

OBTENTION DE *NICOTIANA* HAPLOÏDES A PARTIR D'ÉTAMINES CULTIVÉES *IN VITRO*

J.-P. BOURGIN, J.-P. NITSCH

avec la collaboration technique de S. HAMON

Laboratoire de Physiologie pluricellulaire,
Centre national de la Recherche scientifique, 91 - Gif-sur-Yvette

SOMMAIRE

Cultivées aseptiquement sur un milieu approprié, des étamines de trois *Nicotiana* ont produit des plantules, vraisemblablement à partir des grains de pollen. Ces plantules ont été élevées en serre et se sont développées en plantes adultes qui ont fleuri. Des comptages de chromosomes, effectués à partir des racines, ont révélé que la plupart des plantes provenant d'anthers étaient haploïdes.

INTRODUCTION

Les organismes haploïdes présentent un intérêt particulier : d'une part, les mutations que l'on peut faire subir à leur génome ne sont pas cachées par les effets de gènes dominants ; d'autre part, en rétablissant le nombre diploïde de chromosomes, par exemple au moyen d'un traitement à la colchicine, il est possible de fabriquer d'emblée des sujets homozygotes.

Dans le but d'obtenir des pieds haploïdes de divers *Nicotiana*, nous avons cherché à faire proliférer des cellules haploïdes, celles des grains de pollen. La technique employée a été inspirée des résultats de GUILA et MAHESHWARI (1966) qui ont observé la formation d'embryoïdes à partir de grains de pollen en cultivant *in vitro* des anthers de *Datura*.

TECHNIQUES

1) Espèces essayées

Nous avons cultivé des étamines de *Nicotiana tabacum* L., var. *Wisconsin 38* et var. *Maryland Mammoth*, de *N. sylvestris*, et de trois hybrides : l'hybride *N. sylvestris* × *N. tabacum Maryland Mammoth*, l'hybride tumoral *N. langsdorffii* × *N. glauca* et l'amphidiploïde correspondant (non tumoral).

2) Obtention d'étamines stériles

Dans la plupart des cas, des boutons floraux encore fermés ont été désinfectés par trempage dans une suspension filtrée d'hypochlorite de calcium à 4 p. 100 pendant trois minutes, suivi de deux rinçages à l'eau stérile.

Dans le cas de la variété *Wisconsin 38*, nous avons d'abord cultivé sur un milieu simple des tronçons (7 mm de long environ) de hampe florale prélevés sur des sujets en fleurs, de manière à obtenir la néoformation de fleurs *in vitro* selon la technique de Aghion-Prat (1965).

Le milieu comprenait, par litre :

Macroéléments K (mg) : Ca(NO₃)₂ · 4 H₂O (500), KNO₃ (125), MgSO₄ · 7 H₂O (125), KH₂PO₄ (115).
Oligoéléments A (mg) : MnSO₄ · 4 H₂O (25), H₃BO₃ (10), ZnSO₄ · 4 H₂O (10), Na₂MoO₄ · 2 H₂O (0,25), CuSO₄ · 5 H₂O (0,025).

Fer : 5 ml d'une solution obtenue en dissolvant 7,45 g de Na₂EDTA (éthylène-diaminotétracétate de sodium) et 5,57 g de FeSO₄ · 7 H₂O par litre d'eau distillée.

Addenda organiques (mg) : *myo*-inositol (100), glycine (2), acide nicotinique (5), chlorhydrate de pyridoxine (0,5), chlorhydrate de thiamine (0,5), acide folique (0,5), biotine (0,05).

Saccharose : 50 g.

Agar (*Bacto-Agar* Difco) : 8 g.

Le pH était ajusté à 5,5 (avec HCl ou NaOH) avant autoclavage (15 à 20 min. à 120°C). Les tubes de cultures ont été placés en régime de jours longs de 16 h de lumière (environ 7 000 lux à l'extérieur des tubes de cultures), la température étant de 30°C le jour, 22° la nuit.

Une fois les fleurs obtenues sur les cultures, nous avons prélevé les étamines qui ont été plantées sur les milieux qui seront indiqués plus loin.

3) Comptages de chromosomes

Les comptages de chromosomes ont été effectués sur les pointes de racines des plantes obtenues, après coloration au Feulgen et écrasement. Les pointes de racines ont été plongées dans l'hydroxyquinoline (0,003 M) pendant 3-4 heures, puis fixées à l'éthanol acétique (3 : 1) pendant 2 heures. Après un lavage à l'éthanol à 70 p. 100, elles ont subi une hydrolyse à 60°C en présence de HCl N pendant 6 min., puis ont été colorées au réactif de Schiff pendant un minimum de 30 mn.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Au bout de 6 à 10 semaines de culture en régime de jours longs de 16 h et avec une alternance de température (30°C le jour, 22° la nuit), sont apparues, sur certaines étamines, soit des proliférations sur le filet, soit de petites plantules provenant de l'intérieur de l'anthere (fig. 1). Ces plantules comportaient généralement deux petites feuilles vertes qui pourraient correspondre à deux cotylédons. La rapidité et la fréquence de formation de ces plantules dépendent de l'espèce employée et de la composition du milieu de culture.

1. Rôle de l'espèce employée

Autant des étamines provenant des trois types d'hybrides mentionnés plus haut n'a proliféré. Par contre, nous avons obtenu des plantules à partir d'anthers des variétés *Wisconsin 38* et *Maryland Mammoth* de *N. tabacum* et, surtout, à partir de *N. sylvestris*.

2. Rôle du milieu de culture

Le milieu de base qui a donné des résultats positifs comprenait les macroéléments suivants (en mg/l) : KNO₃ (950), NH₄NO₃ (720), MgSO₄ · 7H₂O (185), CaCl₂ (166),

KH_2PO_4 (68), plus les oligoéléments, le fer, les addenda organiques et la dose d'agar indiqués plus haut. La concentration en saccharose du milieu de base était de 20 g/l.

Comme GUHA et MAHESHWARI, nous avons toujours ajouté une cytokinine aux milieux, zéatine (100 ou 200 $\mu\text{g/l}$), isopentenyladénine (100 $\mu\text{g/l}$), ou kinétine (200 $\mu\text{g/l}$).

Divers additifs ajoutés au milieu de base ont produit les résultats suivants :

a) l'addition d'adénine (40 mg/l), de thymine (40 mg/l), d'hydrolysate de caséine (2,5 g/l), d'extrait de levure (5 g/l), ou de L-proline (35 mg/l) et de pantothénate de calcium (0,1 mg/l) n'a guère favorisé la néoformation de plantules :

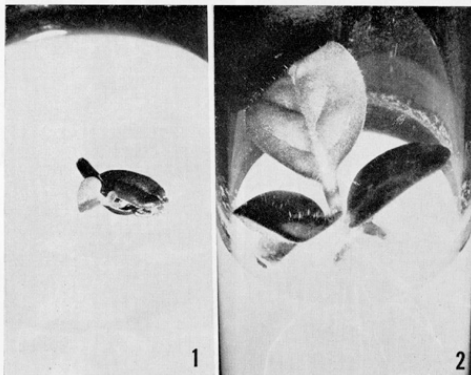


FIG. 1. — Plantule de *Nicotiana tabacum* var. Maryland Mammoth sortant de l'anthere cultivée *in vitro*

FIG. 2. — Plantule de la figure 1 après repiquage sur un milieu sans substances de croissance

b) par contre l'acide indolyl-3-acétique (0,1 mg/l) ou le lait de coco autoclavé (10 p. 100) ont, en présence d'adénine (40 mg/l), nettement favorisé la formation de plantules dans les anthers. Le lait de coco autoclavé n'a pas eu cet effet et n'a stimulé que la formation de cals sur les filets.

3. Obtention de plantes entières

Les plantules obtenues à partir des anthers ont été repiquées *in vitro* sur un milieu simple, constitué par les macroéléments suivants (en mg/l) : KNO_3 (1 900), NH_4NO_3 (1 650), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (440), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (370), KH_2PO_4 (170) et additionné des

oligoéléments et du fer indiqués plus haut, de 10 g/l de saccharose et de 8 g/l d'agar. Lorsque les racines et les feuilles ont atteint un développement suffisant (fig. 2), ces petites plantes ont été repiquées en pots. Nous avons ainsi obtenu des plantes adultes de *N. tabacum*, var. *Wisconsin 38* (fig. 3) et var. *Maryland Mammoth*, et de *N. sylvestris* (fig. 4) qui ont fleuri. Les fleurs étaient légèrement plus petites (de 1/3 environ) que celles des pieds normaux. Dans le cas de la variété *Wisconsin 38*, elles ressemblaient

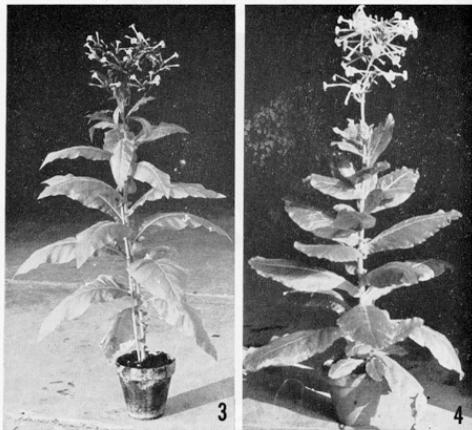


FIG. 3. — Plant haploïde de *N. tabacum* var. Wisconsin 38

élevé en serre à partir d'une plantule d'étamine

FIG. 4. — Plant haploïde de *N. sylvestris* élevé à partir d'une plantule d'étamine

beaucoup à celles de tabacs haploïdes obtenus par d'autres méthodes, en particulier par la sélection de *twin seedlings* (De NETTANCOURT et STOKES, 1960 ; BURK, 1962). Aucune des fleurs produites sur les plantes haploïdes n'a formé de graines.

4. Détermination de l'état haploïde

La détermination de l'état haploïde a été effectuée sur des pointes de racines prélevées sur les plantes adultes.

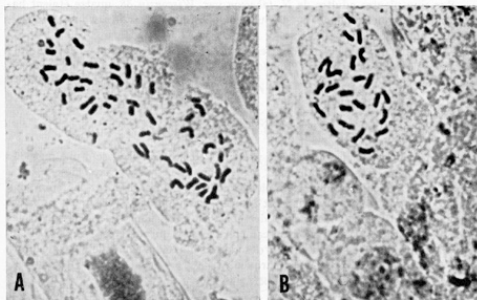


FIG. 5. — Chromosomes de cellules de racines de *N. tabacum* var. Wisconsin 38
A : cellules d'un pied normal ($2n = 48$). B : cellules d'un pied haploïde élevé à partir
d'une plantule d'étamine ($2n = 24$). Les deux photos ont été prises au même grossissement

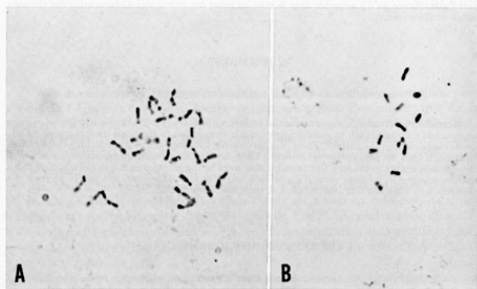


FIG. 6. — Chromosomes de cellules de racines de *N. sylvestris*
A : cellules d'un pied normal ($2n = 24$). B : cellules d'un pied haploïde élevé à partir
d'une plantule d'étamine ($2n = 12$). Les deux photos ont été prises au même grossissement

Sur cinq plantes adultes de *N. tabacum* var. *Wisconsin 38*, quatre étaient haploïdes ($n = 12$), une diploïde (fig. 5). Sur deux plantes de la var. *Maryland Mammoth*, une était haploïde, l'autre diploïde.

Dans le cas de *N. sylvestris*, quatre plantes ont été élevées jusqu'à l'état adulte : 3 étaient haploïdes ($n = 6$), une diploïde (fig. 6).

CONCLUSION

Les résultats qui viennent d'être présentés constituent la base d'une méthode qui devrait permettre d'obtenir assez facilement des *Nicotiana* haploïdes. Jusqu'à présent, la principale technique employée consistait à sélectionner les embryons jumeaux. D'après De NETTANCOURT et STOKES (1960), on trouve environ 1 embryon jumeau haploïde sur 10 000 graines de tabac. De plus, pour repérer les plantules haploïdes, il est nécessaire d'avoir un caractère récessif qui serve de marqueur. Dans le cas présent, il est possible d'obtenir des plantes haploïdes sans que l'on soit limité par la nécessité de trouver un gène marqueur.

Reçu pour publication en décembre 1967.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement M. Essad, Station centrale d'Amélioration des Plantes, INRA, pour l'aide efficace qu'il a apportée dans la mise au point des techniques d'observation des chromosomes de *Nicotiana*.

SUMMARY

PRODUCTION OF HAPLOID NICOTIANA FROM EXCISED STAMENS

Stamens of various *Nicotiana* strains have been cultured *in vitro*. When a cytokinin, such as kinetin, and an auxin, such as indolyl-3-acetic acid, were added to the basal medium, small plantlets developed from the anthers. These plantlets were transferred to a medium lacking these growth substances, then to pots in the greenhouse. They developed into mature plants which flowered. Chromosome counts in the root tips revealed that most of the plants thus raised were haploid. This was the case for *N. tabacum* vars. *Wisconsin 38* and *Maryland Mammoth*, and for *N. sylvestris*. No plantlets were obtained from the stamens of three *Nicotiana* hybrids.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AGHON-PRAT, D., 1965. Néoformation de fleurs *in vitro* chez *Nicotiana tabacum* L. *Physiol. vég.*, **3**, 229-303.
BURK, L. G., 1962. Haploids in genetically marked progenies of tobacco. *J. Hered.*, **53**, 222-225.
De NETTANCOURT, D., STOKES, G. W., 1960. Haploidy in tobacco. *J. Hered.*, **51**, 102-104.
GUHA S., MAHESHWARI S. C., 1956. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature*, **212**, 97-98.