

## PARTIE III

### **Culture *in vitro* et amélioration des plantes**



# 19

## Néoformation de plantes d'épinard à partir de suspensions cellulaires

XING-GUO XIAO, GILBERT CHARLES, MICHEL BRANCHARD

*Laboratoire d'Amélioration des Végétaux-Biotechnologie, ISAMOR, Université de Bretagne Occidentale, Technopole Brest-Iroise, 29280 Plouzané-Brest, France.*

Au cours de ces dernières années, la culture des suspensions cellulaires pour la propagation en masse de plantes a progressé à grands pas, de sorte que le système a été récemment automatisé [5]. Ainsi, la culture industrielle de cellules végétales est réalisée à grande échelle dans des bioréacteurs atteignant un volume de 75 000 litres [8, 10]. Les espèces végétales expérimentées sont nombreuses et vont des espèces ligneuses vivaces aux herbacées annuelles ; elles comprennent notamment *Euphorbia pulcherrima*, *Echinacea purpurea*, le lis, la carotte, la luzerne et divers conifères [3, 7]. Chez l'épinard, l'obtention de suspensions cellulaires a été, pour la première fois, signalée par Dalton et Street [2]. Ce type de culture a alors été utilisé pour de nombreuses études physiologiques ainsi que pour l'isolement de protoplastes. Cependant, à notre connaissance, aucune publication ne mentionne ce jour la néoformation de plantes issues de cultures de suspensions cellulaires.

L'objectif de notre travail a donc été d'établir un système de culture de suspensions cellulaires d'épinard permettant d'obtenir la néoformation de plantes, et de définir quels sont les facteurs majeurs influençant cette néoformation.

### Matériel et méthodes

Des graines d'épinard (*Spinacia oleracea* L cv. Carpo) sont stérilisées et mises à germer comme décrit antérieurement [11]. Pour l'induction de cal, des fragments d'hypo-

cotyles et de racines (sans apex) de 3 à 4 mm de long sont prélevés à partir des plantes âgées d'une semaine et mis en culture en boîte de Pétri sur milieu solide de MS [6] auquel ont été additionnés l'AIA (8,5 mg.l<sup>-1</sup>) et le GA<sub>3</sub> (3,5 mg.l<sup>-1</sup>). Les cultures sont incubées à l'obscurité à 22 ± 1 °C pendant une semaine, puis transférées et maintenues à 24 ± 1 °C sous une lumière continue (LC) d'intensité égale à 30 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> environ. Après 4 semaines de culture, les cals induits sont repiqués sur le même milieu frais.

Des suspensions cellulaires sont alors initiées par transfert de fragments de cals friables dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de milieu liquide composé de MS modifié par Dalton et Street [2] et de (en mg.l<sup>-1</sup>) : myo-inositol 100, glutamine 200, biotine 5,0, AIA 1,0, GA<sub>3</sub> 0,35 et kinétine 0,5. Ce milieu est dénommé M1. Les erlenmeyers sont ensuite placés sur un agitateur (125 rpm) à 22 ± 1 °C, et en lumière continue (environ 6 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). Les cultures sont filtrées par passages successifs sur des tamis métalliques doubles de 200 et 100 µm. Les fractions inférieures à 100 µm et comprises entre 100 et 200 µm sont alors mises dans un volume connu de milieu M1. La densité cellulaire est évaluée à la fois par comptage du nombre de cellules et par mesure du PCV (*packed cell volume*) obtenu par centrifugation à 100 g pendant 5 mn. L'inoculum sert àensemencer 40 ml de milieu M1 par erlenmeyer de 150 ml et est dilué de manière à obtenir une densité finale de 3,2 × 10<sup>4</sup> cellules par ml (soit ≈ 1,7 µl PCV.ml<sup>-1</sup>) ou de 3,2 × 10<sup>5</sup> cellules par ml (soit ≈ 6µl PCV.ml<sup>-1</sup>).

Le repiquage des suspensions cellulaires isolées en milieu liquide est effectué tous les 14 jours. En général, 10 ml de suspensions sont transférés dans 40 ml de milieu de repiquage (M1, M2 ou M3, voir Tableau I) suivant une procédure dite « par étape ». « Une étape » correspond au transfert des suspensions de M1 à M1, « deux étapes », de M1 à M2 ou de M1 directement à M3 et « trois étapes », de M1 à M2 puis à M3. L'intervalle entre chaque étape est de 28 jours. La vitesse d'agitation est alors de 95 rpm.

Les pousses feuillées néoformées dans divers milieux sont alors transférées sur un milieu solide MS contenant de l'AIA (0,5 mg.l<sup>-1</sup>) et GA<sub>3</sub> (0,35 mg.l<sup>-1</sup>) dans des erlenmeyers de 250 ml, pour favoriser leur élévation. Ces pousses feuillées, lorsqu'elles

**Tableau I.** Milieux liquides utilisés pour l'initiation et le repiquage des suspensions cellulaires d'épinard.

Code	Milieu de base	Facteurs de croissance (en mg.l <sup>-1</sup> )		
		AIA	GA <sub>3</sub>	Kinétine
M1	MSM*	1,0	0,35	0,5
M2	MSM			
	M2a	2,5	0,35	0,0
	M2b	5,0	0,35	0,0
M3	MSm**			
	M3a	0,0	0,35	0,0
	M3b	0,0	0,35	0,1
	M3c	5,0	0,35	0,5
	M3d	8,5	0,35	0,0

\*MSM : MS modifié par Dalton et Street (1976) + (en mg.l<sup>-1</sup>) : myo-inositol 100, glutamine 200, biotine 5,0 et saccharose 20 000.

\*\*MSm : MS modifié par Dalton et Street (1976) + (en mg.l<sup>-1</sup>) : myo-inositol 100, glutamine 100, biotine 0,5 et saccharose 20 000.



atteignent 3 cm, sont enracinées dans un milieu MS solidifié par un mélange de Trans-fergel (10 g.l<sup>-1</sup>) et de Difco-agar (3 g.l<sup>-1</sup>) additionné d'ANA (1,0 mg.l<sup>-1</sup>) et de GA<sub>3</sub> (0,35 mg.l<sup>-1</sup>), pH 6,5 sous une photopériode de 10 h, une intensité lumineuse d'environ 36 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> et une thermopériode de 24/16 ± 1 °C jour/nuit. Les jeunes plantes sont alors repiquées en pots contenant un mélange de vermiculite (ou de sable) et du terreau (1 : 3). Ces plantes sont arrosées la première semaine par une solution composée des sels de MS dilués de moitié. Elles sont ensuite arrosées d'une solution diluée au 1/4 des sels de MS, puis enfin d'eau du robinet. Les principaux paramètres de l'environnement se résument en une photopériode de 10 h avec une intensité lumineuse d'environ 40 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, une thermopériode de 20/15 ± 1°C jour/nuit et une humidité relative de 85 ± 10 %.

Tous les milieux utilisés sont ajustés à pH 5,8 avant autoclavage à 120 °C pendant 20 min, à l'exception du milieu destiné à l'enracinement des pousses feuillées qui est ajusté à pH 6,5. L'AIA, L'ANA et le GA<sub>3</sub> sont stérilisés par passage sur un filtre Millipore de 0,45 μ de vide de maille. Les expériences ont été réalisées deux fois, et les valeurs communiquées de callogenèse, de rhizogenèse et de caulogenèse sont donc les moyennes des chiffres obtenus lors de ces expériences.

## **Résultats**

### **Obtention de cals**

De petits cals blanchâtres apparaissent au niveau des sections des explants, lors de la seconde semaine de culture. Ces cals prolifèrent et envahissent le centre des explants. Après 45 jours de culture, les cals atteignent une dimension de 5 à 6 mm de diamètre, et sont d'apparence humide, molle et friable.

### **Établissement des suspensions cellulaires**

Les cals âgés de 45 jours mis en culture se dissocient facilement après une semaine de culture en milieu liquide agité à 125 rpm. Les cultures consistent alors en une suspension de petits agrégats cellulaires ou de cellules isolées et les observations microscopiques révèlent une grande variation dans la dimension et le type de cellules avant filtration.

La fraction cellulaire recueillie entre 100 et 200 μm (dite > 100 μm, ci-après) est constituée de « grandes cellules » isolées et relativement homogènes, alors que la fraction cellulaire de taille inférieure à 100 μm est également homogène, mais surtout constituée de petites cellules rondes et de débris.

### **Croissance et différenciation des cultures**

La division des cellules de la fraction > 100 μm commence environ 48 h après l'ensemencement. Les suspensions deviennent rapidement épaisses et plus ou moins mucilagineuses. Leur vitesse de croissance, lorsqu'elles proviennent de la racine, est plus grande que lorsqu'elles proviennent de l'hypocotyle. La fraction cellulaire de taille inférieure à 100 μm, que son origine soit hypocotylaïre ou racinaire, manifeste une

reprise de croissance très lente, les suspensions devenant plus ou moins brunes avec de rares divisions.

La callogenèse et l'organogénèse obtenues dans la fraction  $> 100 \mu\text{m}$  des suspensions issues des cals de racine à densité cellulaire initiale de  $3,2 \times 10^5 \text{ cellule.ml}^{-1}$  sont résumées dans le Tableau II.

**Tableau II.** Influence du choix de la méthode et du milieu de repiquage sur la callogenèse et l'organogénèse des suspensions cellulaires issues des cals de racine (fraction  $> 100 \mu\text{m}$ ), à la densité cellulaire initiale de  $3,2 \times 10^5 \text{ cellules.ml}^{-1}$

Milieu initial	Une étape* (M1 à M1)	Deux étapes* (M1 à M2 ou M1 à M3)	Trois étapes* (M1 à M2 à M3)	Formation de cals**	Nombre de cals*** formant des	
					racines	bourgeons
M1	(M1)	—	—	oui	0,0	0,0
		M2a	—	oui	50-75	$> 100$
	(M1)	M2b	—	oui	$\approx 90$	0,0
		M3a	—	oui	0,0	0,0
		M3b	—	oui	0,0	0,0
		M3c	—	non	0,0	0,0
		M3d	—	non	0,0	0,0
	(M1)	(M2a)	M3a	oui	50-75	$> 75$
			M3b	oui	50-75	50-75
			M3c	oui	0,0	0,0
			M3d	non	0,0	0,0
		(M2b)	M3a	non	0,0	0,0
			M3b	oui	0,0	0,0
			M3c	oui	0,0	0,0
		M3d	non	0,0	0,0	

\* : méthode comportant 1 à 3 étapes de repiquage sur des milieux différents M1, M2 et M3.

\*\* : cals visibles à l'œil nu.

\*\*\* : nombre des cals par Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de suspension cellulaire.

L'analyse de ce tableau permet d'observer que dans le milieu M1, en utilisant la méthode « une étape », les suspensions cellulaires ne forment que des cals visibles à l'œil nu. Si la méthode comporte « deux étapes », les suspensions produisent alors des cals, des racines adventives et des pousses feuillées si elles sont dans le milieu M2a, mais pas si elles sont dans le milieu M2b. Pourtant, même par la technique « deux étapes », les suspensions transférées directement du milieu M1 aux milieux sans AIA (M3a et M3b) ne forment ni racines ni pousses feuillées, bien qu'elles puissent révéler une organisation en microcals puis en cals. Par ailleurs, la présence ou l'absence de kinétine à une concentration de  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  ne semble pas avoir d'effet notable sur la croissance, la callogenèse, la rhizogénèse ou la caulogénèse des suspensions. Les suspensions repiquées directement du milieu M1 aux milieux contenant de fortes concentrations en AIA, *i.e.* M3c ( $5,0 \text{ mg.l}^{-1}$ ) ou M3d ( $8,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) (technique « deux étapes »), restent toujours à l'état de cellules et/ou de petits agrégats. Par la procédure « trois étapes », après 28 jours dans le milieu M2a, les suspensions produisent des cals, puis des racines adventives et/ou des pousses feuillées quand elles sont transférées dans un troisième milieu qui ne contient pas d'AIA (M3a et M3b). En revanche, quand elles sont repiquées sur un troisième milieu contenant une forte concentration d'AIA (M3c

et M3d), elles ne forment ni racines ni pousses feuillées. Toutefois, même en suivant la procédure « trois étapes », un passage de 28 jours dans le milieu M2b ne permet pas aux suspensions de se différencier dans le milieu M3, quelle que soit la composition hormonale de ce dernier.

Par ailleurs, la fraction cellulaire supérieure à 100  $\mu\text{m}$  à faible densité d'ensemencement, par la technique des « étapes », a pu finalement produire des cals dans les milieux M1 (« une étape »), M2a et M2b (« deux étapes ») ainsi que dans les milieux M3a et M3b après passage dans le milieu M2a (« trois étapes »). De plus, les cals ont pu différencier quelques racines adventives (milieux M1a, M3a et M3b), et même quelques pousses feuillées (milieu M2a), bien que la fréquence de néoformation des racines (< 25/Erlen) et des pousses feuillées (< 10/Erlen) soit faible.

Pour la fraction cellulaire inférieure à 100  $\mu\text{m}$  à forte densité (6  $\mu\text{l}$ . PCV.ml<sup>-1</sup>), les suspensions semblent toujours rester à l'état de cellules isolées ou de très petits agrégats composés de 3 à 4 cellules. En produisant une substance mucilagineuse, elles deviennent donc brunes. Malgré de nombreux repiquages par « étapes », qui leur ont permis de s'organiser en microcals dans le milieu M2a (« deux étapes »), M3a et M3b (« trois étapes »), après un passage dans le M2a, les tentatives d'obtention des pousses feuillées se sont soldées par le brunissement des suspensions. Des résultats similaires ont été obtenus pour les suspensions ensemencées à plus faible densité.

En ce qui concerne les suspensions issues de cals d'hypocotyle, la fraction < 100  $\mu\text{m}$  a repris sa croissance très lentement après l'ensemencement. Ayant traversé toutes les « étapes » de repiquage, elle s'est nécrosée après avoir produit quelques cals dans le milieu M1. Pour la fraction cellulaire > 100  $\mu\text{m}$ , les suspensions à faible densité d'ensemencement s'accroissent plus lentement qu'à densité plus élevée, et elles forment quelques cals dans les milieux M1, M2a ainsi que dans les milieux M3a et M3b après passage dans le milieu M2a. En revanche, les suspensions avec plus forte densité d'ensemencement forment de nombreux cals dans ces milieux : les cals dans le milieu M2a forment des racines adventives tandis que les cals dans le milieu M1 produisent aussi bien des pousses feuillées que des racines adventives.

### **Maintien et enracinement des pousses feuillées et sevrage des jeunes plantes**

Des pousses feuillées sur le milieu gélosé d'allongement poussent vigoureusement et atteignent environ 3 cm après 2 ou 3 semaines de culture. A ce stade, les pousses feuillées sont mises sur milieu d'enracinement. Pendant les 3 semaines qui suivent ce repiquage, plus de 90 % des pousses feuillées s'enracinent. Après transfert en pots, environ 70 % des plantes se développent normalement.

### **Discussion et conclusion**

La bonne qualité des cals de départ est la première garantie pour la croissance et l'évolution des suspensions. L'association d'AIA et de GA<sub>3</sub> a été choisie pour l'induction de ces cals, parce qu'il a été montré que les tissus d'épinard appartiennent au groupe « AIA-spécifique » et « GA<sub>3</sub>-sensible » du point de vue de leur réaction en culture *in vitro* [11].

La dimension des cellules d'ensemencement joue un rôle dominant dans la croissance et l'évolution des suspensions cellulaires. En suivant la même procédure par

« étapes », seules les suspensions de la fraction > 100 µm se divisent activement et forment une population de cals visibles à l'œil nu, qui se différencient et initient des racines adventives et des pousses feuillées.

La densité cellulaire initiale joue un rôle prédominant sur la croissance et l'évolution ultérieure des cultures. A forte densité, la croissance des suspensions est plus rapide et les néoformations des pousses feuillées et des racines adventives sont plus fréquentes qu'à faible densité. Un tel effet est couramment observé en culture de cellules [1]. Chez l'épinard, Fry et Street [4] ont observé que les suspensions cellulaires ne peuvent bien croître qu'à partir d'une densité cellulaire initiale de  $5 \times 10^4$  cellules.ml<sup>-1</sup>.

Le milieu, surtout le deuxième milieu (qu'il y ait deux ou trois étapes), et la méthode de repiquage jouent un rôle déterminant sur la callogenèse et surtout l'organogenèse des suspensions cellulaires. Par la méthode « deux étapes », les suspensions transférées directement aux milieux sans AIA (M3a, M3b) ou aux milieux contenant une concentration supérieure à 5,0 mg.l<sup>-1</sup> d'AIA (M2b, M3c et M3d) ne forment aucun organe. Il en est de même pour celles qui ont traversé la deuxième étape dans le milieu contenant une forte concentration d'AIA (M2b 5,0 mg.l<sup>-1</sup> AIA) par la technique « trois étapes ». En revanche, le repiquage des suspensions sur milieu contenant de l'AIA en faible concentration (M2a, 2,5 mg.l<sup>-1</sup>) conduit à la néoformation de pousses feuillées. De même, après un passage dans le milieu M2a, les suspensions repiquées sur milieux sans AIA (M3a et M3b) par la méthode « trois étapes » ont pu produire des pousses feuillées. Cela implique que l'organogenèse a peut-être été initiée lors de la phase d'induction et/ou de développement des cals par des concentrations élevées d'AIA et de GA<sub>3</sub> et qu'elle n'est que « complétée » lors de la phase de culture des suspensions cellulaires par une concentration plus faible d'AIA. L'absence d'AIA ou sa présence à une concentration trop élevée lors de la phase de culture des suspensions n'est pas favorable à la réalisation de l'organogenèse et/ou inhibe le développement des organes initiés.

Les suspensions issues de cals de racine sont plus favorables que celles provenant d'hypocotyles pour obtenir la régénération de pousses feuillées et cela est peut-être dû à la différence d'état physiologique et de teneurs en AIA et GA<sub>3</sub> actifs endogènes.

En conclusion, la néoformation de plantes à partir de suspensions cellulaires chez l'épinard est, pour la première fois, réalisée, et un système complet de culture, des cals aux cellules isolées jusqu'aux plantes en pots, est établi. Cette néoformation est un processus continu, et de nombreux facteurs interviennent dans ce processus à différentes phases et à différents niveaux. Les principaux, parmi eux, sont, semble-t-il, l'origine et la qualité des cals à partir desquels les cellules sont isolées, la dimension des cellules ensemencées, la densité cellulaire initiale, le milieu et la méthode d'ensemencement et de repiquage ainsi que les conditions physiques de l'environnement.

L'établissement de ce système chez l'épinard fournit un outil potentiellement utilisable pour l'amélioration de cette espèce d'intérêt agronomique.

## Références

1. Benbadis A (1968). Culture de cellules isolées : problème du conditionnement des milieux de culture. In : *La culture de tissus des plantes*. CNRS : 121-129.
2. Dalton CC, Street HE (1976). The role of the gas phase in the greening and growth of illuminated cell suspension cultures of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *In Vitro* 12 : 485-494.

3. Durzan DJ, Durzan PE (1991). Future technologies : model, reference control systems for the scale-up of embryogenesis and polyembryogenesis in cell suspensions cultures. In : Debergh PC, Zimmerman RH, eds. *Micropropagation*, Kluwer Acad. Publ., The Netherlands : 389-423.
4. Fry SC, Street HE (1980). Gibberellin-sensitive suspension cultures. *Plant Physiol* 65 : 472-477.
5. Levin R, Gaba V, Hirsch S, De Nola D, Vasil IK (1988). Automated plant tissue culture for mass propagation. *BioTechnology* 6 : 1035-1040.
6. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
7. Preil W (1991). Application of bioreactors in plant propagation. In : Debergh PC, Zimmerman RH, eds. *Micropropagation*. Kluwer Acad. Publ., The Netherlands : 425-445.
8. Rithershaus E, Wrich J, Weiss A, Westphal K (1989). Large scale industrial fermentation of plant cells : design, instalation and initial operation of a fermentation unit (75 000 litres) for plant cell cultures. *Bio Engineering* 5 : 8-10.
9. Rithershaus E, Wrich J, Weiss A, Westphal K (1989). Large scale industrial fermentation of plant cells : experiences in cultivation of plant cells in a fermentation cascade to a volume of 75 000 litres. *Bio Engineering* 5 : 28-30.
10. Westphal K (1990). Large scale production of biologically active compound in plant cell cultures. In : Nijkamp HJJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J, eds. *Progress in plant cellular and molecular biology*. Proc. VIIth IAPTC Congress, Kluwer Acad. Publ., The Netherlands.
11. Xiao XG, Branchard M (1993). Embryogenesis and plant regeneration of spinach (*Spinacia oleracea* L.) from hypocotyl segments. *Plant Cell Rep* 13 : 69-71.



## 20

### **Clonage de plantes hyperflorales par bourgeonnement stipulaire adventif chez le fraisier micropropagé par méristème**

A. JEMMALI<sup>1</sup>, PH. BOXUS<sup>1</sup>, D. DEKEGEL<sup>2</sup>, G. VAN HEULE<sup>2</sup>

*1. Station fruitière et maraîchère, 234, chaussée de Charleroi, 5030 Gembloux, Belgique.*

*2. Microscopie électronique, Institut Pasteur, 642, rue Engeland, 1180 Bruxelles, Belgique.*

#### **Résumé**

*En dépit de sa propagation sur un milieu de culture contenant seulement  $4,4 \cdot 10^{-6}$  M de cytokinines « 6-Benzyl Amino Purine », le cultivar de fraisier Gorella se distingue par une intense activité organogénétique adventive sur les stipules foliaires. Une fois initié, le centre méristématique qui en résulte se met en prolifération rapide conduisant à la formation d'une masse très importante de petits bourgeons dont le nombre peut facilement dépasser celui des axillaires, et de plus en plus au fil des subcultures.*

*Grâce à la microscopie électronique à balayage, un polymorphisme a été mis en évidence chez les bourgeons stipulaires. Un tel polymorphisme serait surtout lié à leurs stades de développement et aux phénomènes de fasciation et de multi-apex (apex multiples générés par un même méristème) fréquemment observés avec cette forme d'organogénèse particulière.*

*La présence notable d'amidon dans les cellules subépidermiques des stipules en différenciation constituerait une source énergétique indispensable à l'accomplissement d'au moins les premières étapes de l'ontogenèse du bourgeon adventif. Dès que ce dernier acquiert un méristème normal, il devient autonome et son isolement de la stipule ne présente plus d'obstacles à sa prolifération ultérieure. Notons enfin que les micro-*

*plants issus de néoformation sont cultivés avec la même facilité que ceux produits par voie axillaire. Ces deux catégories de plantes ont une morphologie générale semblable ; en revanche les premières produisent toujours plus de fleurs et moins de fraises commercialisables (petit calibre).*

La micropropagation en masse du fraisier pour usage commercial fut décrite pour la première fois par Boxus en 1974 [2], et ultérieurement adaptée à d'autres laboratoires [3, 9, 35].

Des plants de fraisier ont par ailleurs été régénérés à partir de cals émis par méristèmes excisés [24], anthères [25, 30], fragments d'inflorescences et de pétiole [12, 15], feuilles et filets [17], embryons immatures [34], cotylédons excisés et akènes [21] et par stipules foliaires [32].

Une organogenèse directe a été observée sur le limbe foliaire suite à de fréquentes subcultures de deux semaines [36] et sur les stipules du cultivar Gorella micropropagé [13].

Le fraisier octoploïde a souvent été caractérisé par sa grande stabilité génotypique [5] et phénotypique [33]. Néanmoins, certains auteurs ont signalé quelques anomalies chez les plantes micropropagées, à savoir le multi-apex [1], le *white streaking* (stries blanches sur feuilles), la stérilité femelle [33], les dissociations chimériques [18] ou encore l'hyperfloraison [16, 13].

Bien que les travaux réalisés dans le domaine de la culture de tissus chez le fraisier soient nombreux, les chercheurs se sont rarement intéressés à l'aspect histologique et cytologique des diverses formes d'organogenèse décrites jusqu'à présent. C'est notamment la forme adventive qui a fait l'objet de quelques investigations. A ce propos, l'analyse histologique en microscopie optique a porté sur le bourgeonnement adventif endogène ou épidermique au sein du limbe foliaire d'apex excisé [11], la néoformation sur cal stipulaire [32] et l'organogenèse à partir de cellules épidermiques ou subépidermiques de disques foliaires [23].

Le présent travail aura pour objet de caractériser histologiquement et morphogénétiquement le bourgeonnement stipulaire adventif chez le fraisier *in vitro*, et d'étudier le comportement floral des plantes qui en dérivent.

## Matériel et méthodes

L'étude porte exclusivement sur le cultivar Gorella. Les méristèmes sont prélevés sur des pieds mères peu micropropagés. Les milieux de culture sont ceux proposés par Boxus [2].

Après trois subcultures en présence de  $4,4 \cdot 10^{-6}$  M BAP (1 mg/l), les bourgeons axillaires et stipulaires sont séparés et cultivés pendant trois transferts supplémentaires sur  $0,88 \cdot 10^{-6}$  M BAP (0,2 mg/l) seulement.

A la sortie de l'*in vitro*, les plantules sont cultivées en phytotron [13]. Les quinze meilleures plantes de chaque série sont empotées en vue de comparer leurs productions florales à l'anthèse.

Pour les études morphologiques en MEB et histologiques, des échantillons de bourgeons stipulaires ou axillaires sont fixés dans le glutaraldéhyde 2 % préparé avec un tampon cacodylate de sodium 0.2 M à pH 6,5. Les objets destinés à l'observation en balayage sont ensuite lavés à l'eau distillée et passés dans une série de bains alcoo-



liques progressifs allant de 30° à 100°. Après un séjour de quelques heures dans l'alcool anhydre, les échantillons sont séchés au point critique et enrobés d'une couche d'or pour être visionnés à 20 kV au moyen d'un MEB « OMNISCAN ETEC ».

Pour les études histologiques, les objets fixés sont rincés à l'eau distillée trois fois 10 min, puis placés dans l'acide osmique (O<sub>5</sub>O<sub>4</sub>) pendant une nuit. Après rinçage, les tissus passent une nuit dans l'acétate d'uranyl avant de subir des déshydratations à l'alcool puis à l'oxyde de propylène. L'étape suivante consiste à plonger les échantillons dans un mélange d'oxyde de propylène et de résine « Epon Spur » (50 : 50) puis dans de la résine pure renouvelée trois fois. Enfin, les objets sont inclus dans la même résine coulée dans des moules spéciaux et polymérisés à 70 °C pendant 12 heures. Les gélules ainsi obtenues sont fraisées à l'aide d'une fraise « TM 60 REICHERT », et les coupes semi-fines (2 µm) ou fines (50 nm) sont réalisées au moyen d'un microtome « ULTRACUT REICHERT-JUNG ».

Les micrographies sont prises soit au microscope optique « ZETOPAN REICHERT » ou au microscope électronique à transmission « ELMISKOP 1 SIEMENS ».

La ploïdie des vitroplants d'origine axillaire ou stipulaire est déterminée par la technique de cytométrie de flux.

## Résultats

La détection des bourgeons stipulaires chez le cultivar Gorella est possible dès les toutes premières subcultures sur le milieu de production commerciale contenant 1 mg/l BAP.

Après 2 ou 3 cycles consécutifs de multiplication, il est encore facile de faire la distinction entre les deux formes de bourgeonnement, axillaire (BA) et stipulaire (BS). Les premiers accusent une plus grande vigueur par rapport à ceux qui poussent sur les stipules foliaires. Les BA portés à l'aiselle des stipules sont solidaires de la tige, alors que les BS prennent pour site préférentiel la partie distale des stipules formant la connexion de celle-ci avec le pétiole.

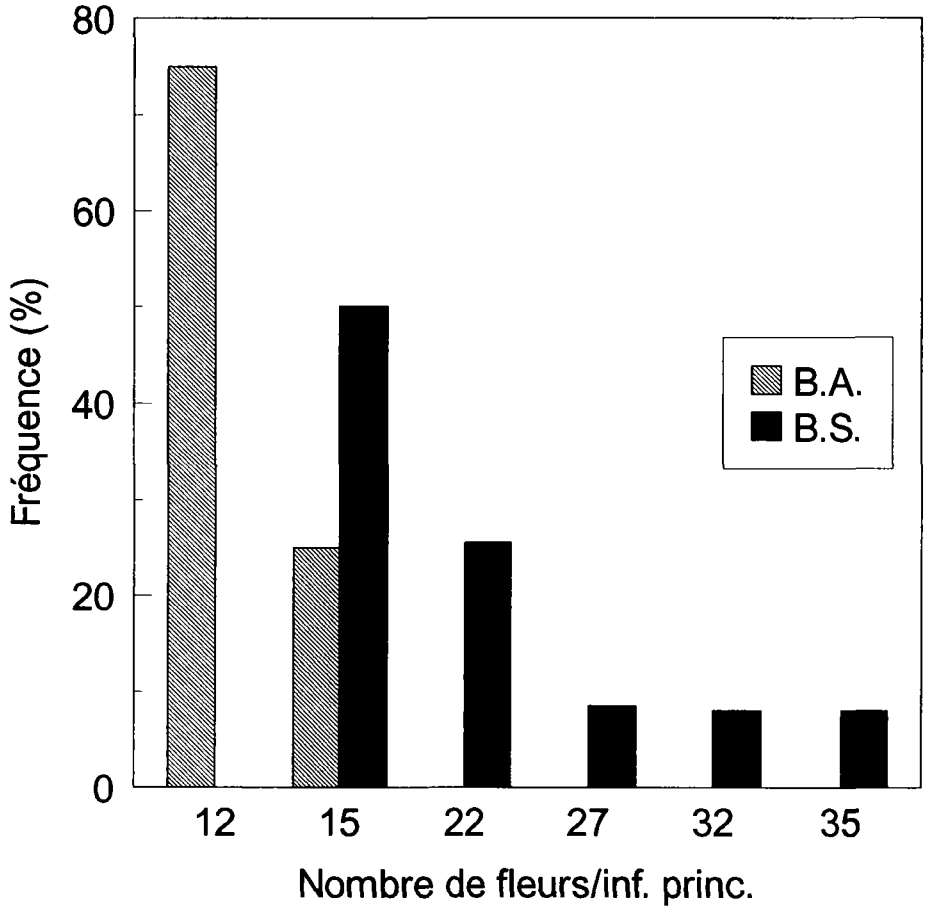
Plus rarement, on rencontre les BS sur la surface intérieure et les bords des deux ailes stipulaires latérales.

Après les trois premières subcultures sur 1 mg/l BAP, les deux types de bourgeons séparés et transférés sur un milieu ne contenant que 0,2 mg/l BAP ne prolifèrent que par voie axillaire. A cette concentration en cytokinine, les explants se multiplient difficilement lors de la première subculture, mais après deux passages supplémentaires, ils se mettent à proliférer avec un taux de multiplication de 3 ou 4 par subculture de trois semaines.

L'enracinement *in vitro* et le transfert sur terreau ordinaire sous climat contrôlé (phytotron) ne posent pas de problèmes. Si les jeunes plantes néoformées présentent un léger manque de vigueur *in vitro*, elles récupèrent rapidement en phytotron et plus aucune différence morphologique ne les distingue des fraisiers d'origine axillaire.

Toutefois, à la floraison, le nombre de fleurs arrivant à l'anthèse est nettement plus élevé chez les plantes d'origine stipulaire (Figure 1) et cela représente la même tendance observée au cours des deux expériences conduites avec des mériclones différents (vitroplants initiés à partir d'apex méristématiques provenant de pieds mères distincts du même cultivar « Gorella »).

Généralement, les fleurs ainsi que les fruits produits par des plantes hyperflorales



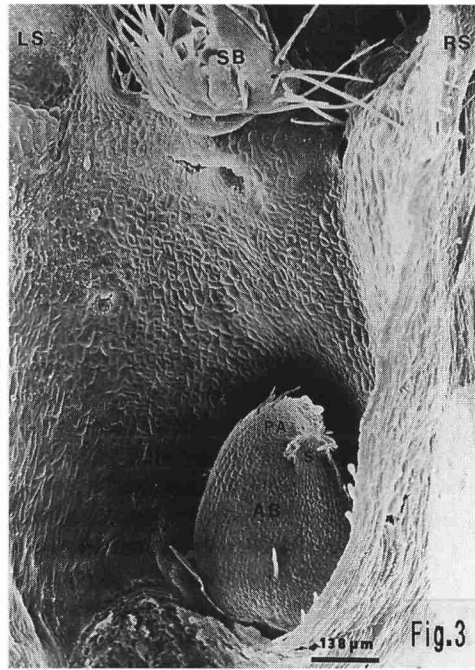
**Figure 1.** Production florale en phytotron de plants de fraiser cv. Gorella clonés *in vitro* par bourgeonnement axillaire (BA) et par bourgeonnement stipulaire (BS). – Distribution de fréquence (%) de l’inflorescence principale en fonction du nombre de fleurs arrivant à l’anthèse.

sont plus petits que ceux des plantes normales. Même si la nouaison n’est pas défectueuse, le calibre des petits fruits n’est pas amélioré.

Les micrographies (au microscope à balayage) des stipules portant à la fois un BA et un BS indiquent que ces deux bourgeons sont relativement très distants l’un de l’autre (Figure 2 et Figure 3). Avant de commencer à déployer ses feuilles, le BA est entouré d’une enveloppe foliaire à limbe réduit et à stipule bien définie. Par contre, à ce même stade, le BS possède une gaine sans stipule et qui doit éclater pour laisser sortir les ébauches foliaires vraies (Figure 2).

La surface organogène des stipules qui ne produit généralement qu’un seul petit bourgeon peut parfois s’étendre pour donner naissance à un amas complexe de plusieurs bourgeons (Figure 4).

Histologiquement, il ressort que deux processus consécutifs de dédifférenciation et



**Figure 2.** Micrographie MEB d'un stade primitif du bourgeon stipulaire en présence d'un bourgeon axillaire en phase d'épanouissement.

**Figure 3.** Micrographie MEB d'un bourgeon stipulaire dont la gaine extérieure est en cours de désintégration en présence d'un bourgeon axillaire non épanoui. AB : bourgeon axillaire, S : stipule, PA : axe pétiolaire, PSB : bourgeon stipulaire primitif, SB : bourgeon stipulaire, LS : aile stipulaire gauche, RS : aile stipulaire droite, LP : pétiole foliaire.

**Figure 4.** Amas de bourgeons stipulaires sur les ailes des stipules foliaires. SBs : bourgeons stipulaires, S : stipules, ABs : bourgeons axillaires alignés à l'aisselle des stipules.

de différenciation sont à l'origine de la néoformation des BS. En effet, l'observation en microscopie optique (Figure 5) montre bien que des couches cellulaires sous-épidermiques et épidermiques des stipules entrent en dédifférenciation. Suite à ce changement, certaines cellules se spécialisent dans l'amylogénèse apportant la source énergétique à d'autres cellules voisines qui se mettent en activité mitotique progressive. Ces dernières, d'abord riches en vacuoles et ne possédant qu'un petit noyau placé contre la membrane plasmique, acquièrent au terme de la dédifférenciation l'aspect de cellules méristématiques. Elles ont alors un rapport nucléoplasmique élevé, des vacuoles très réduites et un cytoplasme riche en organites cellulaires dont les mitochondries, les dictyosomes et les ribosomes (Figure 6). Le méristème primaire ainsi édifié va assurer, par le processus inverse « la différenciation », l'ontogénèse des organes foliaires et caulinaires du bourgeon stipulaire. La différenciation s'accompagne cytologiquement par le regroupement des petites vacuoles en une vacuole plus grande, le noyau occupe alors une position centrale dans la cellule et le contenu cytoplasmique se réduit.

La cytométrie de flux n'a révélé aucune différence de ploïdie entre les deux catégories de plantes axillaires et stipulaires.

## Discussion

Le bourgeonnement adventif direct sur les stipules a été observé chez plusieurs cultivars de fraisier micropropagé sur des milieux contenant de 0,5 à 1 mg/l de BAP. La sensibilité à l'égard de cette organogénèse relève du cultivar, voire même du mériclone. La variété « Gorella » très sensible au phénomène de l'hyperfloraison est aussi des plus aptes au bourgeonnement stipulaire.

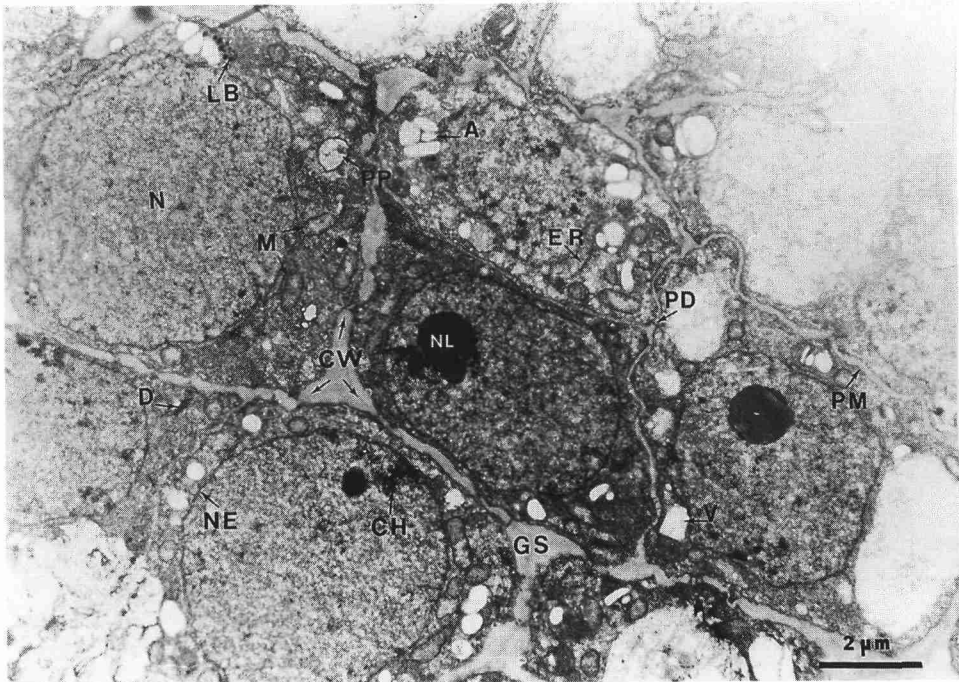
Depuis que le problème de l'hyperfloraison et celui des petits fruits s'est déclaré, des recherches sérieuses ont été menées en France [8, 22] et en Belgique [4, 16] pour en trouver les causes. Ces travaux démontraient que les anciens clones, c'est-à-dire les clones longuement subcultivés, présentaient plus cette aberration que les lots peu ou non micropropagés. C'est pourquoi, à partir de 1981, des corrections ont été apportées au schéma français de production *in vitro*. Notamment, le nombre de subcultures a été limité à 10 et les doses de phytohormones ajoutées au milieu ont été réduites de moitié [28].

Les expérimentations faites par Kinet, à l'Université de Liège, sur le cultivar Gorella ont montré l'existence d'individus hyperfloraux dès la huitième subculture. De plus, cet auteur a démontré la persistance du caractère hyperfloral au travers de plusieurs générations de stolons. Cette constatation nous a conduit à axer nos investigations au niveau de la phase de micropropagation proprement dite où risquaient de se produire des événements temporaires ou répétitifs dont les conséquences s'exprimeraient au champ. La première hypothèse, largement soutenue par les scientifiques, était un déséquilibre physiologique de type hormonal par exemple, mais cela supposerait la réversibilité du déséquilibre par le retour aux conditions normales de culture, ou par l'application de certains traitements comme le froid. Ces mesures ont échoué et il ne nous a pas été possible de provoquer un rétablissement des plants anormaux par multiplication classique.

Même si Demarly [10] signale que la probabilité d'obtenir des variants à partir d'une prolifération adventive dont l'explant initial est un méristème est très faible, l'implication des bourgeons stipulaires [13] dans la production de fraisiers hyperfloraux



**Figure 5.** Coupe longitudinale dans le plan des stipules montrant la dédifférenciation des grosses cellules stipulaires vacuolisées en cellules méristématiques adventives donnant lieu au bourgeon stipulaire. SC : cellules stipulaires vacuolisées, AMC : cellules méristématiques adventives, LP : primordium foliaire ( $\times 50$ ).



**Figure 6.** Micrographie d'une coupe ultrafine effectuée au sein du dôme méristématique du bourgeon stipulaire de la Figure 5. N : noyau, LB : inclusions lipidiques, M : mitochondries, PP : proplastides, CW : paroi cellulaire, D : dycytosomes, A : amyloplastes, NL : nucléole, NE : enveloppe nucléaire, CH : chromatine, ER : réticulum endoplasmique, PD : plasmodesme, GS : méat inter-cellulaire, V : vacuole, PM : membrane plasmique.

n'était pas à écarter d'office comme le prouvent nos expériences actuelles sur les origines stipulaires ou axillaires.

L'étude morphologique et histologique de cette organogenèse particulière révèle un grand polymorphisme des BS qui peuvent s'organiser de différentes manières. La différenciation du BS en véritable bourgeon feuillé peut intervenir, selon les cas, juste à la sortie de l'épiderme ou après la formation préalable d'un petit nodule superficiel à configuration protocormique.

Au point de vue histologique, on retrouve le schéma général décrit par Buvat [6, 7] sur l'organogenèse adventive. Nous avons en plus montré, par une analyse ultrastructurale en MET, l'existence d'un bon nombre de cellules spécialisées en amylogenèse, et ce par la transformation de leurs plastes en véritables amyloplastés. De telles structures vivantes spécialisées pourraient encore se trouver chez le tout jeune méristème primaire, mais elles disparaîtront du méristème adulte qui ne devrait normalement plus contenir de substances paraplasmiques y compris celles des vacuoles.

Une approche ultrastructurale semblable de la néoformation *in vitro* a été décrite chez le *Cichorium intybus* multiplié par nodules méristématiques [26] à partir des cellules cambiales de la nervure principale de feuilles incisées (Piéron, communication personnelle), et chez le tabac reproduit par cal [31].

La présence d'amidon en tant que source énergétique indispensable au bourgeonnement adventif a été observée dans les cals organogènes de *Saintpaulia ionanta* [29] et de *Fragaria x ananassa* [32] ou embryogènes de *Corylus avellana* [27] et de *Coffea arabica* [20].

Le bourgeonnement adventif épiphyllé naturel est assez rare (certaines Polypodiées), mais son éventualité peut néanmoins suggérer une assez grande aptitude potentielle des feuilles à la néoformation de bourgeons adventifs [19]. Chez le fraisier, il pourrait s'agir d'un mécanisme semblable parce qu'il se produit toujours sur une zone bien précise des stipules foliaires qui y seraient prédisposées mais ne l'exprimeraient que sous certaines conditions stimulantes (*in vitro* en particulier).

## Références

1. Anderson HM, Abbott AJ, Wiltshire S (1982). Micropropagation of strawberry plants *in vitro*. Effect of growth regulators on the incidence of multi-apex abnormality. *Scientia Horti* 16 : 331-341.
2. Boxus Ph (1974). The production of strawberry plants by *in vitro* culture. *J Hort Sc* 49 : 209-210.
3. Boxus Ph, Quoirin M, Laine JM (1977). Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. In : *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*, Reinert J, Bajaj YPS eds Springer Verlag, 130-143.
4. Boxus Ph (1986). Comportement du fraisier issu de micropropagation *in vitro*. Aspects pratiques actuels. *Le fruit belge* 410 : 106-110.
5. Boxus Ph (1989). Review on strawberry mass propagation. International strawberry symposium. May-June 88, Cesena (Italy). *Acta Horticulturae* 265 : 309-320.
6. Buvat R (1965). Les bases cytologiques de la différenciation et de la dédifférenciation chez les plantes. *Handbuch d. Pflanzenphysiologie*, Bd. XVI/L : 100-145.
7. Buvat R (1989). Cytology of the process of differentiation and dedifferentiation during the ontogeny of vascular plants. In : *Ontogeny, cell differentiation and structure of vascular plants*. Springer Verlag : 188-224.

8. CIREF (1982-1988). Compte-rendu de l'expérimentation fraise.
9. Damiano C (1980). Strawberry micropropagation. In : Proceedings of the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture : applications and feasibility. USDA-SEA. Agriculture Research Results. ARR-NE-11, Beltsville, Maryland, USA : 11-22.
10. Demarly Y (1986). Experimental and theoretical approach of *in vitro* variations. In : Semal J, ed. *Somaclonal variations and crop improvement. Advances in Agricultural Biotechnology Martinus Nijhoff Publisher* : 84-99.
11. Eun JS, Lee BK, Lee MS, Harn C (1982). Studies on the rapid clonal propagation by means of meristem and callus cultures in strawberry. *J Kor Soc Hort Sci* 23(4) : 259-276.
12. Foucault C, Letouzé R (1987). *In vitro*. Régénération de plants de fraisier à partir de fragments de pétioles et de bourgeons floraux. *Biologia plantarum* 29 (6) : 409-414.
13. Jemmali A, Boxus Ph, Kinet JM (1992). Are strawberry plantlets arising from adventitious stipule buds also true to type ? *Acta Horticulturae* 319 : 171-176.
14. Jemmali A, Boxus Ph (1992). Strawberry behaviour from rooting to anthesis in relation to the number of subcultures *in vitro*. *Physiol Plant* 85 (3), Abst. 531.
15. Jones OP, Waller BJ, Beech MG (1988). The production of strawberry plants from callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12 : 235-241.
16. Kinet JM, Parmentier A (1989). The flowering behaviour of micropropagated strawberry plants cv. « Gorella » : The influence of the number of subcultures on the multiplication medium. In : International Strawberry Symposium. May-June 88, Cesena (Italy). *Acta Horticulturae* 265 : 327-334.
17. Liu ZR, Sanford JC (1988). Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner tissue. *Hort Science* 23 (6) : 1057-1059.
18. Marcotrigiano M, Morgan PA, Swartz HJ, Ruth J (1987). Histogenic instability in tissue culture proliferated strawberry plants. *J Am Soc Hort Sci* 112 : 383-387.
19. Margara J (1982). Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse. INRA-France.
20. Michaux-Ferrière N, Dublin P, Schwendiman J (1987). Étude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explants foliaires de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé* 31 (2) : 103-110.
21. Miller AR, Chandler CK (1990). Plant regeneration from excised cotyledons of mature strawberry achenes. *Hort Science* 25 : 569-571.
22. Navatel JC, Varchaud G, Roudeillac Ph, Bardet A (1986). Comportement agronomique de plants de fraisier issus de pieds-mères produits par micropropagation par rapport au matériel classique. *Infos-CTIFL*, 21 : 2-8.
23. Nehra NS, Stushnoff C, Kartha KK (1989). Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks. *J Am Soc Hort Sci* 114 (6) : 1014-1018.
24. Nishi S, Oosawa K (1973). Mass propagation method of virus-free strawberry plants through meristem callus. *Japan Agricult Res Quart* 7 : 189-194.
25. Oosawa K, Toda M, Nishi S (1974). Studies on the anther culture of vegetable crops. Breeding of a great quantity of virus free plants by means of strawberry anther culture method. *Bull Veg Ornament Crops Res Stn., Japan A* 1 : 41-57.
26. Piéron S, Belaizi M, Boxus Ph (1993). Nodule culture, a possible morphogenetic pathway in *Cichorium intybus* L. propagation. *Scientia hortic* 53 : 1-11.
27. Radojevic LJ, Kovoora A, Zylberberg L (1979). Étude anatomique et histochimique des cals embryogènes de *Coryllus avellana* L. et de *Paulownia tomentosa*. *Steud Rev Cytol Biol Veget - Bot* 2 : 155-167.
28. Rancillac M, Nourrisseau JG, Navatel JC (1987). Incidence de la multiplication *in vitro* sur le comportement du plant de fraisier en France. In : Boxus Ph, Larvor P, eds. *In vitro culture of strawberry plants*. CEC Report, Luxembourg, 55-73.
29. Rao AN (1977). *In vitro* culture of leaf fragments of *Saintpaulia ionanta*. In : Gautheret RJ, ed. *La culture des tissus et des cellules des végétaux*. Masson Paris : 110-122.
30. Rosati P, Devreux M, Laneri U (1975). Anther culture of strawberry. *Hort Science* 10 : 119-120.

31. Ross MK, Thorpe IA, Costerton JW (1973). Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. *Am J Bot* 60 (8) : 788-795.
32. Rugini E, Orlando R (1992). High efficiency shoot regeneration from calluses of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) stipules of *in vitro* cultures. *J Hort Sci* 67 (4) :577-582.
33. Swartz HJ, Galetta GJ, Zimmerman RH (1981). Field performance and phenotypic stability of tissue culture-propagated strawberries. *J Am Soc Hort Sci* 106 : 667-673.
34. Wang DY, Wergin WP, Zimmerman RH (1984). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of strawberry. *Hort Science* 19 : 71-72.
35. Zimmerman RH (1981). Micropropagation of fruit plants. *Acta Horticulturae* 120 : 217-222.
36. Zimmerman RH (1991). Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops. In : Debergh PC, Zimmerman RH, eds. *Micropropagation, technology and application*. Kluwer Academic Publishers : 231-246.



# 21

## **Multiplication végétative *in vitro* d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana***

M.N. DI MICHELE, L. BRAY

*ISERST, Laboratoire de Lutte contre la Désertification, BP 486, Djibouti, République de Djibouti.*

### **Résumé**

*La multiplication végétative in vitro d'Acacia flava syn. erhenbergiana a été mise au point. Les semences sont d'abord mises à germer en conditions stériles. Les bourgeons cotylédonaire sont mis en culture sur un milieu contenant les éléments minéraux de Murashige et Skoog additionné de 50 g.l<sup>-1</sup> de saccharose et de 2 mg.l<sup>-1</sup> de kinétine. Les rameaux obtenus sont microbouturés sur un milieu d'allongement contenant 1 mg.l<sup>-1</sup> de kinétine et 2 mg.l<sup>-1</sup> d'acide  $\alpha$ -naphtylacétique. L'enracinement est réalisé sur un milieu sans hormone ou avec 1 mg.l<sup>-1</sup> d'acide  $\alpha$ -naphtylacétique. La discussion est orientée sur l'optimisation de l'allongement et de l'enracinement. Cet article présente les premiers résultats obtenus à notre connaissance sur la multiplication végétative in vitro de l'espèce. D'ores et déjà, la méthode permet d'obtenir des vitroplants pour des expériences de sélection précoce in vitro et pour des tests de sensibilité à Agrobacterium tumefaciens en vue d'améliorer la résistance à la salinité.*

En Afrique, environ 2 000 millions d'hectares sont considérés comme des terres arides dont les trois quarts sont touchés par la désertification. La quasi-totalité de ces zones dégradées sont des terres de parcours principalement utilisées par les populations nomades [14]. Djibouti, pays aride [15] dont 95 % de la population agricole est nomade, est fortement affecté par une désertification croissante de ses terres cultivées et de

parcours [6]. Les terres cultivées dont l'irrigation est souvent mal gérée subissent une salinisation excessive et deviennent incultes [5].

Les terres de parcours, du fait d'une forte croissance démographique, sont soumises à une exploitation beaucoup plus forte que dans le passé : augmentation corrélative du bétail et de la pression de pâturage, coupes de bois plus importantes. En conséquence, le fragile équilibre existant entre l'utilisation des ressources naturelles par les populations nomades et la capacité de régénération naturelle a été rompu. Le processus de désertification est alors amorcé malgré l'adaptation des espèces locales à des conditions extrêmes d'aridité.

La lutte contre la désertification peut être menée, soit par des méthodes classiques de reboisement [1], soit par les biotechnologies [8]. D'une part, la multiplication végétative *in vitro* permet la conservation de la biodiversité (ou la propagation d'individus ayant acquis des caractères améliorants) [13], d'autre part, les biotechnologies permettent des améliorations génétiques rapides en court-circuitant les longs cycles végétatifs naturels.

Dans le cadre de la lutte contre la désertification, un préalable nécessaire aux travaux d'amélioration génétique à la résistance à la salinité est la mise au point de milieux de multiplication *in vitro*. Cet article a pour objectif de présenter les travaux effectués afin d'introduire et de multiplier *in vitro* *Acacia flava*, espèce à usages multiples intéressant Djibouti et la Corne de l'Afrique.

## Matériels et méthodes

### Matériel végétal

*A. flava* (Forsk.) Schweinf. var. *seyal* (Del.), synonyme d'*A. erenbergiana* peuple des dépressions à sols argileux ou limoneux [8]. C'est un arbre à usages multiples : principalement fourrage, mais aussi bois de chauffe, charbon, bois d'œuvre, production de tanins, clôtures sèches et pharmacopée [1].

### Méthodes

#### • Introduction *in vitro* et obtention du matériel juvénile

Le matériel juvénile est obtenu par la germination *in vitro*, en conditions stériles, des semences récoltées à Djibouti (site de Balbala) en juin 1992. Elles sont conservées dans des sachets plastiques, à l'abri de la lumière, et à une température de 4 °C.

L'inhibition tégumentaire est levée par la scarification à l'acide sulfurique concentré (95-97 %) durant 10 min. Après un rinçage à l'eau courante, les restes de téguments sont supprimés par un essuyage avec du papier filtre. La stérilisation est réalisée sous la hotte à flux laminaire par un premier bain de 10 min dans de l'alcool à 70° suivi d'un deuxième de 10 min dans de l'eau de Javel du commerce diluée à 6° de chlore actif. Enfin, trois rinçages de 10 min chacun sont effectués avec de l'eau distillée et stérilisée.

Les semences sont ensuite mises à germer par lots de 40, dans des pots de germination contenant de l'eau gélosée avec 6 g.l<sup>-1</sup> d'agar-agar (Prolabo) et stérilisée par autoclavage à 110 °C pendant 30 mn.

Les explants, prélevés sur des plantules issues de semis de 15 à 20 jours, sont constitués des deux cotylédons, de 5 mm d'épicotyle et de 3 mm d'hypocotyle [9]. Ils

sont transférés dans des tubes de culture contenant 15 ml d'un milieu de culture solide dit de multiplication contenant les éléments minéraux de Murashige et Skoog [19] additionnés de 50 g.l<sup>-1</sup> de saccharose et de 2 mg.l<sup>-1</sup> de kinétine.

Après 45 à 50 jours de culture, les microboutures d'une taille de 1 à 1,5 cm et comprenant un ou deux nœuds sont prélevées sur les rameaux formés à partir des explants cotylédonaire. Elles sont cultivées dans des tubes contenant 15 ml d'un milieu d'allongement puis repiquées sur milieu d'enracinement.

#### • *Milieux et conditions de culture*

Différents milieux ont été testés pour l'allongement et l'enracinement des microboutures. Ils contiennent toujours les éléments de Murashige et Skoog [19] additionnés de 1 ml.l<sup>-1</sup> du mélange vitaminique de Nitsch et Nitsch [20], de 8 g.l<sup>-1</sup> d'agar-agar (Prolabo) et de 5 ml.l<sup>-1</sup> d'une solution de FeEDTA obtenue par dissolution dans 1 litre d'eau de 5,57 g de FeSO<sub>4</sub> et 7,45 g de Na<sub>2</sub>EDTA. Sauf indication contraire, l'apport en carbone est réalisé par 50 g.l<sup>-1</sup> de saccharose. Le pH est ajusté à 5,6 ± 0,1. Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage pendant 30 min à 110° C.

Les hormones testées, en combinaison ou non, sont la Benzyl Amino Purine (BAP, Sigma) en concentration de 0 à 3 mg.l<sup>-1</sup>, l'acide β-indolylacétique en concentrations de 0 à 1 mg.l<sup>-1</sup>, l'acide gibbérellique de 0 à 2 mg.l<sup>-1</sup>, la kinétine et l'acide α-naphtylacétique (ANA) en concentrations de 0 à 3 mg.l<sup>-1</sup>.

Les explants sont cultivés dans une chambre de culture avec une photopériode, 18 h de jour et 6 h de nuit, à une température de 27° C. La lumière artificielle est générée par des tubes fluorescents OSRAM L 30 W/20.

#### • *Analyse des données*

Les mesures concernant l'allongement sont effectuées de façon hebdomadaire. Au temps initial, il est vérifié par le test t de Student de comparaisons des moyennes qu'il n'y a pas de différences significatives entre les différentes conditions. Par la suite, les différences sont dites significatives à p = 0,05 si la valeur calculée de t est supérieure à la valeur seuil pour un degré de liberté donné (ddl = nombre d'individus moins un).

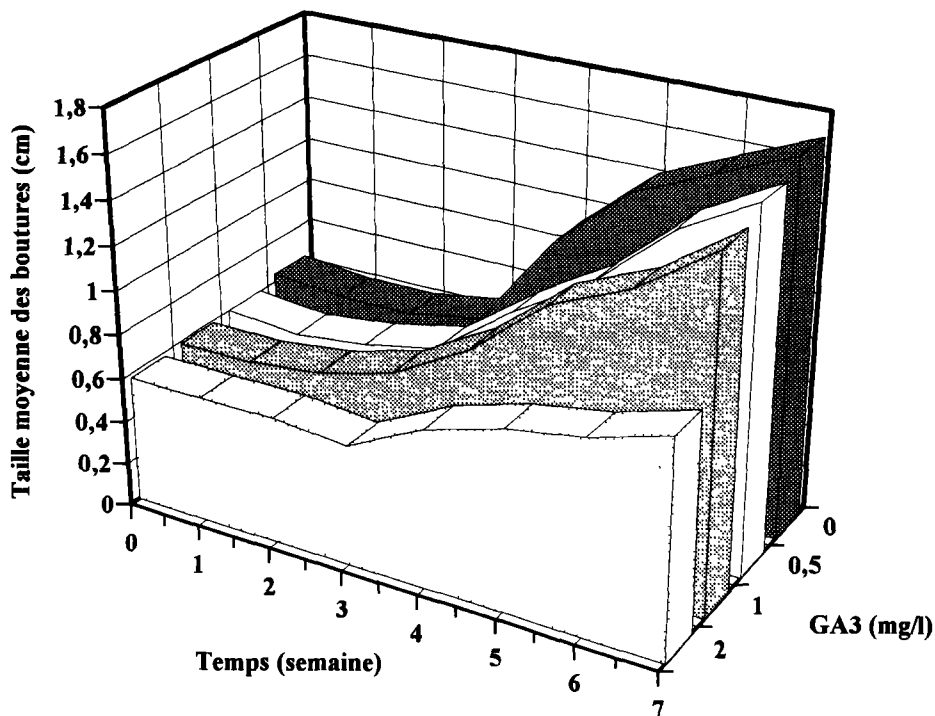
Les mesures concernant l'enracinement des boutures sont présentées à 50 jours. Les données sont analysées selon les mêmes méthodes que pour l'allongement.

## Résultats

### Milieu d'allongement

#### • *Influence de l'acide gibbérellique (GA3)*

La taille des boutures, Figure 1, est donnée en fonction de la durée de repiquage sur des milieux contenant 0, 0,5, 1 ou 2 mg.l<sup>-1</sup> de GA3. Nous constatons qu'il n'y a pas de différence significative entre la taille des boutures cultivées sans hormone ou en présence de 0,5 et 1 mg.l<sup>-1</sup> de GA3 (les valeurs calculées du t de Student sont inférieures aux valeurs seuils). En revanche, les boutures cultivées en présence de 2 mg.l<sup>-1</sup> de GA3 ont une taille significativement inférieure à celle des boutures témoins (t = 2,21). L'acide gibbérellique ne favorise donc pas l'allongement et a, au contraire, un effet inhibiteur à 2 mg.l<sup>-1</sup>.



**Figure 1.** Évolution de la taille des boutures d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* en fonction de la concentration en acide gibbérellique (GA3) dans le milieu de culture (MS).

• **Influence de la kinétine (Kin) et de l'acide  $\alpha$ -naphthylacétique (ANA)**

La Figure 2 représente l'allongement à 6 semaines de boutures repiquées sur des milieux additionnés de Kin et d'ANA en concentrations combinées de 0 à 2 mg.l<sup>-1</sup>. Avant la 6<sup>e</sup> semaine, aucune différence significative n'est observée.

A 6 semaines, l'allongement obtenu avec 2 mg.l<sup>-1</sup> d'ANA et 1 mg.l<sup>-1</sup> de Kinétine est de 1,580 cm et est significativement supérieur à celui des témoins (le t de comparaison des moyennes est de 3,06).

Bien que l'allongement soit plus faible qu'avec 1 mg.l<sup>-1</sup> de Kin et 2 mg.l<sup>-1</sup> d'ANA, les tailles moyennes sans kinétine et avec seulement 1 mg.l<sup>-1</sup> ou 2 mg.l<sup>-1</sup> d'ANA sont aussi significativement plus grandes que celles des témoins avec des valeurs de t, respectivement, de 2,06 et de 2,623.

Enfin, les allongements mesurés sont identiques pour le milieu sans hormone et pour ceux dont le rapport molaire Kin/ANA est équivalent à 1.

• **Influence de la 6-benzyl-aminopurine (BAP)**

L'allongement des boutures a été étudié en fonction de la durée de repiquage sur un milieu dépourvu d'hormone ou contenant 1,2 ou 3 mg.l<sup>-1</sup> de BAP (Figure 3).

Nous observons que l'allongement des boutures jusqu'à la 6<sup>e</sup> semaine est faible (< 0,6 cm) quelle que soit la condition. Entre la 6<sup>e</sup> et la 7<sup>e</sup> semaine, les allongements

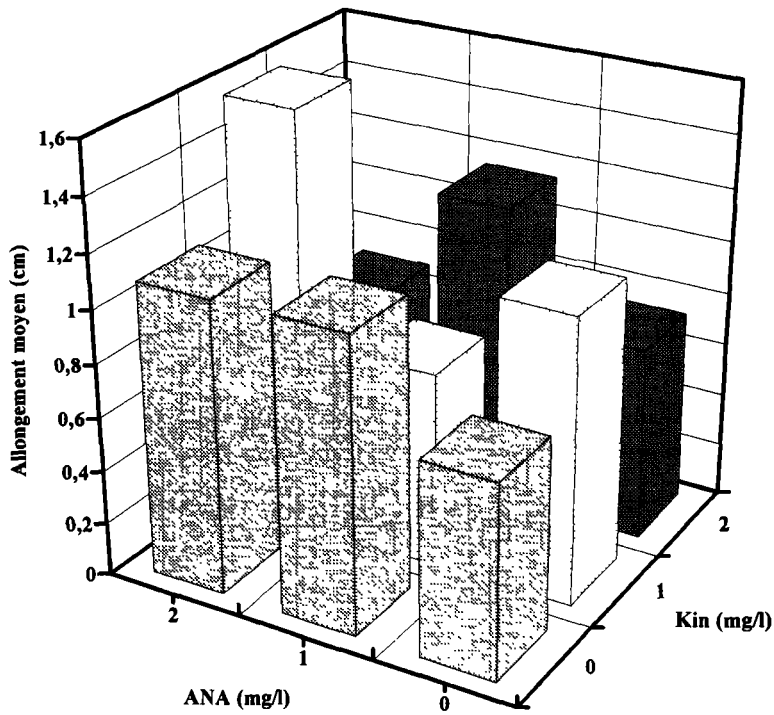


Figure 2. Allongement des boutures d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* en fonction des concentrations en acide  $\alpha$ -naphthylacétique (ANA) et en kinétine (Kin) dans le milieu de culture (MS).

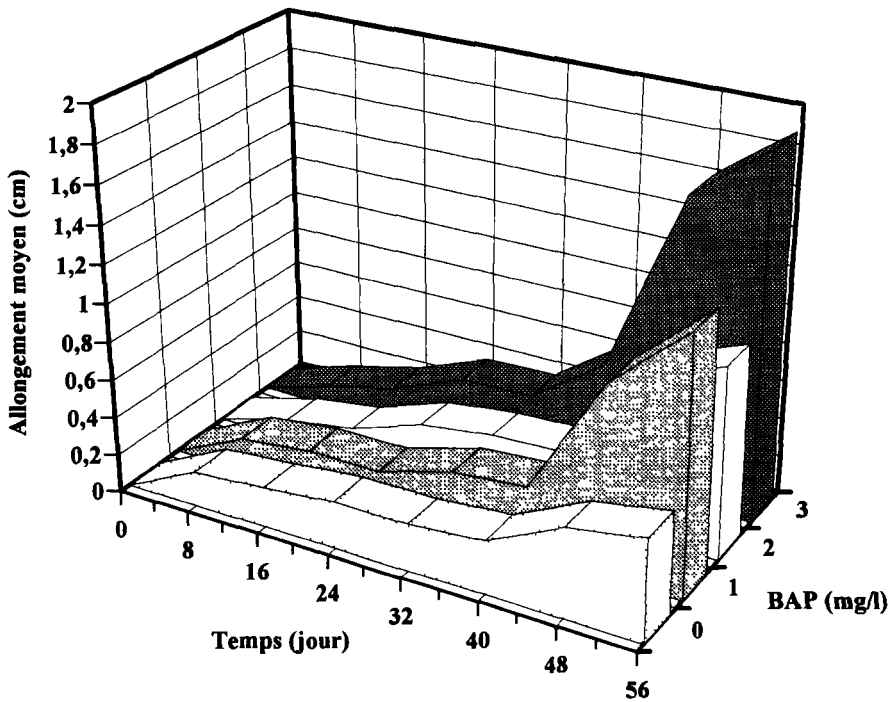


Figure 3. Allongement des boutures d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* en fonction de la concentration en 6-benzyl-aminopurine (BAP) dans le milieu de culture (MS).

augmentent fortement. Ainsi, pour 3 mg.l<sup>-1</sup> de BAP, l'allongement passe de 0,6 à 1,6 cm.

A la 8<sup>e</sup> semaine, les allongements en présence de BAP sont tous significativement supérieurs à ceux des témoins. En effet, les valeurs du t de Student par rapport aux témoins pour 1,2 et 3 mg.l<sup>-1</sup> de BAP sont respectivement de 2,184, 2,139 et 4,32.

### Milieu d'enracinement

#### • Influence de la concentration en saccharose

Le pourcentage moyen de boutures enracinées à 50 jours a été étudié en fonction de la teneur en saccharose et en Kin (Figure 4). En l'absence de kinétine, il n'y a aucune différence significative entre les taux d'enracinement à 30 et 50 g.l<sup>-1</sup> de saccharose qui sont, respectivement, de 11 % et de 13 %. En présence d'hormones, le taux moyen d'enracinement avec 50 g.l<sup>-1</sup> de saccharose est de 12 %, et est significativement plus élevé que pour 30 g.l<sup>-1</sup> (le t de Student est égal à 2,15 et est supérieur à la valeur seuil de 1,96).

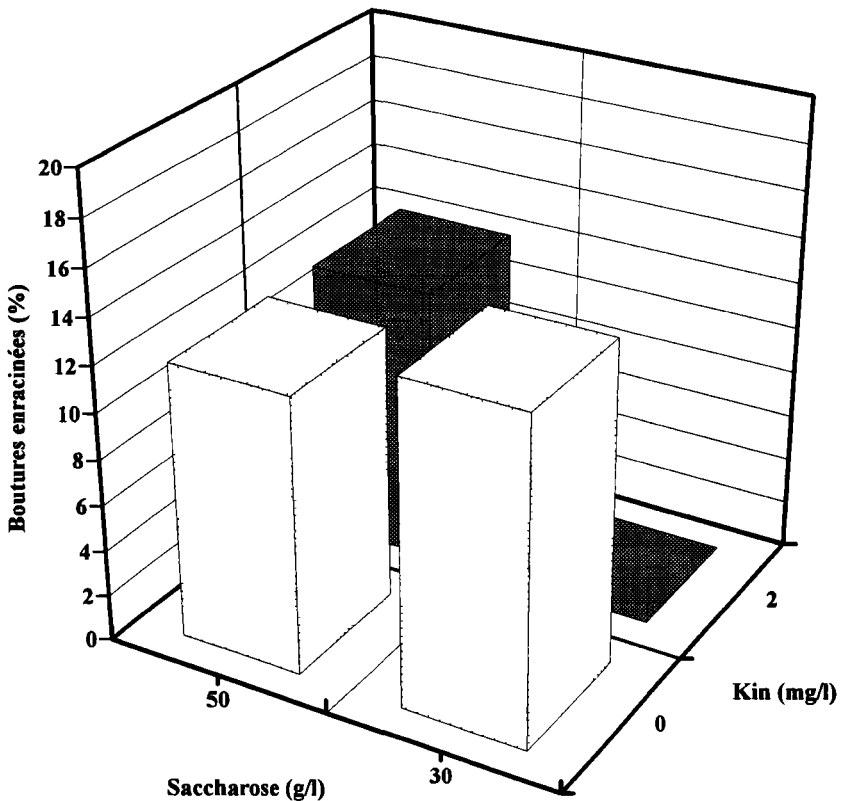


Figure 4. Enracinement des vitroplants d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* en fonction des concentrations en saccharose et en kinétine (Kin) dans le milieu de culture (MS).

• **Influence de l'acide gibbérellique (GA3)**

Le pourcentage de boutures enracinées à 50 jours est représenté sur la Figure 5 en fonction de la teneur en GA3 (0, 0,5, 1 ou 2 mg.l<sup>-1</sup>). Le meilleur pourcentage de boutures enracinées est obtenu sur le milieu dépourvu d'hormones ou en présence de seulement 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de GA3 avec respectivement 7,2 % et 7,1 % de boutures enracinées.

• **Influence des teneurs combinées en Kin et en ANA**

Le pourcentage moyen de boutures enracinées à 50 jours a été étudié en fonction de la concentration en ANA et en Kin (Figure 6). Les meilleurs enracinements sont obtenus en absence d'hormones ou avec 1 mg.l<sup>-1</sup> d'ANA avec, respectivement, 7,2 % et 6,8 % de boutures enracinées.

Enfin, des boutures ont été soumises à une phase d'induction de 10 jours en présence de teneurs combinées en Kin et d'ANA suivie d'une phase d'expression racinaire sur un milieu sans hormones. Aucune différence significative n'a été observée par rapport aux résultats obtenus sans repiquage sur milieu sans hormones.

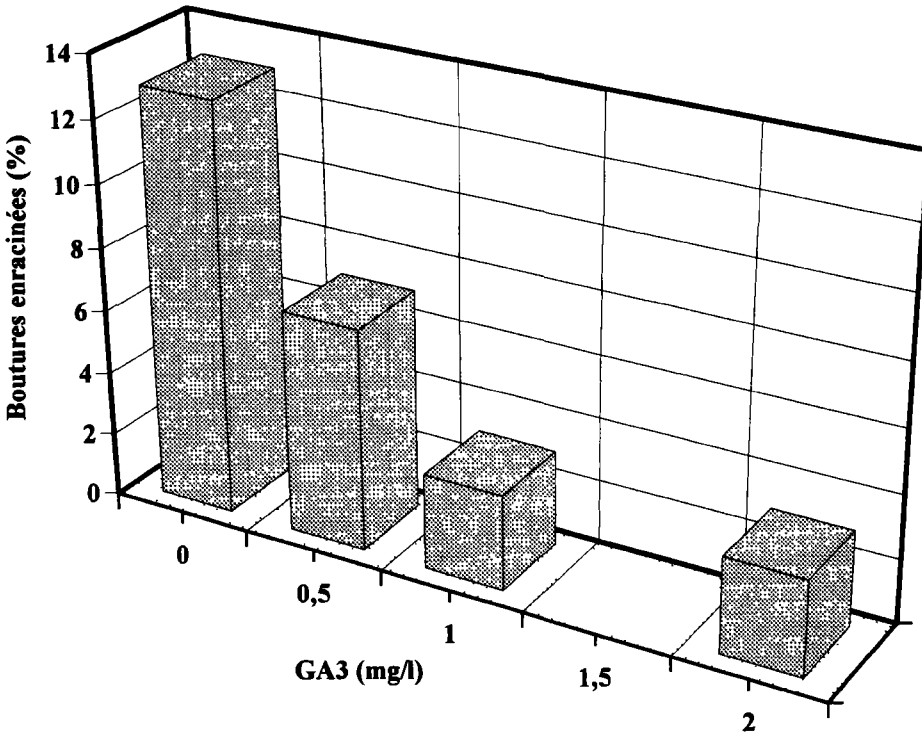
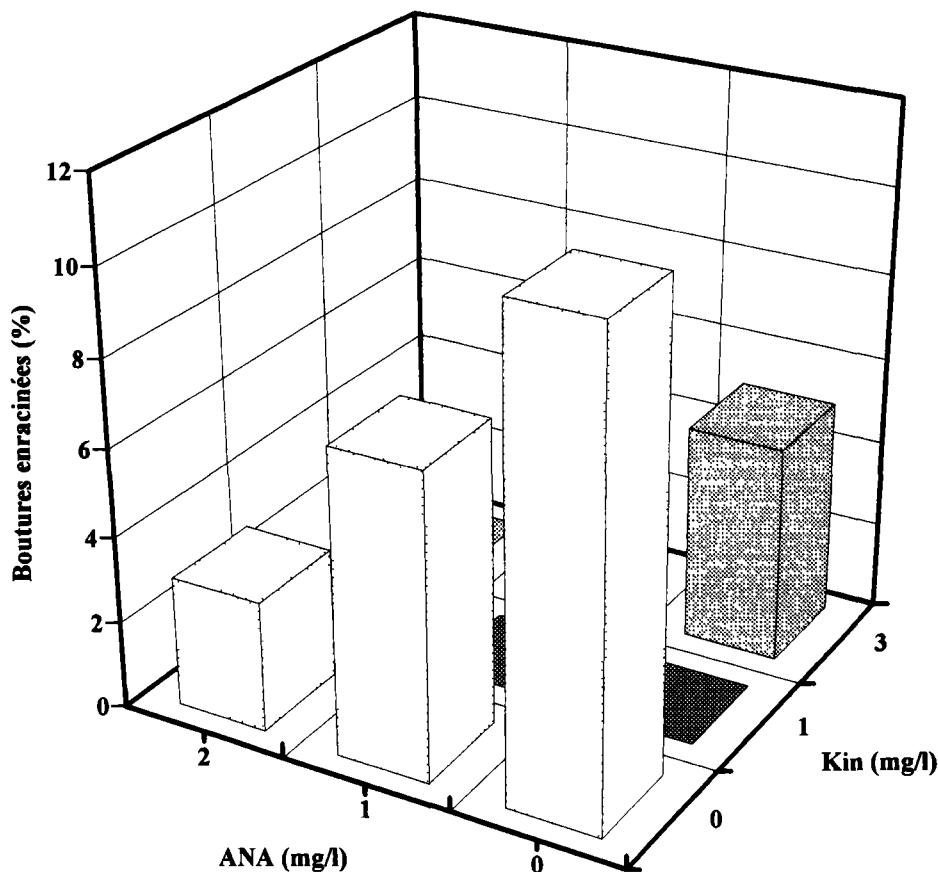


Figure 5. Enracinement des vitroplants d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* en fonction de la concentration en acide gibbérellique (GA3) dans le milieu de culture (MS).



**Figure 6.** Enracinement des vitroplants d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* en fonction des concentrations en acide  $\alpha$ -naphyltacétique (ANA) et en kinétine (Kin) dans le milieu de culture (MS).

## Discussions et perspectives

Ces différentes études ont permis d'introduire et de multiplier *in vitro* *A. flava*. Le milieu d'allongement actuellement utilisé est celui contenant 1 mg.l<sup>-1</sup> de Kin et 2 mg.l<sup>-1</sup> d'ANA. Nous avons aussi montré que la présence de Kin n'est pas nécessaire pour la phase d'allongement. A l'inverse, chez *Prosopis juliflora*, la présence de Kin ou de BAP est nécessaire à l'élongation des boutures [16].

La croissance avec 3 mg.l<sup>-1</sup> de BAP est identique à celle obtenue avec 1 mg.l<sup>-1</sup> de Kin et 2 mg.l<sup>-1</sup> d'ANA, mais elle est obtenue avec une semaine de retard. La caulogénèse est aussi stimulée par la présence de BAP chez *Albizia lebbek* [11] et chez *A. auriculiformis* [12]. Nous poursuivons actuellement des expériences avec des milieux contenant de la BAP combinée à de l'ANA afin d'obtenir un milieu d'allongement optimal.



Par ailleurs, d'autres milieux ou méthodes d'enracinement devront être testés. Chez une autre espèce d'*Acacia*, *A. nilotica*, le pourcentage de boutures enracinées atteint 50 % à 63 jours avec 0,5 mg.l<sup>-1</sup> AIA (données personnelles). Des expériences sont en cours pour vérifier si cette hormone permettrait d'améliorer l'enracinement des boutures d'*A. flava*. L'acide indole-3-butyrique devra aussi être testé car il favorise l'enracinement de nombreuses légumineuses *in vitro* [7, 11, 12, 17] ou *in vivo* [3]. Enfin, une phase d'induction de 10 jours en présence de teneurs combinées en Kin et ANA, suivie d'une phase d'expression racinaire sur un milieu sans hormones n'a pas amélioré l'enracinement des boutures alors qu'une telle méthode permet d'obtenir un taux d'enracinement proche de 100 % chez *A. senegal* [4].

La concentration de saccharose retenue pour les milieux d'allongement et d'enracinement est de 50 g.l<sup>-1</sup>. Les feuilles sont plus nombreuses et plus vertes que par rapport à 30 g.l<sup>-1</sup> et le pourcentage de boutures enracinées est plus élevé. Chez *A. albida*, des taux de rhizogénèse de 100 % sont obtenus avec une concentration identique en saccharose [9]. De plus, nous observons un noircissement de l'extrémité des racines. Ce phénomène est rapporté chez d'autres espèces d'*Acacia* : *A. albida* [9], *A. nilotica* (le noircissement est visible dès la 3<sup>e</sup> semaine, données personnelles).

Il a aussi été montré que l'acide gibbérellique n'avait aucun effet stimulateur aussi bien sur l'allongement que sur l'enracinement des boutures d'*A. flava*. Les résultats que nous avons obtenus chez *A. nilotica* sont identiques. Chez le genre *Acacia*, la GA3 aurait donc un effet inhibiteur aussi bien sur l'allongement que sur l'enracinement, alors que certains auteurs rapportent qu'elle peut stimuler l'allongement des entrenœuds [2]. Selon Junttila [10], l'acide gibbérellique favorise aussi l'allongement des entrenœuds aux dépens de la formation des racines et des feuilles.

En conclusion, les milieux de multiplication végétative *in vitro* d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana* nous ont déjà permis de commencer des études de sélection précoce *in vitro* et d'effectuer des tests de sensibilité à *Agrobacterium tumefaciens* en vue d'obtenir des plantes transgéniques plus résistantes à la salinité.

## Références

1. Audru J, Labonne M, Planchenault D (1990). Desertification : a reversible trend. The example of Djibouti. Ministère de la Coopération/CEE/IEMVT-CIRAD : 8 p.
2. Augé R, Beauchesne G, Boccon-Gibod J, Decourtye L, Galandrin J-Cl, Minier R, Morand J-Cl, Vidalie H (1986). La culture *in vitro* et ses applications horticoles. JB Baillière Pub. : 152 p.
3. Badji S, Ndiaye I, Danthu P, Colonna JP (1991). Vegetative propagation of gum arabic trees. 1. Propagation of *Acacia senegal* (L.) Willd. using lignified cuttings of small diameters with eight nodes. *Agroforestry Systems* 14 : 183-191.
4. Badji S, Mairone Y, Ndiaye I, Merlin G, Colonna JP, Danthu P, Neville P (1992). Multiplication végétative *in vitro* du gommier : *Acacia senegal* L. (Willd.). Symposium UIFRO-AFOCEL Bordeaux sept. 1992 : 155-166.
5. Baulain PY (1990) Arboriculture fruitière. Rapport de fin de projet, première phase, octobre 1987 juin 1990, v. 1. MADR/ministère de la Coopération, Djibouti, 93 p.
6. CNE (Comité National pour l'Environnement) (1991). Rapport National Environnement. ONTA/SPSE, Djibouti, 105 p.
7. Dilip Nandwani, Ramawat KG (1991). Callus culture and plantlets formation from nodal explants of *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. *Indian J Exp Biol* 29 : 523-527.

8. Di Michele MN, Bray L (1993). La culture *in vitro* à Djibouti : un outil de la lutte contre la désertification. *Rivista di Agricoltura Subtropicale e Tropicale* 87 : 85-96.
9. Duhoux E, Davies D (1985). Caulogénèse à partir de bourgeons cotylédonaire d'*Acacia albida* et influence du saccharose sur la rhizogénèse. *J Plant Physiol* 121 : 175-180.
10. Junttila O (1970). Effects of gibberellic acid and temperature on the growth of young seedlings of *Syringa vulgaris* L. *J Hort Sci* 45 : 315-329.
11. Lakshmana PV, Deepesh NDE (1987). Tissue culture propagation of tree legume *Albizia lebbek* (L.) Benth. *Plant Sci* 51 : 263-267.
12. Ranga Rao GV, Prasad MNV (1991). Plantlet regeneration from the hypocotyl callus of *Acacia auriculiformis* – Multipurpose tree legume. *J Plant Physiol* 137 : 625-627.
13. Thorpe TA, Harry IS, Kumar PP (1991). Application of micropropagation to forestry. In : Debergh, PC Zimmerman RH, eds. *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers : 311-336.
14. UNEP (1992). Status of desertification and implementation of the United Nations plan of action to combat desertification. Report of the executive director. UNEP, Nairobi : 88 p.
15. UNESCO (1977) Carte de répartition des régions arides.
16. Wainwright H, England N (1987). The micropropagation of *Prosopis juliflora* (Swartz) DC : establishment *in vitro*. *Acta Horticulturae* 212 : 49-53.
17. Yashpal Goyal, Arya HC (1985). Tissue culture of desert trees : II. Clonal multiplication of *Ziziphus in vitro*. *J Plant Physiol* 119 : 399-404.
18. Lebrun *et al.* (1989).
19. Murashige, Skoog (1962).
20. Nitsch, Nitsch (1962).

## 22

### **Évaluation et potentialité des minitubercules de pomme de terre produits par *in vitro***

G. FOUARGE

*Station de Haute Belgique, CRA Gembloux, Belgique.*

#### **Résumé**

*Si la technique de micropropagation in vitro est intéressante pour régénérer des plants de pommes de terre et mettre sur le marché un matériel végétal de qualité, des problèmes de rentabilité se posent en raison du taux de multiplication qui est souvent aléatoire.*

*Des essais ont été réalisés en vue d'améliorer la production de tubercules en agissant sur la fumure phosphopotassique, les régulateurs de croissance, la densité de repiquage, la masse de substrat.*

*Des facteurs climatiques comme l'humidité, la lumière, la chaleur seraient plus déterminants ainsi que la maîtrise du stockage.*

*La culture hydroponique est aussi une technique à prendre en considération pour une meilleure maîtrise des autres facteurs.*

La technique *in vitro* comme moyen rapide de produire une masse importante de matériel végétal d'un état sanitaire fiable est largement utilisée aujourd'hui.

Depuis plusieurs années, les producteurs de plants de pommes de terre ont choisi cette voie pour améliorer la qualité sanitaire de leur matériel de base.

C'est ainsi qu'ils utilisent soit des microplantules, soit des microtubercules, soit des minitubercules.

Une certaine confusion existe quant à l'origine de ces différentes formes de production.

Si les microplantules et les microtubercules sont des plants produits directement en milieu *in vitro*, les minitubercules sont le résultat d'une première génération *in vivo* issue soit d'une microplantule, soit d'un microtubercule.

Le microtubercule et le minitubercule se différencient par l'origine et par le calibre.

Le microtubercule produit *in vitro* est d'un calibre de 3 à 5 mm, le minitubercule se rapproche déjà plus d'un plant classique par son calibre qui se situe entre 10 et 25 mm. De plus il est produit sur substrat, donc dans un milieu non stérile.

Il n'est cependant pas comparable à un petit calibre de 25 mm issu d'un triage de plants de pleine terre, son potentiel de production étant supérieur.

## Quels sont les problèmes rencontrés et comment les résoudre ?

Les problèmes posés sont le nombre de minitubercules produits par plantule, et l'état physiologique du tubercule au moment de la plantation en plein champ.

Lorsque des microplantules issues du laboratoire sont transférées en phase d'acclimatation en serre, ce transfert se réalise en bacs dont chaque alvéole a une dimension de 6 × 6 cm, soit pratiquement 250 plantules/m<sup>2</sup>.

Après une période de 3 à 4 semaines, la plantule développe un chevelu racinaire important et atteint une hauteur de 10 à 15 cm. Elle est alors transférée en plein champ. La mise en place est généralement mécanisée.

La densité de plantation au champ est de 65 000 plantes/ha, soit un écartement de 0,75 m × 0,20 m ; ce qui correspond aux caractéristiques des repiqueuses à motte.

Le rendement se situe entre 5 et 7 tubercules par plantule. Le calibre est compris entre 35 et 45 mm, donc une fourchette assez étroite d'écart de calibres. Cette homogénéité, tant dans le développement végétatif que dans le calibre des tubercules, est une des constantes de ce matériel végétal qui se caractérise par une grande unité d'âge physiologique.

Les minitubercules suivent un cheminement différent.

Après acclimatation en serre, les plantules sont transférées en bac de culture à une densité de 200 plantes/m<sup>2</sup>, et placées en serre ou sous abri *insectproof*.

Le coefficient de multiplication est assez hétérogène : 2 à 6 tubercules/plante.

Le calibre s'échelonne de 10 mm à 25 mm, voire 35/40 mm.

90 % des tubercules sont supérieurs à 10 mm et quelque 50 % entre 10 et 20 mm.

– Des essais ont été réalisés afin de modifier le taux de multiplication.

– Un renforcement de la fumure phosphotassique n'a pas modifié le nombre de tubercules.

– L'application de chloromequat chlorure (Cycocel), qui, secondairement, aurait pu augmenter le nombre de stolons, a une action légèrement négative sur la variété expérimentée Gasore dont le nombre de tubercules est assez élevé. Le coefficient de multiplication est tombé de 5,1 de moyenne à 4,2.

Nous avons pensé que si nous augmentions le volume de substrat de repiquage, les plantules disposant d'une réserve nutritive et d'un espace racinaire plus importants, ainsi que d'une bonne réserve d'humidité, le rendement en serait logiquement augmenté.

Ce paramètre est loin d'être absolu. Pour une même densité de plantation

(200 pl/m<sup>2</sup>) une profondeur de bac de 6 cm, par rapport à 15 cm, donnait un rendement équivalent lorsque l'irrigation était conduite de façon à maintenir une humidité permanente du substrat, le drainage étant assuré par le dépôt des bacs sur une toile perméable anti-racinaire.

A plus faible densité (100 pl/m<sup>2</sup>), une profondeur de 6 cm s'est montrée même supérieure à 15 cm, soit un coefficient de multiplication 6,8 contre 5,8 pour la variété Gasore expérimentée.

La masse de substrat mis à la disposition de la plantule destinée à produire des minitubercules n'est pas un facteur essentiel.

Il faut optimiser les facteurs physiques comme l'humidité, la lumière et la température qui favorisent une croissance constante.

– Le caractère juvénile des microplantules entraîne aussi une exigence plus grande en durée de culture. Après 5 à 6 mois de culture, nous avons parfois atteint un coefficient 6 avec la formation de gros calibre 40/45 ; ce qui n'est pas nécessaire pour la multiplication future.

– En augmentant la densité, par exemple 500 plantes/m<sup>2</sup>, et en travaillant sur une longue période de culture (5 à 6 mois), il serait possible d'obtenir un nombre plus élevé de tubercules.

Il faut cependant nuancer ce paramètre densité en fonction de la variété.

La variété Jaerle qui produit des tubercules moins nombreux ( $\times 2,8$ ) mais de gros calibre (+ de 35 mm en serre) a intérêt à être plantée à haute densité pour augmenter la quantité et réduire le calibre.

Il en est de même pour la variété Heideniere qui a tendance à s'allonger, et la variété Kennebec qui donne aussi de trop gros tubercules. En revanche, la variété Gasore plantée à une densité de 90 plantules/m<sup>2</sup> a produit le double de minitubercules (6,8 contre 3,4) par rapport à une densité de 180 plantules/m<sup>2</sup>.

Dans ce dernier cas, une occupation moins dense pour un même résultat est une économie de plantules.

Pour augmenter la densité, il faut pratiquement procéder à une mise en place directe en bac de culture, des plantules sortant de l'*in vitro* sans passer par la phase d'acclimatation.

Des essais effectués cette année ont montré que ce passage de l'*in vitro* à la culture en bac était possible, la différence de rendement étant non significative.

– Selon le contrôle par électrophorèse, le positionnement des protéines n'est pas modifié au niveau des minitubercules. C'est aussi un élément important pour l'identification variétale à ce niveau.

Au stade de la production de minitubercules, il n'est pas nécessaire de rechercher un gros calibre.

Aussi, en augmentant la densité, par exemple 500 plantes/m<sup>2</sup>, et en travaillant sur une longue période 4 à 5 mois, il est possible d'obtenir un nombre plus élevé de tubercules.

A densité plus élevée, l'acclimatation en bac à alvéoles n'est plus possible, il faut transférer directement les plantules de l'*in vitro* en bacs simples.

Des essais effectués cette année ont montré que le transfert direct était possible, et les différences de production non significatives, par rapport à un passage préalable en phase d'acclimatation.

– Pour une même variété, l'électrophorèse ne montre aucune différence entre un minitubercule et un tubercule de production de plein champ. Le positionnement des

protéines est identique. L'identification variétale est donc possible au niveau des minitubercules.

– La période de dormance n'est pas plus longue, mais l'évolution du germe est plus lente. Une conduite particulière de la conservation et de l'aménée du minitubercule dans sa phase de germination est nécessaire.

## Potentialité des minitubercules

Au champ, les minitubercules montrent une grande homogénéité de levée et de développement végétatif, mais accusent un retard assez sensible par rapport à des tubercules de sélection classique.

Le retard de début de levée est de  $\pm 5$  jours et la levée générale de  $\pm 10$  jours.

La couverture du sol atteint 80 % à 90 % après 100 jours contre 60 jours en culture traditionnelle.

Ce retard dans le développement phénologique du minitubercule est lié au caractère juvénile du minitubercule qui s'exprime par une dominance apicale du germe qui se comble lentement en cours de culture, d'où moins de tiges et un nombre de tubercules plus faible (jusqu'à 30 %).

Le schéma de production de minitubercules sous abri, la récolte tardive et, par conséquent, le peu de maturité de ces derniers ont pour conséquence de limiter le tubercule dans l'expression de sa capacité de production.

Ce schéma pourrait être modifié.

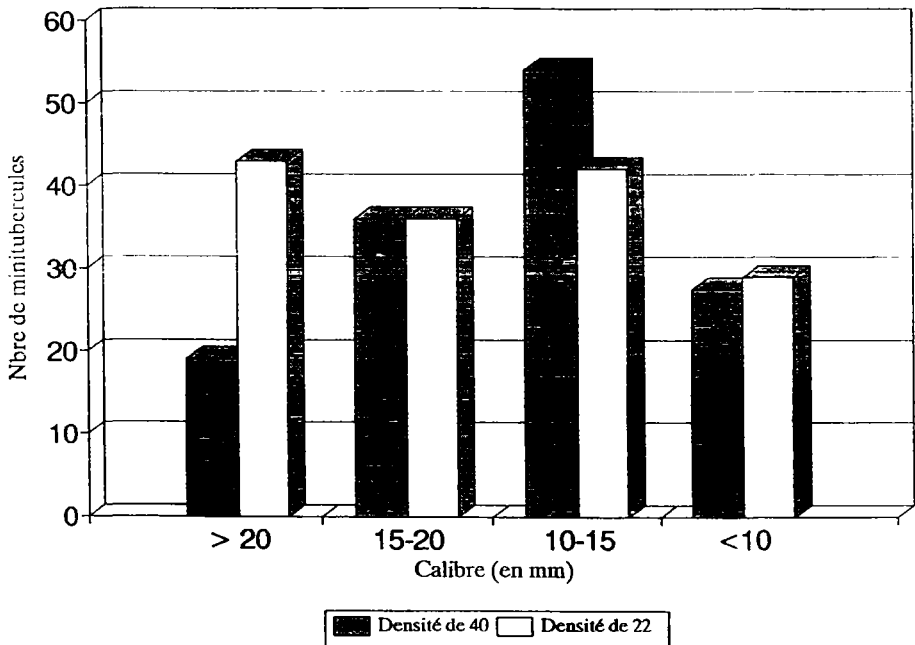


Figure 1. Récolte minitubercules SHB-1993. Essai densité de semis.

**En conclusion**, il faut améliorer, d'une part, la production de minitubercules en milieu protégé et, d'autre part, la productivité de ces minitubercules pour retrouver le potentiel réel propre à chaque variété.

Au niveau des microplantules, il faut mieux intégrer le facteur densité lié à la variété, maîtriser l'irrigation, voire travailler en technique hydroponique avec récolte échelonnée (type éclaircissage).

Au niveau des minitubercules, il faut retrouver leur potentialité en agissant sur un stockage plus court en frigo, une prégermination longue (8 semaines), un apport N-P rapidement utilisable en début de culture.

L'allongement de la période culturale favorable est bénéfique également, d'où l'intérêt d'effectuer la plantation au champ en région plus chaude ou sous tunnel.





## 23

### **Maîtrise de la culture et de la régénération de protoplastes de bananiers en vue de la création de nouvelles structures génétiques**

R. HAICOUR<sup>1</sup>, L. ROSSIGNOL<sup>1</sup>, V. BUI TRANG<sup>2</sup>, R. MEGIA<sup>3</sup>, S. TIZROUTINE<sup>1</sup>

*1. Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât. 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France.*

*2. Laboratoire de Physiologie Végétale, Université Hô-Chi-Minh-Ville, 227 Nguyen Van Cu Q5, TP Hô-Chi-Minh, Vietnam.*

*3. Institut Pertanian Bogor Jurusan Biologi JL Raya Pajajaran, Bogor 16143, Indonésie*

#### **Résumé**

*Plusieurs méthodes mettant en œuvre divers explants ont été appliquées afin d'obtenir des suspensions cellulaires. Ces dernières, initiées soit à partir de géotypes diploïdes, séminifères de l'espèce *Musa acuminata* AA (Long Tavoy, banksii ou malaccensis), soit à partir d'un triploïde, parthénocarpique ABB (le cv. Matavia), se sont avérées constituer le meilleur matériel pour la production de protoplastes aptes à se diviser. Un protocole original, utilisant des protoplastes isolés de suspensions cellulaires en phase active de croissance et mis en culture à haute densité sur « couche nourrice », a permis d'obtenir la division soutenue des protoplastes. A partir d'une suspension cellulaire « âgée » de Long Tavoy ayant perdu ses capacités morphogénétiques, le stade de cal n'a pas été dépassé. Alors que des suspensions nouvellement initiées, ayant conservé un potentiel embryogène important, peuvent être à l'origine de protoplastes à fort potentiel de développement qui évoluent en structures embryonnaires puis en plantes (Malaccensis et surtout Matavia), nous avons observé une embryogenèse somatique directe en prenant comme matériel de départ la suspension cellulaire de Matavia. On a pu obtenir*

ensuite la production de plantes, à partir de ces embryons, mais en faible nombre (dans 10 % de cas environ). On a noté aussi chez ce même cultivar, à partir des embryons somatiques primaires, la mise en place très vite d'un phénomène d'embryogenèse adventive très intense, qui a permis d'augmenter considérablement le nombre de plantes régénérées. Au cours de ce travail, ont été étudiés un certain nombre de facteurs concernant l'évolution quantitative des protoplastes. Nous avons pu déterminer quels étaient les « nourrices » et les supports les plus efficaces et montrer qu'il existait une réponse spécifique des protoplastes de bananiers concernant à la fois la « couche nourrice » et la barrière physique qui sépare les protoplastes de la « nourrice ». Nous avons établi également le moment où doit être appliquée la couche nourrice, et la durée de contact des protoplastes avec celle-ci. Une étude cytologique a permis, par ailleurs, de préciser les modalités d'évolution des protoplastes au cours du temps. Des premiers essais d'électrofusion de protoplastes ont déjà été effectués. On peut à présent envisager une insertion rapide de ces biotechnologies dans les programmes de sélection classique pour contribuer à une amélioration rapide et efficace des bananiers.

Dès le début de la période historique, les bananiers sont des plantes cultivées principalement pour la consommation de leurs fruits. Plus tardivement la production s'organise autour de deux types d'exploitations en fonction des variétés utilisées. La culture de bananes douces (ou « dessert ») sert avant tout à l'exportation. La culture vivrière (ou d'autoconsommation) concerne essentiellement les bananes à cuire et quelques cultivars de bananes douces.

La production mondiale annuelle de bananes est estimée à 72 millions de tonnes. Les bananes douces représentent environ les deux tiers de cette production dont 9 millions de tonnes sont exportés [11]. Ces chiffres indiquent la grande importance à la fois économique et vivrière de ces plantes. La banane représente, en effet, le premier fruit du commerce international pour le tonnage et la valeur commerciale. Les bananes douces et à cuire sont également, dans de nombreux pays tropicaux et subtropicaux, la principale source de glucides pour des centaines de millions d'habitants sur tous les continents.

L'Asie du Sud-Est est le centre d'origine et le principal centre de diversification des bananiers. Ces plantes, de régions tropicales humides, sont des Monocotylédones herbacées appartenant à l'ordre des Scitaminales, à la famille des Musacées, au genre *Musa* L. et à la section *Eumusa* [27]. Parmi toutes les espèces de cette section, *M. acuminata*, seule ou avec *M. balbisiana*, est à l'origine de tous les bananiers cultivés [29]. Les deux espèces au départ sont diploïdes ( $2n = 22$ ), sauvages, seminifères. Leur génome est représenté respectivement par les lettres AA (*acuminata*) et BB (*balbisiana*). En Malaisie, Indonésie et Nouvelle-Guinée seraient apparus les premiers individus diploïdes, parthénocarpiques (AA). A partir de ceux-ci se sont constitués les bananiers cultivés, triploïdes pour la plupart (génomés AAA, AAB, ABB) parthénocarpiques et hautement stériles. Les cultivars triploïdes, actuellement les plus répandus, appartiennent aux sous-groupes Cavendish, bananes douces, cultivars d'exportation (AAA), Plantains (AAB) et Bluggoe (ABB), bananes à cuire.

Actuellement la production bananière est sujette à de très lourdes menaces parasitaires (cercosporioses jaune et noire, maladie de Panama, maladie de Moko, virus du Bunchy top – BBTV –, de la mosaïque du concombre – CMV –, charançons et nématodes...). De toutes ces attaques, la plus redoutable est la cercosporiose noire qui affecte à la fois les bananes douces et les plantains.

En raison du faible nombre de cultivars existants et de leur base génétique restreinte, les bananiers cultivés sont des plantes sensibles aux maladies et surtout à la rapide

extension de nouvelles races d'agents pathogènes. De plus, la monoculture, l'absence de rotation des sols, leur mode de propagation végétative rendent les plantes plus sensibles à la pression parasitaire [7]. Face à ces menaces, les techniques de lutte chimique sont souvent inefficaces, et les traitements inutilisables car trop onéreux ou néfastes pour l'environnement.

Pour éviter la baisse des rendements (aussi bien pour les cultures d'exportation que pour la production vivrière), l'objectif principal des programmes d'amélioration est de pourvoir les cultivars existants de résistances ou de créer et/ou de sélectionner de nouveaux génotypes qui soient résistants ou tolérants aux principales maladies (et en particulier à la cercosporiose noire) [22]. De plus, chez ces cultivars, la parthénocarpie et la stérilité femelle doivent être maintenues ainsi qu'une bonne productivité et une bonne qualité des fruits.

Pour atteindre ces objectifs, les méthodes conventionnelles d'amélioration génétique sont restées sans grand succès jusqu'à présent du fait notamment du haut niveau de stérilité et de la polyploïdisation de ces plantes [22]. Ainsi, après plus de soixante années d'hybridations, il y a eu très peu de nouvelles acquisitions et la plupart des cultivars sont encore naturels, résultant de simple sélection clonale et/ou de mutations [24]. Cependant, d'importants programmes d'amélioration sont actuellement en cours (notamment celui mené par le CIRAD/FLHOR en Guadeloupe) [2, 12].

Afin de résoudre certains problèmes difficilement contournables par les voies d'amélioration classique, l'attention est de plus en plus tournée vers l'insertion, dans les nouveaux programmes de sélection, des techniques de culture *in vitro* et de biotechnologies plus avancées utilisant le génie génétique, toutes les fois qu'elles s'avèrent être efficaces [18, 28].

Un certain nombre de ces techniques ont déjà été mises en œuvre chez les bananiers. Nous nous limiterons volontairement, dans cette présentation, à la régénération de plantes à partir de l'isolement et de la culture des protoplastes. Puis nous envisagerons l'utilisation des protoplastes en vue de l'obtention d'hybrides somatiques par électrofusion et dans le cadre du transfert de gènes par électroporation.

## **L'isolement et la culture des protoplastes**

### **Historique des premiers travaux réalisés sur l'isolement et la culture de protoplastes**

Bakry [1] a été le premier à réussir l'isolement des protoplastes à partir de cals inflorescentiels de AAA (cv. *Grande Naine*). Ensuite Chen et Ku [4], Cronauer et Krikorian [5] ont obtenu des protoplastes qui se sont maintenus en survie durant une quinzaine de jours, mais sans qu'aucune division n'ait été notée. L'année suivante, Chaput [3] a observé des protoplastes plus réactifs en culture qui ont été capables de bourgeonner. Avec la culture en gouttes d'agarose de protoplastes provenant de suspensions cellulaires (*Musa acuminata* ssp. *burmannica* génotype *Long Tavoy* (AA), Da Silva Conceição [6] a constaté les premières divisions (1-3), mais les protoplastes ont tout de même fini par se nécroser au bout d'un mois. Les suspensions cellulaires se sont avérées, par conséquent, être le matériel le plus approprié pour isoler des protoplastes capables de se diviser chez les bananiers, comme d'ailleurs chez d'autres monocotylédones, céréales en particulier [23].

## Matériel utilisé pour la production de protoplastes

Des suspensions cellulaires de quatre génotypes différents dont trois diploïdes (*M. acuminata* ssp. *burmannica* Long Tavoy, ssp. *banksii* et ssp. *malaccensis*) et une triploïde (cv. *Matavia*) ont été employées comme source de protoplastes. Elles sont d'aspects variés (laiteuses ou granuleuses, et dans ce cas, avec nodules de diverses tailles comme chez *Matavia* et la ssp. *malaccensis*) et d'âges différents (ayant de 1 à 6 ans) au moment de leur utilisation comme source de protoplastes.

De plus, les protoplastes ont été isolés durant la phase de croissance active de ces suspensions cellulaires qui est différente selon le génotype utilisé.

## Résultats

### Observations générales sur l'évolution des protoplastes

#### • Rendement, viabilité et variabilité morphologique des protoplastes à l'isolement

Dès les premières minutes d'incubation du matériel dans la solution enzymatique, on peut observer la libération de protoplastes. La quantité de protoplastes obtenue par gramme de suspension cellulaire initiale (masse de matière fraîche) en fin de macération varie selon les génotypes utilisés :

- *M. acuminata* ssp. *burmannica* Long Tavoy = 4 - 5.10<sup>5</sup>/g de masse fraîche.
- *M. acuminata* ssp. *malaccensis* = 1,2 - 4.10<sup>5</sup>/g de masse fraîche.
- Bluggoe cv *Matavia* = 1,1 - 3.10<sup>5</sup>/g de masse fraîche.

Les suspensions granuleuses à nodules (*malaccensis*, *Matavia*) semblent libérer moins de protoplastes que la suspension sans nodules (*Long Tavoy*).

Des échantillons d'au moins 500 protoplastes ont été comptés sous microscope inversé après coloration au FDA [30]. Plus de 90 % des protoplastes isolés sont viables comme le montre leur coloration jaune vert en fluorescence.

La taille et le contenu cytoplasmique des protoplastes varient selon le génotype utilisé et également à l'intérieur d'un même génotype pour une même culture.

Le contenu cytoplasmique des protoplastes de *Long Tavoy* (Pl.IA), de la ssp. *banksii* et de la ssp. *malaccensis* est plus ou moins dense et relativement homogène. Chez le génotype *Matavia* (Pl.IIA), on observe nettement deux types de protoplastes : ceux de taille plus importante, relativement vacuolisés, et chargés de gros grains d'amidon et ceux de plus petite taille, à cytoplasme dense. Le premier type dérive vraisemblablement des cellules de la zone périphérique des gros nodules, riche en réserves amyliques. Le deuxième pourrait avoir pour origine les cellules des massifs à caractères embryogènes de la suspension et des cellules méristématiques des nodules.

#### • Mise au point d'un protocole original pour la culture des protoplastes

Les protoplastes ont été mis en culture à haute densité (5 × 10<sup>5</sup> protoplastes/ml de milieu) sur un milieu avec cellules « nourrices ». La coculture de protoplastes avec des cellules « nourrices » a été souvent utilisée pour activer les divisions. Cette technique, employée pour la première fois par Schneyour *et al* [26] chez des Solanacées (*Nicotiana tabacum* et *Petunia hybrida*) l'a été depuis dans de nombreux autres cas et surtout chez des céréales. Nous l'avons appliquée aux bananiers.

• **Apparition de la paroi et les diverses étapes du développement**

On a pu constater chez des protoplastes venant d'être isolés, la disparition complète de la paroi par l'absence de fluorescence après coloration au calcofluor qui se fixe sur la cellulose. Le suivi microscopique de l'apparition de la paroi, visualisée par la même coloration, nous a permis de constater :

- que pendant les premières 24 heures après leur mise en culture, la synthèse de la paroi des protoplastes se faisait de façon fragmentaire ;
- qu'après 3 jours de culture, 2 % des protoplastes avaient régénéré une paroi complète et commencé à se diviser.

Chez tous les génotypes étudiés, la première division est très discrète. Elle apparaît dès le deuxième jour pour un petit nombre d'entre eux et s'opère de façon non simultanée pour les autres.

Après 3 à 5 jours de culture chez *Long Tavoy*, les premières et deuxièmes divisions se sont produites (Pl.IB et C). On assiste à la formation de microcolonies quelques jours plus tard, puis de microcals au bout de deux semaines (Pl.ID). Après 2 mois de culture, des structures callogènes sont repérables (Pl.IE) [15].

Dans le cas de *Long Tavoy* âgée, pour vérifier si des cals obtenus au-dessus de la couche « nourrice » sont vraiment des cals de bananier *Long Tavoy*, et non le résultat d'une contamination du support par des cellules « nourrices » de *Lolium*, nous avons procédé à des observations morphologiques et cytologiques ainsi qu'à des analyses isoenzymatiques.

Des observations morphologiques et cytologiques montrent, en effet, que les cellules des suspensions cellulaires de *Long Tavoy* sont différentes de celles du *Lolium*. Ainsi, le diamètre moyen des cellules de *Long Tavoy* est plus petit et le cytoplasme est plus dense que celui de cellules de *Lolium*. Les chromosomes de *Lolium* sont aussi plus longs que ceux de *Long Tavoy*. Il résulte de ces observations que les cellules des cals obtenus au-dessus de la couche « nourrice » ont les caractères morphologiques et cytologiques des cellules de la suspension de *Long Tavoy*.

Nous avons mis en évidence deux isozymes : la phosphoglucose mutase (PGM) et l'alcool déshydrogénase (ADH) qui sont capables de distinguer le matériel bananier du matériel *Lolium*. Puisque les zymogrammes des cals, localisés au-dessus du support les séparant de la couche « nourrice » concordent avec celui du matériel de banane, on peut en conclure que ces cals sont bien dérivés des protoplastes des bananes.

Chez le cv. *Matavia*, des massifs paucicellulaires de deux à trois cellules issus de la division de protoplastes sont visibles au bout d'une semaine de culture (Pl.IIB). Au 14<sup>e</sup> jour de culture, des massifs pluricellulaires de tailles variées, peuvent être observés (Pl.IIB et C). Dès le 50<sup>e</sup> jour, des globules apparaissent, déjà épidermisés (Pl.IID). Après deux mois de culture, des structures globulaires embryogènes sont discernables (Pl.IIE). On peut même parfois noter la présence d'un pseudo-suspenseur comme dans les embryons zygotiques. De plus, ces structures globulaires apparaissant cytologiquement conformes à celles des embryons zygotiques classiques de bananiers (Pl.IIF), nous les avons qualifiées d'embryons somatiques. Du fait que tous les protoplastes n'entreprennent pas leur évolution simultanément, on retrouve, dans la culture, diverses étapes de leur développement : massifs cellulaires inorganisés, globules organisés, embryons somatiques bien formés [17].

## Étude de quelques facteurs conditionnant l'évolution quantitative des protoplastes (provenant en particulier de la suspension *Long Tavoy* âgée)

### • Étude comparée de diverses couches « nourrices » [15]

Nous avons comparé (Tableau I) l'effet de 3 suspensions cellulaires, utilisées comme couches « nourrices » (*Lolium multiflorum*, *Triticum monococcum* et *M. acuminata*. *Long Tavoy*) sur des cultures initiales de 0,5 ml de protoplastes de *Long Tavoy*. Cinq répétitions ont été effectuées. Le témoin est constitué par des protoplastes déposés sur du milieu « nourrice » sans cellules « nourrices ». Les supports utilisés ont été soit la double épaisseur de toile à bluter en nylon (mailles 10  $\mu\text{m}$ ), soit une membrane Millipore blanche (mailles 0,22  $\mu\text{m}$ ) et le régulateur de croissance utilisé dans le milieu « nourrice » le 2,4-D (2mg/l).

Après 3 mois de culture, les cals issus de protoplastes ont été pesés et les masses obtenues sont présentées dans le Tableau I. Tout d'abord, certaines colonies cellulaires peuvent se développer parfois chez le témoin, c'est-à-dire en l'absence de cellules « nourrices ». Ainsi la masse moyenne observée après 3 mois de culture est relativement faible (4,8 mg).

L'utilisation d'une couche « nourrice » favorise très nettement le développement des protoplastes de *Long Tavoy* mais cette action est plus ou moins importante selon la « nourrice » utilisée. En particulier celle de *Lolium multiflorum* provoque une augmentation de masse moyenne égale à 163 et à 442 mg. De même la « nourrice » *Long Tavoy* peut entraîner une augmentation importante de la masse qui peut être égale à 367 mg. Avec la nourrice *Triticum monococcum* en revanche, la culture de protoplastes est moins stimulée et la masse des cals obtenus est en moyenne inférieure à celle observée avec les autres « nourrices ». Donc les deux couches « nourrices » les plus efficaces sont : celle de *Lolium* et celle de *Long Tavoy*. Ce sont aussi les « nourrices » qui se divisent le plus activement. On doit cependant constater de fortes variations dans les résultats pour un même type de culture « nourrice » en particulier lorsqu'il s'agit de *Long Tavoy*.

**Tableau I.** Effet de la nature de la « nourrice » et du support sur l'évolution des protoplastes du génotype *Long Tavoy*. Masses des diverses cultures en mg, après 3 mois de culture.

Support Couche « nourrice »	Toile à bluter				Millipore			
	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Triticum monococcum</i>	<i>M. acuminata Long Tavoy</i>	Témoin	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Triticum monococcum</i>	<i>M. acuminata Long Tavoy</i>	Témoin
Répétition								
1	116	142	431	4	346	3	3	4
2	149	90	521	6	455	5	2	10
3	126	114	140	3	405	4	5	3
4	309	8	618	2	533	4	24	3
5	115	121	125	8	471	3	17	4
Moyenne	163 $\pm$ 37,0	95 $\pm$ 23,3	367 $\pm$ 100,2	4,6 $\pm$ 1,1	442 $\pm$ 31,5	3,8 $\pm$ 0,4	10,2 $\pm$ 4,4	4,8 $\pm$ 1,3

• **Effet combiné de la couche « nourrice » et du type de support utilisé [15]**

Comme le montre le Tableau I, les cellules de la « nourrice » de *Lolium* provoquent une prolifération très élevée de cellules de bananiers issues de protoplastes ( $442 \pm 31,5$  mg) avec le Millipore comme support. Il en est de même lorsque la couche « nourrice » est constituée de cellules de *Long Tavoy* et que le support est de la toile à bluter ( $367 \pm 100,2$ ).

Cela indique qu'il y a une réponse spécifique des protoplastes de bananiers (*Long Tavoy*) vis-à-vis à la fois de la couche « nourrice » et de la barrière physique utilisées.

Pour affiner les résultats, on a voulu comparer l'évolution des protoplastes de *Long Tavoy* sur couche « nourrice » *M. acuminata Long Tavoy* avec comme régulateur de croissance le 2,4-D, en fonction de divers supports : toile à bluter, Millipore blanc, disque de cellophane, disque de membrane à dialyse.

Il ressort de cette expérimentation que la toile à bluter et le Millipore blanc constituent les meilleurs supports pour la culture de protoplastes de bananiers.

Des recherches effectuées à KUL (*Catholic University of Leuven*), il ressort que l'évolution des protoplastes est facilitée par une forte densité de protoplastes ( $10^6$  protoplastes/ml), et par l'utilisation d'une couche « nourrice », celle-ci étant séparée des protoplastes par un filtre Millipore noir [21]. Ayant à notre tour vérifié l'efficacité du Millipore noir qui de plus facilite grandement les observations, nous mettrons à présent en culture les protoplastes de bananiers à plus forte densité, sur couche « nourrice » (*Long Tavoy*), et avec comme support le Millipore noir.

• **Effet de la durée du contact des protoplastes avec la couche « nourrice » sur le développement**

Les huit traitements effectués sont présentés dans la Figure 1A. Nous avons utilisé la suspension cellulaire de *Long Tavoy* comme couche « nourrice ». Le régulateur de croissance employé dans le milieu « nourrice » est le 2,4-D, et le support la double épaisseur de toile à bluter. Quatre répétitions ont été réalisées pour chacun des traitements. Le milieu utilisé pour le témoin est identique au milieu « nourrice », à l'exception près qu'il ne contient pas de cellules « nourrices » de bananier.

Le développement des cals a été apprécié par pesées au cours de la culture (à 0, 3, 8, 15, 30 et 60 jours).

Les résultats obtenus (Figure 1B) montrent que la couche « nourrice » est nécessaire surtout en début de culture. Le traitement 8 montre qu'il n'y a pas de développement des protoplastes en cals quand le milieu est dépourvu de cellules « nourrices » lors de la première semaine de culture. On obtient le même résultat quand la couche « nourrice » a été présente seulement de 0 à 15 jours (traitements 7, 1, 2, 3).

Une durée de contact de 30 jours peut devenir favorable à un développement des protoplastes en cals (traitement 4).

Le meilleur résultat a été obtenu après 60 jours de culture sur la couche « nourrice » (traitement 5) et avec des conditions de culture sans changement de milieu.

Dans une expérimentation analogue, effectuée avec des protoplastes de *Matavia*, on a aussi observé que la masse fraîche produite à partir de protoplastes était la plus élevée après 60 jours de culture en continu sur couche « nourrice » (traitement 5).

Par conséquent, la durée de contact des protoplastes avec leur « nourrice », le moment et la durée de son application ont été précisés. Pour être efficace, la « nourrice » doit intervenir dès le début de la culture, et sur une période de 60 jours, en continu, sans changement de milieu.

A/ traitements effectués

Traitement	Jour					
	0	3	8	15	30	60
1	I=====	I*-----	I-----	I-----	I-----	I-----
2	I=====	I=====	I*-----	I-----	I-----	I-----
3	I=====	I=====	I=====	I*-----	I-----	I-----
4	I=====	I=====	I=====	I=====	I*-----	I-----
5	I=====	I=====	I=====	I=====	I=====	I-----
6	I=====	I*=====	I*=====	I*=====	I*=====	I*-----
7	I-----	I-----	I-----	I-----	I-----	I-----
8	I-----	I*=====	I=====	I=====	I=====	I-----

===== = milieu "nourrice" (avec cellules "nourrices" Long Tavoy).

----- = milieu "nourrice" (sans cellules "nourrices")

I = pesée

\* = transfert sur milieu frais

B/ résultats

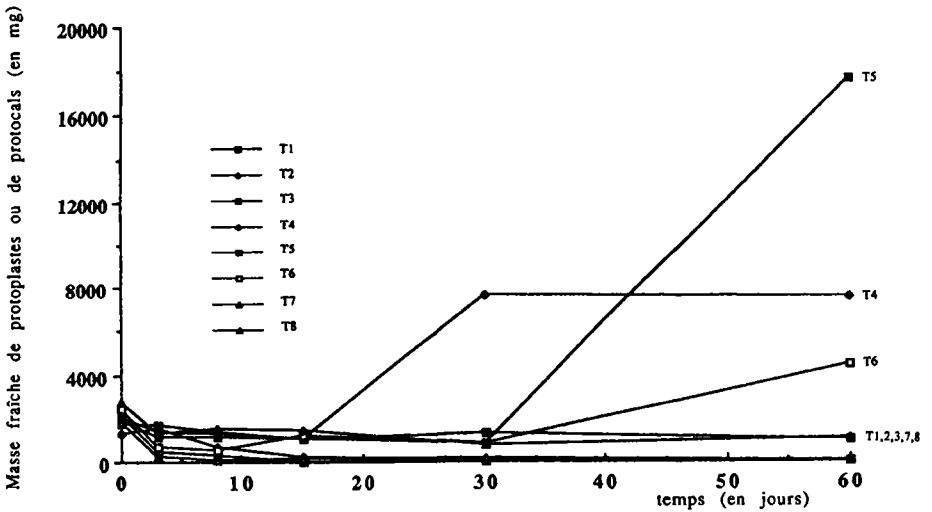


Figure 1. Effet de la durée de contact des protoplastes avec la « nourrice » sur leur développement (génotype *Long Tavoy*). A. Traitements effectués. B. Résultats.



## Recherche des conditions permettant la régénération de plantes

### • A partir des cals issus des protoplastes de Long Tavoy

De nombreuses tentatives de régénération à partir de cals de protoplastes d'une suspension de *Long Tavoy* âgée ont été réalisées. Elles se sont toutes soldées par un échec. Nous pensons que cet insuccès est lié à la perte des capacités morphogènes de cette suspension âgée qui se retrouve aussi dans les protoplastes, puis dans les cals qui en dérivent.

Avec la nouvelle suspension cellulaire embryogène des *Long Tavoy*, des protoplastes ont été obtenus et mis en culture sur couche nourrice. L'expérimentation est en cours.

### • A partir des structures organisées de Matavia

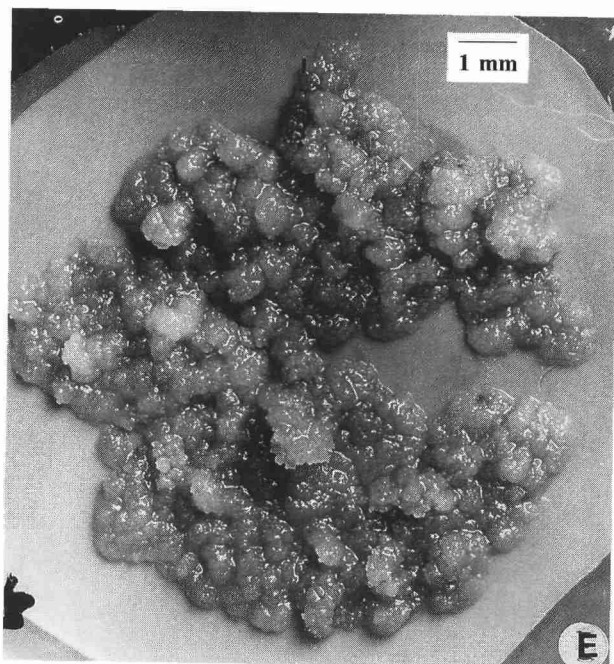
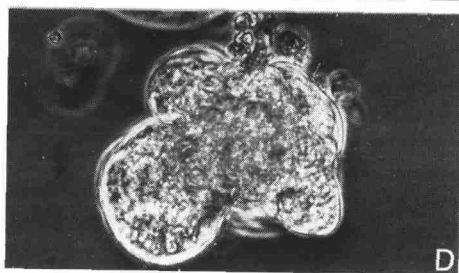
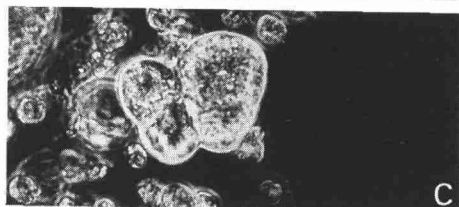
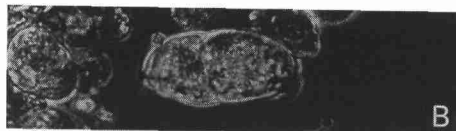
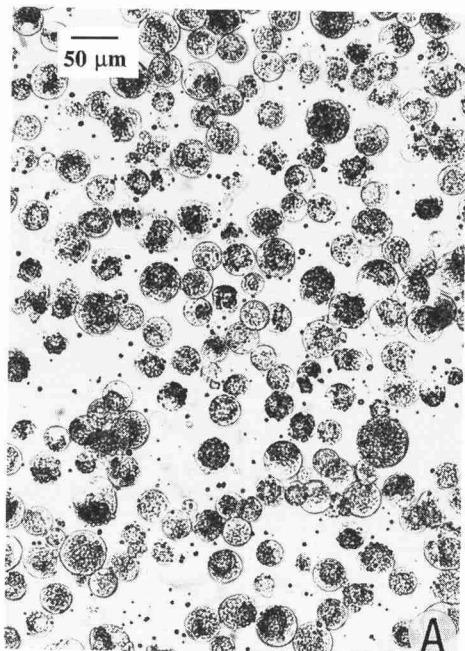
Les structures organisées (structures proembryonnaires et embryonnaires à divers stades) issues de la division de protoplastes du cv. *Matavia*, après 2 à 3 mois de culture sur couche « nourrice », ont été transférées sur des milieux solides, enrichis en BAP pour assurer leur germination. Sur ces milieux on a pu constater que seulement 10 % environ des embryons primaires ont été capables de germer et de se développer en plantes (PI.IIIA) que l'on a pu, sans aucune difficulté, transférer en serre (PI.IIIB). On obtient donc, chez ce cultivar, la régénération de plantes à partir de protoplastes, au travers d'un processus d'embryogenèse directe, ce qui a déjà été observé chez le blé par Li *et al.* [13]. La régénération de plantes par embryogenèse somatique directe à partir de protoplastes a également été réussie chez ce même cultivar à KUL [21].

Les structures embryonnaires primaires restantes, laissées sur milieu enrichi en BAP, ont été le siège d'un phénomène d'embryogenèse secondaire adventive (PI.IIIC, D et E). Cette embryogenèse adventive très intense prend naissance dans les assises superficielles des structures embryonnaires primaires qui se recouvrent alors d'un tissu jaunâtre, plus ou moins friable. Ce phénomène, s'il gêne le développement en plantes des embryons primaires, aboutit par ailleurs à une production considérable de plantes à partir des embryons secondaires (PI.IIIIE). Cette embryogenèse adventive illustre, en tous cas, la totipotence à long terme des cellules de ce type de matériel. Des embryons somatiques adventifs ont été également observés par Dhed'a *et al.* [8], lors de la régénération de plantes à partir de suspensions cellulaires chez ce même cultivar.

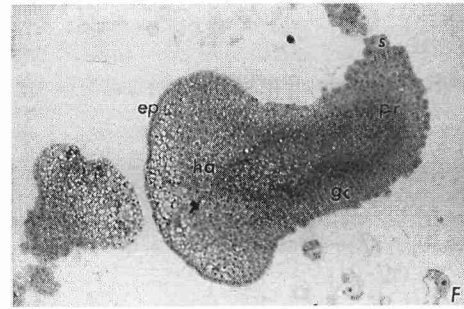
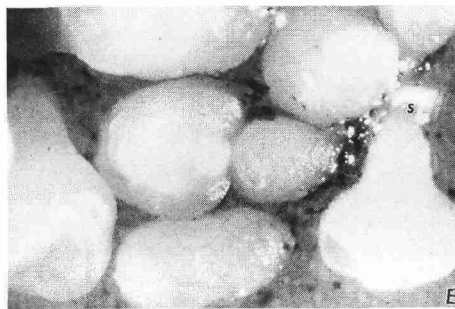
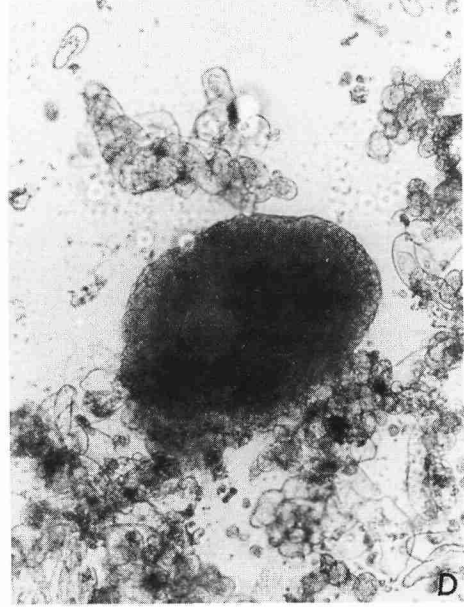
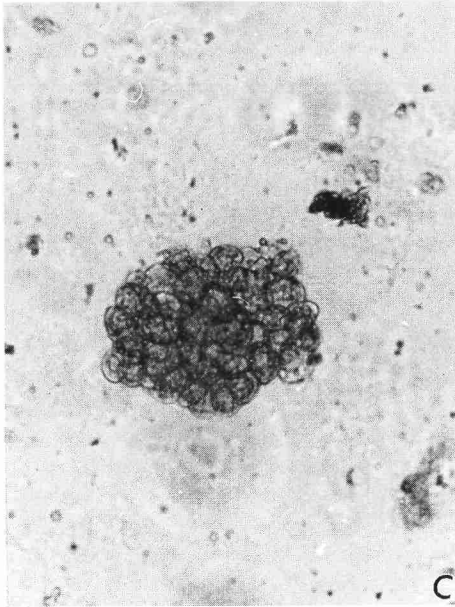
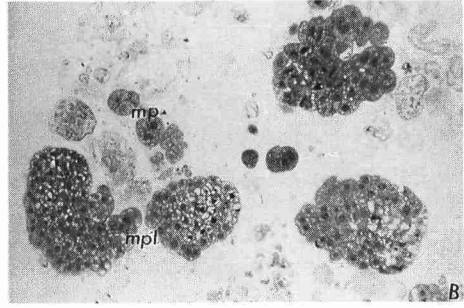
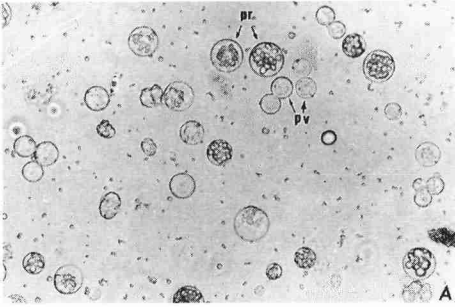
## Travaux en cours et perspectives

Ayant obtenu la régénération des plantes à partir de protoplastes en particulier chez le cv. *Matavia*, un essai est actuellement en cours avec ce cultivar au CIRAD-FLHOR en Guadeloupe. Il vise à établir, dans des conditions agronomiques en champ et sur au moins deux cycles, la conformité morphologique et cytologique des plantes régénérées à partir de protoplastes. Ces plantes seront comparées à d'autres, issues de cultures hautement proliférantes, ayant subi un nombre élevé de repiquages (ces cultures étant le point de départ de la suspension embryogène source des protoplastes), et à des individus témoins provenant de micropropagation.

La régénération est difficile à obtenir chez les Monocotylédones, surtout à partir de cellules isolées et de protoplastes. La maîtrise de ce phénomène et l'obtention de plantes à la fois à partir de suspensions cellulaires embryogènes [8, 9, 10, 14, 16, 19] et

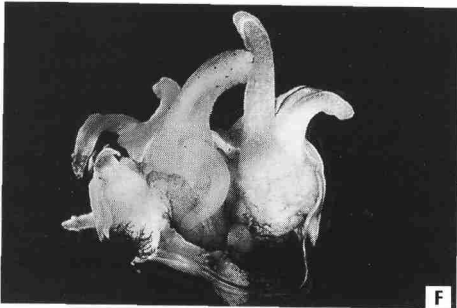
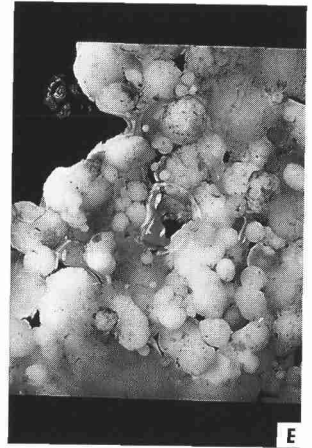
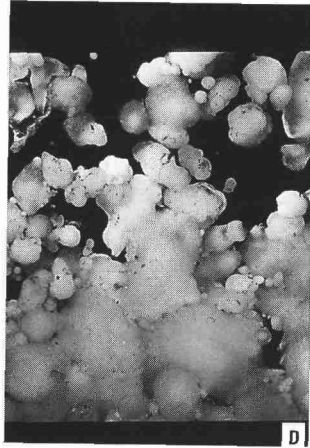
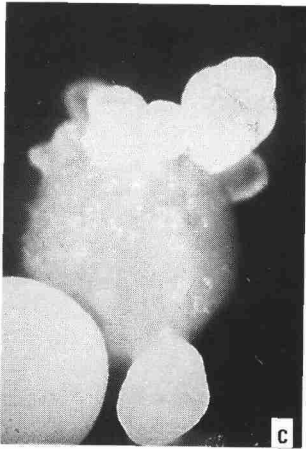
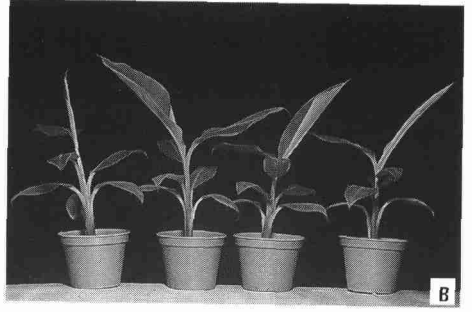
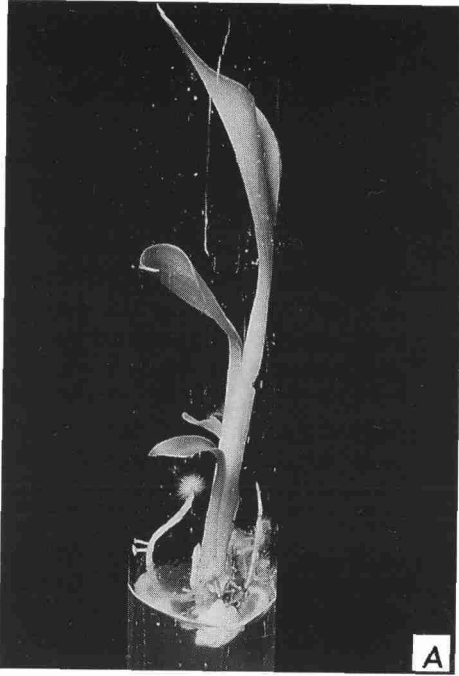


**Planche I.** Les étapes du développement à partir de protoplastes chez le génotype *Long Tavoy*. **A** : Population de protoplastes de *Long Tavoy*. **B et C** : Première et deuxième division des protoplastes après 3 à 5 jours de culture. **D** : Apparition de microcals au bout de deux semaines de culture. **E** : Cals dérivés, au bout de 3 semaines de culture, de protoplastes déposés sur couche « nourrice » *Lolium* et avec comme support une double épaisseur de toile à bluter. n = couche « nourrice » ; t = toile à bluter.



**Planche II.** Les étapes de développement à partir de protoplastes chez le cv. *Matavia*.

**A :** Population de protoplastes de *Matavia* avec présence de deux types de protoplastes : les uns plus gros, relativement vacuolisés et chargés de réserves (pr) et les autres, plus petits, à cytoplasme dense (pv). **B :** Massifs paucicellulaires de 2 à 3 cellules (mp) et massifs pluricellulaires (mpl) provenant du développement de protoplastes. **C :** Amas cellulaire provenant de la division de protoplastes au 14<sup>e</sup> jour de culture. **D :** Globule épidermisé après 50 jours de culture. **E :** Embryons somatiques avec suspenseur au bout de 3 mois de culture. s = suspenseur. **F :** Section longitudinale d'un embryon. ép : épiderme ; ha : haustorium ; gc : gaine cotylédonnaire ; pr : pôle racinaire ; s : suspenseur.



**Planche III.** Obtention de plantes chez le cv. *Matavia*.

**A et B :** obtention de plantes *in vitro* (A) à partir de la germination des embryons primaires puis passage de ces plantes en serre (B). **C, D et E :** A partir de structures embryonnaires primaires formation de nombreux embryons secondaires, de différentes tailles. **F :** Développement en plantes de ces structures secondaires.

de protoplastes [17, 21] a permis de lever chez les bananiers le principal goulot d'étranglement pour la mise en œuvre des biotechnologies.

Aussi avons-nous entrepris des expériences de transfert de gènes qui conduisent à des modifications plus ponctuelles (transformation) ou plus importantes du génome (fusion somatique).

Concernant ce dernier secteur, des essais d'abord réalisés en autofusion ont permis d'adapter l'appareil d'électrofusion aux protoplastes de bananiers.

Des essais d'hétérofusions, avec les autofusions correspondantes des deux parents, ont ensuite été réalisés en utilisant les protoplastes des suspensions cellulaires en notre possession (*M. acuminata* ssp. *burmannica* Long Tavoy, ssp. *banksii* et ssp. *malaccensis* et le cultivar *Matavia*). Ainsi des hétérofusions ( $2x + 2x$ ) et ( $2x + 3x$ ) ont été effectuées. Des pseudo-cals, avec des structures organisées, et des structures organisées plus isolées, ont été obtenus. L'analyse histologique de ces diverses formations est en cours de réalisation. L'évolution morphologique de ces diverses formations va être poursuivie.

Des études ont été déjà entreprises au niveau des suspensions cellulaires et des protoplastes issus de celles-ci, afin de trouver des isozymes qui permettent de les distinguer et qui pourront être utilisés, dans un premier temps, pour séparer les produits de fusion.

Les recherches sur la sélection au niveau diploïde et sur l'haplogénèse ayant bien progressé au CIRAD-FLHOR en Guadeloupe, il sera bientôt possible de disposer de matériels haploïde et diploïde intéressants, avec lesquels on pourra réaliser des fusions d'intérêt agronomique. Cela devrait aboutir à l'obtention de nouveaux génotypes de bananes douces (AAA) et de bananes à cuire (AAB) possédant des résistances en particulier.

Dans l'optique de la transformation chez les bananiers, on peut pratiquer l'électroporation de protoplastes. L'équipe du laboratoire de *Tropical Crop Husbandry* à Louvain a déjà utilisé cette technique chez le Bluggoe et a obtenu une expression transitoire du gène Gus variant entre  $10^{-4}$  et  $5/10^{-5}$  [25]. Ces résultats sont bien inférieurs à ceux notés par cette équipe dans le même temps avec la biolistique (canon à particules à hélium) sur des suspensions cellulaires. Cependant, l'origine unicellulaire des plantes régénérées après électroporation évite l'apparition de chimères. Ces techniques auxquelles on peut ajouter l'ultrasonisation sont actuellement en plein développement [20]. Nous allons nous intéresser à l'électroporation en coopération avec le laboratoire de KUL et continuons à progresser en biolistique [16] avec le nouveau canon à hélium construit au laboratoire et devenu maintenant opérationnel. Actuellement, nous essayons de mettre au point une technique efficace permettant de sélectionner de façon vitale les cellules transformées, en utilisant des gènes de sélection (NPTII et bar...). Il conviendra ensuite de vérifier la stabilité de la transformation et d'obtenir la régénération des plantes à partir des cellules transformées. Une fois ces divers points réalisés avec succès, on sera alors en mesure d'intégrer chez les bananiers des gènes agronomiquement intéressants, lorsque ceux-ci seront disponibles.

Ainsi, grâce, en particulier, à la coopération fructueuse de diverses équipes associées au sein des programmes STD2 et STD3 et à la volonté commune de mettre en œuvre de nouvelles techniques, de grands progrès ont pu être réalisés chez les bananiers. On peut à présent envisager une insertion rapide de biotechnologies dans les programmes de sélection plus classique pour contribuer à une amélioration rapide et efficace des bananiers.

## Références

1. Bakry F (1984). Choix du matériel à utiliser pour l'isolement de protoplastes de bananier (*Musa* sp.). *Fruits* 39 (7-8) : 449-452.
2. Bakry F, Escalant JV, Haïcour R, Horry JP, Leblanc L, Megia R, Rossignol L (1992). Applications of biotechnologies to banana breeding : haplomehtods, regeneration of protoplasts and transformation. In : *INIBAP Workshop-Biotechnology for banana and plantain*, San José, Costa Rica, January 1992 : 27-31.
3. Chaput MH (1987). Isolement et culture de protoplastes chez divers génotypes de bananier (*Musa* sp.) DEA de Génétique et Sélection Animale et Végétale. Université de Paris-Sud, 13 p.
4. Chen WH, Ku ZC (1985). Isolation of mesophyll cells and protoplasts, protoplast fusion and culture in banana. *J Agric Assoc China* 129 : 56-57.
5. Cronauer SS, Krikorian AD (1986). Banana (*Musa* spp.), In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. I, Trees Berlin Heidelberg, Springer-Verlag : 233-252.
6. Da Silva Conceição A (1989). Isolement et culture de protoplastes de bananiers (*Musa* sp.) : étude de divers facteurs. DEA Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 12 p.
7. Delvaux B, Perrier X, Guyot PH (1990). Diagnostic de la fertilité de systèmes culturaux intensifs en bananeraies à la Martinique. *Fruits* 45 (3) : 223-236.
8. Dhed'a D, Dumortier F, Panis B, Vuylsteke D, De Langhe E (1991). Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. « Bluggoe » (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46 : 125-135.
9. Escalant JV, Teisson C (1988). Embryogenèse somatique chez *Musa* sp. *CR Acad Sci Paris*, 306, Série III : 277-281.
10. Escalant JV, Teisson C (1989). Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Rep* 7 : 665-668.
11. Ganry J (1992). Le projet CEE-STD : motivations, réalisation et perspectives. In : Wills B, ed. Symposium International sur l'Amélioration Génétique des Bananiers pour la Résistance aux maladies et Ravageurs. CIRAD 7-9 septembre, Montpellier, France 1992 (sous presse).
12. Horry JP, Bakry F, Ganry J (1992). Création variétale par hybridation au niveau diploïde. In : Wills B, ed. Symposium International sur l'Amélioration Génétique des Bananiers pour la Résistance aux Maladies et Ravageurs. Montpellier, France 7-9 septembre 1992 (sous presse).
13. Li Zy, Xia GM, Chen HM (1992). Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic cell suspensions of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 28 : 79-85.
14. Marroquin CG, Paduscheck C, Escalant JV, Teisson C (1993). Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* and *Musa acuminata* ssp *malaccensis*. *In Vitro Cell Dev Biol* 29 : 43-46.
15. Megia R, Haïcour R, Rossignol L, Sihachakr D (1992). Callus formation from cultured protoplasts of banana (*Musa* sp.). *Plant Sci* 85 : 91-98.
16. Megia R (1993). Obtention de suspensions cellulaires embryogènes, maîtrise du développement à partir de protoplastes et premiers essais de transformation chez les bananiers. Thèse Doctorat en Sciences, Université Paris-Sud, Orsay, 206 p.
17. Megia R, Haïcour R, Tizroutine S, Bui Trang V, Rossignol L, Sihachakr D, Schwendiman J (1993). Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa* spp., ABB group). *Plant Cell Rep* 13 : 41-44.
18. Murfett J, Clarke A (1987). Producing disease-resistant *Musa* cultivars by genetic engineering. In : Persley GJ, De Langhe EA, eds. Banana and plantain breeding strategies. *ACIAR Proceeding* 21 : 87-94.
19. Novak FJ, Afza R, Van Duren M, Perea-Dallos M, Conger BV, Tang XL (1989). Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Biotechnology* 7 : 154-159.

20. Panis B, Swennen R (1992). Cell suspension in *Musa* : applications and prospects. In : Wills B, ed. International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests. CIRAD 7-9 septembre 1992. Montpellier, France (sous presse).
21. Panis B, Wauwe AV, Swennen R (1993). Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* ssp.). *Plant Cell Rep* 12 : 403-407.
22. Persley GJ, De Langhe EA (1987). Banana and plantain breeding strategies. *ACIAR Proceedings* 21 : 187 p.
23. Rhodes CA, Lowe KS, Ruby KL (1988). Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. *Biotechnology* 6 : 56-60.
24. Rowe PR (1984). Breeding bananas and plantains. In : Janick I, ed. *Plant Breed Rev* 7 : 135-155.
25. Sagi L, Remy S, Panis B, De Smet K, Cammue B, Volckaert G, Swennen R (1992). Transient gene expression in banana protoplasts and cells. Poster Session. In : Wills B, ed. International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests. CIRAD septembre 7-9, 1992. Montpellier, France (sous presse).
26. Schneyour Y, Zelcer A, Izhar S, Beckmann JS (1984). A simple feeder-layer technique for the plating of plant cells and protoplasts at low density. *Plant Sci Lett* 33 : 293-302.
27. Simmonds NW (1966). *Bananas*. Longman Ed., 2<sup>e</sup> Edition. Londres, 512 p.
28. Stover RH, Buddenhagen IW (1986). Banana breeding : polyploidy, disease resistance and productivity. *Fruits* 41 (3) : 175-191.
29. Stover RH, Simmonds NW (1987). *Bananas*. Third edition. Longman Scientific and technical. Essex, England, 468 p.
30. Widholm JM (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology*, 47 (4) : 189-194.





# 24

## Régénération *in vitro* et acclimatation du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.)

M. BELAIZI, M.R. BOLEN, P. BOXUS

Centre de Recherches Agronomiques, Station des Cultures Fruitières et Maraîchères,  
234, chaussée de Charleroi, 5030 Gembloux, Belgique.

### Résumé

La micropropagation du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) a été réalisée à partir de nœuds prélevés sur des plantules issues de germination. La mise en culture et la prolifération de ce matériel juvénile n'ont pas posé de problèmes.

Le milieu de multiplication constitué des macroéléments et des microéléments de Quoirin et Lepoivre [5], de  $\text{FeNa}_2\text{EDTA}$  et des vitamines de Walkey [8] a permis d'obtenir un taux de multiplication de l'ordre 2 à 4,5 en présence de BAP 0,5 mg/l,  $\text{GA}_3$  0,1 mg/l et IBA 0,1 mg/l.

L'emploi d'antigibbérelline, comme l'ancymidol, dans le milieu de multiplication a donné lieu à d'abondantes régénérations du type agglomérats de méristèmes. La miniaturisation des explants de caroubier a aussi été obtenue avec le paclobutrazol.

L'enracinement s'est situé entre 60 % et 95 %. La qualité des racines et le pourcentage d'enracinement ont été améliorés par un traitement à l'obscurité et en présence de vermiculite dans le milieu de développement racinaire.

L'acclimatation des plantules n'a pas posé trop de problèmes. Les plantes sont transférées sur un substrat composé de terreau et de vermiculite, maintenues à l'étouffée dans une atmosphère saturée en eau, puis acclimatées progressivement à l'atmosphère ambiante.

Le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) est un arbre cultivé dans les régions méditerranéennes pour son fruit. Le produit principal extrait de la gousse est la gomme de caroube.

Les premières tentatives de multiplication *in vitro* ont été réalisées par Martins-Loucao et Rodriguez-Barrueco [3], qui n'ont observé qu'une formation de cal. Les premiers succès ont été obtenus par Sebastian et McComb [6], et par Vinterhalter *et al.* [7].

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un programme de sélection clonale qui vise à produire rapidement de grandes quantités d'arbres sélectionnés, adaptés aux conditions marginales de sol, de climat, et de relief des régions méditerranéennes.

## Matériel et méthodes

Les explants sont prélevés sur des semis en serre. La désinfection est faite à l'hypochlorite de calcium 7 % pendant 30 minutes, suivie de 3 à 4 rinçages à l'eau distillée stérile.

Le milieu nutritif de base contient les sels minéraux de Quoirin et Lepoivre [5], le  $\text{FeNa}_3\text{EDTA}$ , les vitamines de Walkey [8], les substances de croissance (BAP 0 à 1,5 mg/l,  $\text{GA}_3$  0 à 0,5 mg/l, IBA 0 à 2 mg/l), le saccharose à 30 g/l, le milieu est gélifié par de l'agar (Pasteur) à 5 g/l, le pH est ajusté à 5,7 avant l'autoclavage.

Les explants sont soumis à une photopériode de 16 heures par jour et à une température de  $23 \pm 1^\circ \text{C}$ . L'éclairage est assuré par des tubes fluorescents Philips Daylight de  $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## Résultats

Les travaux de micropropagation du caroubier sont développés au laboratoire depuis septembre 1991.

Pour la mise en culture *in vitro* des explants, les substances hormonales BAP (0,5 ou 1 mg/l), IBA (0 ou 0,1 mg/l),  $\text{GA}_3$  (0 ou 0,1 mg/l) sont ajoutées au milieu nutritif. Quelques oxydations dues à la libération de composés phénoliques peuvent apparaître dans le milieu de culture. Pour éliminer ces oxydations, les explants sont immédiatement transférés sur un nouveau milieu frais. Un bon débourrement et une élévation des pousses sont observés sur les milieux qui contiennent la  $\text{GA}_3$ . Après 4 semaines de culture, le débourrement est de l'ordre de 80 %. Les explants allongés sont sevrés et transférés sur milieu de multiplication.

Les essais préliminaires ont permis de tester plusieurs milieux de multiplication, qui diffèrent par la concentration des substances de croissance (BAP 0 à 1,5 mg/l, IBA 0 à 0,1 mg/l,  $\text{GA}_3$  0 à 0,25 mg/l). Les coefficients de multiplication obtenus varient de 2 à 5 (Tableau I). Les concentrations en BAP supérieures à 0,5 mg/l provoquent une forte callogenèse et une vitrification de l'explant, aussi ont-elles été supprimées (Tableau II, Figure 1).

L'emploi d'antigibbérelline comme l'ancymidol ou le paclobutrazol a été testé en phase de multiplication (l'ancymidol 0,1 à 1 mg/l, le paclobutrazol 1 mg/l). Ces substances donnent d'abondantes régénérations du type agglomérats de méristèmes, et entraînent une miniaturisation des bourgeons. En présence de BAP 0,5 mg/l, les taux de multiplication sont très élevés, de 11 à 16 (Figure 2). Il est possible de maintenir les explants miniaturisés sur le même milieu nutritif pendant plusieurs mois. Une partie de

**Tableau I.** Multiplication du caroubier : influence des substances de croissance. Les résultats expriment les taux de multiplication après 4 à 5 semaines de culture.

MB + BAP + GA3 + IBA (mg/l)	Subcult. 1	Subcult. 2	Subcult. 3	Subcult. 4
0,50 + 0,10 + 0,00	1,0	2,0	3,8	3,2
0,50 + 0,25 + 0,00	1,3	1,7	2,7	3,7
0,50 + 0,10 + 0,10	1,1	1,4	2,8	4,5
0,50 + 0,25 + 0,10	1,4	1,4	3,6	3,5
1,00 + 0,10 + 0,00	1,8	4,4	5,1	3,8
1,00 + 0,25 + 0,00	1,0	2,7	3,5	2,1
1,00 + 0,10 + 0,10	1,3	6,7	6,0	3,0
1,00 + 0,25 + 0,10	1,2	4,9	5,0	3,0
1,50 + 0,10 + 0,00	1,5	6,2	3,9	4,0
1,50 + 0,25 + 0,00	1,6	6,2	4,6	3,4
1,50 + 0,10 + 0,10	1,2	5,1	3,3	3,7
1,50 + 0,25 + 0,10	1,4	4,7	2,7	3,8

**Tableau II.** Comparaison de 2 milieux de multiplication en fonction des récipients de culture après 8 subcultures consécutives. Les résultats expriment les taux de multiplication après 4 à 5 semaines de culture.

Subculture	M 1 (tube)	M 1 (bocal)	M 3 (tube)	M 3 (bocal)
1	3,9	3,6	3,2	2,1
2	2,9	2,9	2,9	2,7
3	3,6	2,5	3,3	2,7
4	2,9	5,4	3,7	4,2
5	2,2	3,2	2,5	3,7
6	3,8	3,7	3,6	3,3
7	2,7	2,9	2,9	2,9
8	3,7	2,6	2,5	3,1

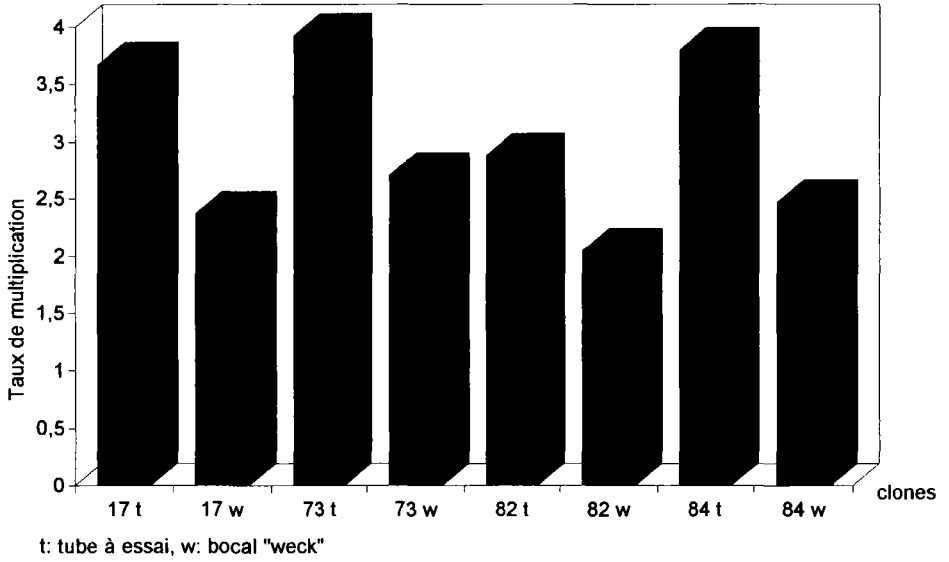
M 1 = MB + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA3

M 3 = MB + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA3 + 0,1 mg/l IBA.

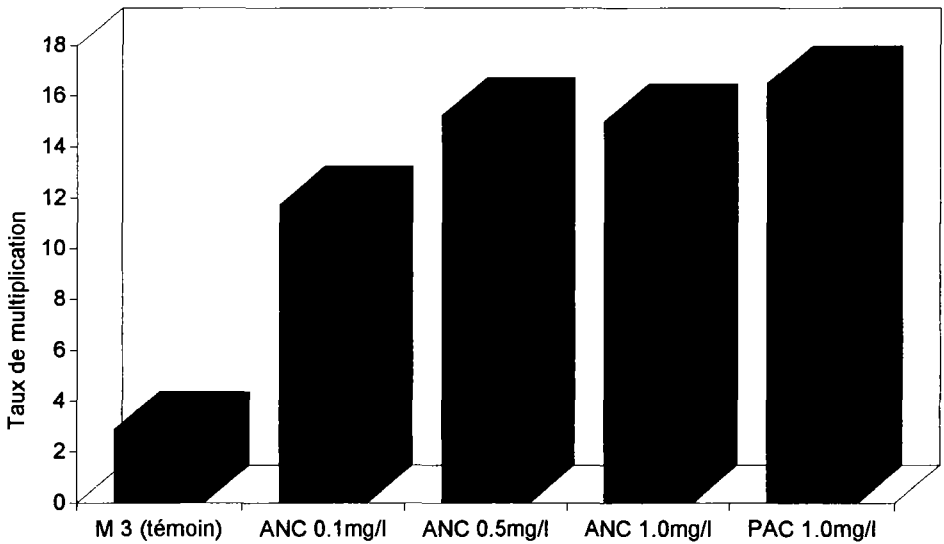
ces explants miniaturisés a été repiquée sur un milieu d'élongation. avant son enracinement.

Le milieu d'enracinement de base contient les sels minéraux de Quoirin et Lepoivre [5], le FeNa<sub>2</sub>EDTA, les vitamines de Walkey [8], le saccharose 20 g/l, l'agar 5 g/l, et le pH est ajusté à 5,7.

L'enracinement du caroubier a tout d'abord été réalisé à la lumière. Les pousses ont été transférées sur le milieu d'enracinement en présence de 2 mg/l IBA, et pendant 5 semaines de culture. Pour cette première tentative d'enracinement, nous avons séparé



**Figure 1.** Influence des différents clones de caroubier sur le milieu de multiplication. (MB + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA3 + 0,1 mg/l IBA).



**Figure 2.** Effet de l'ancymidol ou du paclobutrazol en présence de 0,5 mg/l BAP pendant la phase de multiplication du caroubier.

les explants selon leur milieu de multiplication, le pourcentage d'enracinement est de 62 % à 72 % (Tableau III).

Pour améliorer le pourcentage d'enracinement et la qualité des racines, le milieu d'enracinement a été modifié :

- les macroéléments de Quoirin et Lepoivre [5] sont dilués de moitié et dépourvus de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,
- et l'enracinement peut se dérouler en deux phases :
  - induction en présence IBA (1 ou 2 mg/l) et à l'obscurité (7 ou 14 jours),
  - développement des racines sur un milieu sans auxine et à la lumière.

Le milieu de développement racinaire est constitué soit de :

- milieu gélosé par de l'agar,
- milieu gélosé (agar) ajouté à la vermiculite,
- milieu liquide dans lequel est ajoutée la vermiculite.

Les meilleurs résultats d'enracinement ont été obtenus sur le milieu de développement contenant la vermiculite avec milieu gélosé : 95 % de pousses enracinées après 5 semaines de culture (Tableau IV).

Les microplantes sont transférées *ex vitro* pour l'acclimatation, sur un substrat composé de terreau et de vermiculite, et maintenues à l'étouffée dans une atmosphère saturée en eau. Elles sont progressivement acclimatées à l'atmosphère ambiante. Nous avons obtenu 85 % de plantes acclimatées après 6 semaines.

**Tableau III.** Influence du milieu de multiplication sur l'enracinement du caroubier. Indication en présence de 2 mg/l IBA et à la lumière. Les résultats sont relevés après 5 semaines de culture.

MB + BAP + GA3 + IBA (mg/l)	Nombre d'explants testés	Nombre de pousses enracinées	Enracinement %
0,50 + 0,10 + 0,00	50	31	62
0,50 + 0,25 + 0,00	25	16	64
0,50 + 0,10 + 0,10	57	41	72

**Tableau IV.** Enracinement du caroubier. Influence de l'induction et du milieu de développement. Les résultats sont relevés après 5 semaines de culture.

Obscurité IBA (mg/l)	7 jours	7 jours	14 jours	14 jours
	1	2	1	2
M. gélosé	40 %	15 %	40 %	0 %
M. liquide + V	80 %	80 %	80 %	86,7 %
M. gélosé + V	85 %	85 %	90 %	95 %

M: milieu.  
V: vermiculite.

## Conclusion

La mise en culture et la multiplication du caroubier n'a pas posé trop de problèmes. Les taux de multiplication se situent entre 2 et 5 après 4 semaines de culture. Les concentrations en BAP supérieures à 1 mg/l n'augmentent pas le nombre de pousses axillaires, mais à l'inverse, elles entraînent la formation de cal et l'apparition de la vitrification.

L'utilisation de l'ancymidol ou du paclobutrazol a donné les meilleurs taux de multiplication. C'est une voie très intéressante pour obtenir rapidement un nombre très élevé d'arbres sélectionnés. Ces deux substances ont été utilisées avec succès par Ziv [9] sur *Gladiolus* et *Nerine*. Dans notre laboratoire, les agglomérats méristématiques sont induits chez l'*Eucalyptus* par Osson et Boxus [4] même en absence de cytokinines et d'antigibbérellines. De telles structures méristématiques ont aussi été obtenues sur *Pinus radiata* par Aitken-Christie *et al.* [1] sans antigibbérelline mais en présence de BAP.

Quant à l'enracinement du caroubier, il se situe entre 62 % et 95 % selon les conditions de milieu et de culture. Sebastian et McComb [6] ont montré l'importance du milieu de multiplication sur l'enracinement. Ils ont obtenu 92 % de pousses enracinées si le milieu de prolifération ne contenait que la zéatine ; à l'inverse, en présence de 1 mg/l GA<sub>3</sub> dans le milieu de multiplication, le taux d'enracinement chutait à 33 %. Sur le milieu d'enracinement aéré, gélose et vermiculite, proposé par Jay-Allemand *et al.* [2], nous obtenons jusqu'à 95 % d'enracinement.

A l'avenir, nous chercherons à optimiser les techniques de propagation par bourgeonnement axillaire ou agglomérats méristématiques, et à bien maîtriser l'acclimatation de matériel issu d'arbres sélectionnés adultes.

## Références

1. Aitken-Christie J, Singh AP, Davies H (1988). Multiplication of meristematic tissue : a new tissue culture system for radiata pine. In : Hanover JW, Keathley DE, eds. *Genetic manipulation of woody plants*. Basic Life Science 44, Plenum, New York : 413-432.
2. Jay-Allemand C, Capelli P, Cornu D (1992). Root development of *in vitro* hybrid walnut microcuttings in a vermiculite-containing gelrite medium. *Scientia Horticulturae* 51 : 335-342.
3. Martins-Loução MA, Rodriguez-Barrueco C (1981). Establishment of proliferation callus from roots, cotyledons and hypocotyls of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seedlings. *Z Pflanzenphysiol* 103 : 297-303.
4. Osson A, Boxus P (1992). Des agglomérats de dômes méristématiques, une nouvelle alternative dans la multiplication clonale d'*Eucalyptus camaldulensis*. In : *Production de variétés génétiquement améliorées d'espèces forestières à croissance rapide*, AFOCEL-IUFRO, Bordeaux, 14-18 septembre : 203-211.
5. Quoirin M, Lepoivre P (1977). Étude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulturae* 78 : 437-442.
6. Sebastian KT, McComb JA (1986). A micropropagation system for carob. *Scientia Horticulturae*, 28 : 127-131.
7. Vinterhalter D, Grubisic D, Bojovic-Cvetic D, Budimir S (1992). Lenticel hypertrophy in shoot cultures of *Ceratonia siliqua* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 31 : 111-114.
8. Walkey DG (1972). Production of apple plantlets from axillary bud meristems. *Can J Plant Sci* 52 : 1085-1087.
9. Ziv M (1990). Morphogenesis of *Gladiolus* buds in bioreactors – Implication for scaled-up propagation of geophytes. In : VII International Congress on Plant Tissue and Cell culture, Amsterdam, June 24-29 : 119-124.

## 25

### Étude de l'expression transitoire des gènes marqueurs CAT et GUS dans les protoplastes de tournesol

HÉLÈNE LAPARRA, GÜNTHER HAHNE

*Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Louis Pasteur, 12, rue du Général-Zimmer, 67084 Strasbourg, France.*

Le tournesol, *Helianthus annuus* L., appartient à la famille des Composées. Peu de travaux ont porté sur le transfert direct de gènes dans les protoplastes de cette espèce. Jusqu'à présent, seuls Moyne *et al.* [8] et Kirches *et al.* [4] ont étudié le transfert direct de gènes dans les protoplastes de tournesol, les premiers en obtenant une transformation stable, les seconds en étudiant l'expression transitoire.

L'expression transitoire de gènes est mise en évidence par la mesure de l'activité de la protéine codée par un ADN étranger, suite à son transfert dans les cellules cibles (cet ADN reste extra-chromosomique et son expression est de nature transitoire). Cette technique peut être utile pour un certain nombre d'études. C'est une méthode rapide : les résultats peuvent être obtenus seulement quelques heures après la transfection des protoplastes. Elle permet d'optimiser les conditions de transfert de gènes, d'étudier le contrôle de la régulation génique par des paramètres physiques, d'identifier les séquences régulatrices des gènes.

Nous avons appliqué cette méthode aux protoplastes d'hypocotyle de tournesol. Dans nos conditions, ils sont aisés à isoler, avec des rendements élevés (5-6.10<sup>6</sup> protoplastes/g d'hypocotyle frais). Leur taux de viabilité est important. Ce système permet donc au sein d'une même expérience de travailler sur un grand nombre d'individus.

Afin de mettre au point un système d'expression transitoire dans les protoplastes d'hypocotyle de tournesol, nous avons testé en parallèle trois méthodes de transfert direct de gènes, en vue de choisir et d'optimiser celle qui donnait les meilleurs résul-

tats. Les méthodes utilisées sont : l'électroporation, l'utilisation du polyéthylène glycol (PEG) ou du dioctadécylglycylspermine (DOGS).

Les deux premières méthodes, couramment utilisées sur les protoplastes, sont efficaces sur de nombreuses espèces végétales aussi bien en expression transitoire qu'en transformation stable. En revanche, la troisième méthode n'a jamais été testée sur des protoplastes d'origine végétale. Elle repose sur l'utilisation d'une polyamine et a été initialement mise au point sur des systèmes animaux.

L'intensité de l'expression transitoire est analysée à l'aide de deux gènes rapporteurs codant pour la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) et pour la  $\beta$ -D-glucuronidase (GUS). Pour chaque technique, 4 essais indépendants sont réalisés.

## Matériels et méthodes

### Isolement et culture des protoplastes

Les protoplastes sont isolés à partir d'hypocotyles, provenant de plantules cultivées en conditions axéniques pendant 7 jours [2].

Les protoplastes transformés et les témoins non-transformés sont cultivés en milieu liquide [5] à une densité finale de  $5 \cdot 10^4$  / ml.

### Vecteur de transformation

Le plasmide pCG35S de 8,3 kb [6] contient les gènes *kan*, *uidA* et *cat* sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV. Ces gènes codent respectivement pour les protéines NPTII (néomycine phosphotransférase II), GUS ( $\beta$ -D-glucuronidase) et CAT (chloramphénicol acétyltransférase).

### Techniques de transformation

#### • *Électroporation*

Les protoplastes sont incubés pendant 30 minutes à 4° C dans une solution composée de mannitol (0,6 M) et de CaCl<sub>2</sub> (0,1 mM). L'électroporation est ensuite effectuée avec 10<sup>6</sup> protoplastes/ml, 40  $\mu$ g d'ADN plasmidique et 80  $\mu$ g d'ADN entraîneur à l'aide d'un électroporateur Gene Pulser de Biorad. La distance entre les électrodes des cuvettes d'électroporation est de 4 mm. Différentes conditions de voltage (de 0 à 1400 volts (V)/cm) sont testées. Les impulsions sont données par une décharge de la capacité à 125  $\mu$ F.

#### • *Polyéthylène glycol (PEG)*

Le protocole suivi est celui de Lepetit *et al.* [6], à l'exception de la première étape, dans laquelle les protoplastes sont placés pendant 30 minutes à 4° C dans une solution de KCl (100 mM), CaCl<sub>2</sub> (125 mM), MES (0,7 g/l) à pH 5,7.

#### • *Dioctadécylglycylspermine (DOGS)*

C'est une polyamine de synthèse constituée de deux molécules d'acide stéarique liées à une molécule de spermine *via* une molécule de glycine [1]. Elle nous a été aimablement fournie par Dr Behr (Laboratoire de Chimie Génétique, CNRS URA 1386, Facul-



té de Pharmacie de Strasbourg). En solution aqueuse, le DOGS forme spontanément des liposomes cationiques. Après le mélange avec une solution diluée d'ADN plasmidique, le DOGS se complexe avec l'ADN. Dans le cas de la transformation des cellules animales, on pense que les complexes ADN-DOGS pénètrent dans la cellule par endocytose [7].

Le protocole de transformation est extrêmement simple (mélange des solutions de complexes ADN-DOGS et de protoplastes suivi d'une incubation). Nous en avons étudié les paramètres clés.

### Dosage des activités GUS et CAT

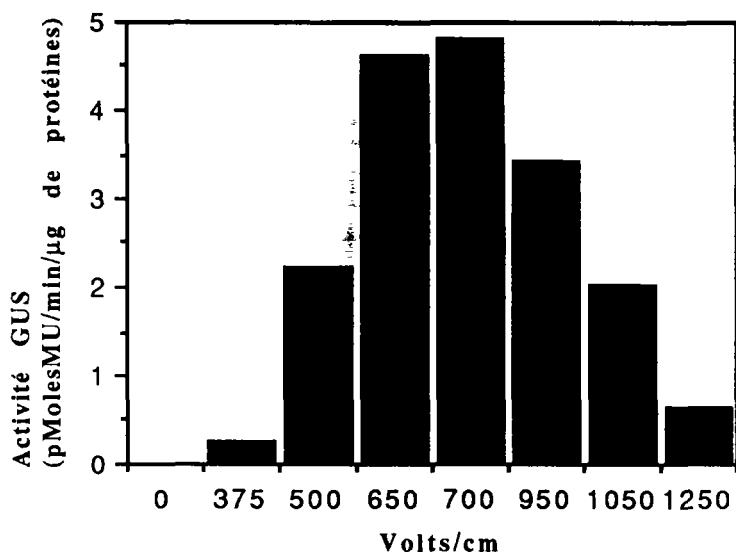
L'activité GUS est dosée par fluorimétrie selon le protocole décrit par Jefferson [3]. Les résultats sont exprimés en pmoles de Méthyl Umbelliférone (MU)/min/ $\mu$ g de protéines extraites des protoplastes.

L'activité CAT est mesurée selon le protocole de Lepetit *et al.* [6]. Les résultats sont exprimés en cpm/heure (h)/ $\mu$ g de protéines extraites des protoplastes.

## Résultats

### Électroporation

L'activité de la GUS a été détectée à partir d'un voltage de 375 V/cm (seuil de perméabilisation de la membrane des protoplastes). Elle était maximale à 700 V/cm et diminuait aux voltages supérieurs à cause de la mort des protoplastes (Figure 1).



**Figure 1.** Résultats de l'électroporation exprimés par l'activité de la GUS ( $10^6$  protoplastes, 40  $\mu$ g d'ADN plasmidique, 80  $\mu$ g d'ADN entraîneur).

**PEG (polyéthylène glycol)**

Nous avons étudié différents paramètres influant sur l'expression transitoire : la masse moléculaire du PEG, la présence d'ADN entraîneur, la concentration d'ADN plasmidique.

Quelle qu'ait été la masse moléculaire du PEG, le pourcentage de protoplastes viables était de l'ordre de 40 %. Le PEG 6 000 est le plus efficace (Figure 2) et a donc été utilisé pour les expériences suivantes.

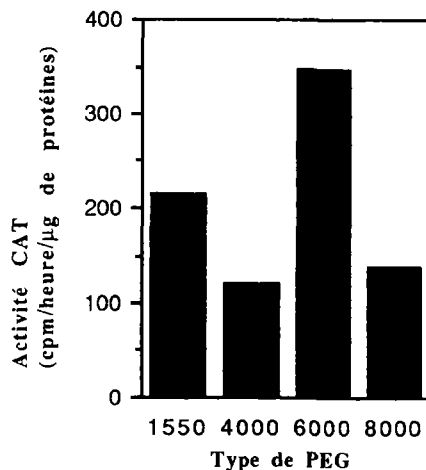
Les activités CAT et GUS étaient deux fois plus élevées en présence d'ADN entraîneur qu'en son absence (Tableau I). Les expériences suivantes contiennent donc de l'ADN entraîneur.

**Tableau I.** Mesure des activités CAT et GUS, 24 heures après l'application de différentes techniques de transfert direct de gènes.

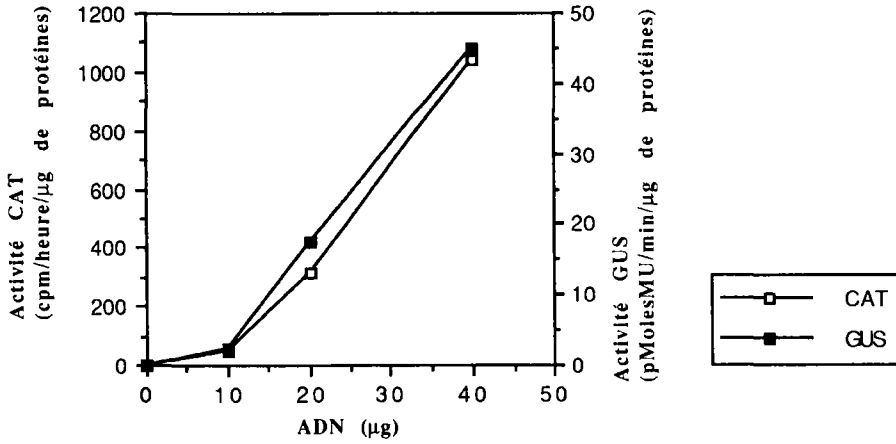
Technique de transfection	Quantité d'ADN plasmidique ( $\mu\text{g}$ )	ADN entraîneur	CAT (cpm/h/ $\mu\text{g}$ de prot.)	GUS (pMolesMU/min/ $\mu\text{g}$ de prot.)
PEG 6 000	20	+	310	18
	20	-	165	10
PEG 6 000 Électroporation	40	+	850	45
	40	+	92	5

Les activités CAT et GUS étaient proportionnelles à la quantité d'ADN plasmidique (Figure 3).

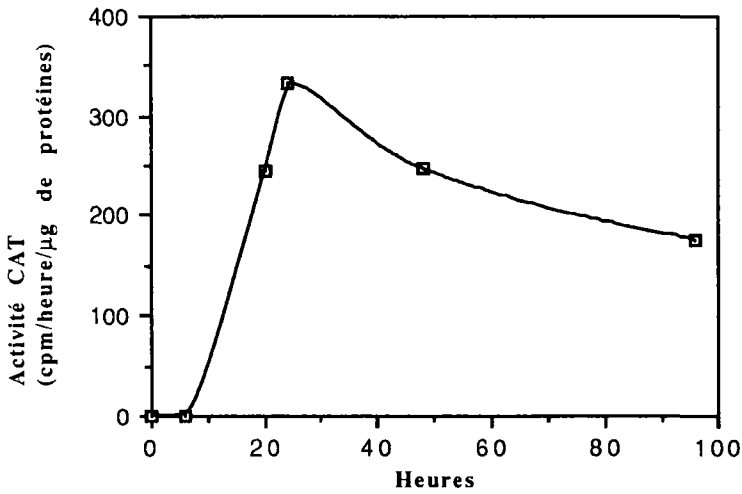
En utilisant les conditions définies précédemment (PEG 6 000, présence d'ADN entraîneur), nous avons suivi la cinétique de l'activité CAT (Figure 4). Elle n'a été détectée qu'après 6 heures de culture. Elle augmentait très vite jusqu'à 30 heures. A la suite de ce pic d'activité, elle diminuait progressivement et restait toujours exprimée après 4 jours de culture.



**Figure 2.** Influence de la masse moléculaire du PEG sur l'activité CAT ( $10^6$  protoplastes,  $20 \mu\text{g}$  d'ADN plasmidique,  $40 \mu\text{g}$  d'ADN entraîneur).



**Figure 3.** Influence de la quantité d'ADN plasmidique sur les activités CAT et GUS (PEG 6000,  $10^6$  protoplastes, pour chaque point la quantité d'ADN entraîneur est double de celle de l'ADN plasmidique).



**Figure 4.** Cinétique de l'activité CAT (PEG 6 000,  $10^6$  protoplastes, 20 µg d'ADN plasmidique, 40 µg d'ADN entraîneur).

### **DOGS (dioctadécylglycylspermine)**

Différents protocoles ont été mis en œuvre pour la transformation des protoplastes par le DOGS. Les facteurs importants (Behr, communication personnelle) sont le rapport entre la concentration en ADN et en DOGS, la concentration en calcium lors de la formation des complexes ADN-DOGS, le temps d'incubation des cellules avec ces complexes avec ou sans agitation.

Par ailleurs, nous avons remarqué l'effet très agglutinogène du DOGS sur les protoplastes de tournesol. Cet effet est accru lorsque les protoplastes sont agités après transformation avec les complexes ADN-DOGS. Cela pourrait expliquer la mort cellulaire observée et les résultats négatifs de l'expression transitoire obtenus.

### **Conclusion**

Après optimisation et évaluation de plusieurs approches, la méthode retenue pour le transfert direct de gènes est la transformation par le polyéthylène glycol. Cette technique de transformation a conduit à un niveau d'expression transitoire élevé pour les gènes marqueurs utilisés. Le niveau est comparable à celui obtenu avec le même plasmide sur les protoplastes de tabac [6]. De plus, c'est une technique reproductible, rapide, facile à mettre en œuvre et peu onéreuse.

Comme la plupart des méthodes de transfert direct de gènes, les conditions optimales de transformation par le PEG s'accompagnent de la mort d'une partie de la population cellulaire (60 % dans notre cas). Une mort plus importante (80 %) est observée par Kirches *et al.* [4] sur les protoplastes de mésophylle de tournesol. Par ailleurs, ces auteurs ont également comparé la transformation par le PEG et l'électroporation sur des protoplastes de mésophylle de tournesol. L'expression transitoire obtenue après électroporation dans leur cas est plus faible que celle obtenue après traitement au PEG. Cela correspond bien à nos observations.

Le DOGS est une molécule qui a été testée avec succès sur les systèmes animaux et dont les avantages sont réels (simplicité et efficacité du protocole et non-toxicité du DOGS). Il permet également d'encapsuler l'ADN et donc de le protéger vis-à-vis des endonucléases cellulaires. Néanmoins, nous n'avons pas réussi à détecter une expression transitoire dans les protoplastes de tournesol. Dans nos conditions, le DOGS est une molécule très agglutinogène et nous n'avons pu contourner cet effet.

En vue de réaliser des transformations stables, il est intéressant de disposer d'un système permettant l'expression maximale, la détection précoce d'un événement génétique et la mise en place d'une sélection efficace des cellules transformées.

Nous disposons maintenant d'un outil pour l'étude des constructions géniques dans le tournesol. Par exemple, l'étude comparative de promoteurs forts (promoteur 35S du CaMV et promoteur du gène d'actine) et l'analyse du rôle des séquences *enhancers* peuvent être envisagées en expression transitoire.

## Références

1. Behr J-P, Demeneix B, Loeffler J-P, Perez-Mutul J (1989). Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 6982-6986.
2. Fischer C, Klethi P, Hahne G (1992). Protoplasts from cotyledon and hypocotyl of sunflower (*Helianthus annuus* L.) : shoot regeneration and seed production. *Plant Cell Rep* 11 : 632-636.
3. Jefferson RA (1987). Assaying chimeric genes in plants : the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rept* 5 : 387-405.
4. Kirches E, Frey N, Schnabl H (1991). Transient gene expression in sunflower mesophyll protoplasts. *Act Bot* 104 : 212-216.
5. Lenée P, Chupeau Y (1986). Isolation and culture of sunflower protoplasts (*H. annuus* L.) : factors influencing the viability of the cell colonies derived from protoplasts. *Plant Sci* 43 : 69-75.
6. Lepetit M, Ehling M, Gigot C, Hahne G (1991). An internal standard improves the reliability of transient expression studies in plant protoplasts. *Plant Cell Rep* 10 : 401-405.
7. Loeffler J-P, Behr J-P (1993). Gene transfer into primary and established mammalian cell lines with lipopolyamine-coated DNA. *Methods Enzymol* 217 : 599-618.
8. Moyne A-L, Tagu D, Bergounioux C, Freyssinet G, Gadal R (1988). Transformed calli obtained by direct gene transfer into sunflower protoplasts. *Plant Cell Rep* 8 : 97-100.



# 26

## **Polymorphisme de l'ADN total chez des plantes régénérées à partir de protoplastes de pomme de terre**

OUMEMA ELLOUZ<sup>1</sup>, LILIA LAKHOUA<sup>1</sup>, ALI GARGOURI<sup>2</sup>

1. École Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP W, 3038 Sfax, Tunisie.

2. Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie.

La pomme de terre est une plante d'une grande importance économique pour la Tunisie. Malheureusement les problèmes de contamination, par des viroses (le PVY étant le plus redoutable) principalement, sont à l'origine d'une baisse conséquente de la production dans certaines régions de Tunisie.

Pour résoudre ce problème, et connaissant les limites de la sélection traditionnelle, on peut s'adresser aux techniques de culture *in vitro* et de génie génétique. Outre les méthodes d'éradication de virus (par thermothérapie, chimiothérapie et culture d'apex), ces nouvelles techniques et en particulier celles utilisant les protoplastes offrent des perspectives prometteuses :

- la possibilité d'induire une variation somaclonale importante [3] par régénération *in vitro* à partir d'explants y compris de protoplastes. Cette variation peut toucher des caractères quantitatifs obéissant à des facteurs polygéniques ;

- la production d'hybrides somatiques par fusion intraspécifique entre des clones dihaploïdes de pomme de terre [2] ou interspécifique avec des espèces sauvages diploïdes compatibles, susceptibles d'apporter des caractères intéressants, notamment de résistance [10] ;

- l'introduction de caractères mono ou oligogéniques (en particulier la résistance à une maladie, à un prédateur) par transfert d'ADN dans des protoplastes ou dans des explants à l'aide d'agrobactéries.

Notre objectif est actuellement de maîtriser les différentes étapes d'une stratégie

visant à cumuler, dans un même individu, les caractéristiques intéressantes des deux parents, l'un d'eux possédant des caractères de résistance à des virus. Il s'agit là d'un transfert de certaines techniques de pointe qui ont déjà été mises au point chez cette plante. Nous décrirons, dans cet article, la production de plantes régénérées à partir de protoplastes, mais aussi à partir de feuilles de vitroplants ainsi que les variations observées au niveau de l'ADN total chez ces plantes régénérées.

## Matériel végétal et méthodes

Nous nous sommes servis de vitroplants appartenant à deux variétés (4x) de consommation, demi-précoces, largement utilisées en Tunisie (Spunta et Claustar) et au génotype Aminca H6 (2x), aimablement fourni par l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) de Landerneau (France) hypersensible au virus x et résistant au nématode doré (*Globodera rostochiensis* pathotype RO1). Ces génotypes ont été multipliés *in vitro* sur milieu de Murashige et Skoog (MS) [8] additionné des vitamines de Morel [7], de 20g/l de saccharose et de 7,5g/l d'agar. Le bouturage des apex de vitroplants a lieu dans des tubes non scellés, placés à  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ , sous une photopériode de 13 h de lumière par jour, et une intensité lumineuse de  $80\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$ . Après 3 semaines de culture, les apex des jeunes plantes obtenues sont à nouveau excisés et repiqués sur le même milieu durant une période de trois semaines et ainsi de suite...

Les méthodes employées sont les suivantes :

- l'isolement de protoplastes et leur purification,
- la production de plantes régénérées à partir de divers explants,
- l'analyse moléculaire de ces plantes.

### L'isolement et la purification des protoplastes

Les protoplastes sont préparés chez les divers génotypes mentionnés à partir de vitroplants âgés de 3 semaines.

La face inférieure des feuilles est dilacérée à l'aide d'un scalpel. La macération des feuilles (30 mg de matière fraîche/ml de solution enzymatique) a lieu en boîtes de Pétri, à l'obscurité pendant une nuit et à  $27^{\circ}\text{C}$ . La solution enzymatique est composée de la solution minérale CPW [4] additionnée de 0,5 M de mannitol, 1 % (m/v) de cellulase R10, 0,2 % (m/v) de macérozyme (Yakult - Tokyo - Japon) et de 0,05 % (m/v) d'acide 2-N morpholino éthanesulfonique (MES). Le pH = 5,5.

Les protoplastes ont été purifiés en adoptant la méthode décrite par Chaput *et al.* [2].

### La production de plantes régénérées à partir de divers explants

La régénération de plantes a été effectuée de trois façons différentes :

a) A partir de disques foliaires de vitroplants provenant des deux variétés Spunta et Claustar en utilisant le milieu C3 et les conditions de cultures décrites par Quraishi *et al.* [9].

b) A partir de protoplastes isolés appartenant à ces deux mêmes variétés.

Les protoplastes de Spunta et de Claustar ont été mis en culture à l'obscurité à  $27^{\circ}\text{C}$ , à raison de  $10^4$  à  $10^5$  protoplastes/ml sur le milieu de culture VKM [1] addition-



né de 250 mg/l de polyéthylène glycol 6 000 (PEG), 0,2 mg/l d'acide 2-4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), 0,5 mg/l de zéatine, 1mg/l d'acide naphthalèneacétique (ANA), 3,3 % (m/v) de glucose, 3,2 % (m/v) de mannitol et de 0,05 % (m/v) de MES.

Vingt-quatre heures après l'isolement, les protoplastes commencent à former leur paroi et, au bout de 3 à 4 jours, la première division est observable. Après 7 jours, les cultures sont passées progressivement à la lumière.

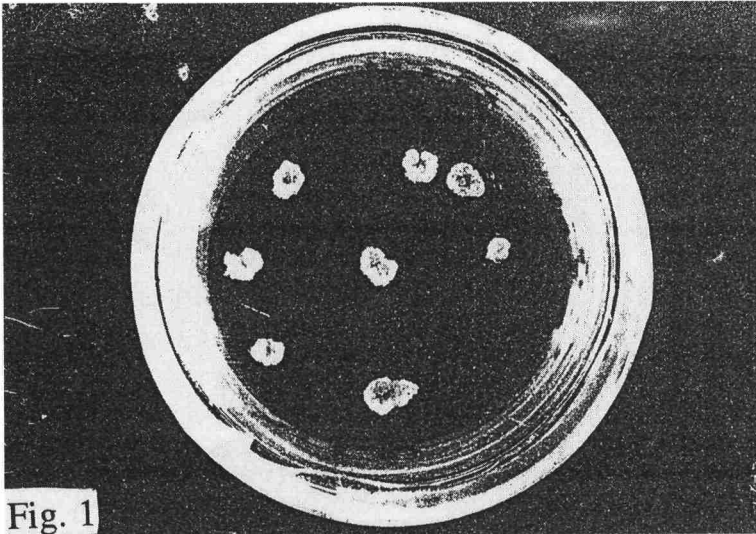
Au bout de 15 jours, on voit se former des microcals d'environ 0,5 mm de diamètre. Ces microcals sont transférés sur un milieu de croissance identique au précédent, sauf pour la composition en régulateurs de croissance (2,4-D 0,1 mg/l et benzylaminopurine (BAP) 2 mg/l). Quinze à vingt jours après, on a des cals de 1 à 3 mm de diamètre. Le transfert de ces cals sur un milieu de base MS [8] additionné de vitamines [5], de saccharose 20g/l, de 0,5 mg/l d'ANA et de zéatine permet leur croissance (Figure 1).

L'initiation des bourgeons est obtenue sur le même milieu, mais différent par la composition en régulateurs de croissance (l'acide indolacétique (AIA) 0,1mg/l et zéatine 2 mg/l). Les jeunes pousses obtenues (Figure 2) sont ensuite multipliées par microbouturage successifs *in vitro*.

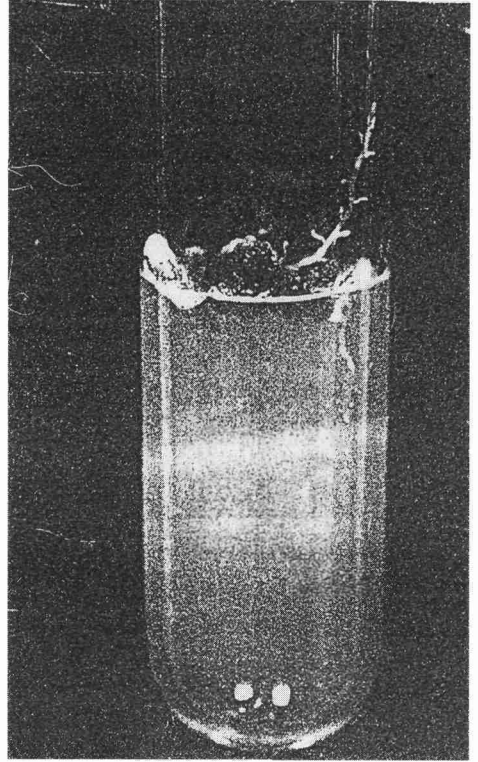
c) A partir de protoplastes fusionnés entre Claustar (4x) et Aminca H6 (2x).

Après isolement, les protoplastes de deux génotypes Claustar (4x) et Aminca H6 (2x) en suspension sont mélangés à volume égal dans une solution contenant du PEG 6 000 (30 % à 40 % selon la technique de Kao et Michayluck [5] (Figure 3).

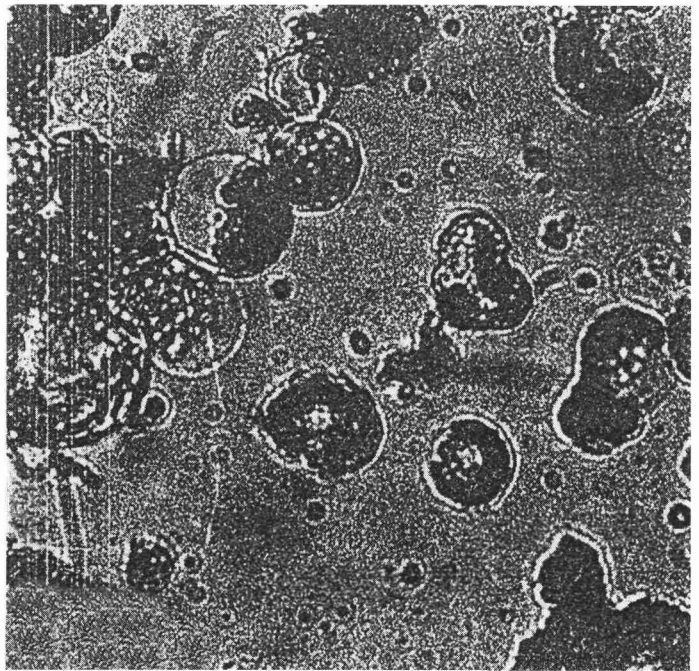
Après la fusion, on suit le même protocole que pour la régénération à partir de protoplastes isolés.



**Figure 1.** Cal issu de la prolifération de protoplastes sur le milieu de croissance.



**Figure 2.** Initiation de bourgeons évoluant en tiges.



**Figure 3.** Fusion de protoplastes des 2 variétés Aminca (2x) et Claustar (4x).

## **L'analyse moléculaire des plantes**

Elle a comporté plusieurs étapes :

### **• Extraction de l'ADN total**

- 2 grammes de tissu végétal sont mis à congeler à - 70° C pour au moins une heure,
- broyage dans un mortier prérefroidi,
- choc osmotique avec l'addition de 5 ml d'eau stérile,
- continuer le broyage,
- immédiatement après, addition de 5 ml phénol saturé au Tris-HCl pH 8,
- mélanger 5 minutes et centrifuger 10 minutes à 8 000 rpm (rotor Sorvall, 20° C) dans des tubes Corex,
- refaire un traitement au phénol,
- à la phase aqueuse ajouter 5 ml de chloroforme,
- mélanger 5 minutes et centrifuger 10 minutes à 8 000 rpm (rotor Sorvall) dans des tubes Corex,
- à la phase aqueuse, ajouter 1/10 volume AcNa 3 M et 1 volume Isopropanol (ou 2,5 volumes Éthanol),
- mélanger (sans vortexer) et laisser l'ADN précipiter au moins une heure à - 70° C (sinon la nuit),
- centrifuger 10 minutes à 8 000 rpm à froid,
- jeter le surnageant, sécher le culot et resuspendre du TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM),
- analyser la qualité et la quantité par migration d'une aliquote sur gel et par mesure de la DO à 260 nm et 280 (protéines contaminantes). Le rapport 260/280 doit se situer entre 1,7 et 2,
- (si besoin est, on peut éliminer encore l'ARN et les protéines contaminantes par un traitement à la RNase et à la Protéinase K, suivi par un traitement au phénol-chloroforme et précipitation à l'éthanol/AcNa).

### **• Digestion par une enzyme de restriction**

Environ 5 µg d'ADN sont digérés par l'enzyme BamHI ou HindIII dans le tampon approprié pendant une nuit dans une étuve à 37° C. La digestion est déposée sur un gel d'agarose 0,7 % à côté d'un marqueur de poids moléculaire. Après électrophorèse dans un tampon TAE (ou TBE), et coloration au BET, le gel, avec une règle à côté, est photographié sous UV. La digestion était totale car on n'observe pas d'ADN de haut poids moléculaire (de taille supérieure à l'ADN de  $\lambda$  natif) en haut des profils de digestion sur gel coloré au BET.

### **• Marquage de la sonde par Random priming**

- la sonde employée provient de DNA ribosomal de levure (*Saccharomyces cerevisiae*),
- le kit utilisé provient de chez Boehringer,
- l'ADN est dénaturé par chauffage 5 à 10 minutes à 100° C, on lui ajoute :
  - 2 µl de mélange réactionnel (les hexa-nucléotides dans le tampon 10x),
  - 3 µl de (dATP, dGTP, dITP) à 0,5 mM,
  - 3 µl de dCTP radioactif (3 000Ci/mmmole),
  - 1 µl de fragment de Klenow d'ADN polymérase (2 unités),
  - volume final : 20 µl ;

- incubation 1 à 3 heures à 37° C,
- arrêt par addition de 2 µl d'EDTA 0,5 M,
- séparation de l'ADN marqué des nucléotides libres par *spin-column* : dépôt sur colonne (seringue 1ml) de Sephadex G50 (déjà remplie et centrifugée 3 secondes à 2 000 rpm) et centrifugation 3 minutes à 2 000 rpm,
- collecte de l'ADN. Avant l'hybridation la sonde est dénaturée (chauffage 10 minutes à 100° C et dépôt immédiat dans la glace).

• **Transfert sur filtre et hybridation à la sonde**

Le gel est traité comme suit :

- deux fois 15 minutes immergé dans HCl 0,25 N,
- deux fois 30 minutes immergé dans NaOH 0,5 M et NaCl 1,5 M,
- deux fois 30 minutes immergé dans Tris-HCl 1 M et NaCl 1,5 M.

L'ADN, ainsi dénaturé, est alors transféré sur filtre de Nylon (ou de Nitrocellulose) par capillarité ou par transfert sous vide, en présence de 10 x SSC.

L'ADN est fixé au filtre de Nylon par exposition aux UV pendant 3 minutes.

Le filtre est préhybridé, 3 heures sous agitation à 65° C, dans une solution de : 1 x Denhardt, 6 x SSC, 0,1 % SDS et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé.

Le filtre est immergé dans une solution de sonde dénaturée pendant une nuit dans les mêmes conditions.

Le filtre est lavé comme suit :

- deux fois 5 minutes à température ambiante dans 2 x SSC, 0,1 % SDS,
- trois fois 15 minutes à 65° C dans 2xSSC, 0,1 % SDS,
- une fois 15 minutes à 65° C dans 0,1xSSC, 0,1 % SDS.

Le filtre est alors séché, mis en autoradiographie pendant quelques jours, puis le film est développé.

## Résultats

### Sur l'isolement et la purification de protoplastes

Les travaux de Thomas [11] ayant montré que les protoplastes provenant du mésophylle de plantes cultivées *in vitro* permettraient d'obtenir les résultats les plus reproductibles, nous avons utilisé uniquement ce type de matériel pour isoler les protoplastes.

Cette technique d'isolement jointe à la méthode de purification des protoplastes mise au point par Chapat *et al.* [2] nous a permis d'obtenir 7.10<sup>6</sup> protoplastes par gramme de matière fraîche.

### Sur la production de plantes régénérées

Nous n'avons pas encore réussi à initier des régénérations à partir des protoplastes fusionnés de Claustar et d'Aminca.

Des plantes régénérées ont été obtenues :

- à partir de petits cals friables verts apparus au niveau des blessures sur feuilles de vitroplants de Spunta et de Claustar,

– à partir de cals provenant de la culture de protoplastes provenant de ces deux mêmes variétés.

On peut noter que la morphologie des plantes issues de cals est particulière : les feuilles sont plus petites et les racines moins importantes que chez les vitroplants témoins ou les plantes régénérées à partir de feuilles de ces vitroplants.

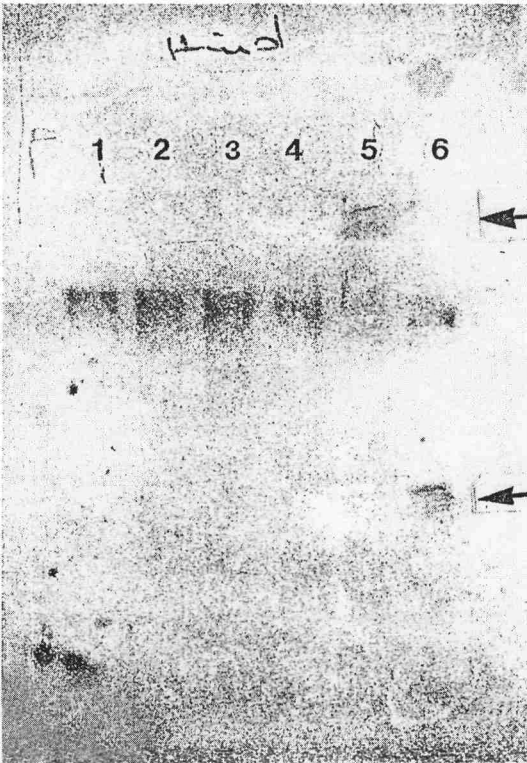
### **Sur l'analyse moléculaire des plantes obtenues**

Nous avons extrait l'ADN total de plantes cultivées *in vitro* de Spunta et Claustar et des régénérations obtenues chez ces 2 mêmes variétés, soit à partir de feuilles, soit à partir de cals provenant de la culture de protoplastes.

Les digestions par Bam HI où Hind III ont été complètes.

Après hybridation à la sonde, les résultats avec Bam HI ont été plutôt décevants : on n'a pas observé de bandes nettes.

Avec Hind III les bandes sont bien visibles et conduisent à des informations intéressantes. Le même profil est obtenu pour les plantes *in vitro* de Spunta (Figure 4, piste 1) et Claustar (Figure 4, piste 4) et pour les plantes régénérées à partir de feuilles de ces deux mêmes variétés (Figure 4, piste 2 et 3). En revanche, les deux régénérations obtenues à partir de cals de protoplastes chez Claustar (Figure 4, pistes 5 et 6) et étudiées quant à leur ADN présentent chacune un profil particulier avec apparition d'une nouvelle bande.



**Figure 4.** Caractérisation des clones par hybridation moléculaire.

## Conclusions et perspectives

Nous avons mis en évidence, au cours de ce travail, chez l'ADN total de 2 plantes régénérées à partir de cals de protoplastes, une bande supplémentaire qui n'existait pas chez les plantes témoins *in vitro* et chez les plantes régénérées à partir de feuilles que nous avons observées. Ce résultat va de pair avec l'aspect morphologique particulier de ces plantes issues de protoplastes.

Une étude de l'ADN cytoplasmique à l'aide d'enzymes de restriction, menée par Kemble et Shepard [6] chez des protoclonés de la variété Russet Burbank, a déjà montré des changements au niveau de l'ADN mitochondrial. A l'inverse, l'ADN chloroplastique restait très stable.

A la suite de ces diverses données, il serait intéressant :

- de poursuivre l'étude sur l'ADN total en la réalisant sur un nombre plus élevé de plantes néoformées, à partir à la fois de feuilles et de protoplastes. Cela, afin de pouvoir s'assurer de l'existence d'un polymorphisme de l'ADN pour les plantes de la deuxième provenance citée et, à l'inverse, d'une stabilité de l'ADN pour les plantes de la première origine ;

- d'examiner de façon précise les plantes régénérées présentant un polymorphisme de leur ADN total, pour voir si cette divergence peut être attribuée au DNA cytoplasmique (c'est-à-dire au DNA mitochondrial, puisque le DNA chloroplastique est généralement stable) ou au DNA nucléaire ;

- d'utiliser une sonde mitochondriale précisant le niveau de la variation observé ;

- d'essayer d'autres enzymes de restriction, d'autres sondes, voire même d'autres méthodes d'analyse telles que la RAPD afin de détecter d'autres variations éventuelles ;

- d'effectuer la même analyse par RFLP sur les plantes issues de la fusion de protoplastes, quand celles-ci auront été obtenues.

## Références

1. Binding H, Nehls R, Shieder O, Sopory SK, Wenzel G (1978). Regeneration of mesophyll protoplasts isolated from dihaploid clones of *Solanum tuberosum*. *Physiol Plant* 43 : 52-54.
2. Chaput MH, Sihachakr D, Ducreux G, Marie D, Barghi N (1990). Somatic hybrid plants produced by electrofusion between dihaploid potatoes : BF15 (H1), Aminca (H6) and Cardinal (H3). *Plant Cell Rep* 9 : 411-414.
3. Evans DA, Sharp WR (1988). Somaclonal variation and its application in plant breeding. *Newsletter* 54 : 2-10.
4. Frearson EM, Power JB, Cooking EC (1973). The isolation culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev Biol* 33 : 130-137.
5. Kao KN, Michayluck MR (1975). Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a low population density in liquid media. *Planta* 126 : 105-110.
6. Kemble RJ, Shepard JF (1984). Cytoplasmic DNA variation in a potato protoclonal population. *Theor Appl Genet* 69 : 211-216.
7. Morel G, Wetmore RH (1951). Fern callus tissue culture. *Am J Bot* 38 : 141-143.
8. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.

9. Quraishi A, Rossignol-Bancilhon L, Nozeran R (1970). Effet de l'origine du fragment sur la callogenèse et l'organogénèse *in vitro* chez *Solanum tuberosum* L. var. « BF15 ». *Ann Amélior Plants* 29 (6) : 639-663.
10. Serraf I, Sihachakr D, Ducreux G, Brown SC, Allot M, Barghi N, Rossignol L (1991). Interspecific somatic hybridization in potato by protoplast electrofusion. *Plant Sci* 76 : 115-126.
11. Thomas E (1981). Plant regeneration from shoot culture-derived protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* cv. Maris Bard). *Plant Sci Lett* 23 : 81-88.





## 27

### **Embryogenèse somatique chez la patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) : caractérisation et régénération des plantes**

D. SIHACHAKR<sup>1</sup>, J.M. CAVALCANTE-ALVES<sup>1</sup>, S. TIZROUTINE<sup>1</sup>,  
M. ALLOT<sup>1</sup>, I. MUSSIO<sup>1</sup>, A. SERVAES<sup>1</sup>, D. NZOGHÉ<sup>2</sup>, G. DUCREUX<sup>1</sup>

1. *Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bâtiment 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France.*

2. *Laboratoire de culture in vitro, CIAM, BP 2183, Libreville, Gabon.*

La patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Convolvulacées) est une plante d'intérêt économique considérable dans les zones tropicales et même dans certaines zones tempérées d'Europe du Sud et des États-Unis d'Amérique [22]. La production mondiale de tubercules est estimée à 133,3 millions de tonnes pour l'année 1989, avec un rendement moyen de 14,4 t/ha [5]. La Chine (114,0 Mt), l'Indonésie (2,1 Mt), l'Ouganda (1,8 Mt), l'Inde (1,4 Mt), le Japon (1,3 Mt), le Rwanda (0,8 Mt), le Brésil (0,75 Mt) et les États-Unis d'Amérique sont parmi les plus grands producteurs [5]. Le tubercule de patate douce est très riche en calories et vitamines, ainsi qu'en protéines dont la teneur varie entre 2 % et 10 % selon les cultivars [11, 25].

La patate douce est originaire d'Amérique du Sud (Colombie, Équateur et Nord Pérou) où existe encore une grande diversité d'*Ipomoea batatas*. Elle a été introduite en Europe par Christophe Colomb au XV<sup>e</sup> siècle. La patate douce, ou *Ipomoea batatas* (L.) Lam., est une dicotylédone gamopétale, de l'ordre des polémoniales et de la famille des convolvulacées.

Bien que des progrès aient été obtenus par les méthodes de sélection classique pour l'introduction des caractères de résistance aux maladies, aux nématodes et aux insectes, ainsi que pour l'amélioration de la teneur en protéines et de la qualité du tubercule, le processus de sélection est un travail de longue haleine, et nécessite la manipulation d'un très grand nombre d'individus et des techniques améliorées de croisements. De

plus, l'incompatibilité sexuée et la stérilité de certains génotypes et des hybrides rendent encore plus difficiles les méthodes de sélection classique [22].

Afin de mener le programme de sélection de la patate douce avec efficacité, des nouvelles techniques, comprenant notamment la variation somaclonale, la fusion de protoplastes et la transformation, peuvent être utilisées en conjonction avec les méthodes classiques de sélection. Cependant, l'accès à ces nouvelles techniques nécessite la mise au point de protocoles reproductibles de régénération de plantes à partir de cultures de tissus de patate douce.

Cette plante est considérée comme une espèce récalcitrante en ce qui concerne la régénération. L'objet de cet article est de passer en revue divers systèmes de régénération chez la patate douce. Une attention particulière portera sur l'embryogenèse somatique qui constitue la voie la plus efficace concernant la régénération chez cette plante. En effet, l'embryogenèse somatique permet d'obtenir un taux élevé et inégalable de multiplication, et la capacité de régénération peut être effectivement maintenue pendant longtemps. En plus, le processus de l'embryogenèse aboutit à la production de structures bipolaires, c'est-à-dire comprenant un axe apical et racinaire.

## Régénération de plantes à partir de cultures d'explants

Une méthode de propagation accélérée par bouturages successifs de nœuds de tiges a été mise au point afin de disposer d'un grand nombre d'individus sains qui constituent un matériel de départ physiologiquement homogène et juvénile pour des expérimentations *in vitro* [19].

Des investigations concernant la régénération à partir de culture d'organes ou de fragments d'organes de patate douce ont été entreprises par plusieurs auteurs [2, 9, 18, 19]. Ainsi des fragments de tiges repiqués sur du milieu MS additionné de 1 mg/l d'acide indole acétique (AIA) peuvent donner naissance à des régénérations de bourgeons [19]. Des études comparatives plus détaillées de milieux de culture ont permis de montrer que les meilleures réponses concernant la précocité (2 semaines de culture) et la fréquence de régénération (22 %) ont été obtenues avec la combinaison de 0,01 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) avec 0,01 mg/l de kinétine [2]. Les bourgeons peuvent apparaître (a) le plus fréquemment au niveau de cals cicatriciels, (b) directement sur les explants à proximité des zones traumatisées, et enfin (c) à la base des racines néoformées [19].

La comparaison de capacité organogène de différents organes mis en culture a montré que les explants de tiges sont les plus aptes à régénérer par rapport aux explants foliaires [2, 19]. Par ailleurs, les meilleures réponses organogènes sont obtenues à partir des explants prélevés sur des plantes *in vitro*. Il est intéressant de noter que le repiquage de fragments de cals organogènes sur du milieu neuf aboutit à la régénération de nouveaux bourgeons. En revanche, le repiquage de cals primaires non organogènes de patate douce, même sur un milieu très favorable, conduit toujours à une callogenèse abondante sans aucune manifestation morphogénétique [2].

## **Régénération de plantes à partir de protoplastes**

Des protoplastes peuvent être isolés à partir de fragments de tiges, de pétioles ou de calcs de patate douce, alors que le mésophylle se montre très récalcitrant à la digestion enzymatique. Les premiers travaux sur l'isolement de protoplastes à partir de calcs de tige de patate douce remontent à l'année 1979 [24]. Ensuite, Bidney et Shepard [1] ont obtenu des calcs à partir de culture de protoplastes issus de germes de tubercules, en utilisant un système de culture comportant un réservoir de milieu. D'autres chercheurs ont abouti également à l'obtention de calcs qui ne manifestent aucune organogenèse [13, 17], ou qui produisent seulement des racines [20]. Cependant, des néoformations sporadiques de bourgeons à partir de culture de protoplastes de patate douce ont été signalées pour le cultivar Chugoku N° 25 [16].

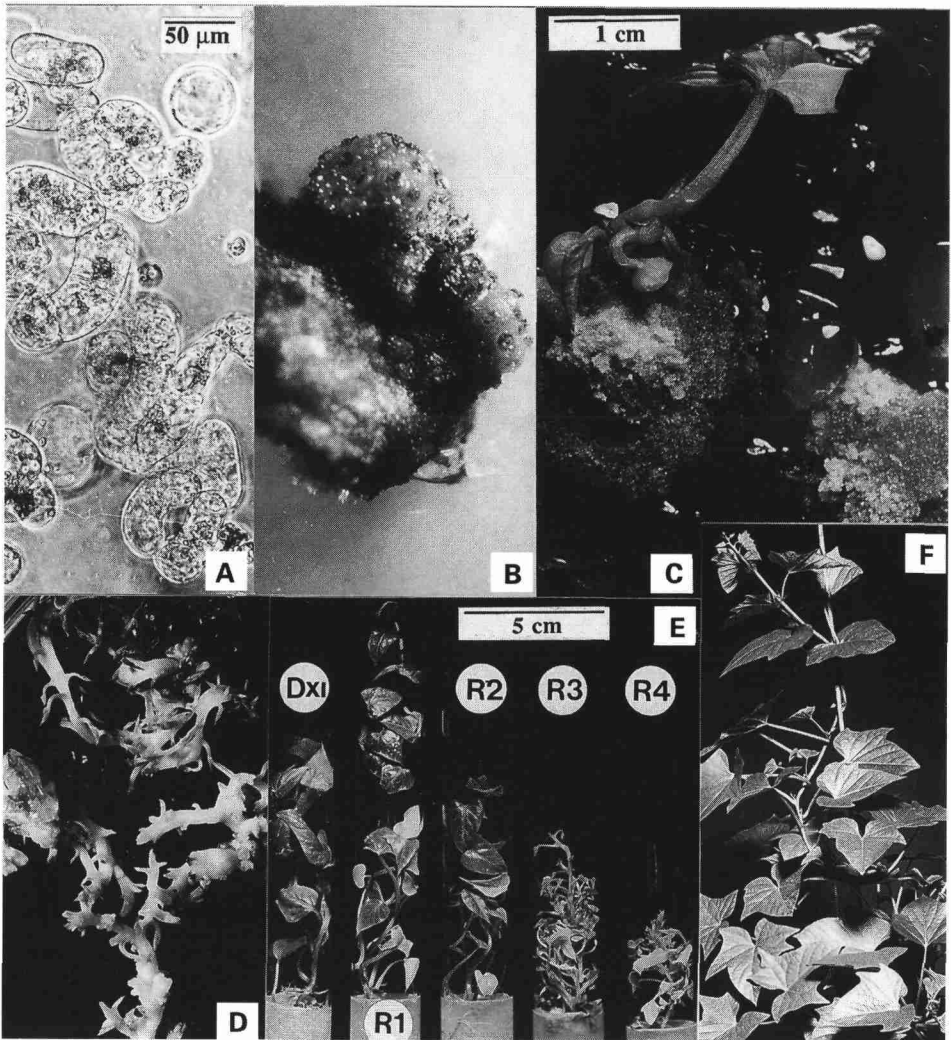
Des résultats intéressants concernant la régénération de bourgeons à partir de culture de protoplastes ont été obtenus chez la patate douce, grâce à des efforts qui ont porté sur la recherche de combinaisons de régulateurs de croissance, de séquences de milieu de culture et en particulier sur le choix du matériel végétal utilisé comme source de protoplastes [21]. En effet, la comparaison de matériel végétal prélevé en serre et *in vitro* montre la nette supériorité de ce dernier concernant la viabilité et le taux de division de protoplastes qui en sont issus, ainsi que la capacité ultérieure à régénérer des bourgeons. Ces performances sont sans doute dues à l'état physiologiquement juvénile et homogène du matériel végétal qui caractérise les plantes *in vitro*. De plus, la grande dilution de la culture, combinée avec le passage sur des milieux successifs riches en cytokinine, de la zéatine en particulier, stimule la croissance des calcs et favorise la régénération de bourgeons [21]. Ainsi, des plantes ont été régénérées à partir de calcs de protoplastes chez 2 cultivars de patate douce, cv. Duclos 11 et Ira. Les plantes régénérées présentent une grande variabilité affectant la morphologie générale de la plante, celle des feuilles, la ramification ainsi que le système racinaire (Figure 1). L'analyse du contenu en ADN de 15 protoclonés d'apparence morphologique normale, par cytométrie en flux, a montré des valeurs similaires ou très proches de celles du clone témoin [22]. Malgré la stabilité du contenu en ADN des clones analysés, leur évaluation en conditions de champs, réalisée au Gabon en collaboration avec Dr Nzoghé, a révélé une variabilité dans la croissance et notamment dans la tubérisation. En effet, certains clones sont très productifs, pouvant donner jusqu'à 2 fois plus de tubercules que le clone témoin, alors que d'autres ne tubérisent pas.

## **Embryogenèse somatique**

### **Induction**

L'embryogenèse somatique chez la patate douce est initiée à partir de calcs de culture d'anthers [23], de feuilles, d'apex, de fragments de tiges ou de racines [14], et de bourgeons axillaires notamment [3, 4, 12].

Le milieu d'induction est composé du milieu de base MS [15] additionné de 30 g/l de saccharose, 10  $\mu$ M d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et solidifié par 7 g/l d'agar. Après 6 à 8 semaines d'incubation à l'obscurité et à 27°C, un certain nombre de bourgeons axillaires, prélevés sur des plantes *in vitro* et mis en culture, produisent des calcs mucilagineux blanchâtres à partir desquels émergent des calcs compacts



**Figure 1.** Régénération de protoplastes de patate douce. **A.** Cellules issues de divisions de protoplastes ; **B.** Cals organogènes issus de culture de protoplastes ; **C.** Régénération de plantes ; **D.** Régénération à partir de cals organogènes ; **E.** Plantes régénérées montrant une grande variabilité, DXI (clone témoin), R1 à R4 (clones régénérés) ; **F.** Une plante régénérée plantée en serre.

embryogènes (Figure 2 A). D'autres bourgeons mis en culture donnent naissance soit à des cals de plus petite taille (mais qui brunissent et meurent au bout de quelques semaines), soit à des cals friables non embryogènes et à croissance rapide. Ce dernier type de cals est d'un aspect translucide, d'une couleur variant du blanc au brun, et ne devient jamais embryogène. Les cals compacts embryogènes sont d'une couleur jaune clair et comportent quelquefois des zones plus ou moins anthocyanées chez certains cultivars (Figure 2 B) [3].

L'évaluation du potentiel embryogène chez 10 cultivars de patate douce montre un effet « génotype » très hautement significatif (Tableau I A). Parmi les génotypes testés, les cultivars 90, Zho et 865 donnent les meilleures réponses embryogènes avec respectivement 10 %, 15 % et 17 % de cals embryogènes (Tableau I A). Il est intéressant de noter que le cultivar Duclos 11 n'a donné aucune réponse embryogène quelle que soit la concentration en 2,4-D utilisée (2,5 à 15  $\mu\text{M}$ ), alors que ce génotype a produit quelques régénérations de bourgeons à partir de culture de protoplastes [21].

**Tableau I.** Réponses de l'embryogenèse somatique de 10 cultivars de patate douce. A) Pourcentage de cals embryogènes obtenus après 6-8 semaines d'incubation de bourgeons axillaires dans du milieu MS contenant 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D ; effectif : 120-160 bourgeons axillaires/génotype ; l'effet « génotype » est très hautement significatif pour  $P = 0,001$  ; B) Pourcentage de réversion de cals embryogènes en cals friables et non-embryogènes après repiquage sur du milieu MS contenant 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D ; effectif : 200 cals/génotype ; l'effet « génotype » est très hautement significatif pour  $P = 0,001$ .

Génotype	D 11	Qu	Yul	Zho	90	132	209	530	865	953
A) Réponse embryogène (%)	0,0	1,3	1,5	15,0	10,0	5,0	8,0	3,6	17,0	7,0
B) Réversion de cals (%)	-	1,0	1,0	3,0	12,0	2,5	7,0	1,5	10,5	0,5

Les cals embryogènes sont multipliés par repiquages successifs sur du milieu MS contenant 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D et maintenus à l'obscurité. Cependant, après plusieurs repiquages, certains secteurs du cal deviennent friables et non embryogènes (Figure 2 C). Ils ont tendance à envahir complètement la culture car leur croissance est 5 à 8 fois plus rapide que celle des cals embryogènes. De plus, la réversion des cals embryogènes vers un état friable non embryogène est irréversible, et s'accompagne d'une perte définitive de la capacité à régénérer des bourgeons [3]. La comparaison des fréquences de réversion montre un effet « génotype » très hautement significatif avec une probabilité de  $P = 0,001$  (Tableau I B). En effet, les cultivars Quangshu, Yulciboi et 953 sont parmi les génotypes qui ont le taux (0,5 % à 1 %) le plus faible de réversion, alors que le cultivar 90 présente le taux le plus élevé (12 %) (Tableau I B).

Les cals embryogènes et non embryogènes sont maintenus à l'obscurité sur du milieu MS contenant 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D pour l'analyse ultérieure des isoenzymes.

## Régénération de plantes

Il est intéressant de noter que l'induction et la différenciation d'embryons somatiques chez la patate douce, ainsi que leur maturation nécessite la présence d'un niveau élevé d'auxine, du 2,4-D en particulier. En effet, la différenciation d'embryons somatiques de patate douce est obtenue par repiquage de cals embryogènes dans du milieu MS additionné de 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D et de 1  $\mu\text{M}$  de benzylaminopurine (BAP). La culture est d'abord maintenue à l'obscurité pendant une semaine puis exposée à la lumière. Les embryons globulaires apparaissent après 4 semaines de culture (Figure 2 D). Des exigences nutritionnelles similaires, comprenant notamment des concentrations élevées en auxines, sont requises pour l'induction et la formation d'embryons somatiques chez l'aubergine. Seule la phase de développement d'embryons matures en plantules ne nécessite pas la présence d'auxines [7]. Chez d'autres espèces, telles que la carotte [10] ou le maïs [8], la formation d'embryons somatiques comprend une courte phase d'induction sur un milieu riche en auxines, suivie d'un transfert sur un milieu qui en est dépourvu, ou en contient, mais à faibles concentrations.

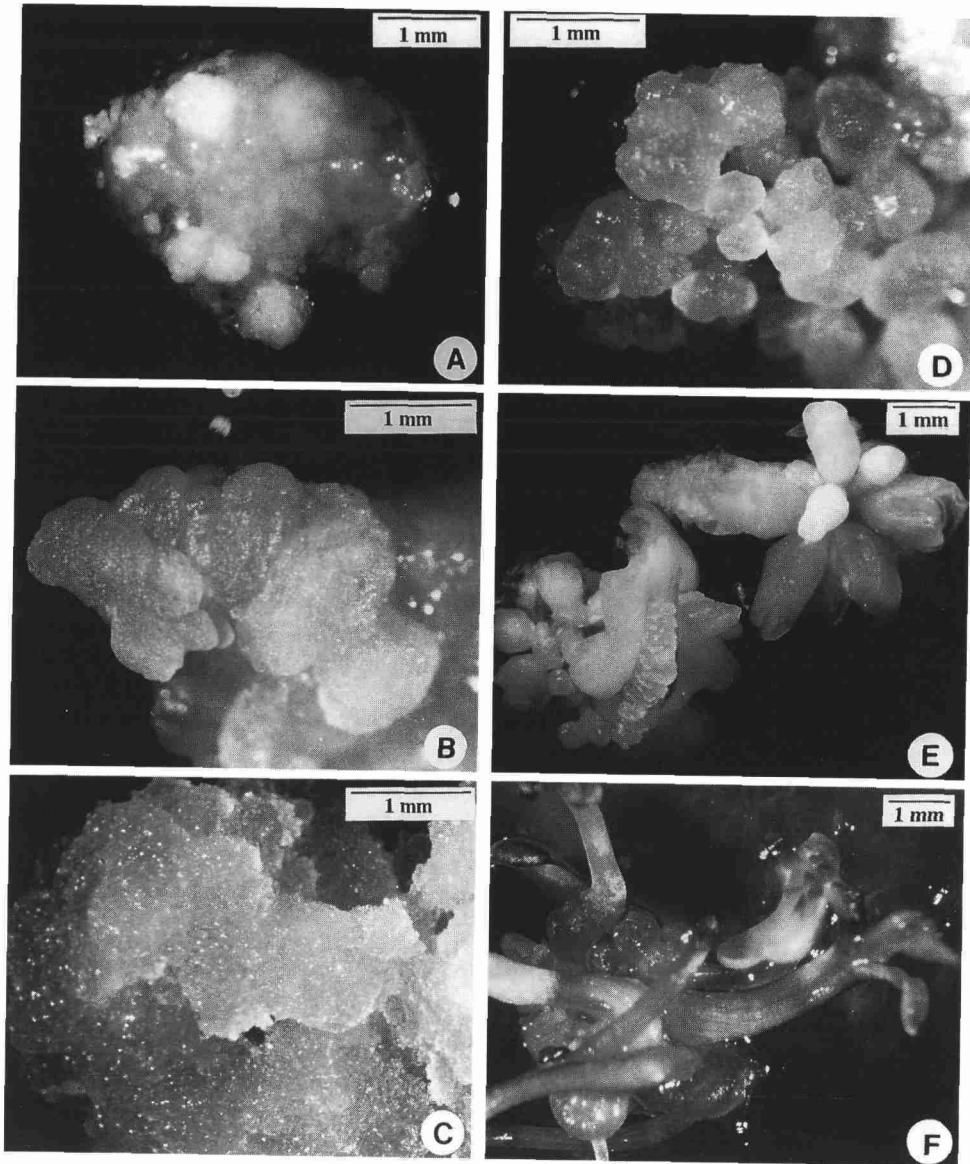
Dans cette étude, moins de 5 % d'embryons globulaires de patate douce sont capables de se développer en plantules à la suite de leur transfert dans un milieu dépourvu d'hormones. Cette observation semble indiquer que la plupart des embryons globulaires n'ont pas suffisamment évolué vers des stades plus développés, y compris en particulier les stades cotylédonnaires qui sont plus aptes à germer sur le milieu sans régulateur de croissance. Ainsi, le repiquage des embryons globulaires sur du milieu MS additionné d'une combinaison de 0,01  $\mu\text{M}$  de 2,4-D avec 0,01  $\mu\text{M}$  de kinétine pendant 3 semaines, suivi d'un transfert dans un milieu sans hormones améliore efficacement leur développement en embryons cotylédonnaires (Figure 2 E). Mais la réponse dépend du génotype testé. En effet, pour le cultivar 953, la fréquence de développement d'embryons globulaires en embryons cotylédonnaires est de 95 % ; elle n'est que de 24 % pour le cultivar 90. Les embryons somatiques au stade cotylédonnaire verdissent à la lumière. Ils sont plus aptes à former des plantules à raison de 3-5 plantules par cal comportant des embryons mis en culture (Figure 2 F). Les cals embryogènes ainsi obtenus chez plusieurs cultivars de patate douce, et leur capacité à régénérer des plantes sont constamment maintenus depuis plus de 3 ans de culture.

## Caractérisation par l'analyse des isoenzymes

Les isoenzymes sont facilement détectables et la variation de leurs activités est souvent associée à des différences génétiques et des modifications morphogénétiques, alors que l'évaluation du potentiel embryogène par observations morphologiques est toujours subjective. C'est pourquoi, dans cette étude, nous avons utilisé 4 systèmes d'isoenzymes pour caractériser les différents événements morphogénétiques survenus au cours de l'embryogenèse somatique chez la patate douce. Ce sont les estérases (Est, E.C.3.1.1.2), les peroxydases (Prx, E.C.1.11.1.7), les phosphatases acides (Acp, E.C.3.1.3.2) et les glutamates oxaloacétates transaminases (Got, E.C.2.6.1.1).

Quatre types de matériel végétal (la feuille, les cals embryogènes et non embryogènes, et les embryons somatiques au stade globulaire) issus de 3 génotypes (les cultivars 90, 953 et Quangshu) ont été caractérisés à l'aide des isoenzymes.

Chacun des 4 systèmes d'isoenzymes analysés permet de distinguer les 3 génotypes étudiés. De plus, ils montrent des différences dans leurs activités entre les différents types d'organisation, et en particulier entre les cals embryogènes et non embryogènes.



**Figure 2.** Embryogenèse somatique chez la patate douce. **A.** Cal mucilagineux à partir duquel émergent des cals compacts embryogènes ; **B.** Cal compact embryogène ; **C.** Cal friable non-embryogène ; **D.** Embryons somatiques globulaires ; **E.** Embryons somatiques cotylédonnaires ; **F.** Germination des embryons somatiques.

Le profil de bandes des estérases est complexe. Il comprend un très grand nombre de bandes, sans doute lié à l'état allohexaploïde de la patate douce (Figure 3 A). La feuille est caractérisée essentiellement par des bandes situées dans la zone de migration lente, c'est-à-dire les plus proches de la cathode. Les cals friables non embryogènes, à croissance rapide se distinguent des cals embryogènes par l'absence d'activité des estérases. Cependant, des activités sont observées au niveau de la zone de migration rapide chez les cals non embryogènes du cultivar 953. Elles sont toutefois différentes de celles des cals embryogènes du même génotype (Figure 3 A) par un nombre moins élevé de bandes. Peu de différence existe entre les cals embryogènes et les embryons globulaires, sauf pour le cultivar Quangshu dont le profil des estérases des cals embryogènes se distingue de celui des embryons globulaires par la présence de plus de bandes au niveau de la zone de migration rapide.

Pour les peroxydases, les cals friables non embryogènes se distinguent des cals embryogènes essentiellement par la présence d'activités au niveau de la zone de migration lente (Figure 3 B). Il y a peu de différence entre les cals embryogènes et les embryons globulaires. Ils sont essentiellement caractérisés par des bandes de migration rapide (Figure 3 B).

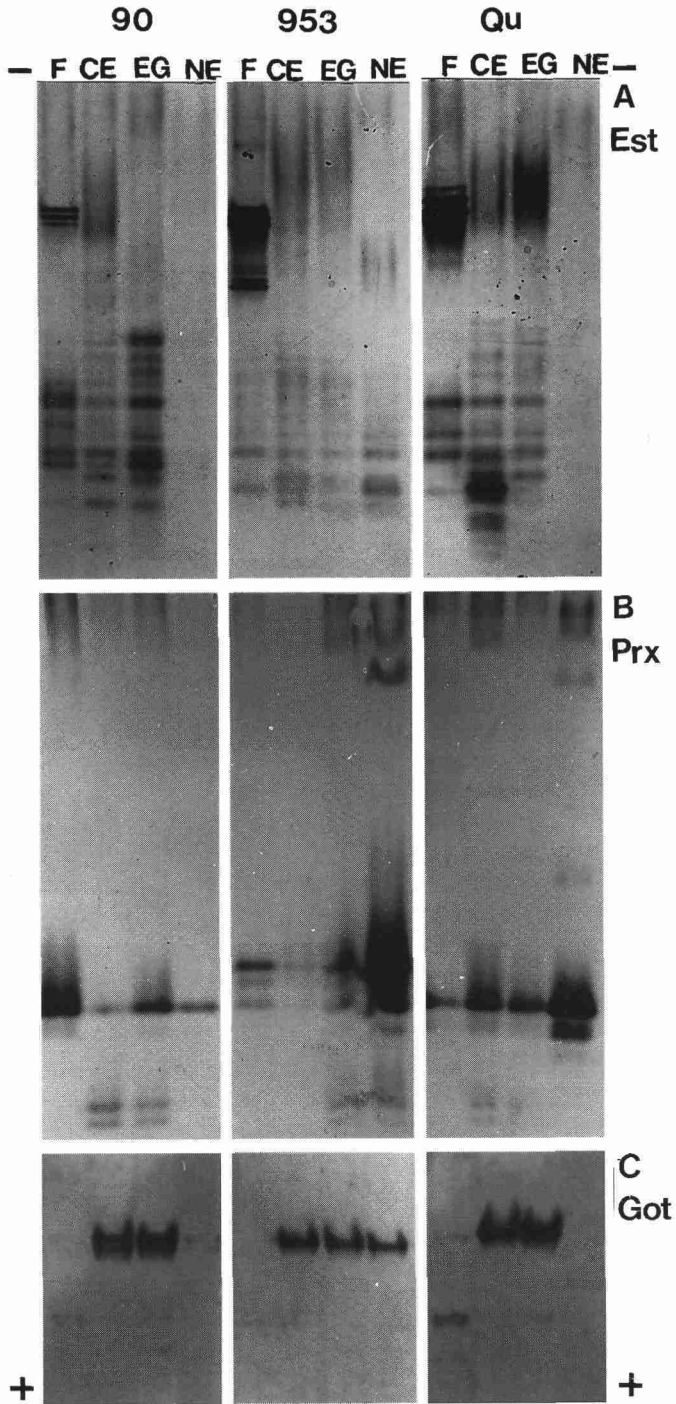
Pour les glutamates oxaloacétates transaminases (Got), la feuille est caractérisée par des bandes situées dans la zone de migration rapide. Les cals friables non embryogènes du cultivar Quangshu ne présentent aucune activité. En revanche, les génotypes 90 et 953 ont respectivement une faible et une intense activité au niveau de la zone de migration lente (Figure 3 C). Par ailleurs, les cals embryogènes et les embryons globulaires ont le même profil isozymique pour les 3 génotypes étudiés (Figure 3 C).

En ce qui concerne les phosphatases acides, les cals non embryogènes sont caractérisés par l'absence d'activités notamment chez les cultivars 90 et Quangshu, ou par une très faible activité chez le cultivar 953. Il y a peu de différence entre les cals embryogènes et les embryons globulaires. Les feuilles ont des activités intenses dans la zone de migration lente.

Dans cette étude, l'analyse des isozymes montre de grandes différences dans leurs activités entre les cals embryogènes et non embryogènes. En revanche, peu de changements ou aucune modification spécifique n'ont été observés entre les cals embryogènes et les embryons globulaires. Cela semble indiquer que les isozymes étudiées sont probablement impliquées dans l'organisation de cals plutôt que dans le processus de différenciation des embryons somatiques.

Il est également intéressant de noter que les activités des isozymes sont plus faibles ou absentes chez les cals friables non-embryogènes, comparées à celles des cals embryogènes. Cette situation est non seulement due à la différence de quantité de protéines qui est de 20 % à 30 % plus faible dans les cals friables non-embryogènes (Tableau II), mais elle peut être aussi liée à une activité faible ou nulle des isozymes dans les cals non embryogènes. Des résultats similaires ont été constatés chez les cals embryogènes et non embryogènes de maïs [6].





**Figure 3.** Les profils isozymiques de feuille (F), de cals embryogènes (CE), non embryogènes (NE), et d'embryons globulaires (EG) de 3 cultivars de patate douce (90, 953 et Quangshu). **A.** Les estérases (Est) ; **B.** Les peroxydases (Prx) ; **C.** Les glutamates oxaloacétates transaminases (Got).

**Tableau II.** Teneur en protéines (mg / 100 mg de MF) dans la feuille (F), les cals embryogènes (CE), non embryogènes (NE), et les embryons globulaires (EG) chez les cultivars 90, 953 et Quangshu.

Génotype	90				953				Quangshu			
	F	CE	EG	NE	F	CE	EG	NE	F	CE	EG	NE
Teneur en protéines	1,5±0,2	1,5±0,3	1,3±0,2	1,1±0,2	1,3±0,2	1,4±0,2	1,6±0,3	1,2±0,1	1,3±0,2	1,6±0,3	1,5±0,4	1,0±0,2

## Conclusion

Cette étude présente divers systèmes de régénération chez la patate douce. Bien que la micropropagation soit très bien maîtrisée, la régénération chez cette plante montre encore des difficultés affectant la culture des cals secondaires ou des protoplastes. La voie de l'embryogenèse somatique paraît alors la plus reproductible et efficace pour la régénération chez la patate douce, car elle permet d'assurer en permanence un taux élevé et inégalable de multiplication d'individus sains, juvéniles et homogènes. En plus, les tissus embryogènes constituent sans doute un matériel compétent, possédant un potentiel organogène élevé pour la régénération des protoplastes. Cette potentialité morphogénétique devrait faciliter l'accès à de nouvelles techniques, notamment la fusion cellulaire et la transformation, qui doivent être désormais incluses dans les programmes de sélection de patate douce.

*Remerciements :* Les auteurs remercient la Communauté Européenne et l'AUEPLF pour l'intérêt porté à ce travail et le soutien financier.

## Références

1. Bidney DL, Shepard JF (1980). Colony development from sweet potato petiole protoplasts and mesophyll cells. *Plant Sci Lett* 18 : 335-342
2. Bouhassan A (1984). Analyse du polymorphisme des néoformations obtenues *in vitro* à partir de divers tissus de patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Convolvulacées). Thèse 3<sup>e</sup> Cycle, Université Paris-Sud, Orsay, 167p.
3. Cavalcante Alves JM, Sihachkr D, Allot M, Tizroutine S, Mussio I, Servaes A, Ducreux G (1993). Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Plant Cell Rep* 13 : 437-441.
4. Chée RP, Cantliffe DJ (1988). Somatic embryony patterns and plant regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. *In vitro Cel Dev Bot* 24 : 955-958.
5. FAO (Food and Agriculture Organization) (1989). *Production yearbook*, Rome, Italy : 139.
6. Franz PF, De Ruijter NCA, Schel JHN (1989). Isozymes as biochemical and cytochemical markers in embryogenic callus cultures of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep* 8 : 67-70.
7. Gleddie S, Keller WA, Setterfield G (1986). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Solanum melongena* (eggplant). *Can J Bot* 64 : 355-361.

8. Green CE, Phillips RL (1975). Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Sci* 15 : 417-421.
9. Gunckel JE, Sharp WR, Williams SB, West WC, Dinkwater WO (1972). Root and shoot initiation in sweet potato explants as related to polarity and nutrient media variation. *Bot Gaz* 133 : 254-262.
10. Halperin W, Wetherell D (1964). Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. *Am J Bot* 51 : 274-283.
11. Hattori T, Nakagawa T, Maeshima M, Nakamura K, Asahi T (1985). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for sporamin, the major soluble protein of sweet potato tuberous roots. *Plant Mol Biol* 5 : 313-320.
12. Jarret RL, Salazar S, Fernandez ZR (1984). Somatic embryogenesis in sweet potato. *Hort Science* 19 : 397-398.
13. Kokubu T, Sato M (1988). Isolation and culture of petiole protoplasts of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. and its related species. *Mem Fac Agr Kagoshima Univ* 24 : 83-89.
14. Liu JR, Cantliffe DJ (1984). Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.). *Plant Cell Rep* 3 : 112-115.
15. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
16. Murata T, Hoshino K, Miyazi Y (1986). Plant regeneration from protoplasts of sweet potato. *Japan Breed* 36 : 236-237.
17. Otani M, Shimada T, Niizeki H (1987). Mesophyll protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Sci* 53 : 157-160.
18. Sehgal CB (1978). Regeneration of plants from anther cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir). *Z Pflanzenphysiol* 88 : 349-352.
19. Sihachakr D (1982). Premiers résultats concernant la multiplication végétative *in vitro* de la patate douce (*Ipomoea batatas* Lam., Convolvulacées). *Agr Trop* 37 : 142-151.
20. Sihachakr D, Ducreux G (1987). Isolement et culture de protoplastes de deux variétés de patate douce (*Ipomoea batatas* Lam.). *Can J Bot* 65 : 192-197.
21. Sihachakr D, Ducreux G (1987). Plant regeneration from protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). *Plant Cell Rep* 6 : 326-328.
22. Sihachakr D, Ducreux G (1993). Regeneration of plants from protoplasts of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry* Vol. 23. Plant protoplast and genetic engineering IV, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg : 43-59.
23. Tsay HS, Tseng MT (1979). Embryoid formation and plantlet regeneration from anther callus of sweet potato. *Bot Bull Acad Sinica* 20 : 117-122.
24. Wu YW, Ma TP (1979). Isolation, culture and callus formation of *Ipomoea batatas* protoplasts. *Acta Bot Sinica* 21 : 335-338.
25. Yang TH, Tsai YC, Hseu CT, Ko HS, Chen SW, Blackwell RQ (1975). Protein content and its amino acid distribution of locally produced rice and sweet potato in Taiwan. *J Chinese Agric Chem Soc* 13 : 132-138.



# 28

## **Propagation *in vitro* du pêcher-amandier GF-557**

A. GHORBEL, A. CHATIBI, A. MLIKI, M.E. KCHOUK, H. ZEMNI

*INRST, Laboratoire de Culture in vitro, BP 95, Hammam-Lif. 2050, Tunisie.*

### **Résumé**

*L'hybride pêcher-amandier GF-557 est employé en Tunisie pour la culture du pêcher. Il présente une bonne compatibilité en pépinière, nécessite un greffage tardif et résiste aux nématodes de type méloïdogyne, à la chlorose et surtout à la sécheresse. La multiplication végétative conforme par bouturage ligneux, semi-ligneux et herbacé présente deux problèmes majeurs, à savoir :*

*– le faible pourcentage de réussite du bouturage suite à la difficulté d'enracinement des boutures,*

*– une importante dissémination de maladies d'origine fongique, bactérienne et surtout virale par la diffusion de matériel contaminé.*

*Ces deux difficultés au moins ont justifié le recours à la technique de culture in vitro. La maîtrise de la production à petite échelle puis à grande échelle du GF-557 in vitro a nécessité la mise au point de milieux de prolifération et d'enracinement. En dépit des phénomènes de vitrification et de jaunissement des pousses, le taux de multiplication demeure satisfaisant et atteint la valeur moyenne de 8. Les pousses issues des bourgeons axillaires se ramifient très rapidement par débourrement des axillaires de deuxième ordre. L'obscurité améliore la qualité et la quantité des racines. En effet, en absence de lumière, l'auxine paraît plus active en phase de préinitiation et d'initiation des racines. Le passage à la lumière en absence d'hormone permet d'améliorer la vigueur des vitroplants après l'apparition de signes d'étiollement. L'étude du comportement des vitroplants en serre d'acclimatation a révélé des difficultés d'ordre patholo-*

gique et physiologique. Les tests sérologiques par ELISA ont permis de démontrer l'absence totale des virus connus chez l'hybride GF-557.

Le porte-greffe GF-557 est un hybride pêcher-amandier obtenu à partir d'un amandier de semis et « shalil », un pêcher originaire du Pakistan [7, 12]. Employé pour la culture du pêcher, le GF-557 présente une bonne compatibilité en pépinière et nécessite un greffage tardif. Il est nettement plus vigoureux que le pêcher franc, il est résistant aux nématodes de type méloïdogyne (*M. incongnita*, *M. javanica*, *M. arenaria*), à la chlorose ferrique et surtout à la sécheresse. Cet hybride est très conseillé pour l'Afrique du Nord [7, 12].

En Tunisie, une enquête effectuée auprès des pépiniéristes révèle un besoin pressant en porte-greffe pêcher-amandier GF-557. C'est ainsi que les demandes s'élèvent à 200 000 plants par an. Le GOVPF (Groupement obligatoire des viticulteurs et producteurs de fruits) importe à lui seul par an 50 000 vitroplants d'un autre porte-greffe, le GF-677, dont 20 000 sont aussi produits localement par bouturage. C'est dire que les besoins sont importants en quantité, mais aussi en qualité, puisque les plants importés sont des GF-677 et non des GF-557 très appréciés par les pépiniéristes tunisiens.

Le mode de multiplication du GF-557 par semis est très rarement employé en raison de la grande hétérogénéité qu'il peut induire. En revanche, la mise en place d'une multiplication végétative conforme a retenu l'attention des pépiniéristes. C'est ainsi que ce porte-greffe a été multiplié par bouturage ligneux, semi-ligneux et herbacé [2]. Toutefois, deux problèmes majeurs peuvent découler de ce mode de multiplication :

- d'une part, un faible pourcentage de réussite du bouturage, suite aux difficultés d'enracinement des boutures,
- d'autre part, le risque de dissémination de maladies d'origine fongique, bactérienne et surtout virale par suite d'une propagation végétative de matériel infecté.

L'objectif de notre travail consista d'abord à améliorer les taux de multiplication et d'enracinement. La réussite de l'étape d'enracinement et la qualité des racines obtenues sont déterminantes dans la valeur économique du produit obtenu. Par ailleurs, nous serons amenés à maîtriser tous les aléas de la production industrielle *in vitro* du porte-greffe fruitier.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Le pêcher-amandier GF-557 est un hybride entre le pêcher (*Prunus persica* Batsch L.) et l'amandier (*Prunus amygdalus*). Le plant de départ est un pied-mère pêcher-amandier GF-557 certifié conforme.

### Désinfection

Des baguettes de  $\pm 20$  cm sont prélevées sur le pied-mère pendant le mois de mai, période où le GF-557 est physiologiquement actif. Elles sont débarrassées de leurs feuilles et nettoyées à l'eau savonnée. Elles sont ensuite frottées à l'aide d'un coton imbibé d'alcool à 70° puis de Mercryl Laurylé pur. Après morcellement, les fragments contenant 4 à 5 nœuds sont trempés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 8°

de Chlore additionnée de Tween 20 à 0,1 % pendant 15 minutes et sous agitation continue. Enfin, trois rinçages à l'eau stérile sont effectués pour enlever toute trace d'hypochlorite de sodium. Les boutures et apex sont ainsi prêts à la mise en culture *in vitro* (Figure 1).

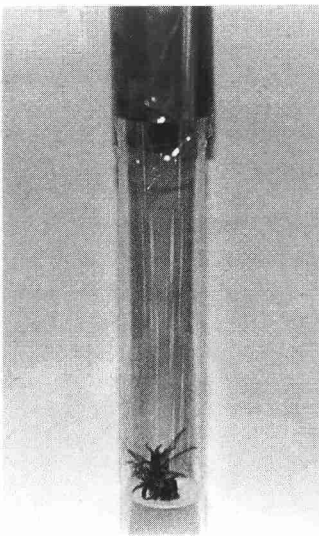
## Conditions de culture

Le pH des milieux de culture est ajusté à 5,6 par addition d'acide chlorhydrique (1N) ou d'hydroxyde de potasse (1N) avant autoclavage à 116 °C pendant 24 minutes. Les flacons de culture vides, tubes ou bocaux, subissent un autoclavage de deux heures à 116 °C. Après ensemencement sous la hotte à flux laminaire, à raison de 10 pousses (phase de multiplication) à 20 (phase d'enracinement) par bocal, les flacons sont placés dans la chambre de culture sous une intensité lumineuse de 12 W.m<sup>-2</sup> assurée par des tubes fluorescents. La photopériode est de 12 heures. La température est de 23 °C le jour et de 19 °C la nuit.

## Milieux de culture

### Prolifération intense

Les petites pousses obtenues à partir des apex ou des boutures implantés sont transférées sur les milieux de multiplication M1 ou M2 (Tableau I). L'utilisation de ces deux milieux de culture s'est effectuée d'une manière alternative tous les 21 jours afin d'éviter le phénomène d'accoutumance et de faire profiter les explants de substances minérales et organiques de nature et de concentration variable. Pour les différents milieux de culture, qu'il s'agisse de l'étape d'initiation ou du stade de prolifération, le sucre



**Figure 1.** Bourgeonnement obtenu à partir d'une bouture de GF-557 cultivée sur milieu MS contenant 2 mg.l<sup>-1</sup>BAP.

utilisé est soit le saccharose, soit le glucose, et ce, en fonction du comportement des plants *in vitro*.

### **Enracinement**

Pour l'enracinement, les plants sont individualisés et repiqués sur le milieu de culture M3 (Tableau II). Ils sont placés à l'obscurité totale pendant 5 jours, comme phase d'induction et d'initiation des racines. Les plants sont ensuite transférés sur le milieu de culture M4 dépourvu d'hormones, à la lumière avec une photopériode de 12 heures.

### **Acclimatation**

Dans le but d'adapter progressivement les plantules au milieu *ex vitro*, nous avons mis au point une étape de préacclimatation. La technique consiste à ouvrir légèrement les couvercles des bocaux de culture dès la fin de l'étape d'enracinement. Les plantules sont extraites de leurs bocaux de culture et séjournent trois à quatre jours en chambre de culture dans des cristallisoirs contenant un coton imbibé de solution nutritive composée des sels minéraux de MS [11], le cristallisoir demeurant couvert d'une feuille de cellophane (cellofrais). Les plantules bien développées passent à la serre d'acclimatation. Elles sont lavées et débarrassées de leur gélose puis traitées par deux fongicides : le benlate à 0,6 g.l<sup>-1</sup> et l'aliète à 2,5 g.l<sup>-1</sup>. Elles sont empotées sur un substrat terreux composé de 30 % de tourbe, 30 % de sable et 40 % de terreau contenant de la laine de roche. A l'intérieur de la serre, la température est fixée à 22° C. L'ombrage est assuré par une toile tendue sous le vitrage. Les conditions de croissance des plantes dans la serre sont progressivement rapprochées des conditions naturelles. Des traitements préventifs par des insecticides (karaté à 0,75 mg.l<sup>-1</sup>) sont administrés tous les 15 jours durant toute la phase d'endurcissement.

## **Résultats et discussion**

### **Prolifération intense *in vitro***

Tous les 21 jours de culture, une partie des pousses obtenues est transférée dans des bocaux de 250 ml contenant 70 ml de milieu de culture M1 à raison de 8 à 10 pousses par bocal, et ce, tout au long de la phase d'instauration de l'état juvénile qui dure 70 jours, soit trois à quatre subcultures. Nous avons remarqué que les pousses ont des difficultés à s'adapter à l'environnement des bocaux, comme en témoigne la rapide diminution de leur croissance. De plus, le nombre de pousses vitreuses augmente et la formation de cal est très marquée. Paradoxalement, on constate un léger allongement des pousses et un feuillage dense à l'image de ce que nous observons chez le pied-mère. Après trois ou quatre repiquages successifs sur M1, et en prenant soin d'éliminer à chaque fois les pousses vitrifiées, nous avons constaté que les pousses se différencient de plus en plus, présentant une miniaturisation des feuilles qui prennent une forme lancéolée caractéristique. Le taux de multiplication s'améliore progressivement. Ainsi, après le quatrième repiquage, les plants présentent à leur base deux à quatre pousses de taille très variable allant jusqu'à 2 cm de longueur. Ces pousses correspondent au développement des bourgeons axillaires. A partir de ce stade, nous procédons à la culture des nœuds et



**Tableau I :** Composition des milieux de culture, phase de multiplication.

Substances	Milieux	M1 mg.l <sup>-1</sup>	M2 mg.l <sup>-1</sup>
Macro-éléments		LQ	MS*
Micro-éléments		LQ	MS
Vitamines		MS	MS
Fe-EDTA (Koch-Light)		20	20
Myo-inositol		100	100
BAP		0,6	0,3
AIB		0,2	0,1
GA3		0,2	0,1
Sucre (saccharose/glucose)		30 000	30 000
Agar		8 000	8 000

LQ : Lepoivre et Quoirin, 1977.

MS : Murashige et Skoog, 1962.

MS\* : La concentration en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  est diluée au quart.

**Tableau II :** Composition des milieux de culture, phase d'enracinement.

Substances	Milieux	M3 mg.l <sup>-1</sup>	M4 mg.l <sup>-1</sup>
Macro-éléments		MS	MS
Micro-éléments		MS	MS
Vitamines		MS	MS
Fe-EDTA (Koch-Light)		20	20
Myo-inositol		100	100
ANA		0,5	–
Saccharose		30 000	30 000
Agar		8 000	8 000

ce, dans le but d'améliorer de façon significative le taux de multiplication qui varie alors entre 6 et 8. Dans ces conditions, une pousse composée de 4 à 6 nœuds est subdivisée en 4 à 6 explants, correspondant chacun à un nœud. Pour cette culture, l'emploi du glucose comme source de carbone est préférée au saccharose. Notons qu'avec un bocal contenant au départ 25 nœuds, nous avons obtenu, au bout de trois semaines, l'équivalent de 6 à 7 bocaux, soit 170 nœuds. Les pousses issues des bourgeons axillaires se ramifient très rapidement par débourement des axillaires de deuxième ordre (Figure 2).

Au cours de cette phase de multiplication, les problèmes liés aux phénomènes de jaunissement des pousses, de callogenèse à la base des explants, et de vitrification des plants ont été contournés par l'utilisation de dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) à raison de 90 mg/l et par l'alternance des milieux de culture MS [11] et LQ [8].



**Figure 2.** Prolifération intense de GF-557 *in vitro* (à droite) et apparition de jaunissement des pousses cultivées sur M2 (à gauche).

### Phase d'enracinement

Le but principal est d'obtenir des racines qui donnent satisfaction tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif.

A la fin de la phase de prolifération, les pousses de taille égale ou supérieure à 1,5 cm sont individualisées et repiquées sur le milieu d'enracinement M3 contenant 0,5 mg.l<sup>-1</sup> ANA (Tableau III). Les concentrations élevées en ANA donnent naissance à un gros cal à la base des pousses. Les racines obtenues sont longues et ramifiées (Figure 3).

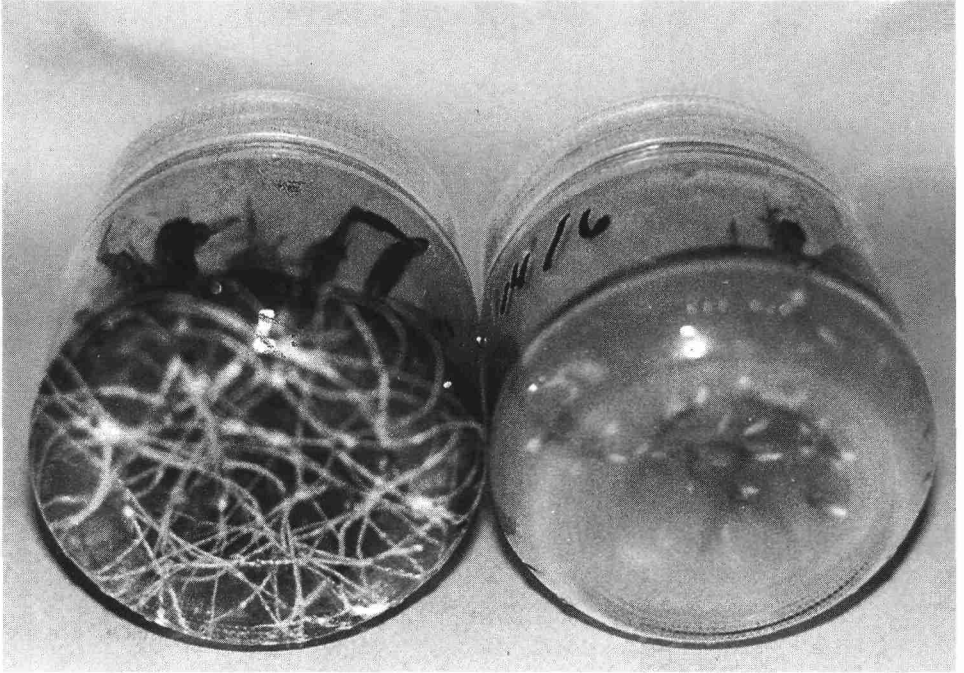


**Figure 3.** Phase d'enracinement de plants de GF-557 sur milieu M4 riche en ANA ( $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ).

En dépit du fait que le pourcentage d'enracinement avoisine les 100% à la lumière ou à l'obscurité lorsque la concentration en ANA est égale à  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ , l'apparition des racines est plus rapide à l'obscurité. Celles-ci sont courtes, très épaisses et présentent des signes d'oxydation en lumière continue (Figure 4). Toutefois, la qualité des pousses est légèrement affectée à l'obscurité en raison de leur étiolement. Ce phénomène est réversible dès le passage à la lumière.

Contrairement aux observations effectuées par plusieurs auteurs [4, 5], la lumière ne semble pas déterminante dans l'induction ou l'initiation des racines du GF-557. Au contraire, un passage de 5 jours à l'obscurité permet l'induction et l'initiation rapide des racines chez le porte-greffe GF-557. Ces résultats rejoignent globalement ceux mentionnés par Mosella *et al.* [10], Moncousin [9] et Gaspar [6]. Il apparaît donc que l'auxine pourrait être plus active lorsque les plantules séjournent pendant 5 jours à l'obscurité. Le passage, ensuite, sur milieu M4 dépourvu d'hormones éviterait la rétroinhibition des racines par les auxines [6, 10].

Le meilleur pourcentage d'enracinement obtenu en utilisant de l'AIB comme auxine dans le milieu de culture ne dépasse pas 60% (Tableau III). Cette étape d'enracinement était fondamentale pour la suite de nos travaux concernant la reprise en terre des vitroplants. Ainsi, l'obtention d'un système racinaire développé pourrait lever toute ambiguïté quant à la reprise des plants en serre d'acclimatation.



**Figure 4.** Influence de la lumière sur la qualité des racines obtenues lorsque les pousses sont cultivées cinq jours à l'obscurité totale (à gauche) ou en lumière continue (à droite).

**Tableau III :** Influence de la nature des hormones sur le pourcentage d'enracinement du GF-557.

		Conc. mg.l <sup>-1</sup>						
Hormones		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1,0	1,5
AIB	N*	0	0	0	18	18	2	1
	%	0	0	0	60	60	7	3
ANA	N*	0	6	15	21	29	18	12
	%	0	2	52	72	96	60	40

N\* : nombre de pousses racinées sur 30 plantules testées.

% : pourcentage de pousses racinées.

### Phase d'acclimatation

#### • Préacclimatation

Après environ un mois de séjour sur le milieu d'enracinement, les plantules atteignent une taille de 7 à 8 cm avec un système racinaire bien développé. Ces plantules sont

ensuite retirées des bocaux, puis soigneusement débarrassées de la gélose, afin d'éviter le développement des micro-organismes pathogènes. L'ouverture graduelle de la feuille de cellophane permet aux plantules de s'adapter à l'air ambiant, ce qui se traduit par un verdissement significatif et un allongement important des plantules (10 à 12 cm) au bout de trois à quatre jours de séjour *ex vitro*. Ainsi, la plantule se prépare à un fonctionnement autotrophe. Nous avons également remarqué l'apparition de nouvelles racines indispensables pour la réussite de l'étape d'acclimatation en serre (Figure 5).

• **Acclimatation en serre**

Globalement, les pertes les plus sensibles ont été remarquées en serre deux à trois semaines après transfert des plantules en serre sur substrat terreux. Elles commencent d'abord par flétrir, puis se nécrosent, laissant des signes indicateurs de la pourriture du collet et des lésions sur la tige. Dans certains cas, malgré le traitement anti-botrytis à base de bénomyl ou de thiophanate au moment et après l'empotage des plants, ces signes de dépérissement persistent. Nous avons également noté le problème du blocage de croissance des plants (Figure 6).

Nos recherches ont été orientées pour mettre en évidence les causes principales des pertes constatées lors du transfert du GF-557. Nous avons étudié :

- la qualité des racines ainsi que la vigueur des plants sortis des bocaux de culture,
- les facteurs abiotiques comme le substrat terreux, la température et l'humidité,
- les facteurs biotiques tels que les micro-organismes (champignons et bactéries).

Nous avons constaté que, lorsque le sevrage est réalisé en période chaude, aux mois de juin, juillet et août (Tableau IV), les taux de reprise sont considérablement affectés (60 %). Cela est essentiellement lié aux températures élevées ( $\geq 25^\circ \text{C}$ ) favorables au développement excessif des champignons pathogènes (botrytis et rhizoctonia). Les pertes sont supérieures lorsque les plantules présentent une certaine fragilité ou sensibilité causée par les cassures involontaires des racines au moment du rempotage.

**Tableau IV :** Variation des pourcentages de reprise du porte-greffe GF-557 en fonction de la date de sortie des plantules.

Mois	Nb. vitroplants empotés	Nb. de vitroplants ayant repris	Pourcentage de reprise
Décembre	150	145	97
Janvier	150	125	83
<b>Juin</b>	4 000	2 380	<b>59</b>
<b>Juillet</b>	8 000	4 964	<b>62</b>
<b>Août</b>	6 000	3 636	<b>61</b>
Septembre	2 000	1 368	68



**Figure 5.** Étape de préacclimation avant le transfert des vitroplants à la serre.



**Figure 6.** Comportement des plants de GF-557 en serre d'acclimation.

## Assainissement viral

A côté des bactéries et des champignons, les virus sont à l'origine de nombreuses maladies et anomalies présentant des symptômes variables et qui sont généralement incurables.

Ces virus entraînent rarement la mort de la plante mais provoquent le plus souvent un affaiblissement des rendements et une dégénérescence de la plante virosée [3].

L'assainissement par voie méristématique du GF-557 demeure une voie longue (6 mois) et dépend étroitement de la taille du méristème prélevé. C'est pourquoi nous avons été amenés à tester le clone produit *in vitro*.

Par des tests ELISA, effectués au laboratoire de protection des plantes de l'Université de Bari, nous avons recherché les cinq virus les plus répandus chez les arbres fruitiers, à savoir : Sharka (Plum pox virus), ApCLSV (*Apple Chlorotic Leaf Spot Virus*), PNRSV (*Prunus Necrotic Ring Spot Virus*), PDV (*Prune Dwarf Virus*) et ApMV (*Apple Mosaic Virus*). Les tests révèlent que tous les échantillons GF-557 sont indemnes de ces virus. Ce résultat montre l'intérêt de l'emploi des méristèmes pour la production de plants indemnes de virus.

## Conclusion

La maîtrise de la production à petite échelle de GF-557 *in vitro* a nécessité la mise au point de milieux de prolifération ou d'enracinement et l'amélioration de la qualité des pousses racinées. L'obscurité semble obligatoire pour améliorer la quantité et la qualité des racines. Elle devient alors inutile, voire nocive lors de la phase de post-initiation, d'où l'intérêt d'utiliser un milieu de culture dépourvu d'hormones. Le passage à la lumière permet d'améliorer la vigueur des vitroplants après l'apparition des signes d'étiollement.

L'étude des vitroplants en serre d'acclimatation a révélé des difficultés d'ordre pathologique et physiologique. Les températures dépassant les 22 °C provoquent une diminution considérable du pourcentage de reprise des vitroplants.

Les tests sérologiques par ELISA ont permis de confirmer le maintien d'un bon état sanitaire des plants de pêcher-amandier GF-557 produits *in vitro*. Les cinq virus les plus répandus chez les arbres fruitiers n'ont pas été révélés sur les vitroplants régénérés *in vitro*.

Toutefois, le problème crucial demeure toujours l'établissement d'un calendrier de production industrielle qui tiendra compte aussi bien de la date de livraison aux pépiniéristes que de la période d'acclimatation des vitroplants. Ainsi, l'amélioration de la production *in vitro* ne justifie l'extension du système de multiplication à une échelle industrielle que si le calendrier de production répond aux exigences techniques et commerciales. Dans ces conditions, la technique de culture *in vitro* devient rentable. Il serait intéressant de suivre le comportement de ces plants en plein champ et d'évaluer l'incidence de l'état sanitaire sur l'augmentation de la vigueur et du rendement des clones régénérés.

## Références

1. Barghchi M, Alderson PG (1989). Pistachio (*Pistacia vera* L.). In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 5 : Trees II, 68-98.
2. Bernard R, Grassely C (1981), Le pêcher-amandier. INRA, Bordeaux. *Arboriculture fruitière*, n° 328 : 38-43.
3. Bigre JP, Morand JC, Tharoud T (1986). *Pathologie des cultures florales et ornementales*. Tech. et Doc. JB Baillière, Paris, 237 p.
4. Côte F, Domergue R, Folliot M, Bourrin J, Marte F (1991). Micropropagation *in vitro* de l'ananas. *Fruits*, II. Vol. 46.
5. Escalant JV (1987). Les bananiers diploïdes en culture *in vitro* (*Musa acuminata* et *Musa balbisianna*) : étude du comportement et recherche de variabilité. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, France, 174 p.
6. Gaspar T (1988). Aspects physiologiques de l'organogenèse *in vitro*. In : *Culture de cellules, tissus et organes végétaux*. Presses Polytechniques Romandes, Suisse.
7. Gautier M (1982). Le pêcher et sa culture. CTIFL. Documentation n°340 (1<sup>re</sup> partie) : 49-54.
8. Lepoivre P, Quoirin M (1977). Étude des milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Hort* 78 : 437-442.
9. Moncousin C (1982). Contribution à la caractérisation biochimique et physiologique de la phase juvénile de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) au cours de sa multiplication végétative conforme et accélérée en culture *in vitro*. Thèse de Doctorat Ingénieur. Université Paris-Sud. Centre d'Orsay, 209 p.
10. Mosella CL, Macheix JJ, Jonard R (1980). Les conditions du microbouturage *in vitro* du pêcher (*Prunus persica* Batsch.) : influences combinées des substances de croissance et de divers composés phénoliques. *Physiol Veg* 18 : 597-608.
11. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
12. Vidaud J, Jacoutet I, Thiveno J (1987). *Le pêcher : références et techniques*. CTIFL, 445 p.



## 29

### **Les effets de la phytohémagglutinine (PHA) dans la culture *in vitro* végétale**

M. KHOSROWCHAHLI, S.A. GAËM-MAGAMIE

*Laboratoire de Génétique, Faculté des Sciences, Université de Tabriz, Iran.*

#### **Résumé**

*Les effets mitogènes de la phytohémagglutinine (PHA) ont déjà été démontrés sur les cellules animales et quelques espèces végétales (Phaseolus). Dans nos études, ces effets sur les tissus du tabac, Nicotiana tabacum L. var. Basmacerisse 31, en culture in vitro, en utilisant le milieu de culture de Murashig et Skoog n'ont pu être démontrés. En revanche, nous avons constaté une interaction positive entre la forme P de la phytohémagglutinine avec le 2,4-dichlorophénoxyacétique acide (2,4-D), et la benzyladenine (BA) aux concentrations : 0,1 ppm BA ; 0,1 ppm 2,4-D et 1 ou 2 ppm PHA (P) ; pour les poids frais et secs des cals. De plus, on a constaté chez les explants une potentialité supérieure à la formation du cal et à l'organogenèse pour les concentrations ci-dessus par rapport aux autres concentrations utilisées.*

La lectine est le nom généralement attribué aux glycoprotéines qui peuvent agglutiner les globules rouges sanguins. Ces produits diffèrent les uns des autres par le poids moléculaire, le type des acides aminés, les métaux qu'ils contiennent et la conformation spatiale. On les extrait, à partir des différentes espèces végétales, de la graine, de la racine et de la partie corticale des plantes adultes. On peut encore les extraire des bactéries, des champignons, des œufs de poissons et des membranes cellulaires des mammifères, etc. La lectine extraite du germe du blé a été utilisée pour distinguer les cellules normales des cellules malignes [2, 4].

Les effets mitogènes de la PHA ont été démontrés pour la première fois en 1960 [10].

La PHA est une lectine extraite du haricot à graines rouges. Les effets les plus importants de la PHA sont la stimulation de la division des leucocytes aux taux de concentration situés entre 1 à 5 µg/lit dans le milieu de culture *in vitro* [12]. En ajoutant ce produit au milieu de culture des leucocytes, on constate un changement dans la structure de la membrane cytoplasmique, ce qui conduit à une modification dans la perméabilité de celle-ci ; de plus, d'autres changements se produisent, comme l'augmentation de la synthèse des phospholipides, l'acétylation et la phosphorylation des histones et d'autres protéines nucléaires. En général, dix à vingt heures après l'introduction de la PHA dans le milieu de culture, la synthèse de l'ARN et des protéines augmente ; la synthèse de l'ADN commence après 48 heures et la cellule entre alors dans la phase de division [12].

Le poids moléculaire de la PHA a été estimé à environ 115 000 + 4 500 daltons où les hydrates de carbone présentent une proportion de 10 % [12].

Les données concernant les effets des lectines sur les cellules et les tissus végétaux sont rares. Sous les effets de la PHA, on a constaté une accélération de la germination chez *Phaseolus coccineus* L. tandis qu'elle n'agit pas sur *P. vulgaris* L. Chez *Allium cepa* L., aux températures en dessous de 20 °C, la PHA accélère la croissance des racines. On a constaté que, chez cette espèce, l'augmentation des pourcentages de divisions cellulaires est en relation avec la concentration de la PHA. La production des fruits parthénocarpiques chez la tomate mâle stérile et la poire (variété Bartelette) a été constatée sous l'effet de la PHA [3]. On a également mis en évidence une différence significative pour la vitesse de la germination des grains de pollen chez *Lolium longiflorum* L. sous l'effet de la PHA [13].

La lectine extraite du soja augmente le nombre, le poids des cellules et la synthèse de l'ADN dans les tissus de cette espèce. Ces trois paramètres donnent une idée des effets mitogénétiques des lectines [5]. La relation entre le niveau de la lectine intracellulaire et la différenciation cellulaire au niveau de la culture des tissus est aussi démontrée [8]. De plus, on a constaté que le niveau de la lectine intracellulaire au stade de la formation du cal est plus faible qu'au stade de l'organogenèse [8].

Comme les effets de la PHA ont été généralement étudiés sur les cellules et les tissus du genre *Phaseolus*, nous avons donc repris ce travail pour étudier ces effets sur un autre genre végétal.

## Matériel et méthodes

Nous avons utilisé les tissus provenant du tabac *Nicotiana tabacum* L. var. Basmacerisse 31 reçu du centre d'amélioration du tabac de l'Ourmieh (Azerbaïdjan de l'ouest/Iran). Les explants des feuilles ont été prélevés à partir des feuilles situées au niveau de la deuxième ou de la troisième feuille des plantes cultivées en serre. Le poids des explants était de 0,02 g pour un diamètre d'un centimètre. Utilisant le milieu de culture de M.S. [14], le 2,4-D et la BA ont été supplémentés en tant que sources d'auxines et de cytokinine, ainsi que deux formes de la PHA. Les concentrations choisies sont indiquées dans le Tableau I.

**Tableau I.** Niveau de la concentration des produits utilisés.

Produits	Concentrations	
	2,4-D	0,1 ppm
BA	0,1 ppm	1 ppm
PHA (M)	0, 1, 2, 3, ppm	
PHA (P)	0, 1, 2, 3, 4, ppm	

Comme la PHA est un produit thermosensible, on a donc utilisé une membrane de 0,2  $\mu$  pour la stériliser. Le pH des milieux de culture a été ajusté à  $5,7 \pm 0,1$ .

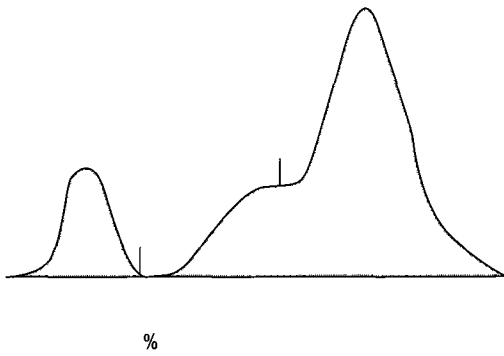
Le poids frais, le poids sec, ainsi que la potentialité de formation du cal et de l'organogenèse ont été étudiés six semaines après la mise en culture des explants. Pour avoir recours à la PHA (P) fraîche, nous l'avons extraite à partir des graines du haricot rouge de la variété NAZ en utilisant la méthode de Rigas [11] ; on a ensuite comparé les bandes électrophorétiques de la PHA (P) extraites avec celles de la PHA (P) Sigma et Difco pour s'assurer de la fiabilité de l'extrait (Figure 1). Nous avons utilisé la méthode de Folin-Lowry [7] pour estimer la concentration de la PHA (P) dans l'extrait.

## Résultats

Les poids frais et secs du cal et les organes obtenus ont été analysés par le dispositif expérimental *split-plot*. L'analyse statistique des différents niveaux de concentrations du 2,4-D et de BA, et leurs combinaisons au seuil de 1 % montrent une différence significative (Tableau II). Pour les concentrations de 0,1 ppm 2,4-D et 0,1 ppm de BA, nous avons obtenu le poids frais et sec maximum. Pour les différentes concentrations de la PHA (M), une différence significative n'a pas été observée aux seuils de 5 % et 1 % (Tableau II). Pour les effets d'interaction hormone x PHA (M), nous n'avons observé aucune différence significative (Tableau II).

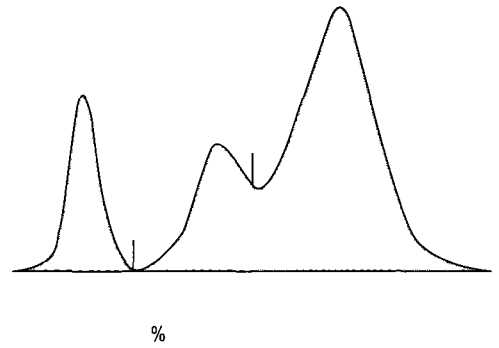
**Tableau II.** Analyse de la variance pour poids frais et poids secs.

S.V.	DDL	Poids frais			Poids secs		
		SCE	CM	F	SCE	CM	F
				**			**
Hormones	3	166 3895	55 4930	269 99	0 2351	0 0784	247 47
Erreur 1	12	2 4651	0 2054		0 0038	0 0003	
Niveaux				ns			ns
PHA(M)	3	16 7904	5 5968	2 5859	0 0154	0 0051	2 318
Hormones X				ns			ns
PHA(M)	9	21 2170	2 3563	1 0887	0 0158	0 0018	0 820
Erreur 2	36	77 9146	2 1643		0 0792	0 0022	
<b>Totale</b>	<b>63</b>	<b>284 7667</b>			<b>0 3493</b>		



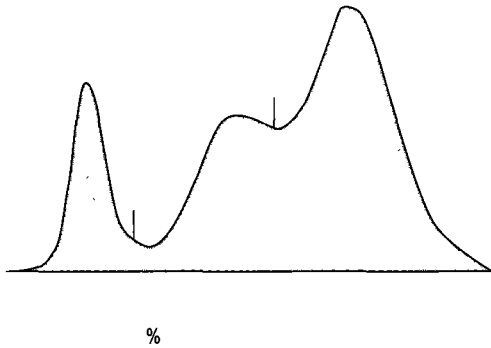
01	15,2
02	15,1
03	39,7

A



01	17,7
02	20,1
03	62,2

B



01	16,7
02	27,4
03	55,9

C

**Figure 1.** Comparaison des pics électrophorétiques : A = PHA (P) Sigma, B = PHA (P) extraite, C = PHA (P) Difco.

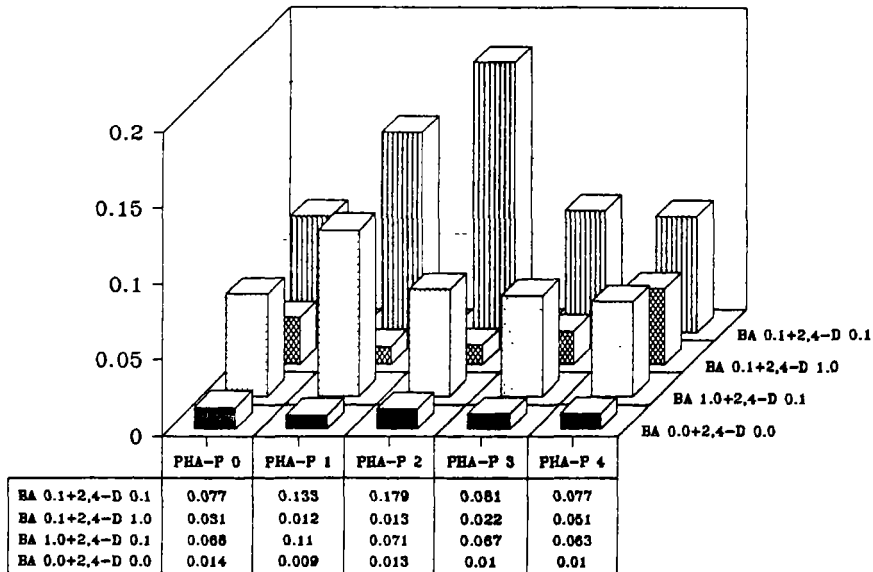
L'analyse statistique des poids frais et secs du cal et des organes pour les différentes concentrations du 2,4-D et de BA et les cinq niveaux de la PHA (P), ainsi que les différentes combinaisons de ces produits montrent une différence significative pour le 2,4-D et la BA comme dans l'analyse précédente (Tableau III). En même temps, aucun effet significatif pour les différentes concentrations de la PHA (P) n'a été observé (Tableau III). Dans cette expérience, l'interaction hormone x PHA (P) montre une différence significative au seuil de 1 %. La comparaison des moyennes par la méthode de Duncan indique que les combinaisons de : 0,1 ppm 2,4-D, 0,1 ppm BA et 1 ppm PHA (P) ; 0,1 ppm 2,4-D, 0,1 ppm BA et 2 ppm PHA (P) ont un effet positif significativement différent des autres concentrations (Figure 2).

**Tableau III.** Analyse de la variance pour poids frais et poids secs.

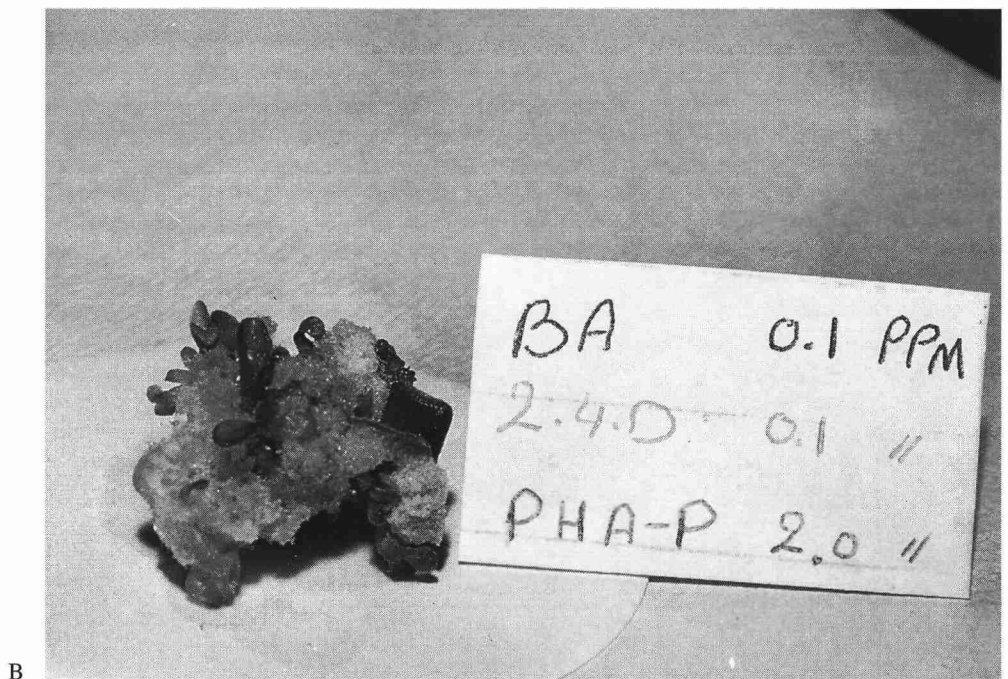
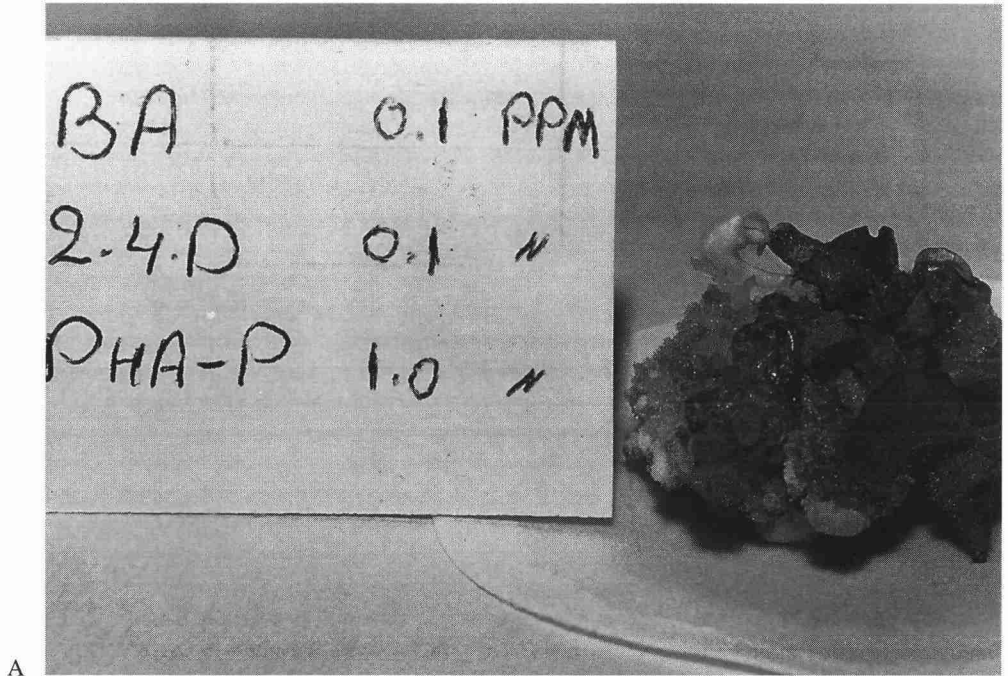
S.V.	Poids frais				Poids secs		
	DDL	SCE	CM	F	SCE	CM	F
Hormones	3	97 3871	32 4624	22 505	0 1838	0 0619	28 74
Erreur 1	20	28 8482	1 4424		0 0431	0 0020	
Niveaux PHA(P)	4	10 3509	2 5877	2 4700	0 0120	0 0051	2 500
Hormones X PHA(P)	12	31 4704	2 6225	2 5080	0 0536	0 0045	3 750
Erreur 2	80	83 6494	1 0456		0 0974	0 0012	
<b>Totale</b>	<b>119</b>	<b>251 7060</b>			<b>0 3919</b>		

ns : non significative

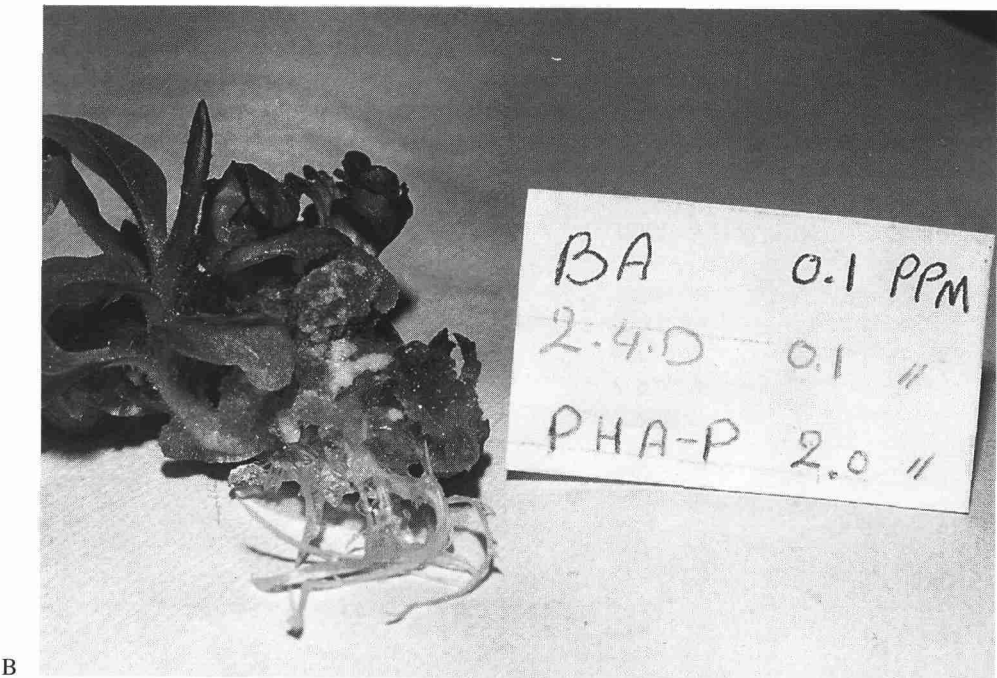
\*\* : différence significative p = 1 %



**Figure 2.** Effet des différentes concentrations du 2,4-D, de la BA et de la PHA (P) sur le poids sec.



**Figure 3.** A et B : Cal et points de différenciations quatre semaines après la mise en culture sous l'effet de la PHA (P) à 1 et 2 ppm.



**Figure 4.** A et B : Formation des racines et de la tige six semaines après la mise en culture sous l'effet de la PHA (P) à 1 et 2 pmm.

## Discussion

Les analyses des résultats obtenus montrent que la PHA sous ses formes M et P et ses différentes concentrations n'ont aucun effet sur la production du cal et la potentialité d'organogenèse du cal. Cela peut être dû en partie à l'existence de la barrière formée par la paroi des cellules végétales. En revanche, la combinaison de PHA (P), 2,4-D et de BA montre un effet net sur la production du cal et sa potentialité d'organogenèse (Figure 3 : A et B, Figure 4 : A et B). L'absence des radicaux d'hydrate de carbone dans la PHA (P) a dû faciliter la pénétration de celle-ci dans la cellule en présence de l'auxine et de la cytokinine, ce qui a probablement augmenté le taux des divisions cellulaires.

De plus, en introduisant la PHA (P) et la PHA (M) dans le milieu de culture, nous avons constaté une nette augmentation de l'intensité des couleurs des feuilles des explants par rapport aux témoins, durant les deux premières semaines de l'expérience. Les effets de la PHA (P) chez les cellules végétales comme chez les cellules animales ont été plus significatifs que les effets de la PHA (M) ; cela est sûrement dû à l'élimination des radicaux glucidiques dans la PHA (P). Comme les protoplastes végétaux sont dépourvus de paroi cellulaire, on pourrait les utiliser pour mieux vérifier ces effets des lectines.

## Références

1. Asen S, Larson RE (1951). *Agr Exp Sta Progress Rep* 40 : 1-4.
2. Aub JC, Tieslan C, Lankester A (1963). *Proc Natl Acad Sci USA* 50 : 613-619.
3. Bangerth F, Gotz G, Buchlon G (1972). *Z Pflanzenphysiol* 66 : 357-377.
4. Burger MM, Goldberg AR (1967). *Proc Natl Acad Sci USA* 57 : 359-366.
5. Howard J, Shannon L, Oki L, Murashig T (1977). *Exp Cell Res* 107 : 448-450.
6. Lis H, Sharon N (1981). In : ed Abraham Marcus *Lectins in higher plants*. Academic press N.Y. : 371-448.
7. Lowry OH, Rosenbrough NY, Farr AL, Randall RJ (1951). *J Biol Chem* 193 : 265-275.
8. Meimeth T, Than van KT, Marcotte J, Trinn TH, Clarke AE (1982). *Plant Physiol* 70 : 579-584.
9. Nagel W (1972). *Planta* 106 : 269-272.
10. Nowell PC (1960). *Cancer Res* 20 : 462-466.
11. Rigas DA, Li JG, Osgood EE (1951). *Am J Med* 10 : 776.
12. Sharon N, Lis H (1989). *Lectins*. Chapman and Hall, NY.
13. Southworth D (1975). *Nature* 258 : 600-602.
14. Torres KC (1989). *Tissue culture techniques for horticultural crops*. Von-Nostrand, Reinhold, N.Y.



# 30

## Étude précoce des effets morphologiques et physiologiques du rapport sodium/calcium *in vitro* sur une population d'*Atriplex halimus*

Y. POURRAT, P. DUTUIT

Équipe d'Écotecnologie, Université de Paris-Sud, Tour E1,  
92296 Châtenay-Malabry, France.

### Résumé

*L'Atriplex halimus est une plante fourragère importante des zones arides méditerranéennes. L'ensemble de cette étude a pour objectif de repérer, dans la diversité génétique naturelle d'une population, les types pouvant se comporter de façon optimale dans certaines conditions. Dans un premier temps nous avons centré nos observations sur le comportement in vitro de jeunes plantes vis-à-vis de faibles concentrations de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Ca}^{++}$  dans le milieu. Vingt milieux différents par leur contenu en  $\text{NaCl}$  et en  $\text{CaCl}_2$  ont été utilisés : cinq concentrations différentes de  $\text{Na}^+$  (entre 0,1 et 1 mM) et, pour chacune, quatre concentrations de  $\text{Ca}^{++}$ , donnant les rapports  $\text{Na}/\text{Ca}$  de 3, 2, 1 et 0,5. Il a été observé que le rapport  $\text{Na}/\text{Ca}$  a un effet significatif sur tous les critères biométriques étudiés (longueur de la tige, longueur de la racine la plus longue et nombre des feuilles). Le rapport  $\text{Na}/\text{Ca}$  égal à 2 a produit les valeurs les plus faibles. En revanche, c'est le rapport 1 qui a donné les valeurs les plus fortes. Le dosage de l'activité enzymatique de la GS et de la GDH montre que, pour une même concentration de  $\text{Na}^+$ , ces deux enzymes sont significativement sensibles aux variations de la concentrations de  $\text{Ca}^{++}$  du milieu. Ces résultats sont remarquables si on tient compte de ce que nous étudions les incidences des variations de ces deux éléments à très faibles concentrations. En utilisant des concentrations de  $\text{Na}^+$  plus élevées (entre 1 et 10 mM), tout en respectant les mêmes rapports avec la concentration du  $\text{Ca}^{++}$  du*

milieu de 3, 2, 1 et 0,5, les variations observées sur des paramètres biométriques, telles que les longueurs de la tige et de la racine la plus longue et le poids de la matière sèche de la partie aérienne, sont significativement dépendantes de la quantité de  $\text{Na}^+$  à elle seule. Au contraire, le nombre de feuilles ne varie significativement qu'avec le rapport entre le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{Ca}^{++}$ . La concentration de  $\text{Na}^+$  dans les tissus de la plante reste stable quand le  $\text{Na}^+$  du milieu augmente. En revanche, la concentration de  $\text{Ca}^{++}$  dans les tissus augmente fortement quand le  $\text{Ca}^{++}$  dans le milieu augmente.

L'*Atriplex halimus* est un arbuste halophile fourrager des steppes arides, important dans l'économie d'élevage des pays de l'Afrique du Nord et du Moyen-Orient. Bon réten-teur des sols, cette plante a aussi une importance écologique. Or, les formations à *Atriplex halimus* sont de plus en plus dégradées.

Le besoin est apparu de disposer de clones dont les caractéristiques de tolérance à la salinité du sol soient connues, les plantes les plus tolérantes étant repérées au sein des populations naturelles qui présentent une grande diversité génétique. C'est avec cet objectif que la culture *in vitro* a été entreprise. Il s'est avéré nécessaire d'analyser les mécanismes d'action de certains éléments minéraux dans la construction de la plante dès les premiers stades de développement. C'est ainsi que nous avons observé que la composition minérale (macroéléments) du milieu avait une importance déterminante sur l'organogenèse des jeunes plantes même à des concentrations faibles [1].

Dans cette étude, il nous a paru intéressant d'élucider quels sont les effets, sur la croissance et le développement des jeunes plantes, de différentes concentrations de sodium et de calcium dans le milieu de culture. Le Saos et Binet [3] ont déjà montré un effet de l'interaction sodium/calcium sur la croissance d'une autre plante halophile, le *Suaeda maritima*.

Nous avons jugé nécessaire de respecter des valeurs précises des rapports  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  pour différents niveaux de concentration du  $\text{Na}^+$ , mais dans des conditions générales de faible concentration ionique. Ce choix, comme celui de travailler sans apport de substances de croissance, a été fait dans le but de faire ressortir plus clairement les effets de chacun des éléments.

Nous nous sommes intéressés aux paramètres biométriques tels que les longueurs de tige et de racine, le nombre de feuilles, le poids sec des parties aériennes et racinaires. Nous nous sommes également intéressés à la corrélation entre la présence de calcium et de sodium dans les tissus et la valeur des paramètres biométriques.

Nous avons recherché les systèmes enzymatiques impliqués dans les événements morphologiques observés. Les activités enzymatiques des glutamine-synthétase (GS) et glutamate-déshydrogénase (GDH) ont donc été mesurées.

## Matériel et méthodes

Les semences d'*Atriplex halimus* ont été récoltées à Djelfa (Algérie). Les semis sont faits à partir de graines stérilisées à l'hypochlorite de sodium (Domestos). Elles sont mises à germer dans des boîtes de Petri, sur du papier filtre imbibé d'eau distillée, à 25 °C constant et sous un éclairage fluorescent de 25  $\mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  (photopériode de 12 h). Le 4<sup>e</sup> jour d'imbibition, les plantules ont une longueur moyenne de 1,52 cm. Elles sont repiquées à raison d'une plantule par tube, sur les différents milieux de culture expérimentés. La méthode a déjà été décrite par Pourrat et Dutuit [9].

Vingt-huit milieux de culture sont expérimentés, ils diffèrent seulement par leur contenu en chlorures de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Ca}^{++}$ . Ils possèdent tous 15 mg/l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 300 mg/l de  $\text{KNO}_3$ , 13,4 mg/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 50 mg/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et les microéléments de Murashige et Skoog [7], les vitamines de Morel [4], 20 g/l de saccharose, 0,1 mM de Fer EDTA et 8 g/l d'Agar (Bactoagar Difco). Le pH final est ajusté à 5,8.

Les mesures sont faites après un mois de culture des plantules. Les paramètres biométriques considérés sont : la longueur de la tige, le nombre de feuilles, la longueur de la plus longue racine et, pour certaines expériences, les poids secs des parties aériennes et racinaires. Les dosages du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Ca}^{++}$  tissulaires sont faits, après minéralisation des tissus, dans une solution chlorhydrique, par spectrométrie atomique, d'absorption pour le  $\text{Ca}^{++}$  et d'émission pour le  $\text{Na}^+$ . Les activités enzymatiques de la GDH et de la GS sont suivies par spectrophotométrie d'après la méthode utilisée par Boucaud et Billard [2].

Chaque expérience correspond à un ensemble de 28 milieux. Chaque milieu est testé sur 24 individus et avec 3 répétitions. Les résultats de chaque paramètre ont été analysés d'après le dispositif *split-plot* (traitements et sous-traitements) dont le modèle est :

$$X_{ijk} = \mu + M^i + B_j + \varepsilon_{ij} + T_k + (MT)_{ik} + \delta_{ijk} \\ i = 1 \dots m ; j = 1 \dots b ; k = 1 \dots t \\ \varepsilon_{ij} = N(0, \sigma_M) ; \delta_{ijk} = N(0, \sigma_T)$$

Les traitements (M) correspondent aux différentes concentrations de  $\text{Na}^+$ , les sous-traitements (T), aux différentes concentrations de  $\text{Ca}^{++}$  pour chaque traitement. Le terme B correspond aux répétitions [10].

Toutes les moyennes (de traitement ou de sous-traitement) sont présentées avec l'écart type ( $\sigma_{n-1}$ ) correspondant.

## Résultats

### Concentrations de sodium entre 0,1 et 1,0 mM

L'effet de l'augmentation progressive de la concentration du  $\text{Ca}^{++}$  pour 5 concentrations différentes de  $\text{Na}^+$  (0,1 mM, 0,5 mM, 0,78 mM, 0,87 mM et 1 mM), tout en respectant les rapports  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  de 3, 2, 1, et 0,5, est montré dans le Tableau I. L'analyse globale fait apparaître que, d'une façon très générale, c'est le rapport  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++} = 2$  qui donne les valeurs les plus faibles et le rapport  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++} = 1$  (qui correspond au doublement de la quantité de  $\text{Ca}^{++}$ ), les résultats les plus forts. Un nouveau doublement de la quantité de  $\text{Ca}^{++}$  (c'est-à-dire le passage du rapport  $\text{Na}/\text{Ca}$  de 1 à 0,5) produit une diminution des valeurs.

#### • Longueur de la tige

L'analyse des résultats montre que, à elle seule, la concentration de  $\text{Na}^+$  dans le milieu n'influence pas significativement la longueur de la tige (Figure 1). Néanmoins, l'allongement le plus fort a été obtenu pour la concentration de 0,78 mM (Figure 2). Au contraire, en ce qui concerne les rapports entre la concentration du  $\text{Na}^+$  et celle du  $\text{Ca}^{++}$ , on obtient un effet significatif au risque de 1 %. Sur la Figure 2, on voit que pour chacune des concentrations de  $\text{Na}^+$  testées, il y a toujours une augmentation de la longueur de la tige lorsque l'on passe du rapport  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  égal à 2 au rapport 1. L'aug-

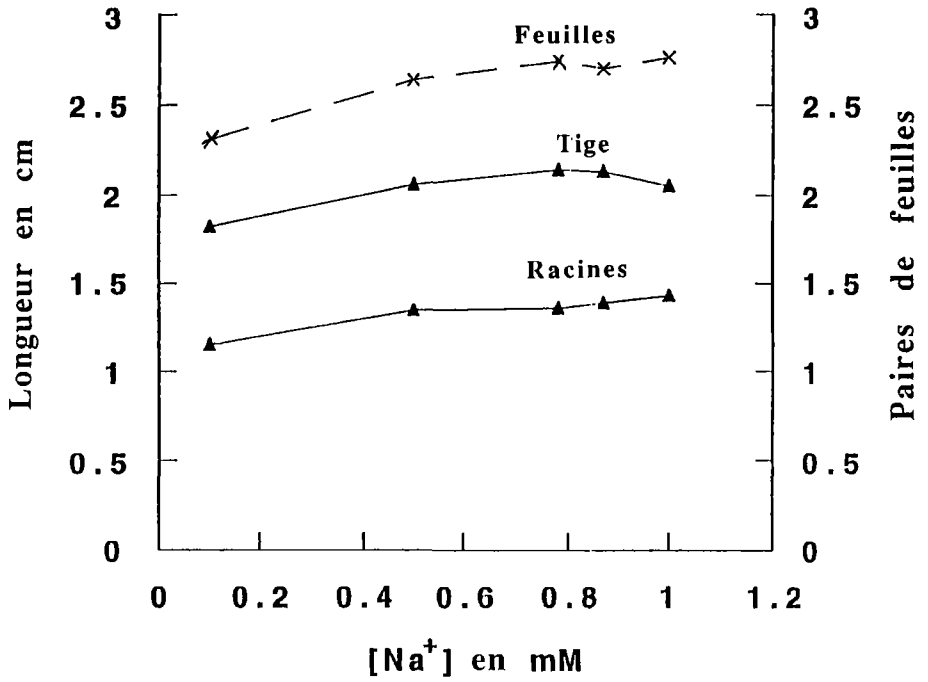


Figure 1. Effet de différentes concentrations de Na<sup>+</sup> sur la croissance de plantules d'*Atriplex halimus*.

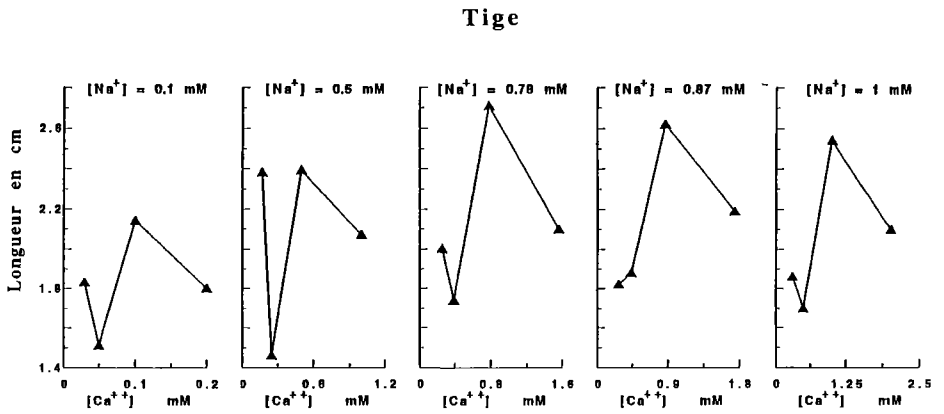


Figure 2. Effet de différents rapports Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> sur la longueur des tiges de plantules d'*Atriplex halimus*.

**Tableau I.** Effet de différentes concentrations de sodium et de calcium dans le milieu de culture, sur la croissance de plantules d'*Atriplex halimus*.

Traite- ment	[Na <sup>+</sup> ] en mM	[Ca <sup>++</sup> ] en mM	[Na <sup>+</sup> ]/[Ca <sup>++</sup> ]	Longueur de tige en cm	Nombre de paires de feuilles	Longueur de la racine la plus longue	Longueur en cm
1	0,1	0,03	3	1,83 ± 0,25	2,15 ± 0,03	1,11 ± 0,21	
2	0,1	0,05	2	1,51 ± 0,29	2,10 ± 0,12	1,13 ± 0,14	
3	0,1	0,10	1	2,14 ± 0,40	2,63 ± 0,49	1,21 ± 0,14	
4	0,1	0,20	0,5	1,80 ± 0,13	2,35 ± 0,33	1,17 ± 0,22	
5	0,5	0,17	3	2,38 ± 0,33	2,67 ± 0,62	1,41 ± 0,25	
6	0,5	0,25	2	1,46 ± 0,16	2,32 ± 0,25	1,13 ± 0,15	
7	0,5	0,50	1	2,39 ± 0,09	2,95 ± 0,54	1,50 ± 0,08	
8	0,5	1,00	0,5	2,02 ± 0,30	2,64 ± 0,35	1,37 ± 0,11	
9	0,78	0,26	3	2,00 ± 0,07	2,50 ± 0,29	1,18 ± 0,08	
10	0,78	0,39	2	1,74 ± 0,58	2,51 ± 0,07	1,24 ± 0,10	
11	0,78	0,78	1	2,71 ± 0,67	3,37 ± 0,86	1,51 ± 0,03	
12	0,78	1,56	0,5	2,10 ± 0,13	2,58 ± 0,11	1,53 ± 0,23	
13	0,87	0,28	3	1,82 ± 0,03	2,39 ± 0,41	1,29 ± 0,31	
14	0,87	0,44	2	1,88 ± 0,23	2,39 ± 0,27	1,29 ± 0,14	
15	0,87	0,87	1	2,62 ± 0,58	3,21 ± 0,97	1,48 ± 0,14	
16	0,87	1,74	0,5	2,19 ± 0,66	2,82 ± 0,46	1,50 ± 0,48	
17	1,00	0,30	3	1,86 ± 0,11	2,37 ± 0,55	1,24 ± 0,29	
18	1,00	0,50	2	1,70 ± 0,06	2,69 ± 0,73	1,32 ± 0,04	
19	1,00	1,00	1	2,54 ± 0,09	3,22 ± 0,48	1,64 ± 0,05	
20	1,00	2,00	0,5	2,10 ± 0,26	2,75 ± 0,10	1,54 ± 0,37	

mentation relative la plus forte (+ 63,7 %) a été obtenue à 0,5 mM de Na<sup>+</sup>. Tandis que le passage du rapport 1 au rapport 0,5 produit une diminution des valeurs dont les plus importantes correspondent à 0,78 mM Na<sup>+</sup> (- 22,5 %) (Tableau II).

Pour toutes les concentrations de Na<sup>+</sup>, les valeurs de longueur de tige les plus fortes sont obtenues pour un rapport Na/Ca de 1. Les valeurs les plus faibles correspondent au rapport Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> de 2. Pour chaque concentration du Na<sup>+</sup>, l'augmentation progressive du Ca<sup>++</sup> produit une diminution de la longueur de la tige quand le rapport Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> passe de 3 à 2, puis une augmentation quand il passe de 2 à 1 et une nouvelle diminution quand on passe de 1 à 0,5. La seule exception à ce comportement se situe entre le rapport 3 et 2 pour 0,87 mM de Na<sup>+</sup>.

#### • Nombre de feuilles

Les différentes concentrations de Na<sup>+</sup> ont un effet significatif au risque de 5 % sur le nombre de feuilles. La valeur la plus forte a été obtenue pour 1mM (Figure 1). En ce qui concerne les rapports entre la concentration du Na<sup>+</sup> et celle du Ca<sup>++</sup>, on obtient un effet significatif au risque de 1 %. Sur la Figure 3, on voit que, pour chacune des concentrations de Na<sup>+</sup> testées, il y a toujours une augmentation du nombre de feuilles lorsque l'on passe du rapport Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> égal à 2 au rapport 1. L'augmentation relative la plus forte (+ 34,3 %) a été obtenue à 0,78 et 0,87 mM de Na<sup>+</sup>. Tandis que le passage du rapport 1 au rapport 0,5 produit une diminution des valeurs dont la plus importante (- 23,4 %) correspond à 0,78 mM Na<sup>+</sup> (Tableau II).

**Tableau II.** Variation relative (en %) de la longueur de la tige et de la racine la plus longue, ainsi que du nombre de paires de feuilles, après le doublement de la quantité en calcium et la décroissance du rapport  $[Na^+]/[Ca^{++}]$  de 2 à 1 et de 1 à 0,5 et cela pour toutes les concentrations de sodium testées.

[Na <sup>+</sup> ] en mM	Variation en % du paramètre quand [Na <sup>+</sup> ]/[Ca <sup>++</sup> ] change de 2 à 1			Variation en % du paramètre quand [Na <sup>+</sup> ]/[Ca <sup>++</sup> ] change de 1 à 0,5		
	Longueur de tige	Nombre de feuilles	Longueur de racine	Longueur de tige	Nombre de feuilles	Longueur de racine
0,10	+ 41,7	+ 25,2	+ 7,1	- 15,9	- 10,6	- 3,3
0,50	+ 63,7	+ 27,1	+ 32,7	- 15,5	- 10,5	- 8,7
0,78	+ 55,7	+ 34,3	+ 21,8	- 22,5	- 23,4	+ 1,3
0,87	+ 39,4	+ 34,3	+ 14,7	- 16,4	- 12,1	+ 1,3
1,00	+ 49,4	+ 19,7	+ 24,2	- 17,3	- 14,6	- 6,1

Pour toutes les concentrations de Na<sup>+</sup>, les valeurs du nombre de feuilles les plus fortes sont obtenues pour un rapport Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> de 1. Les valeurs les plus faibles correspondent au rapport Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> de 2, sauf pour la concentration en sodium de 1 mM. Pour chaque concentration du Na<sup>+</sup>, l'augmentation progressive du Ca<sup>++</sup> produit une augmentation du nombre de feuilles quand le rapport Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> passe de 2 à 1, et une diminution quand il passe de 1 à 0,5. Le comportement entre le rapport 3 et 2 n'est pas homogène.

• *Longueur de la racine la plus longue*

L'analyse des résultats montre que la concentration de Na<sup>+</sup> dans le milieu influence significativement au risque 5 % la longueur de la racine. L'allongement le plus fort a été obtenu pour la concentration de 1 mM de sodium (Figure 1). En ce qui concerne les rapports entre la concentration du Na<sup>+</sup> et celle du Ca<sup>++</sup>, on obtient un effet significatif au risque de 1 %.

Sur la Figure 4, on voit que pour chacune des concentrations de Na<sup>+</sup> testées, il y a toujours une augmentation de la longueur de la racine lorsque l'on passe du rapport Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> égal à 2 au rapport 1. L'augmentation relative la plus forte (+ 32,7 %) a été obtenue à 0,5 mM de Na<sup>+</sup>. Tandis que le passage du rapport 1 au rapport 0,5 produit une diminution des valeurs uniquement pour les concentrations de 0,1, 0,5 et 1 mM de Na<sup>+</sup>. La décroissance la plus forte (- 8,7 %) est obtenue pour 0,5 mM de sodium (Tableau II).

Pour les concentrations de 0,1, 0,5 et 1 mM de Na<sup>+</sup>, les valeurs de longueur de racine les plus fortes sont obtenues pour un rapport Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> de 1. Pour les concentrations de 0,78 et 0,87 mM de Na<sup>+</sup>, le rapport Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> égal à 0,5 donne un résultat légèrement supérieur au rapport 1.

La longueur la plus forte (1,64 cm) a été obtenue pour des concentrations en sodium et calcium de 1 mM et la valeur la plus faible (1,11 cm) est obtenue pour les concentrations en Na<sup>+</sup> et Ca<sup>++</sup> respectivement de 0,1 et 0,03 mM.

### Feuilles

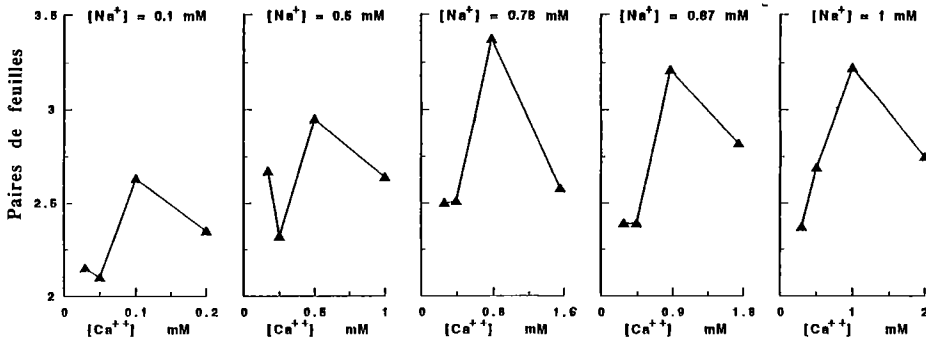


Figure 3. Effet de différents rapports Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> sur le nombre de paires de feuilles de plantules d'*Atriplex halimus*.

### Racines

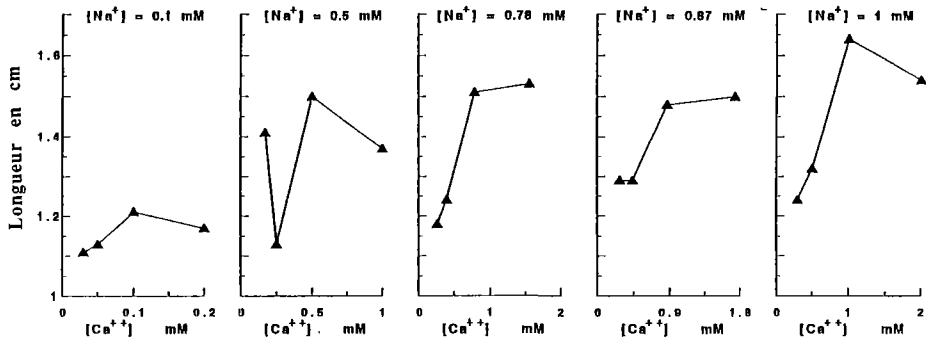
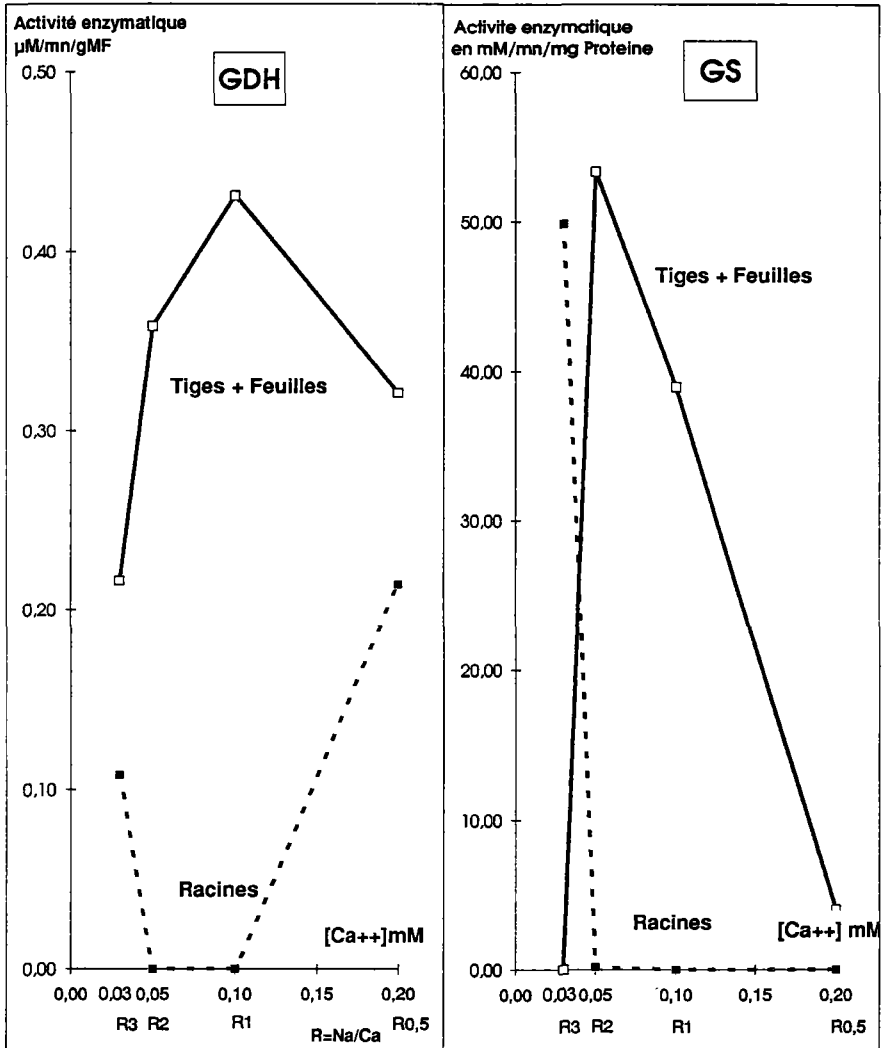


Figure 4. Effet de différents rapports Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> sur la longueur de la racine la plus longue de plantules d'*Atriplex halimus*.

#### • Dosage de l'activité enzymatique de la GS et la GDH

Nous avons choisi la situation de plus faible concentration ionique, c'est-à-dire 0,1mM de Na<sup>+</sup>, 0,03 mM, 0,05 mM, 0,1 mM et 0,2 mM de Ca<sup>2+</sup> respectivement pour les rapports 3, 2, 1 et 0,5, pour effectuer les mesures d'activité enzymatique séparément dans les tissus racinaires et aériens. Les résultats obtenus apparaissent sur la Figure 5. Ils montrent que le système enzymatique constitué par ces deux enzymes est sensible à la variation du Ca<sup>2+</sup> du milieu. Dans la partie aérienne, l'optimum de l'activité des deux enzymes est obtenu aux concentrations en Ca<sup>2+</sup> de 0,05 et 0,1 mM alors qu'à ces mêmes concentrations dans les tissus racinaires l'activité enzymatique est inexistante. Tandis que, dans la partie aérienne, l'activité des deux enzymes augmente fortement quand on passe de 0,03 mM à 0,05 mM, dans les racines, ces deux activités diminuent brusquement.



**Figure 5.** Effet de différentes concentrations en calcium pour une concentration en sodium de 0,1 mM sur l'activité enzymatique de la GDH et de la GS dans les tissus de la racine et de la partie aérienne de plantules d'*Atriplex halimus*.

### Concentrations de sodium entre 1,0 et 10,0 mM

Dans le cas des concentrations de sodium entre 1,0 et 10,0 mM (Tableau III), l'effet de l'augmentation progressive de la concentration du calcium (rapports Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> de 3, 2, 1 et 0,5) n'a pas eu d'effet significatif sur les paramètres biométriques : longueurs de la tige et de la racine la plus longue et poids de la matière sèche de la partie aérienne. Au contraire, c'est l'augmentation de la concentration en Na<sup>+</sup> à elle seule qui produit un effet positif significatif sur ces paramètres. En revanche, le nombre de feuilles ne

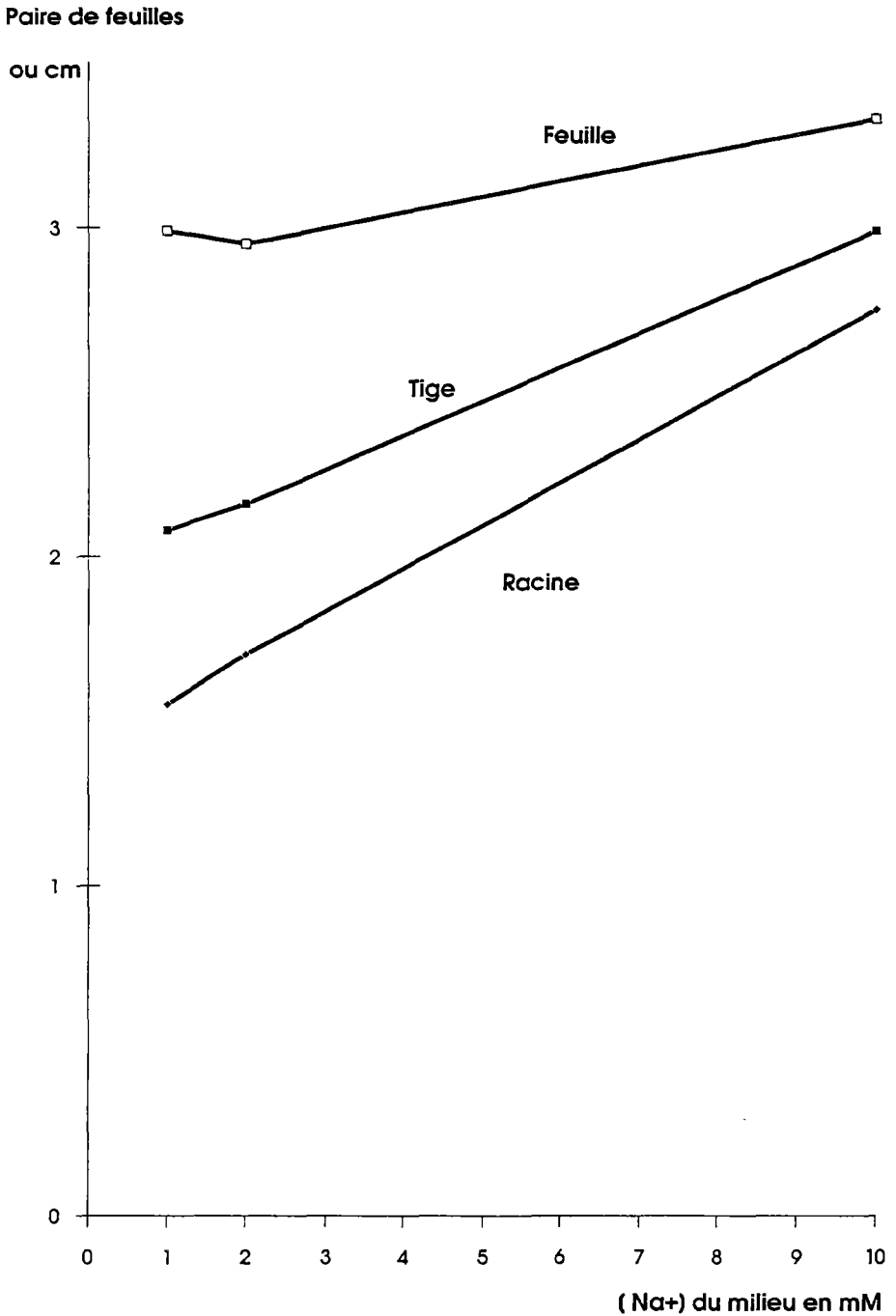


dépend significativement que du rapport Na/Ca. Sur la Figure 6, on peut observer que la longueur de la tige et de la racine ainsi que le nombre de feuilles augmentent quand le Na<sup>+</sup> passe de 1,0 mM à 10,0 mM. C'est la racine qui montre la plus forte croissance (+ 62 %). En ce qui concerne le poids de la matière sèche des parties aériennes, la Figure 7 montre qu'il progresse, comme les autres paramètres biométriques (+ 47 %), inversement au poids de la matière sèche racinaire qui, lui, diminue légèrement (- 10 %). Si on considère le rapport entre le poids de la matière sèche aérienne et racinaire, celui-ci augmente fortement quand le sodium varie de 2,0 mM à 10,0 mM (+ 64 %).

Les quantités de sodium et de calcium dosées dans les tissus des parties aériennes et racinaires des plantes apparaissent sur la Figure 7. Le Na<sup>+</sup> tissulaire reste inchangé pour les concentrations de 2,0 et 10,0 mM, tant dans les tissus racinaires qu'aériens. Cependant, entre 1 et 2 mM, il est à noter que la concentration en sodium des tissus de la partie aérienne décroît fortement (de 13,79 µg/mg MS à 7,84 µg/mg MS). En ce qui concerne le calcium, il augmente dans les tissus quand la concentration de Na<sup>+</sup> varie de 1,0 à 10,0 mM, ce qui correspond aussi, dans ce protocole expérimental, à une augmentation corrélative du Ca<sup>++</sup> dans le milieu. L'augmentation dans la partie aérienne est beaucoup plus forte (31,39 µg/mg MS contre 13,65 µg/mg MS dans les racines à 10,0 mM de Na<sup>+</sup>).

**Tableau III.** Longueur de la tige, nombre de feuilles et longueur de la racine la plus longue de jeunes plantes d'*Atriplex halimus* cultivées in vitro sur des milieux contenant 1, 2 et 10 mM de Na<sup>+</sup> et différentes concentrations de Ca<sup>++</sup> (± l'écart type de la moyenne).

Milieu	[Na <sup>+</sup> ] mM	[Ca <sup>++</sup> ] mM	[Na <sup>+</sup> ]/[Ca <sup>++</sup> ]	Longueur tige (cm)	Nombre de feuilles	Longueur racinaire (cm)
1	1,0	0,3	3	2,0 ± 0,1	3,0 ± 0,3	1,3 ± 0,2
2	1,0	0,5	2	2,1 ± 0,1	2,9 ± 0,3	1,4 ± 0,1
3	1,0	1,0	1	2,0 ± 0,4	2,9 ± 0,3	1,7 ± 0,2
4	1,0	2,0	0,5	2,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	1,8 ± 0,2
5	2,0	0,6	3	2,1 ± 0,3	2,8 ± 0,3	1,3 ± 0,3
6	2,0	1,0	2	2,0 ± 0,4	2,8 ± 0,2	1,4 ± 0,3
7	2,0	2,0	1	2,1 ± 0,4	2,9 ± 0,1	1,6 ± 0,4
8	2,0	4,0	0,5	2,5 ± 0,5	3,3 ± 0,0	2,4 ± 0,2
9	10,0	3,0	3	3,0 ± 0,4	3,5 ± 0,4	2,6 ± 0,3
10	10,0	5,0	2	3,2 ± 0,4	3,6 ± 0,4	2,7 ± 0,2
11	10,0	10,0	1	3,2 ± 0,6	3,4 ± 0,3	3,1 ± 0,5
12	10,0	20,0	0,5	2,5 ± 0,5	2,9 ± 0,4	2,6 ± 0,5



**Figure 6.** Effet de différentes concentrations en sodium (1,2 et 10 mM) sur les longueurs de la tige et de la racine la plus longue et sur le nombre de paires de feuilles chez des plantules d'*Atriplex halimus*.

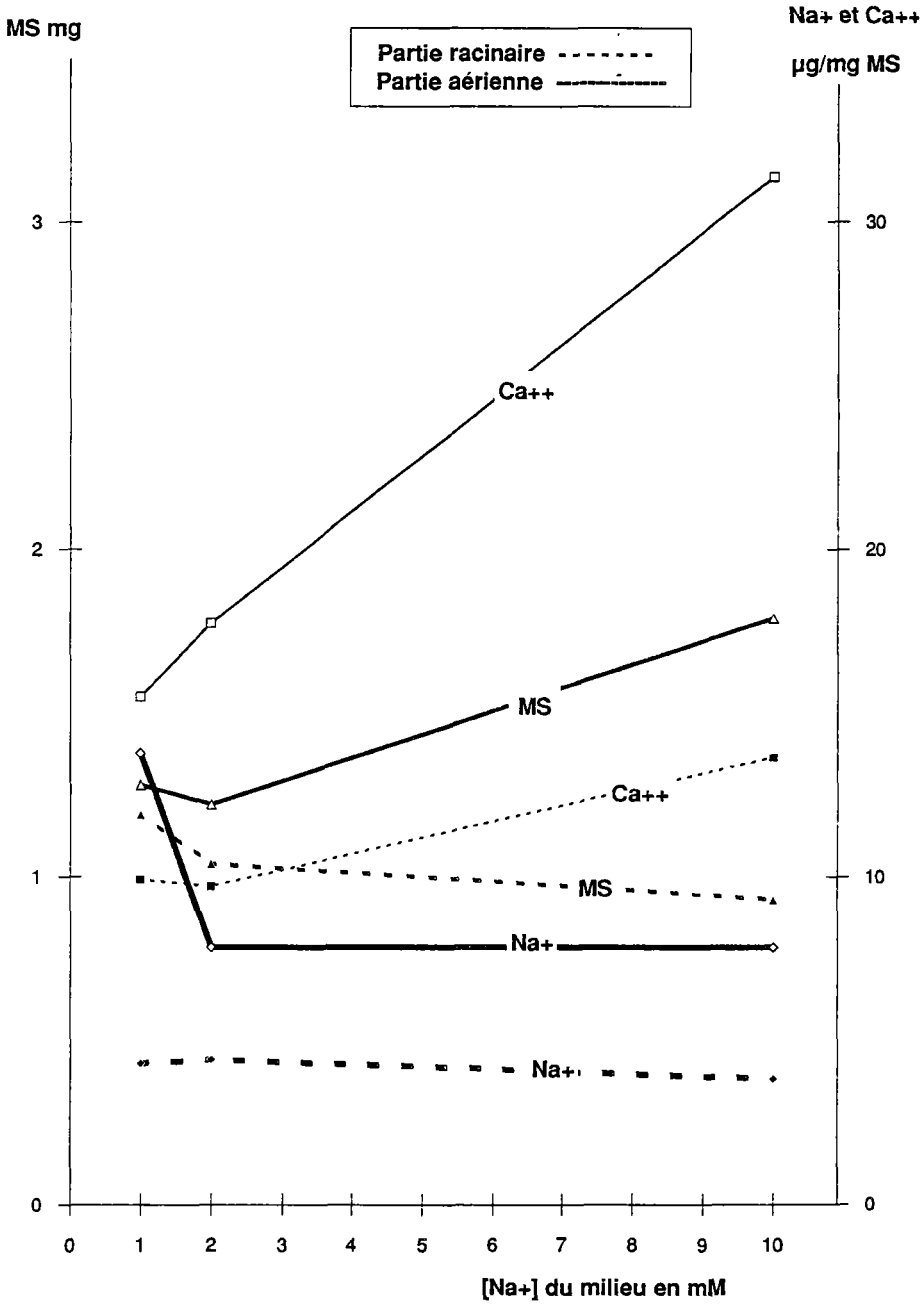


Figure 7. Effet de différentes concentrations en sodium (1,2 et 10 mM) sur le poids de matière sèche et les concentrations en calcium et en sodium des tissus des parties aériennes et racinaires chez des plantules d'*Atriplex halimus*.

## Discussion et conclusion

Les résultats montrent que le principal événement est la stimulation des paramètres biométriques quand la concentration de  $\text{Ca}^{++}$  est doublée et la concentration du sodium inchangée (dans ce cas-là, le rapport  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  varie de 2 à 1). Cela est exact pour toutes les concentrations testées entre 0,1 et 1mM. Un autre phénomène significatif est la diminution de ces mêmes paramètres quand intervient un deuxième doublement de la concentration de calcium (le rapport  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  variant de 1 à 0,5). Ces mêmes résultats montrent que la variation de concentration de  $\text{Na}^+$  influe légèrement sur les paramètres comparativement aux effets induits par les variations du rapport  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ .

Afin d'expliquer la reproductibilité de ces phénomènes observés entre 0,1 et 1,0 mM de sodium et la significativité statistique des résultats, nous devons tenir compte du fait que les différences morphogénétiques sont induites par de très faibles variations des concentrations du sodium et du calcium (environ 0,1 mM). Les concentrations utilisées usuellement dans les études sur les halophytes sont beaucoup plus élevées [3, 5, 8]. Par exemple, la longueur de la tige présente une différence de 85 % entre la moyenne la plus faible (1,46 cm) et la plus forte (2,71 cm) obtenue par une augmentation des concentrations de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Ca}^{++}$  de 0,38 mM et de 0,53 mM respectivement (Figure 2). La moyenne la plus faible a été obtenue avec un rapport  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  de 2 et la plus forte avec un rapport de 1.

Mozafar *et al.* [6] ont observé, sur l'*Atriplex halimus* cultivé sur des solutions nutritives avec différents rapports de concentrations de  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , que les meilleurs résultats de croissance étaient obtenus quand le rapport était égal à 1. Cela serait dû à une interaction positive d'ordre biochimique entre ces deux éléments, peut-être en relation avec un équilibre ionique favorable au fonctionnement de certains systèmes enzymatiques.

Des résultats obtenus sur *Atriplex vesicaria* et *A. spongiosa*, cultivés sur des solutions nutritives, montrent que l'absorption du calcium est modifiée par les concentrations en  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$  [8]. Dans le cas d'une autre halophyte (*Suaeda maritima*), il y a compétition dans l'absorption de ces deux éléments [3].

Dans notre système, il semble difficile de penser à un antagonisme entre le sodium et le calcium, dans la mesure où le rapport entre le sodium et le calcium peut provoquer soit une stimulation, soit une décroissance des valeurs des paramètres (Figures 2, 3 et 4).

La sensibilité des systèmes enzymatiques étudiés (enzymes responsables de la fixation de l'azote) aux variations de la concentration de calcium dans le milieu (Figure 5), pourrait être à la base des modifications morphologiques observées. Cette étude préliminaire mérite d'être approfondie et élargie à d'autres enzymes intervenant dans des fonctions vitales de la plante.

Les résultats obtenus avec 1,0, 2,0 et 10,0 mM montrent que bien que la concentration en  $\text{Na}^+$  du milieu augmente, le contenu de  $\text{Na}^+$  tissulaire reste très stable. En même temps, on observe que les valeurs de tous les paramètres biométriques augmentent. Cette constatation nous conduit à penser qu'il doit y avoir un système de régulation de la concentration du sodium cellulaire, soit au niveau de l'absorption racinaire, soit au niveau des glandes excrétrices [6, 11]. Si on considère que le  $\text{Ca}^{++}$  se retrouve dans les tissus plus abondamment quand sa concentration augmente dans le milieu, il est possible de penser que c'est le calcium qui favorise la croissance et qu'il pourrait limiter l'entrée du  $\text{Na}^+$  au niveau des racines.

## Références

1. Benrebaha F, Pourrat Y, Dutuit P (1992). Induction de la callogenèse chez l'*Atriplex halimus* sur des milieux de culture dépourvus d'hormones de croissance. Rôle des éléments minéraux. *Bull Soc Sot Fr*, 139, Lettres bot : 219-222.
2. Boucaud J, Billard JP (1978). Caractérisation de la glutamate déshydrogénase chez une halophyte obligatoire : le *Suaeda maritima* var. *macrocarpa*. *Physiol Plant* 44 : 31-37.
3. Le Saos J, Binet P (1987). Halophilie et alimentation calcique chez *Suaeda maritima* L. Dum. variété *macrocarpa* Moq. *Oecol Plant* 8 : 127-134.
4. Morel G, Wetmore RH (1951). Fern callus tissue culture. *Am J Bot* 38 : 141-143.
5. Mozafar A, Goodin JR (1970). Vesiculated hairs : a mechanism for salt tolerance in *Atriplex halimus* L., *Plant Physiol* 45 : 62-65.
6. Mozafar A, Goodin JR, Oertli JJ (1970). Sodium and potassium interactions in increasing the salt tolerance of *Atriplex halimus* L. : II Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> uptake characteristics. *Agron J* 62 : 481-484.
7. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
8. Osmond CB (1966). Divalent cation absorption and interaction in *Atriplex*. *Aust J Biol Sci* 19 : 37- 48.
9. Pourrat Y, Dutuit P (1993). Effects of the sodium and calcium concentrations on the *in vitro* growth of *Atriplex halimus* L. plantlets. *J Plant Nutr* 16, (8) : 1417-1429.
10. Snedecor GW, Cochran WG (1984). Méthodes statistiques. Association de coordination technique agricole ed. (Paris), 6<sup>e</sup> édition, 649 p.
11. Uchiyama Y (1987). Salt tolerance of *Atriplex nummularia*. *Technical Bulletin of Tropical Agriculture Research Center* (Japan), 22 : 69 p.

