-311.
- HARKETT P.J., 1981, External factors affecting length of dormant period in potato, *J. Sci. Food Agric.*, **34**, 102-103.
- HARTMANS K.J. and VAN LOON C.D., 1987, Effect of physiological age on growth vigour of seed potatoes of two cultivars. 1. Influence of storage period and temperature on sprouting characteristics, *Potato Research*, **30**, 397-409.
- HAWKER J.S., MARSCHNER H., and KRAUSS A., 1979, Starch synthesis in developing potato tubers, *Physiol. Plant.*, **46**, 25-30.
- HEMBERG T., 1985, Potato rest. In : *Potato Physiology*, LI P.H. ed., Acad.Press, Inc. Orlando, Florida, **11**, 353-388.
- HENDRICKS S.B. and TAYLORSON R.B., 1975, Breaking of seed dormancy by catalase inhibition, *Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.)*, **72**, 306-309.
- HILBERT J.L., 1989, Contribution à l'étude des interactions plantes-champignons ectomycorhiziens. Modifications de la biosynthèse des protéines au cours du développement de la symbiose *Eucalyptus globulus* - *Pisolithus tinctorius*, Thèse de l'Université Nancy I, 105 pages.
- HILBERT J.L. and MARTIN F., 1988, Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of ectomycorrhiza-specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus*, *New Phytol.*, **110**, 339-346.
- HILHORST H.W.M., 1990, Seed dormancy and germination : light and nitrate, Ph. D. thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 109 pages.
- HOCHSTRASSER D.F., HARRINGTON M.G., HOCHSTRASSER A.C., MILLER M.J. and MERRILL C.R., 1988, Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, **173**, 424-435.
- HU H. and COUVILLON G. A., 1990, Activities of catalase and pentose phosphate pathway dehydrogenases during dormancy release in Nectarine seed, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **115** (6), 987-990.
- HUANG H. and VILLANUEVA V.R., 1992, Inhibition of polyamine biosynthesis and seed germination in *Picea abies*, *Phytochem.*, **31** (10), 3353-3356.

- HUGHES J.C. and FULLER T.J., 1984, Fluctuations in sugars in cv. Record during extended storage at +10°C, *Potato Research* , **27** , 229-236.
- HUSSEY G. and STACEY N.J., 1981, *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.), *Ann. Bot.*, **48**, 787-796.
- IRITANI W.M. and WELLER L., 1978, Factors influencing reconditioning of Russet Burbank potatoes, *Amer. Potato J.*, **55**, 425-430.
- ISHERWOOD A.F., 1973, Effect of changes in storage temperature on the metabolism of the potato tuber, Proc. 5th triennial conf. EAPR, Norwich, 156-157.
- ISHERWOOD A.F., 1976, Mechanism of starch-sugar interconversion in *Solanum tuberosum*, *Phytochem.* , **15**, 33-41.
- ISHERWOOD A.F. and BURTON W.G., 1975, The effect of senescence, handling, sprouting and chemical sprout suppression upon respiratory quotient of stored potato tubers, *Potato Research*, **18**, 98-104.
- JOLIVET E., 1969, Physiologie de la tubérisation, *Ann. Physiol. Vég.*, **11** (3), 265-301.
- JOLIVET E. , FIALA V., QUEROU Y. et TENDILLE C., 1986, Variations rapides et temporaires des teneurs en amines du tubercule de Pomme de terre au cours de la rupture de son repos végétatif par la rindite, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **303** (III), 529-532.
- KAUR-SAWHNEY R. , SHIH L.M. and GALSTON W.A., 1982, Relation of polyamines biosynthesis to the initiation of sprouting in potato tubers, *Plant Physiol.*, **69**, 411-415.
- KAUR-SAWNEY R., TIBURCIO A.F. and GALSTON A.W., 1988, Spermidine and flower bud differentiation in thin-layer explants of tobacco, *Planta*, **173**, 282-284.
- KLOSE J., 1982, Genetic variability of soluble proteins studies by two-dimensional electrophoresis on different inbred mouse strains and on different mouse organs, *J. Mol. Evol.*, **18**, 315-328.
- KOCACALISKAN I., KUFREVIOGLU I., KEHA E.E. and CALISKAN S., 1989, Breaking of dormancy in potato tubers by electrical current, *J. Plant Physiol.*, **135**, 373-374.
- KORABLEVA N.P., MOROZOVA E.V. and METLITSKII L.V., 1977, Role of phenolic and terpenoid inhibitors in regulation dormancy of potato. In : *Plant Growth and Regulation, Proc. 2nd Int. Symp.*, Sofia, Kudrev, Ivanova and Karanov eds, 224-227.

- KOVACS M.I.P. and SIMPSON G.M., 1976, Dormancy and enzyme levels in seeds of wild oats, *Phytochem.*, **15**, 455-458.
- KRAUSS A., 1985, Interaction of nitrogen nutrition, phytohormones, and tuberization. In : Potato physiology, P.H. LI ed., Academic Press, Orlando, Florida, 209-230.
- KRIJTHE N.K., 1946, De invloed van de bewaring van aardappelknollen op den bouw van de knoppen en op de ontwikkeling tot volwassen plant, *Meded. Landbouwhogeschool*, **47**, 3-36.
- KRIJTHE N.K., 1958, Changes in the germinating power of potatoes from the time of lifting onwards, *Eur. Potato J.*, **1**, 69-71.
- KRIJTHE N.K., 1962, Observations on the sprouting of seed. *Eur. Potato J.*, **5**, 316-333.
- LA CROIX L.J. and JASWAL A.S., 1967, Metabolic changes in after-ripening seed of *Prunus cerasus*, *Plant Physiol.*, **42**, 479-480.
- LADYZHENSKAYA E.P., KADYRZHANOVA D.K., KORABLEVA N.P. and METLITSKII L.V., 1983, Binding of gibberellic and abscissic acids with plasmalemma preparation from potato tuber parenchyma, *Fisiologiya Rastanii*, **30** (2), 246-252.
- LAEMMLI U.K., 1970, Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- LANG G.A., 1987, Dormancy : a new universal terminology, *Hort. Science*, **22** (5), 817-820.
- LASCARIDES D.L., 1967, Shortening the dormant period of spring-grown seed potatoes for midsummer planting, *Eur. Potato J.*, **10**, 100-107.
- LAVIEVILLE L., 1991, Etude de la microtubérisation *in vitro* chez la Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.), Thèse de l'Université d'Amiens, 137 pages.
- LEE T.S.G., 1978, Effect of succinic acid-2, 2-dimethylhydrazide, gibberellic acid and temperature on the invertase and sucrose synthase activity of potato tubers, *Arq. Biol. Techno.*, **21**, 87-91.
- LEGRAND B., 1987, Les peroxydases et leur régulation au cours de la néoformation de bourgeons par des tissus de *Cichorium intybus* L. cultivés *in vitro*, Thèse de l'Université Lille I, 219 pages.

- LEVITT J., 1954, Investigations of the cytoplasmic particulates and proteins of potato tubers. III. Protein synthesis during the breaking of the rest period, *Physiol. Plant.*, **7**, 597-601.
- LINDBLOM H., 1966, Proceedings of the European Association of Potato Research (Zürich), 184-185.
- LINDBLOM H., 1970, Sprouting tendency of stored potatoes, *Potato Research*, **13**, 159-166.
- LINNEMAN A.R., VAN ES A. and HARTMANS K.J., 1985, Changes in the content of L-ascorbic acid, glucose, fructose, sucrose and total glycoalkaloids in potatoes (cv. Bintje), stored at 7, 16 and 28°C, *Potato Research*, **28**, 271-278.
- LIU X.Y., ROCHA-SOSA M., HUMMEL S., WILLMITZER L. and FROMMER W.B., 1991, A detail study of the regulation and evolution of the two classes of patatin genes in *Solanum tuberosum* L., *Plant Molecular Biology*, **17**, 1139-1154.
- MADEC P., 1958, Le rôle du tubercule-mère dans l'évolution des germes de la Pomme de terre, *Ann. Amélior. Pl.*, **8**, 151-169.
- MADEC P., 1981, Historique de la notion d'âge physiologique du tubercule de Pomme de terre, Abstracts of conference papers 8 th triennial conference EAPR (München), 62-63.
- MADEC P. et PERENNEC P., 1955, Les possibilités d'évolution des germes de la Pomme de terre et leurs conséquences, *Ann. Amélior. Pl.*, **5**, 555-574.
- MADEC P. et PERENNEC P., 1959, Le rôle respectif du feuillage et du tubercule-mère dans la tubérisation de la Pomme de terre, *Eur. Potato J.*, **2**, 22-49.
- MADEC P. et PERENNEC P., 1962, Les relations entre l'induction de la tubérisation et la croissance chez la plante de Pommes de terre (*Solanum tuberosum* L.), *Ann. Physiol. Végét.*, **4**, 5-84.
- MADEC P. et PERENNEC P., 1969, Levée de dormance de tubercules de Pommes de terre d'âge différent : action de la rindite, de la gibbérelline et de l'oéilletonnage, *Eur. Potato J.*, **12**, 96-115.
- MARES D.J, SOWOKINOS J.R. and HAWKER J.S., 1985, Carbohydrate metabolism in developing potato tubers. In : *Potato Physiology*, P. H. LI ed., Academic Press INC, **9**, 279-327.
- MARINUS J. and BODLAENDER K.B.A., 1978, Growth and yied of seed potatoes after application of gibberellic acid to the tubers before planting, *Neth. J. agric. Sci.*, **26**, 354-365.

- MARTINEZ-ZAPATER J.M. and OLIVER J.L., 1984, Identification of potato varieties: an isozyme approach. In : *Solanaceae* : biology and systematics, D'Arcy W.G. ed., Columbia University Press, New York.
- MATEJKO C. and DAHLHELM H., 1991, Polyamines synthesis and its relation to dormancy in *Allium cepa* L., *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **187**, 217-226.
- Mc CONCKEY E.H., 1982, Molecular evolution, intracellular organization, and the trinary structure of proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3236-3240.
- Mc DONALD J.G. and COLEMAN W.K., 1988, A reevaluation of bromoethane in comparison to rindite for the post-harvest detection of virus Y in tubers by ELISA, *Amer. Potato J.*, **65**, 547-550.
- MEIJER E.G.M. and SIMMONDS J., 1988, Polyamine levels in relation to growth and somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa* L., *J. Exp. Bot.*, **39** (203), 787-794.
- MENGOLI M., BAGNI N., LUCCARINI G., RONCHI V.N. and SERAFINI-FRACASSINI D., 1989, *Daucus carota* cell cultures : polyamines and effect of polyamine biosynthesis inhibitors in proembryogenic phase and different embryo stages, *J. Plant Physiol.*, **134**, 389-394.
- MIGNERY G.A., PIKAARD C.S. and PARK W.D., 1988, Molecular characterisation of the patatin multigene family of potato, *Gene*, **62**, 27-44.
- MIKITZEL L.J. and KNOWLES N.J., 1989 a, Potato seed-tuber age affects mobilization of carbohydrate reserves during plant establishment, *Ann. Bot.*, **63**, 311-320.
- MIKITZEL L.J. and KNOWLES N.R., 1989 b, Polyamine metabolism of potato seed-tubers during long-term storage and early sprout development, *Plant Physiol.*, **91**, 183-189.
- MINATO T. and OKAZAWA Y., 1978, Effect of ethylene treatment on auxin metabolism of potato tubers, *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.*, **58**, 535-547.
- MINATO T., KIKUTA Y. and OKAZAWA Y., 1982, Effect of (2-chloroethyl) phosphonic acid (CEPA) on cytokinin level of potato tubers, *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.*, **61**, 180-186.
- MIODUSZEWSKA H. and BIELINSKA-CZARNECKA M., 1984, Influence of GA₃ treatment on acid phosphatase activity in potato tubers towards the end of growth, in dormancy and sprouting, *Acta Physiologiae Plantarum*, **6** (2), 75-81.

- MIYAZAKI J.H. and YANG S.F., 1987, The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis, *Physiol. Plant.*, **69**, 366-370.
- MOLET D., 1988, Culture *in vitro*: Evolution des techniques. Boutures - Microtubercules - Minitubercules, *La Pomme de Terre Française*, **444**, 43-47.
- MOLET D., 1990, Culture *in vitro*: Le point sur la production des boutures, microtubercules et minitubercules, *La Pomme de Terre Française*, **459**, 173-176.
- MOLL A., 1985, Der einfluss des physiologischen Alters der Pflanzknollen auf die Ertragsbildung von Kartoffelsorten verschiedener reifezeit, *Potato Research*, **28**, 233-250.
- MONTAGUE M.J., ARMSTRONG T.A. and JAWORSKI E.G., 1979, Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota* L., *Plant Physiol.*, **62**, 430-433.
- MURASHIGE T. and SKOOG F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- NOODEN L.D. and WEBER J.A., 1978, Environmental and hormonal control of dormancy in terminal buds of plants. In : *Dormancy and developmental arrest : experimental analysis in plants and animals*, Clutter M.E. ed., Academic press, New York, 221-268.
- NOWAK J., 1977, Biochemical changes in stored potato tubers with different rest periods. I. Influence of the storage temperature and isopropyl phenylcarbamates (IPC and CIPC) on protein changes., *Z. Pflanzenphysiol.*, **81**, 113-124.
- NOZERAN R., BANCILHON-ROSSIGNOL L. and GREANAN S., 1977, Nouvelles possibilités d'obtention et de multiplication rapide de clones sains de Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.), *C. R. Acad. Sci., Paris*, **285**, 37-40.
- OBATA-SASAMOTO H. and SUZUKI H., 1979, Activities of enzymes relating to starch synthesis and endogenous levels of growth regulators during tuberization of isolated potato stolons cultured *in vitro*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **95**, 69-75.
- OBHLIDALOVA L., SLABY K. and SEBANEK J., 1979, Changes in the content of native cytokinins and gibberellins during the storage of potato tubers in relation to their polarity, *Rost. Vyr.*, **25**, 229-233.

O'BRIEN P.J., ALLEN E.J., BEAN J.N., GRIFFITH R.L., JONES S.A. and JONES J.L., 1983, Accumulated day-degrees as a measure of physiological age and the relationships with growth and yield in early potato varieties. *J. Agric. Sci., Camb*, **101**, 613-631.

O'BRIEN P.J. and ALLEN E.J., 1992, Effects of seed crop husbandry, seed source, seed tuber weight and seed rate on the growth of ware potato crops, *J. Agric. Sci.*, **119**, 355-366.

OLIVER J.L. and MARTINEZ-ZAPATER J.M., 1985, A genetic classification of potato based on allozyme patterns, *Theor. Appl. Genet.*, **69**, 305-311.

PAIVA E., LISTER R.M. and PARK W.D., 1983, Induction and accumulation of major tuber proteins of potato in stems and petioles, *Plant Physiol.*, **71**, 161-168.

PATERSON D.R., WITTEWER S.H., WELLER, L.E. and SELL H.M., 1952, The effect of preharvest foliar sprays of maleic hydrazide on sprout inhibition and storage quality of potatoes, *Plant Physiol.*, **27**, 135-142.

PERENNEC P. et MADEC P., 1960, Influence du tubercule sur la croissance et le développement du germe de Pomme de terre, *Ann. Physiol. Végét.*, **2**, 29-67.

PERENNEC P. et MADEC P., 1980, Age physiologique du plant de Pomme de terre. Incidence sur la germination et répercussions sur le comportement des plantes, *Potato Research*, **23**, 183-199.

PETEL G., SUELDO R., COUDRET A. and GENDRAUD M., 1992, Plasmalemma fluidity in parenchyma cells from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers during the break of dormancy, *Biologia Plantarum*, **34** (5-6), 373-380.

PETEL G., CANDELIER P. and GENDRAUD M., 1993, Effect of ethanol on filiate tubers of Jerusalem artichoke : a new tool to study tuber dormancy, *Plant Physiol. Biochem.*, **31** (1), 67-71.

PETERSON L., BARKER W.G. and HOWARTH M.J., 1985, Development and structure of tubers. In : *Potato physiology*, Li P.H. ed., Acad. Press, New York, 124-152.

PHILLIPS R., PRESS M.C. and EASON A., 1987, Polyamines in relation to cell division and xylogenesis in cultured explants of *Helianthus tuberosus* : lack of evidence for growth-regulatory action, *J. Exp. Bot.*, **38**, 164-172.

POLLOCK C.J., and AP REES T., 1975, Activities of enzymes of sugar metabolism in cold-stored tubers of *Solanum tuberosum*, *Phytochem.*, **14**, 613-617.

- PRESSEY R. and SHAW R., 1966, Effect of temperature on invertase, invertase inhibitor, and sugars in potato tubers. *Plant Physiol.*, **41**, 1657-1661.
- PROTACIO C.M. and FLORES H.E., 1992, The role of polyamines in potato tuber formation, *In vitro Cell. Dev. Biol.*, **28**, 81-86.
- RACUSEN D., 1983, Occurrence of patatin during growth and storage of potato tubers, *Can. J. Bot.*, **61**, 370-373.
- RACUSEN D., 1984, Lipid acyl hydrolase of patatin, *Can. J. Bot.*, **62**, 1640-1644.
- RACUSEN D. and FOOTE M., 1980, A major soluble glycoprotein of potato tubers, *J. Food Biochem.*, **4**, 43-52.
- RACUSEN D. and RACUSEN R., 1992, Esterase activity and structural heterogeneity in patatin from wild potato species, *Can. J. Bot.*, **70**, 597-600.
- RAJNCHAPEL-MESSAI J., 1987, La pomme de terre fait peau neuve, *Biofutur*, **60**, 25-35.
- RAPPAPORT L., 1956, Growth regulating metabolites, *Calif. Agric.*, **12**, 4-5.
- RAPPAPORT L., LIPPERT L.F. and TIMM H., 1957, Sprouting, plant growth and tuber production as affected by chemical treatment of white potato seed pieces. I. Breaking the rest period with gibberellic acid, *Amer. Potato J.*, **34**, 254-260.
- RAPPAPORT L. and SACHS M., 1967, Wound induced gibberellins, *Nature*, **214**, 1149-1150.
- RAPPAPORT L. and WOLF N., 1969, The problem of dormancy in potato tubers and related structures. In : *Dormancy and survival*, Symp. Soc. Exp. Biol., Woolhouse H.W. ed., Cambridge, University press, **23**, 219-240.
- REKHA S.M.N., RAMA M.V. and NARASIMHAM P., 1983, Synergistic action of gibberellin and ethrel on the inducement of sprouting in potatoes, *J. Food Sci. Techn.*, **20**, 120-122.
- REUST W., 1982, Contribution à l'appréciation de l'âge physiologique des tubercules de Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) et étude de son importance sur le rendement, Thèse de l'Ecole Polytechnique Fédérale, Zürich, 113 pages.
- REUST W., 1986, EAPR working group "physiological age of the potato", *Potato Research*, **29**, 268-271.

- REUST W. and AERNY J., 1985, Determination of physiological age of potato tubers with using sucrose, citric and malic acid as indicators, *Potato Research*, **28**, 251-261.
- REUST W. and GUGERLI P., 1984, Oxygen and carbon dioxide treatment to break potato tuber dormancy for reliable detection of potato virus Y (PVY) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Potato Research*, **27**, 435-439.
- ROBERTS E.H., 1969, Seed dormancy and oxidation processes, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **23**, 161-192.
- ROBERTS E.H., 1973, Oxidative processes and the control of seed germination. In : *Seed ecology*, Heydecker W. ed., Butterworths, London, 189-218.
- ROBERTS E.H. and SMITH R.D., 1977, Dormancy and the pentose phosphate pathway. In : *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*, A.A. Khan ed., North-Holland biochemical Press, **18**, 384-411.
- ROBIE C.A. and MINOCHA S.C., 1989, Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. I. The effects of difluoromethylornithine and difluoromethylarginine, *Plant Science*, **65**, 45-54.
- ROCHA-SOSA M., SONNEWALD U., FROMMER W.B., STRATMANN M., SCHELL J. and WILLMITZER L., 1989, Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene, *EMBO J.*, **8**, 23-29.
- ROHOZINSKI J., EDWARDS G.R. and HOSKINS P., 1986, Effects of brief exposure to nitrogenous compounds on floral initiation in apple trees, *Physiol. Vég.*, **24** (6), 673-677.
- ROSAHL S., SCHELL J. and WILLMITZER L., 1987, Expression of a tuber-specific storage protein in transgenic tobacco plants : demonstration of an esterase activity, *EMBO J.*, **6**, 1155-1159.
- ROSENSTOCK G. and KAHL G., 1978, Phytohormones and the regulation of cellular processes in aging storage tissue. In : *Biochemistry of wounded plant tissues*, Kahl G. ed., De Gruyter, Berlin New York, 623-671.
- RUIZ-NIETO A., VILCHEZ M., CHUECA A. and LOPEZ-GORGE J., 1989, Analisis varietal de *Solanum tuberosum* por electroenfoque analitico de proteinas del suero del tuberculo, *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, **29**, 340-350.
- RUIZ-NIETO A.R., SANCHO A. Ch., BARROS M.V. and GORGE J.L., 1990, Peroxidase zymograms at constant and gradient pH electrophoresis as an analytical test in the identification of potato varieties, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 2148-2153.

- RYLSKI I., RAPPAPORT L., PRATT H. K., 1974, Dual effects of ethylene on potato dormancy and sprout growth, *Plant Physiol.*, **53**, 658-662.
- SAMOTUS B., NIEDZWIEDZ M., KOŁODZIEJ Z., LEJA M. and CZAJKOWSKI B., 1974, Storage and reconditioning of tubers of Polish potato varieties and strains. 1. Influence of storage temperature on sugar level in potato tubers of different varieties and strains, *Potato Research*, **17**, 64-81.
- SATTELMACHER B. and MARSCHNER H., 1978, Cytokinin activity in stolons and tubers of *Solanum tuberosum* during the period of tuberization, *Physiol. Plant.*, **44**, 69-72.
- SATOH S. and ESASHI Y., 1980, No contribution of the pentose phosphate pathway in dormancy-breaking of cocklebur seeds, *Physiol. Plant.*, **48**, 243-246.
- SAUDEMONT D., 1992, Essais d'embryogenèse somatique chez des génotypes de chicorées Witloof (*Cichorium intybus* L. var. Witloof). Comparaison avec un hybride embryogène (*Cichorium intybus* L. var. Magdebourg x *Cichorium endivia* L. var. latifolia) et analyses des polyamines endogènes libres, Thèse de l'Université Lille I, 121 pages.
- SERAFINI-FRACASSINI D., TORRIGIANI P. and BRANCA C., 1984, Polyamines bound to nucleic acids during dormancy and activation of tuber cells of *Helianthus tuberosus*, *Physiol. Plant.*, **60**, 351-357.
- SIEFFERT A., 1988, Pollution par le SO₂ et interaction avec la sécheresse, des facteurs de dépérissement des forêts? Etude de la composition protéique des aiguilles de *Picea abies* L. Karst., Thèse de Paris XI, 126 pages.
- SIMMONDS J.A. and SIMPSON G.M., 1971, Increased participation of the pentose phosphate pathway in response to after-ripening and gibberellic acid treatment of caryopses of *Avena fatua* L., *Can. J. Bot.*, **49**, 1833-1840.
- SIMMONDS J.A. and SIMPSON G.M., 1972, Regulation of the Krebs cycle and pentose phosphate pathway activities in the control of dormancy in *Avena fatua* L., *Can. J. Bot.*, **50**, 1041-1048.
- SLOCUM R.D., KAUR-SAWHNEY R. and GALSTON A.W., 1984, The physiology and biochemistry of polyamines in plants, *Arch. Bioch. Biophys.*, **235** (2), 283-303.
- SŁOMNICKI I. and RYLSKI I., 1964, Effect of cutting and gibberellin treatment on autumn-grown seed potatoes for spring planting, *Eur. Potato J.*, **7**, 184-192.
- SMITH T.A., 1985, Polyamines, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **36**, 117-143.

- SMITH T.A. and DAVIES P.J., 1985, Separation and quantitation of polyamines in plant tissue by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives, *Plant Physiol.*, **78**, 89-91.
- SONNEWALD U., STUDER D., ROCHA-SOSA M. and WILLMITZER L., 1989, Immunocytochemical localization of patatin, the major glycoprotein in potato (*Solanum tuberosum*) tubers, *Planta*, **178**, 176-183.
- SOWOKINOS J.R., 1973, Maturation of *Solanum tuberosum*. I. Comparative sucrose and sucrose synthetase levels between several good and poor processing varieties, *Amer. Potato J.* , **50** , 234-247
- SOWOKINOS J.R., 1976, Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*. I. Changes in ADP-Glucose and UDP-Glucose pyrophosphorylases activities associated with starch biosynthesis during tuberization, maturation, and storage of potatoes, *Plant Physiol.*, **57**, 63-68.
- STEINBERG R.A., O'FARREL P.H., FRIEDRICH U. and COFFINE P., 1977, Mutations causing charge alteration in regulatory subunits of the cAMP-dependent protein kinase of cultured S49 lymphoma cells, *Cell*, **10**, 381-391.
- STUART W. and MILSTEAD E.H., 1934, Shortening the rest period in the potato, U.S. Dep. Agric.,Tech. Bull., 415.
- SWAMY P.M. and SANDHYARANI C.K., 1986, Contribution of the pentose phosphate pathway and glycolytic pathway to dormancy breakage and germination of peanut (*Arachis hypogea* L.) seeds, *J. Exp. Bot.*, **37** (174), 80-88.
- SWAMY P.M., UMAPATHI P. and NARASIMHA REDDY S.B. , 1980, Involvement of PP pathway enzymes in the dormancy of peanut (*Arachis hypogea* L.) seeds., *Z. Pflanzenphysiol.*, **97**, 373-376.
- SZALAI I. and DEVAY M., 1957, Die Wirkung der "Rindite Dämpfe" auf den N-Stoffwechsel der Kartoffelknollen in den einzelnen Keimungsphasen, *Acta Univ. Szeged, Acta Biol. (N.S.)*, **3**, 25-31.
- SZCZOTKA Z., 1984, Polyamines changes in (*Quercus borealis* Michx.) and (*Quercus robur* L.) seeds during ageing in controlled conditions, *Acta Physiol. Plant.*, **6**, 127-136.
- TAO K.L.and KHAN A.A., 1976, Changes in isoperoxydases during cold treatment of dormant pear embryo, *Plant Physiol.*, **57**, 1-4.
- TAYLOR M.A., BURCH L.R. and DAVIES H.V., 1993, Changes in polyamine biosynthesis during the initial stages of tuberisation in potato (*Solanum tuberosum* L.), *J. Plant Physiol.*, **141**, 370- 372.

THEVENOT C. , SIMOND-COTE E. , PERINO C. and DAUSSANT J., 1989, Pentose phosphate pathway deshydrogenases in relation to the dormancy , germination , and growth of apple embryos, *Isr. J. Bot.* , **38** , 193-198.

THORNTON N.C., 1939, Oxygen regulates the dormancy of the potato, *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **10**, 339-361.

TIBURCIO A.F., GENDY C.A. and TRAN THAN VAN K., 1989, Morphogenesis in tobacco subepidermal cells : putrescine as marker of root differentiation, *Plant Cell Tissue and Organ Culture.*, **19**, 43-54.

TIMM H., RAPPAPORT L., BISHOP J.C. and HOYLE B.J., 1962, Sprouting, plant growth, and tuber production as affected by chemical treatment of white potato seed species. IV. Responses of dormant and sprouted seed potatoes to gibberellic acid, *Amer. Potato J.*, **39**, 107-115.

TIZIO R. et TIZIO C.R., 1981, Role du tubercule-mère dans la tubérisation de la plante de Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L., variété Bintje), *Phyton*, **40** (1), 49-59.

TORRIGIANI P., SCOCCIANI V. and BAGNI N., 1988, Polyamine oxidase activity and polyamine content in maize during seed germination, *Plant Physiol.*, **74**, 427-432.

TORRIGIANI P., SERAFINI-FRACASSINI D. and BAGNI N., 1987, Polyamine biosynthesis and effect of dicyclohexylamine during cell cycle of *Helianthus tuberosus*, *Plant Physiol.*, **74**, 427-432.

TSUKAMOTO Y., ASAHIRA T. and NAMIKI T., 1961, Studies on the dormancy of the potato tuber. IV. The effect of gibberellin on breaking dormancy of potatoes lifted at different times, *Mem. Res. Inst. Fd. Sci. Kyoto Univ.*, **23**, 23-27.

TURNBULL C.G.N. and HANKE D.E., 1985, The control of bud dormancy in potato *Solanum tuberosum* cultivar majestic tubers : evidence for the primary role of cytokinins and a seasonal pattern of changing sensitivity to cytokinin, *Planta*, **165**, 359-365.

TWARDOWSKI T. and SZCZOTKA Z., 1989, The influence of selected polyamines on elongation binding factor 1 activity during the stratification of norway maple seeds, *J. Plant Physiol.*, **134**, 32-36.

UPADHYAYA M.K., SIMPSON G.M., and NAYLOR., 1981, Levels of glucose-6-phosphate and glucose-6-phosphogluconate dehydrogenases in the embryos and endosperms of some dormant and non-dormant lines of *Avena fatua* during germination, *Can. J. Bot.*, **59**, 1640-1646.

- VAKIS N.J., 1986, Influence of physiological ageing of seed potatoes on yield and earliness, *Potato Research*, **29**, 417-425.
- VALLEJOS C.E., 1983, Enzyme activity staining. In : *Isozymes in plant genetics and breeding, part A*, Tanksley S.D. and Orton T.J. eds., Amsterdam, 469-516.
- VAN DEN BERG J.H., VREUGDENHIL D., LUDFORD P.M., HILLMAN L.L. and EWING E.E., 1991, Changes in starch, sugar, and abscisic acid contents associated with second growth in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) one-leaf cuttings, *J. Plant Physiol.*, **139**, 86-89.
- VAN DER PLAS L.H.W., 1987, II.1 Potato tuber storage : Biochemical and physiological changes . In : *Biotechnology in agriculture and forestry* , Bajaj Y.P.S. ed., Vol 3 : Potato , 109-135.
- VAN DER ZAAG. and VAN LOON C.D., 1987, Effect of physiological age on growth vigour of seed potatoes of two cultivars. 5. Review of literature and integration of some experimental results, *Potato Research*, **30**, 451-472.
- VAN ES A. and HARTMANS K.J., 1987 a, Starch and sugars during tuberization, storage and sprouting. In : *Storage of Potatoes*, Rastovski A. and Van Es A. eds., Pudoc Wageningen, 79-113.
- VAN ES A. and HARTMANS K.J., 1987 b, Effect of physiological age on growth vigour of seed potatoes of two cultivars . 2 . Influence of storage temperature on dry matter content and peroxidase activity of sprouts, *Potato Research* , **30** , 411-421.
- VAN HIELE F.J.H., 1961, Unsprouted potato tubers treated with gibberellic acid (GA₃), *Eur. Potato J.*, **4** (1), 26-39.
- VAN ITTERSUM M.K., 1992 a, Relation between growth conditions and dormancy of seed potatoes. 1 . Effects of nitrogen, *Potato Research*, **35**, 355-364.
- VAN ITTERSUM M.K., 1992 b, Relation between growth conditions and dormancy of seed potatoes. 3 . Effects of light, *Potato Research*, **35**, 377-387.
- VAN ITTERSUM M.K., 1992 c, Variation in the duration of tuber dormancy within a seed potato lot, *Potato Research*, **35**, 261-269.
- VAN ITTERSUM M.K. and SCHOLTE K., 1992 a, Relation between growth conditions and dormancy of seed potatoes. 2 . Effects of temperature, *Potato Research*, **35**, 365-375.

- VAN ITTERSUM M.K. and SCHOLTE K., 1992 b, Shortening dormancy of seed potatoes by storage temperature regimes, *Potato Research*, **35**, 389-401.
- VAN LOON C.D., 1983, The effect of a cold shock on dormancy of potatoes, *Potato Research*, **26**, 81.
- VAN LOON C.D., 1987, Effect of physiological age on growth vigour of seed potatoes of two cultivars. 4 . Influence of storage period and storage temperature on growth and yield in the field, *Potato Research* , **30** , 441-450.
- VAN STADEN J. and DIMALLA G.G., 1978, Endogenous cytokinins and the breaking of dormancy and apical dominance in potato tubers, *J. Exp. Bot.*, **29** (112), 1077-1084.
- VAN VLIET W.F. and SCHRIEMER W.H., 1960, The sugar accumulation in potatoes kept at a low temperature, as studied in a small selection of samples of dutch varieties, *Eur. Potato J.*, **3** (3), 263-271.
- VERMA S.C., SHARMA T.R. and VARMA S.M., 1974, Sucrose accumulation during high-temperature storage of potato tubers, *Potato Research*, **17**, 224-226.
- VILLANUEVA V.R., ADLAKHA R.C. and CANTERA-SOLER A.M., 1978, Changes in polyamine concentration during seed germination, *Phytochem.*, **17**, 1245-1249.
- VINCENT E.M. and ROBERTS E.H., 1977, The interaction of light, nitrate and alternating temperatures in promoting the germination of dormant seeds of common weed species, *Seed Science Technology*, **5**, 659-670.
- WANG P.J. and HU C.Y., 1982, *In vitro* mass tuberisation and virus-free seed potato production in Taiwan, *Amer. Potato J.*, **59**, 33-37.
- WIESE W., BOMMER D. and PATZOLD C., 1975, Einfluss differenzierter Wasserversorgung auf Ertragebildung und Knollenqualität der Kartoffelpflanze (*Solanum tuberosum* L.), *Potato Research*, **18**, 618-631.
- WORKMAN M., KERSCHNER E. and HARRISON M., 1976, The effect of storage factors on membrane permeability and sugar content of potatoes and decay *Erwinia caratovora* var. *atroseptica* and *Fusarium roseum* var. *sambucinum*, *Amer. Potato J.*, **53**, 191-204.
- WURR D.C.E., 1975, Relationships between sprouting characters and stem development in two maincrop potato varieties, *Potato Research*, **18**, 83-91.

ZIVY M., THIELLEMENT H., DE VIENNE D. and HOFMANN J.P., 1983, Study on nuclear and cytoplasmic genome expression in wheat by two-dimensional gel electrophoresis. 1. First results on 18 alloplasmic lines, Theor. Appl. Genet., **66**, 1-7.

ZIVY M., 1986, Influence des ampholytes sur la révélation des protéines au nitrate d'argent. In : Recent progresses in two-dimensional electrophoresis, Galteau M.M., Siest G., ed., Presses Universitaires, Nancy, 69-72.

