

**L'ANDROGENESE IN VITRO CHEZ LE TOURNESOL CULTIVE
(HELIANTHUS ANNUUS L.)**

A. MEZZAROBBA

UCST, Laboratoire de Loudes, 11400 CASTELNAUDARY, France

R. JONARD

USTL, Lab. physiol. végétale appliquée, 34060 MONTPELLIER, France

RESUME

L'isolement *in vitro* d'anthers de tournesol (*Helianthus annuus* L.) à un stade jeune du développement de la microspore a permis d'obtenir des embryons avec des fréquences élevées. Un traitement thermique des anthers à 35° C et à l'obscurité pendant les 12 premiers jours de culture augmente significativement le rendement en embryons. Le développement de ces embryons a fourni des plantes diploïdes (73 %), haploïdes (20 %), et mixoploïdes (7 %). Parmi les plantes diploïdes, 80 % sont bien d'origine gamétique comme le révèle l'étude d'un marqueur génétique et le suivi au champ des plantes autofécondées.

SUMMARY

High percentages of embryos were obtained from cultivated sunflower anther culture at a young stage of the microspore development. A pretreatment of the anthers in the dark at 35 °C during the first 12 days of culture increased significantly embryos yield. Diploid (73 %), haploid (20 %) and mixoploid (7 %) plants were regenerated from these embryos. 80 % of the diploid plants have a gametic origine as it was shown by the study of a genetic marker and the observation of the self fertilization plants in the field.

INTRODUCTION

Les travaux sur l'haploïdisation du tournesol par culture d'anthers *in vitro* sont assez récents et peu nombreux. Ils ont essentiellement intéressé des espèces sauvages ou des hybrides interspécifiques (Bohorova *et al.*, 1980 ; Alissa *et al.*, 1985). Nos travaux, initiés en 1985, sont parmi les premiers à porter sur le tournesol cultivé, *Helianthus annuus* L. (Mezzarobba et Jonard, 1986).

MATERIEL ET METHODES

Le matériel végétal a été fourni par le laboratoire du tournesol de la station d'amélioration des plantes de l'INRA de Montpellier. Il comprend des lignées : MH 1-2, B11 A3, 82R159, et des hybrides F1 : M6.4 X 82R159, INRA 4701 et RODEO.

B11 A3 et INRA 4701 se caractérisent par la présence d'un gène marqueur anthocyané T, responsable de la pigmentation de l'hypocotyle.

Les anthers sont prélevées lorsque les microspores sont au stade tétrade de méiose. Elles sont désinfectées et mises en culture *in vitro* sur un milieu d'initiation constitué des solutions minérales de Murashige et Skoog (1962) diluées de moitié et additionnées du mélange vitaminique de Morel et Wetmore (1951), de vitamine B12 (0,2 mg/l), d'un mélange d'acides aminés, de saccharose (120 g/l), d'ANA (0,5 mg/l) et de BAP (0,5 mg/l). Le milieu est solidifié par 3,3 g/l de gelrite et le pH ajusté à 5,9 avant autoclavage.

Les anthers sont alors soumises à un traitement thermique à 35°C et à l'obscurité pendant les 12 premiers jours de culture. Les premiers embryons apparaissent au bout de 15 jours. Ils sont repiqués au stade "torpille" sur un milieu liquide constitué des solutions minérales de Monnier (1976) et additionné des vitamines de Morel et Wetmore (1951), d'un mélange d'acides aminés et de 15 g/l de saccharose.

Au stade 2 à 3 paires de feuilles, les plantules sont transférées en terre; les comptages chromosomiques sont effectués sur les pointes racinaires et au niveau des anthères.

RESULTATS ET DISCUSSION

Effets d'un choc thermique à 35° C sur le taux d'anthères embryogènes

GENOTYPES	NB ANTHÈRES ENSEMENCEES	ANTHÈRES EMBRYOGÈNES	
		NOMBRE	%
<u>1. Traitement témoin à 25°C et à l'obscurité</u>			
MH 1.2	260	0	-
INRA 4701	300	12	4,0
B11 A3	280	9	3,2
M64x82R159	260	21	8,1
82 R159	300	4	1,3
Rodéo	300	1	-
Total	1700	47	2,8

2. Traitement à 35°C pendant 12 jours et à l'obscurité

MH 1.2	300	9	3,0
INRA 4701	260	31	11,9
B11 A3	300	28	9,3
M64x82R159	280	111	39,6
82 R159	260	6	2,3
Rodéo	300	3	1,0
Total	1700	188	11,1

Les résultats consignés dans le tableau ci-dessus montrent un effet bénéfique du traitement thermique à 35°C sur le taux d'anthères embryogènes. Le rôle positif d'un choc thermique au froid sur l'androgénèse a été souligné chez de nombreuses espèces : tabac, blé, datura, riz, etc... Par contre, peu d'auteurs rapportent l'influence d'un traitement à la chaleur : Keller et Armstrong (1979) chez le colza, Dumas de Vaultz *et al.* (1981, 1982) chez le piment et l'aubergine.

L'analyse des résultats précédents laissent également entrevoir un effet assez net du génotype sur la capacité embryogène des anthères, l'hybride F1 : M6.4 X 82 R159 fournissant les meilleurs résultats.

Evolution des embryons néoformés en plantules

Génotypes	Nb anthères ensemencées	Nb anthères embryogènes	Plantes viables regénées		
			N	2N	Mixopl.
MH 1.2	300	9	0	2	0
INRA 4701	260	31	1	5	0
B11 A3	300	28	1	4	0
M64x82R159	280	111	4	18	2
82 R159	260	6	2	0	1
Rodéo	300	3	0	1	0
Total	1700	188	8	30	3

Le tableau ci-dessus indique que moins de 20% des embryons formés évoluent en plantes viables. Les autres présentent, 1 à 2 semaines après leur repiquage sur le milieu de différenciation, un développement anormal qui se traduit le plus souvent par un blocage

de l'activité du méristème caulinaire. Des coupes cytologiques effectuées à ce niveau, montre une vitrification des tissus accompagnée souvent d'une accumulation de cellules à polyphénols.

Parmi les plantes régénérées, 20% sont haploïdes, 73% diploïdes et 7% mixoploïdes. L'étude du marqueur anthocyané sur les génotypes B11 A3 et INKA 4701 a donné les résultats suivants :

- B11 A3 (T/t) 4 plantes 2N dont 1 non anthocyanée (t/t)
3 anthocyanées (T/T ou T/t)
- INRA 470 (T/t) 5 plantes 2N dont 3 non anthocyanées (t/t)
2 anthocyanées (T/T ou T/t)

Les plantes-mères étant anthocyanées (T/t), les plantes diploïdes non anthocyanées qui ont été régénérées sont des haploïdes doublés spontanément.

Le suivi des plantes diploïdes au champ révèle que près de 80% d'entre elles sont d'origine gamétiques, les descendance issues d'autofécondation étant bien fixées. Les autres, en ségrégation, peuvent soit être d'origine somatique, soit résulter de variants induits par la culture *in vitro*.

CONCLUSION

L'haplodiploïdisation du tournesol par culture d'anthers *in vitro* rencontre encore des difficultés, notamment au niveau de la différenciation des embryons en plantules.

Toutefois, même si les rendements sont encore faibles et très liés au génotype de la plante mère, cette technique présente un avantage non négligeable par rapport à la gynogenèse, la fréquence des doublements spontanés semblant nettement plus élevée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALISSA A., SERIEYS H. et JONARD R., 1985.** Sur les possibilités de régénérations d'espèces sauvages et d'hybrides interspécifiques du genre *Helianthus* par androgénèse *in vitro*. C.R. Acad. Sc. Paris, 300 (1), 25-30.
- BOHOROVA H.E., ATANASSOV A.I. and ANTONOVA G.P., 1980.** In vitro isolation of anthers from interspecific hybrids in the *Helianthus* genus. C.R. Acad. Bulgarie, Bio. Genétique, 33 (11), 1545-1548.
- DUMAS DE VAULX R. et CHANBONNET D., 1982.** Culture in vitro d'anthers d'aubergine (*Solanum melongena* L.): stimulation de la production de plantes au moyen de traitements à +35°C associés à de faibles teneurs en substances de croissance. Agronomie, 2(10), 983-988.
- DUMAS DE VAULX R., CHANBONNET D. et POCHARD E., 1981.** Culture *in vitro* d'anthers de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à +35°C. Agronomie, 1(10), 859-864.
- KELLER W.A. and ARMSTRONG K.C., 1979.** Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. Theor. Appl. Genet., 55, 65-67.
- MEZZAROBBA A. et JONARD R., 1986 -** Effets du stade de prélèvement et des prétraitements sur le développement *in vitro* d'anthers prélevées sur le tournesol cultivé (*Helianthus annuus* L.) C.R. Acad. Sc. Paris, 303 (5), 181-186.
- HONNIER H., 1976 -** Culture in vitro de l'embryon immature de *Capsella bursa - pastoris* - Rev. Cyt. Biol. Vég., 39, 1-20.
- MOREL G. and WETHORE R.H., 1951 -** Fern tissue culture. Am. J. Bot., 38, 141-143.
- MURASHIGE T. and SKOOG F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15, 473-497.