



**HAL**  
open science

**Culture d'antheres in vitro chez trois Solanacees maraicheres: le piment (*Capsicum annum L.*), l'aubergine (*Solanum melongena L.*), la tomate (*Lycopersicon esculentum Mill.*) et obtention de plantes haploides**

D. Chambonnet

► **To cite this version:**

D. Chambonnet. Culture d'antheres in vitro chez trois Solanacees maraicheres: le piment (*Capsicum annum L.*), l'aubergine (*Solanum melongena L.*), la tomate (*Lycopersicon esculentum Mill.*) et obtention de plantes haploides. *Sciences du Vivant [q-bio]*. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 1985. Français. NNT: . tel-02857921

**HAL Id: tel-02857921**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02857921>**

Submitted on 8 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

A C A D E M I E D E M O N T P E L L I E R

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

**T H E S E**

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc  
pour obtenir le grade de **Docteur d'Université**

**CULTURE D'ANTHERES IN VITRO CHEZ TROIS SOLANACEES MARAICHÈRES :**

**LE PIMENT (Capsicum annuum L.), L'AUBERGINE (Solanum melongena L.)**

**LA TOMATE (Lycopersicon esculentum Mill.) ET OBTENTION DE PLANTES HAPLOIDES**

par

**Daniel CHAMBONNET**

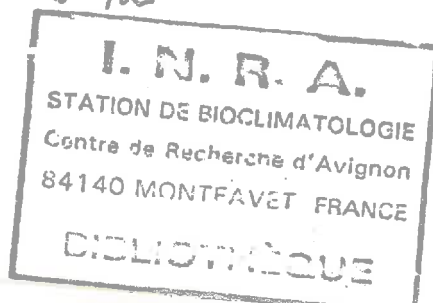
I.N.R.A., Station d'Amélioration des Plantes Maraîchères  
B.P. 94 - 84140 MONTFAVET

soutenue le 17 avril 1985 devant la Commission d'Examen :

M. R. JONARD, Président  
Mme N. PARIS-PIREYRE  
MM. J. HUGARD  
C. RAQUIN  
R. DUMAS DE VAULX

16 OCT. 1985

No 965



**Bi TR6**

Ce travail réalisé à la station d'Amélioration des Plantes Maraîchères de Montfaret que dirige Monsieur BECAUT, s'intègre dans le programme de recherches sur l'haploïdie confié à Monsieur DUMAS-de-VAULX.

Je remercie Monsieur JONARD, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc qui a accepté de présider le jury de cette thèse, ainsi que les autres personnes qui ont bien voulu examiner ce mémoire : Madame PARIS-BIREYRE, également Professeur à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Monsieur HUGARD, Professeur à l'École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Monsieur RAQUIN, chargé de Recherches à l'Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, Messieurs DUMAS-de-VAULX et BECAUT, respectivement Maître et Directeur de Recherches à la Station d'Amélioration des Plantes Maraîchères de Montfaret.

Monsieur DUMAS-de-VAULX m'a confié ce travail, m'a conseillé tout au long de la rédaction des résultats, et la cordialité de nos rapports n'est sans

doute pas le moindre faitum de révolte  
dont j'ai bénéficié.

Ma reconnaissance s'adresse aussi à  
madame TROUSSE qui a dactylographié  
ce texte avec un soin extrême, et à ma-  
dame LATERROT qui m'a constamment  
aidé à me procurer les documents bi-  
bliographiques.

Et puis ..... Comment ne pas penser à  
tous ceux déjà partis, ou encore présents,  
aupquels je me suis lié depuis plus de  
20 ans à Montfaret, dont l'amitié  
m'est si précieuse, et qui m'ont  
encouragé.

Je témoigne enfin ma gratitude aux  
auteurs que j'ai cités, qui m'ont donné  
l'illusion de comprendre, car ...

Je n'ai jamais compris grand' chose  
Il n'y a jamais grand' chose  
ni petite chose.

Il y a autre chose.

Autre chose,

C'est ce que j'aime, qui me plaît  
Et que je fais.

J. Brévert.

### **Abréviations utilisées**

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>2,4-D</b>	Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique
<b>AIA</b>	Acide Indole-3-Acétique
<b>ANA</b>	Acide 1-Naphtalène Acétique
<b>AG3</b>	Acide Gibbérellique
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	Acide Ethylènediaminotetraacétique, sel disodique
<b>HD</b>	Haploïde doublé

## SOMMAIRE

<b>I - INTRODUCTION</b>	<b>p. 1</b>
1. Caractères généraux des haploïdes chez les Solanacées	
2. Intérêts des haploïdes	
3. Exemples d'utilisation pratique des haploïdes	2
<b>II - DIFFERENTES VOIES D'HAPLOIDISATION</b>	<b>3</b>
<b><u>A. VOIES D'OBTENTION DES HAPLOIDES</u></b>	
1. <u>In situ</u>	
1.1. <u>Origine maternelle</u>	
1.2. <u>Origine paternelle</u>	5
2. <u>In vitro</u>	6
2.1. <u>Origine maternelle</u>	
2.2. <u>Origine paternelle</u>	7
<b><u>B. MECANISME DE L'ANDROGENESE PAR CULTURE D'ANTHERES IN VITRO</u></b>	<b>9</b>
1. <u>Rappel de la microsporogenèse in situ</u>	
2. <u>Déviati on de la maturation des grains de pollen</u>	10
2.1. <u>Quand se produit la déviation ?</u>	
2.2. <u>Comment se produit la déviation</u>	11
2.3. <u>Résultats de la déviation</u>	
2.4. <u>Quels sont les facteurs qui agissent sur la déviation ?</u>	12
<b>III. MATERIEL VEGETAL ET TECHNIQUES DE CULTURE IN VITRO</b>	<b>23</b>
<b><u>A. GENERALITES SUR LES SOLANACEES</u></b>	
<b><u>B. LE PIMENT (Capsicum annum L.)</u></b>	<b>24</b>
1. <u>Origine</u>	
2. <u>Botanique</u>	25
3. <u>Intérêt économique</u>	
4. <u>Cultivars de piment utilisés dans nos essais</u>	26
<b><u>C. L'AUBERGINE (Solanum melongena L.)</u></b>	
1. <u>Origine</u>	
2. <u>Botanique</u>	
3. <u>Intérêt économique</u>	27
4. <u>Cultivars d'aubergine utilisés dans nos essais.</u>	
<b><u>D. LA TOMATE (Lycopersicon esculentum Mill.)</u></b>	<b>28</b>
1. <u>Origine</u>	
2. <u>Botanique</u>	
3. <u>Intérêt économique</u>	29
4. <u>Cultivars de tomate utilisés dans nos essais</u>	

<u>E. LES TECHNIQUES DE LABORATOIRE</u>	p. 30
1. <u>Les milieux de culture</u>	
2. <u>Techniques de prétraitement des boutons floraux au froid et de traitement des anthères à la chaleur</u>	31
2.1. <u>Prétraitement au froid</u>	
2.2. <u>Traitement à la chaleur</u>	
3. <u>Désinfection du bouton floral</u>	32
4. <u>Mise en culture des anthères</u>	
5. <u>Technique de détermination rapide du stade d'évolution des microspores après la mise en culture</u>	
6. <u>Technique de détermination rapide du stade d'évolution des microspores sur la plante</u>	33
7. <u>Observation des mitoses somatiques de piment, aubergine, tomate</u>	
<u>F. TECHNIQUE DE DOUBLEMENT CHROMOSOMIQUE</u>	34
<b>IV - ANDROGENESE PAR CULTURE D'ANTHERES DE PIMENT (Capsicum annuum L.)</b>	36
<u>A. RAPPEL DES FACTEURS PERMETTANT L'ANDROGENESE PAR CULTURE D'ANTHERES CHEZ LE PIMENT</u>	36
<u>B. FACTEURS AMELIORANTS</u>	37
1. <u>Changement de la nature du traitement physique et de la nature du matériel végétal traité.</u>	
1.1. <u>Résultats</u>	
1.2. <u>Conclusion</u>	
2. <u>Action d'un traitement par la chaleur pendant les 2 ou 8 premiers jours de culture (teneurs variables en 2,4-D, teneur constante en kinétine)</u>	38
2.1. <u>Résultats</u>	
2.2. <u>Conclusion</u>	
3. <u>Action d'un traitement par la chaleur pendant les 2 ou 8 premiers jours de culture (teneurs variables en 2,4-D, absence de kinétine)</u>	39
3.1. <u>Résultats</u>	
3.2. <u>Conclusion</u>	
4. <u>Action d'un traitement par la chaleur pendant les 2 ou 8 premiers jours de culture (teneurs équivalentes en 2,4-D et kinétine)</u>	40
4.1. <u>Résultats</u>	
4.2. <u>Conclusion</u>	41
5. <u>Conclusion de ces 3 essais</u>	
6. <u>Mise au point du milieu R<sub>2</sub></u>	42

<u>C. APPLICATION DE LA TECHNIQUE A UNE GAMME ELARGIE</u>	
<u>DE GENOTYPES</u>	p. 42
1. <u>Résultats</u>	43
2. <u>Conclusion</u>	44
Autre essai	
1. <u>Résultats</u>	
1.1. <u>Rendements en plantes</u>	
1.2. <u>Niveau de ploïdie</u>	
1.3. <u>Qualité des plantes produites</u>	
<u>D. DISCUSSION ET CONCLUSION SUR LES FACTEURS AMELIORANTS</u>	45
<u>V - ANDROGENESE PAR CULTURE D'ANTHERES D'AUBERGINE</u>	47
(Solanum melongena L.)	
<u>A. EFFET PRODUIT SUR DES ANTHÈRES DE VARIÉTÉ "DOURGA"</u>	
<u>PAR UN TRAITEMENT A LA CHALEUR (35°C) PENDANT LES 8</u>	
<u>PREMIERS JOURS DE CULTURE</u>	47
1. <u>Résultats</u>	48
1.1. <u>Rendements en plantes</u>	
1.2. <u>Niveau de ploïdie</u>	
2. <u>Conclusion</u>	49
<u>B. EFFET DE L'ABSENCE DE KINETINE DANS LE MILIEU DE CULTURE</u>	
1. <u>Résultats</u>	50
1.1. <u>Rendements en plantes</u>	
1.2. <u>Niveau de ploïdie</u>	
2. <u>Conclusion</u>	
<u>C. EFFET PRODUIT SUR LES ANTHÈRES DE LA VARIÉTÉ "DOURGA"</u>	
<u>PAR LE REMPLACEMENT DU 2,4-D PAR L'AIA</u>	51
1. <u>Résultats</u>	
1.1. <u>Rendements en plantes</u>	
1.2. <u>Niveau de ploïdie et voies embryogènes</u>	
2. <u>Conclusion</u>	
<u>D. RECHERCHE D'UN MILIEU DE CULTURE PERFORMANT SUR UNE</u>	
<u>SÉRIE ÉTENDUE DE GENOTYPES</u>	52
1. <u>Les milieux de culture</u>	
2. <u>Résultats toutes variétés confondues</u>	
2.1. <u>Milieux embryogènes</u>	
2.2. <u>Milieux non embryogènes</u>	53
2.3. <u>Effet de concentration des éléments associés 2 par 2</u>	
<u>sur les rendements en plantes</u>	



3. <u>Conclusion sur la composition des milieux</u>	p. 54
4. <u>Résultats variétaux</u>	
5. <u>Cas particuliers du cultivar "Ronde de Valence" et des hybrides F1 réciproques ("Ronde de Valence" x "Dourga") et ("Dourga" x "Ronde de Valence")</u>	56
5.1. <u>"Ronde de Valence"</u>	
5.2. <u>Les hybrides F1 réciproques ("Ronde de Valence" x "Dourga") et ("Dourga" x "Ronde de Valence")</u>	
6. <u>Conclusions sur les résultats variétaux</u>	57
<b><u>E. APPLICATION DE LA TECHNIQUE A DU MATERIEL EN COURS DE SELECTION</u></b>	<b>58</b>
1. <u>Matériel végétal</u>	
2. <u>Résultats</u>	
2.1. <u>Rendements en plantes</u>	
2.2. <u>Niveau de ploïdie</u>	59
3. <u>Conclusion partielle</u>	
<b><u>F. CONCLUSION GENERALE</u></b>	
<b>VI - CULTURE D'ANTHERES DE TOMATE (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)</b>	<b>63</b>
<b><u>A. GENERALITES</u></b>	
<b><u>B. ESSAI DES MILIEUX DE CULTURE QUI DONNENT DE BONS RESULTATS CHEZ LE PIMENT</u></b>	<b>64</b>
<b><u>C. ESSAI DES MILIEUX DE CULTURE QUI DONNENT DE BONS RESULTATS CHEZ L'AUBERGINE</u></b>	<b>65</b>
1. <u>Résultats</u>	
2. <u>Conclusion</u>	66
<b><u>D. ESSAI DE REMPLACEMENT DU 2,4-D PAR L'AIA OU L'ANA</u></b>	<b>67</b>
1. <u>Remplacement du 2,4-D par l'AIA</u>	
1.1. <u>Résultats</u>	
2. <u>Remplacement du 2,4-D par l'AIA et de la kinétine par la zéatine</u>	
2.1. <u>Résultats</u>	68
3. <u>Remplacement du 2,4-D par l'ANA</u>	
3.1. <u>Résultats</u>	
4. <u>Conclusion de ces essais</u>	
5. <u>Recherche de l'influence de la gibbérelline dans le milieu d'induction</u>	69
5.1. <u>Résultats</u>	
6. <u>Recherche de l'influence de la teneur en saccharose du milieu d'induction</u>	
6.1. <u>Résultats</u>	70
6.2. <u>Conclusion</u>	

7. <u>La fabrication de nouveaux milieux de culture</u>	71
7.1. <u>Résultats toutes variétés confondues</u>	
8. <u>Essais d'amélioration du milieu C<sub>D</sub></u>	72
8.1. <u>Variation des teneurs en saccharose du milieu C<sub>D</sub></u>	
8.2. <u>Résultats</u>	
8.3. <u>Conclusion</u>	73
8.4. <u>Recherche de l'effet d'acides aminés incorporés au milieu C<sub>D</sub></u>	
8.5. <u>Résultats</u>	
8.6. <u>Recherche de l'effet d'une dose élevée en chélate de fer NaFeEDTA avec le milieu C<sub>D</sub></u>	74
8.7. <u>Résultats</u>	
9. <u>Conclusion de ces essais</u>	
 <u>E. CONCLUSION GENERALE</u>	 75
 VII - <u>UTILISATION DES HAPLOIDES ET HAPLOIDES DOUBLES (HD)</u> <u>DE PIMENT ET AUBERGINE</u>	  77
VIII - <u>DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	80
 ANNEXES	 86
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 91

## I - INTRODUCTION

Selon RILEY, cité par RAQUIN (1980) : "un haploïde est un sporophyte qui possède la garniture chromosomique du gamétophyte de la même espèce".

### 1. Caractères généraux des haploïdes chez les Solanacées

L'observation des haploïdes de Datura, tabac, pomme de terre, piment, aubergine, pétunia, montre que leur taille est réduite par rapport à celle des individus diploïdes de la même espèce. Les feuilles étroites et allongées sont souvent ternes. Les entrenœuds sont courts, et les yeux situés à l'aisselle des feuilles poussent précocement donnant aux plantes un aspect buissonnant. Toutes les pièces florales sont réduites, les fleurs sont généralement stériles, parfois, on peut noter la présence de rares grains de pollen d'apparence normale, mais peu ou pas fonctionnels. Non fécondé, l'ovaire se développe parthénocarpiquement.

### 2. Intérêts des haploïdes

Ce point a souvent été discuté, notamment par NITSCH (1972), CHASE (1974), DEMARLY (1975), GALLAIS (1978), PELLETIER (1979), HANDRO (1981), NITSCH (1981).

- Obtention rapide de l'homozygotie par doublement des chromosomes. Ainsi on peut obtenir des lignées fixées que l'on peut tester valablement pour leur valeur propre et leur valeur en combinaison.

- Simplification de l'analyse génétique

. L'application d'agent mutagène aux diploïdes permet l'observation directe des mutations récessives sur les individus haploïdes qui en sont issus.

. Etude génétique

= Création de lignées trisomiques à partir de la pollinisation d'un haploïde par du pollen provenant d'une plante diploïde normale. Ces lignées permettent la localisation de gènes sur les chromosomes. Un tel travail est en cours chez le piment pour construire un début de carte génétique (POCHARD, 1970, 1977).

= Visualisation des caractères récessifs portés à l'état hétérozygote par des hybrides F<sub>1</sub>.

= Transfert génome/cytoplasme. L'androgenèse in situ peut permettre de transférer un génome dans un cytoplasme différent.

- Incorporation en sélection

. Récurrente. Elle peut se faire à 2 niveaux :

= Pour mesurer les progrès génétiques d'un cycle à l'autre par l'observation d'un nombre limité de lignées HD et ainsi juger de la valeur du matériel à l'état homozygote et de la recombinaison des caractères.

= Pour sortir du système d'amélioration du matériel de base et aller vers la création variétale par sortie d'un nombre plus élevé de lignées HD dont on pourra tester la valeur propre ainsi que leur valeur en combinaison si l'objectif est la création d'hybrides F1.

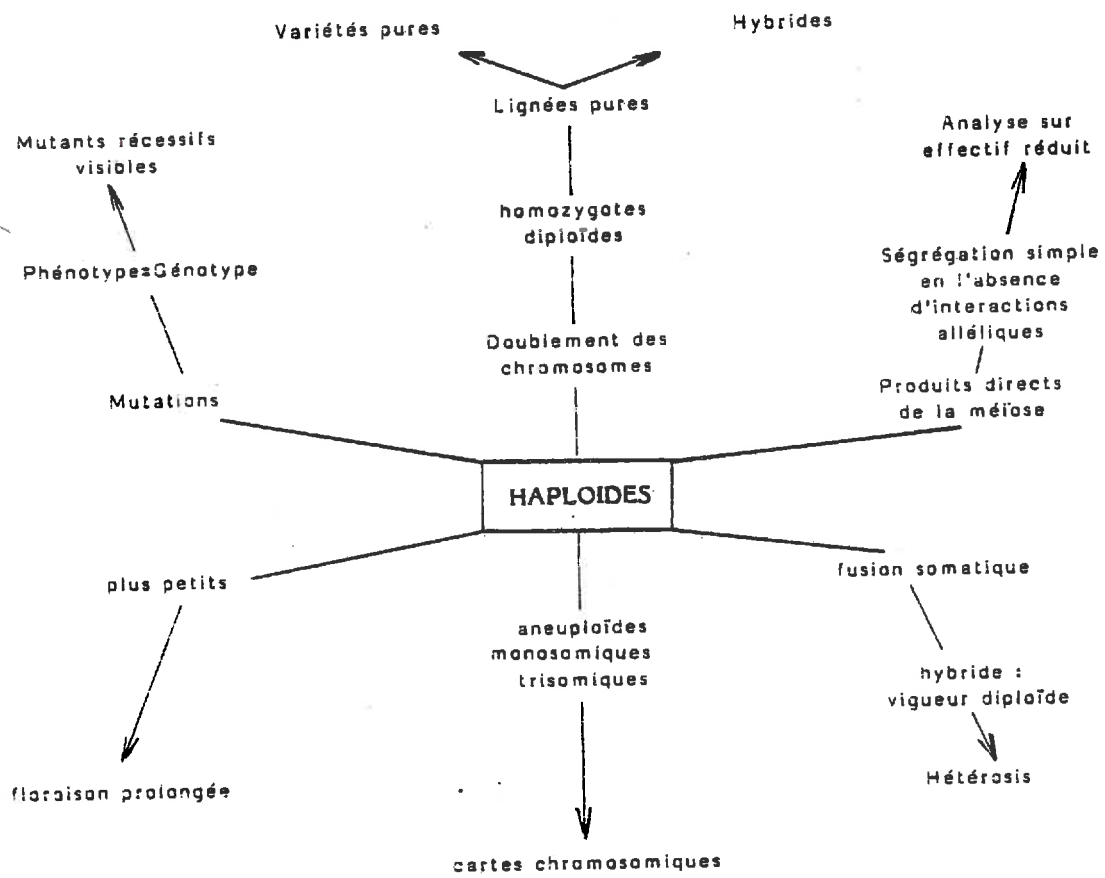
. L'haploïdisation peut s'incorporer également comme moyen de fixation rapide dans d'autres schémas de sélection.

Dans tous les cas, une étude plus approfondie doit être effectuée pour déterminer le niveau d'incorporation des HD en sélection, et étudier les lignées HD ainsi obtenues. Pour ce dernier point, on peut relever quelques remarques sur leur stabilité ou conformité.

Il peut exister en effet de légères mais significatives différences entre les haploïdes diploïdisés et les individus des variétés fixées de départ : chez le coton par exemple (MEREDITH et al., 1970) ; le blé (PICARD, 1978) ; le riz (TRUONG, 1977, citée par PICARD, 1978 ; ANDRE, 1978) ; chez Nicotiana sylvestris Speggaz. et Combes DE PAEPE (1977) constate que les haplo-diploïdes croisés entre eux sont plus vigoureux et s'orientent vers un type d'individus particuliers. Pour PELLETIER (1979), les haploïdes issus de "lignées pures" révèlent des variations qui peuvent être préexistantes ou bien induites par le processus lui-même.

### 3. Exemples d'utilisation pratique des haploïdes

L'haploïdie est désormais incluse dans divers programmes de sélection. Parmi les espèces de grande culture, l'exemple le plus ancien est celui du maïs (CHASE, 1969). Les schémas de sélection de l'orge (KASHA & KAO,



1970), la pomme-de-terre (WENZEL & SOPORY, 1978), le riz (CHASE, 1978), le blé (PICARD et al., 1976), le colza (RENARD & DOSBA, 1980) l'utilisent.

En culture maraîchère, elle apparaît chez l'asperge (DORE, 1977), le piment (POCHARD & DUMAS DE VAULX, 1971) et l'aubergine (Research Group of Haploïd Breeding, Pékin, 1978).

#### 4. Conclusion

Chez les végétaux supérieurs, l'haploïdie est un état naturel ou induit compatible avec la vie, que le sélectionneur exploite après doublement chromosomique. Les différentes applications de l'haploïdie que nous avons vues justifient l'importance des travaux entrepris pour leur obtention. Cependant l'intérêt réel des haploïdes ne sera vraiment établi qu'après une suffisamment longue expérience de leur utilisation dans une gamme variée d'espèces et de schémas de sélection.

## II - DIFFERENTES VOIES D'HAPLOIDISATION

Au cours des quinze dernières années, l'intérêt pour l'utilisation de l'haploïdie et la recherche des voies d'obtention chez les végétaux supérieurs, s'est accru considérablement.

### A. VOIES D'OBTENTION DES HAPLOIDES

#### 1. In situ

##### 1.1: Origine maternelle

##### = Polyembryonie

En 1943, COOPER rapporte l'apparition de jumeaux chez Lilium, la plante haploïde provient du développement d'une synergide. Il observe également l'apparition de plantes jumelles à la suite de croisement interspécifique chez Nicotiana. Les mêmes observations sont faites par YAKOULEV (1968). Chez le piment (Capsicum annuum L.), la gémellité haploïde apparaît avec une fréquence de 1 pour 10 000 environ (CHRISTENSEN, 1943 ; POCHARD, 1969). Une synergide serait vraisemblablement à l'origine de l'embryon supplémentaire (DUMAS DE VAULX & POCHARD, 1974 ; DUMAS DE VAULX, 1977). Chez la vigne (Vitis vinifera L.), la polyembryonie est une caractéristique

variétale contrôlée génétiquement. Elle pourrait être influencée par certains facteurs du milieu : faible taux de nouaison, conditions climatiques (BOUQUET, 1980). Elle apparaît après la double fécondation et permet le développement d'une cellule haploïde du sac embryonnaire habituellement réprimée.

= Perturbations du processus de fécondation

- . Croisements interspécifiques
 

Apparition d'une paire de vrais jumeaux haploïdes  $n = 20$  pour chacune des plantes à la suite d'un croisement entre Cucurbita maxima Duch. par C. moschata Duch. (HAYASE, 1954).

Le protoxyde d'azote appliqué au moment de la seconde mitose pollinique provoque la formation d'un seul noyau spermique chez Solanum phureja L. fécondant S. tuberosum L. La double fécondation n'existe pas ; ce phénomène stimule le développement parthénogénétique de la cellule-oeuf (MONTEZUMA DE CARVALHO, 1967).

Chez Gossypium barbadense L., TURCOTTE & FEASTER (1969), révèlent des cas de semigamie. "Lors de la fécondation, le noyau mâle pénètre dans l'oosphère mais la fusion ne se fait pas et l'embryon est une chimère de secteurs haploïdes d'origine maternelle et paternelle" (RAQUIN, 1980).

Obtention d'haploïdes après croisement de Cucumis melo L. x C. ficifolius A. Rich. : espèce sauvage africaine tétraploïde (DUMAS DE VAULX, 1979).
- . Irradiations subies par le zygote avant la première mitose. Chez Petunia hybrida Hort., CORNU & MAIZONNIER (1970) induisent le développement d'un haploïde par traitement mutagène au stade zygote après une fécondation hybride.
- . Irradiations subies par le pollen chez Nicotiana sanderae Hort. (DULIEU, 1964 ; PANDEY, 1973).
- . Inactivation du gamète mâle. Chez le tremble, la fusion avec le noyau femelle est empêchée à la suite d'inactivation du pollen par le bleu de Toluidine (ILLIES, 1974). Chez la pomme-de-terre, l'inactivation se produit par action de la colchicine sur la division du gamète mâle. La colchicine inhibe la forma-

tion du fuseau durant la division cellulaire (MONTELONGO-ESCOBEDO & ROWER, 1969).

= Après fécondation incomplète ne concernant que les noyaux secondaires.

Chez le maïs, SARKAR & COE (1966) constatent que l'albumen des graines contenant un haploïde, est triploïde et la fusion est presque toujours solitaire.

Dans le croisement Hordeum vulgare L. par H. bulbosum L., il y a élimination progressive et totale du génome de H. bulbosum L. au cours des premières divisions de l'embryon (KASHA & KAO, 1970 ; LANGE, 1971).

La fécondation est incomplète par suite d'élimination chromosomique. Ce cas se rencontre chez Triticum aestivum L. pollinisé par Hordeum bulbosum L. Les chromosomes de H. bulbosum L. sont éliminés. Le mécanisme de production de ces haploïdes semble être le même que pour la production d'haploïdes d'orge à la suite du croisement d'H. vulgare L. par H. bulbosum L. (BARCLAY, 1975 ; SNAPE et al., 1980).

Par croisement intergénérique de Raphanus sativus L. par Brassica oleracea L. KANEKO & YUKIO (1980) obtiennent Raphanobrassica. L'hybride recroisé par R. sativus L. produit un haploïde de R. sativus L. apparu sous forme de couple de jumeaux.

= Mécanisme inconnu

C'est le cas chez les "fèves plates" du cacao pour lesquelles "les haploïdes peuvent résulter soit d'une fécondation retardée, soit de combinaisons génétiques défavorables qui entraînent un ralentissement de la croissance de l'embryon, soit de phénomènes de stérilité particulière liés à un défaut de fécondation ou à une faillite de la mégasporogénèse, soit enfin d'un stimulus d'origine quelconque" (DUBLIN, 1973).

## 1.2. Origine paternelle

= Irradiations subies par l'ovule avant fécondation

C'est le cas d'Anthirrhinum majus L., la fleur femelle traitée aux rayons X est pollinisée par du pollen de fleur non irradiée (EHRENSBERGER,



1948, cité par POCHARD, 1969).

= Semigamie. Cas déjà envisagé dans le paragraphe précédent, et vu ici sous l'aspect développement du gamète mâle.

## 2. In vitro

### 2.1. Origine maternelle

C'est la voie la plus proche de la voie normale et c'est pourtant la technique in vitro qui obtient jusqu'à maintenant le plus faible nombre d'exemples de réussite. Elle fait appel au développement des cellules haploïdes du sac embryonnaire d'ovules non fécondés après culture in vitro d'ovules ou d'ovaires.

Lorsqu'il y a fécondation chez le piment par exemple, les tubes polliniques atteignent le sac embryonnaire en 48 heures, mais la division du zygote ne débute que 5 à 6 jours après pollinisation (DUMAS DE VAULX, 1977 ; MOLHOVA, 1977). Il se produit pendant ce temps des phénomènes que la technique de la gynogenèse in vitro doit induire artificiellement.

Chez Gingko biloba L., TULECKE (1964) et chez Solanum melongena L. UCHIMIYA et al. (1971) provoquent le développement de tissus haploïdes sans obtenir de plantes.

Chez Hordeum vulgare L., SAN NOEUM (1976, 1978) obtient directement des plantes chlorophylliennes.

PREIL (1977), CAGNET-SITBON (1981), MEYNET & SIBI (1984) induisent la gynogenèse de Gerbera jamesonii Hook.

ZONGEHUN & HAISHAN (1979), ZHU & WU (1979) initient après passage par cals, des plantes haploïdes de Triticum aestivum L. C'est lorsque le pollen est au stade uninucléé qu'ils mettent en culture les ovules non fécondés du même épi. Par la même technique, ils obtiennent également des haploïdes de Nicotiana tabacum L.

Chez Oriza sativa L., ASSELIN DE BEAUVILLE (1980) provoque l'apparition directe de plantes haploïdes chlorophylliennes. Leur origine serait due aux cellules antipodes (IRAT 1982).

Les dernières publications concernent la betterave (BOSSOUTROT & HOSEMANS, 1983), le lys (GU & CHENG, 1983), tandis que chez la courgette (CHAMBONNET & DUMAS DE VAULX, à paraître) des résultats encourageants ont été obtenus.

## 2.2. Origine paternelle

### = Culture de pollen isolé

NITSCH & NORREEL (1973) cultivent du pollen de Datura innoxia Mill. soumis à un choc thermique. Egalement en 1973, DEBERGH & NITSCH rapportent les premiers résultats obtenus chez la tomate.

L'induction et le développement d'embryons androgénétiques de Datura innoxia Mill. sont renforcés si les boutons floraux sont soumis à une température basse, et les grains de pollen isolés, centrifugés avant d'être cultivés à l'obscurité pendant un temps assez long (SANGWAN-NORREEL, 1977).

### = Pollen précultivé

Des essais ont été réalisés pour modifier la technique de prélèvement de pollen d'anthères précultivées pendant quelques jours. MAHESHWARI et al. (1982) citent les travaux de NITSCH (1974a), REINERT et al. (1975), WERNICKE & KOHLENBACH (1977) sur Nicotiana tabacum L., WEATHERHEAD & HENSHAW (1979) sur Solanum tuberosum L. et enfin CHEN et al. (1980) sur Oriza sativa L.

### = Culture d'anthères

Le plus fréquemment, les microspores contenues dans l'anthère sont uninucléées et atteignent le stade lère mitose pollinique : Nicotiana tabacum L. (DUNWELL, 1981), N. rustica L. (TAGUCHI & MII, 1982), Triticum aestivum L. (PICARD & DE BUYSER, 1973). Pour le marronnier et le citronnier, les microspores doivent être uninucléées jeunes, alors que pour l'Hévéa et les Cupressus, le stade uninucléé âgé est préféré.

## Species in which androgenesis has been reported\*

<b>DICOTYLEDONS</b>	
Chenopodiaceae	<i>Rosa damascena</i> (C)
<i>Beta vulgaris</i> (P)	<i>R. hybrida</i> (C)
Compositae	Rubiaceae
<i>Gerbera jamesonii</i> (P)	<i>Coffea arabica</i> (C)
Convolvulaceae	Rutaceae
<i>Pharbitis nil</i> (P)	<i>Poncirus trifoliata</i> (P)
Cruciferae	Salicaceae
<i>Arabislopsis griffithiana</i> (C)	<i>Populus berolinensis</i> (P)
<i>A. korshinskyi</i> (C)	<i>P. canadensis</i> × <i>P. koreana</i> (P)
<i>A. pumila</i> (C)	<i>P. harbinensis</i> × <i>P. pyramidalis</i> (P)
<i>A. thaliana</i> (P)	<i>P. nigra</i> (P)
<i>Brassica campestris</i> (P)	<i>P. simonii</i> × <i>P. nigra</i> (P)
<i>B. napus</i> (P)	<i>P. ussuriensis</i> (P)
<i>B. oleracea</i> (P)	Sapindaceae
<i>B. oleracea</i> × <i>B. alboglabra</i> (P)	<i>Aesculus hippocastanum</i> (P)
<i>Iberis amara</i> (C)	Saxifragaceae
Cucurbitaceae	<i>Ribes nigrum</i> (PE)
<i>Luffa cylindrica</i> (PE)	Scrophulariaceae
<i>L. echinata</i> (PE)	<i>Digitalis purpurea</i> (P)
Euphorbiaceae	Solanaceae
<i>Hevea brasiliensis</i> (P)	<i>Atrapa belladonna</i> (P)
Geraniaceae	<i>Capsicum annuum</i> (P)
<i>Pelargonium hortorum</i> (P)	<i>C. frutescens</i> (C)
<i>P. roseum</i> (P)	<i>Datura innoxia</i> (P)
Geraniaceae	<i>D. metel</i> (P)
<i>Salvinipetala imantha</i> (P)	<i>D. meteloides</i> (P)
Leguminosae	<i>D. muricata</i> (P)
<i>Arachis correntina</i> (C)	<i>D. stramonium</i> (P)
<i>A. glabrata</i> (C)	<i>D. wrightii</i> (P)
<i>A. hypogaea</i> (P)	<i>Hyoscyamus albus</i> (P)
<i>A. villosa</i> (P)	<i>H. muticus</i> (P)
<i>Cajanus cajan</i> (C)	<i>H. niger</i> (P)
<i>Phaseolus aureus</i> (C)	<i>H. pusillus</i> (P)
<i>P. vulgaris</i> (C)	<i>Lycium halimifolium</i> (P)
<i>Vicia faba</i> (C)	<i>Lycopersicon esculentum</i> (P)
Primulaceae	<i>L. peruvianum</i> (C)
<i>Primula ohromica</i> (P)	<i>L. pimpinellifolium</i> (PE)
Ranunculaceae	<i>Nicotiana affinis</i> (P)
<i>Anemone canadensis</i> (P)	<i>N. alata</i> (P)
<i>A. coronaria</i> (PE)	<i>N. attenuata</i> (P)
<i>A. hepatica</i> (PE)	<i>N. banariensis</i> (P)
<i>A. multifida</i> (P)	<i>N. clevelandii</i> (P)
<i>A. runcinata</i> (P)	<i>N. glauca</i> × <i>N. langsdorffii</i> (P)
<i>A. virginiana</i> (P)	<i>N. glutinosa</i> (P)
<i>Helleborus foetidus</i> (PE)	<i>N. knightiana</i> (P)
<i>Paeonia albiflora</i> (PE)	<i>N. langsdorffii</i> (P)
<i>P. hybrida</i> (P)	<i>N. longiflora</i> (P)
<i>P. lactiflora</i> (C)	<i>N. nudicaulis</i> (P)
<i>P. lutea</i> (PE)	<i>N. otophora</i> (P)
<i>P. suffruticosa</i> (PE)	<i>N. paniculata</i> (P)
Rosaceae	<i>N. plumbaginifolia</i> (P)
<i>Fragaria ananassa</i> (P)	<i>N. ruimondii</i> (P)
<i>Prunus amygdalus</i> (C)	<i>N. rustica</i> (P)
<i>P. armeniaca</i> (C)	<i>N. sanderi</i> (P)
<i>P. avium</i> (PE)	<i>N. stocktonii</i> (P)
<i>P. persica</i> (C)	<i>N. suaveolens</i> (P)
<i>Pyrus communis</i> (PE)	<i>N. sylvestris</i> (P)
<i>P. malus</i> (PE)	<i>N. tabacum</i> (P)
	<i>N. velutina</i> (P)
	<i>Petunia axillaris</i> (P)
	<i>P. axillaris</i> × <i>P. hybrida</i> (P)
	<i>P. hybrida</i> (P)
<i>Physalis minima</i> (P)	Ulmaceae
<i>Scopolia carniolica</i> (P)	<i>Ulmus americana</i> (C)
<i>S. lurida</i> (P)	Vitaceae
<i>S. physaloides</i> (P)	<i>Vitis vinifera</i> (P)
<i>Solanum tuberosum</i> (P)	<i>V. vinifera</i> × <i>V. ripensis</i> (P)
<i>S. cardiophyllum</i> (P)	MNOCOTYLEDONS
<i>S. caripense</i> (C)	Commelinaceae
<i>S. chacoense</i> (C)	<i>Tradescantia bracteata</i> (PE)
<i>S. demissum</i> (P)	Gramineae
<i>S. demissum</i> × <i>S. tuberosum</i> (P)	<i>Aegilops caudata</i> × <i>A. umbellata</i> (P)
<i>S. dulcamara</i> (P)	<i>Agropyron repens</i> (PE)
<i>S. fendleri</i> (P)	<i>Bromus inermis</i> (P)
<i>S. hjertingii</i> (P)	<i>Festuca arundinacea</i> (P)
<i>S. howgassii</i> (P)	<i>F. pratensis</i> (PE)
<i>S. infundibuliforme</i> (P)	<i>F. pratensis</i> × <i>Lolium multiflorum</i> (PE)
<i>S. megistocerosolobum</i> (P)	<i>Hordeum vulgare</i> (P)
<i>S. melongena</i> (P)	<i>Lolium multiflorum</i> (P)
<i>S. michoacanum</i> (P)	<i>Oryza perennis</i> (P)
<i>S. microdonum</i> (P)	<i>O. sativa</i> (P)
<i>S. mocheense</i> (C)	<i>Phleum pratense</i> (C)
<i>S. multisectum</i> (P)	<i>Secale cereale</i> (P)
<i>S. nigrum</i> (P)	<i>S. montanum</i> (PE)
<i>S. pennellii</i> (P)	<i>Setaria italica</i> (P)
<i>S. phureja</i> (P)	<i>Triticale</i> (P)
<i>S. phureja</i> × <i>S. tuberosum</i> (P)	<i>Triticum aegilopoides</i> (C)
<i>S. pinnatisectum</i> (C)	<i>T. aestivum</i> (P)
<i>S. psivrichum</i> (P)	<i>T. dicoccoides</i> (P)
<i>S. stenotumum</i> (P)	<i>T. durum</i> (P)
<i>S. stoloniferum</i> (P)	<i>T. ispananicum</i> (C)
<i>S. suaveolens</i> (C)	<i>T. mammoicum</i> (C)
<i>S. surattense</i> (P)	<i>T. spelta</i> (C)
<i>S. tuberosum</i> 4n (P)	<i>T. vulgare</i> (P)
<i>S. tuberosum</i> 2n (P)	<i>T. vulgare</i> × <i>Agropyron glaucum</i> (P)
<i>S. vernei</i> (C)	<i>Zea mays</i> (P)
<i>S. verrucosum</i> (P)	Iridaceae
<i>S. verrucosum</i> × <i>S. chacoense</i> (P)	<i>Freesia species</i> (P)
<i>S. verrucosum</i> × <i>S. tuberosum</i> (P)	Liliaceae
<i>Withania somnifera</i> (C)	<i>Asparagus officinalis</i> (P)
Theaceae	<i>Lilium longiflorum</i> (P)
<i>Camellia sinensis</i> (C)	

\* Response observed has been indicated in parentheses by abbreviations: C for callus, PE for a few pollen divisions up to globular embryo formation and P for embryo or plantlet formation. To avoid a long list of literature, references to the reports have been omitted.

Chez la tomate, les microspores sont en méiose (ZAGORSKA et al., 1982).

Chez le Prunus armeniaca L., le jeune grain de pollen doit être bicellulaire (HARN & KIM, 1972).

La culture d'anthères peut donner naissance à :

- l'initiation de quelques divisions jusqu'à la formation d'un globule.
- développement d'un cal.
- obtention directe d'embryons et de plantes haploïdes chlorophylliennes.

#### - Culture d'anthères de piment

Les premières méthodes d'obtention, décrites par WANG et al. (1973), GEORGE & NARAYANASWAMI (1973), KUO et al. (1973), SACCARDO & DEVREUX (1974), NOVAK (1974) et enfin HARN et al. (1975) sont difficilement reproductibles dans nos conditions. Par ailleurs toutes imposent le passage par cal et le taux de régénération ensuite est très faible.

En 1979, SIBI et al. produisent des plantes par la voie "embryogénèse directe". VAGERA & HAVRANEK (1983) puis ABAK (1983) adaptent la technique à leurs conditions.

#### - Culture d'anthères d'aubergine

En 1973, RAINA & IYER différencient des plantes haploïdes à partir de cals de pollen. Les premiers haploïdes sont produits directement ou régénérés à partir de cals, repiqués sur plusieurs milieux différents (Research Group of Haploid Breeding, 1978). En 1979, ISOUARD et al., puis RAQUIN & ISOUARD (1980) obtiennent des embryons directement ainsi que des cals plus ou moins organisés. DUMAS DE VAULX & CHAMBONNET (1982) produisent à partir d'anthères traitées à la chaleur sur un milieu de culture à faibles taux de substances de croissance de nombreuses plantes de génotypes divers.

#### - Culture d'anthères de tomate

Des cals sont issus des anthères à différents stades de mise en culture.

- . Après mitose pollinique (SHARP et al., 1971)
- . En début de méiose (GRESSHOFF & DOY, 1972)
- . Au stade uninucléé (GULSHAN et al., 1981 ; BOURDON, 1982).

Une association de 2 prétraitements des anthères : centrifugation et basse température est sans effet sur la poursuite des divisions (LIEBERWIRTH et al., 1981).

Seuls ZAGORSKA et al. (1982) cultivant des anthères dont les microspores sont en méiose obtiennent des plantes.

A la suite des travaux de TRAN THANH VAN & TRINH (1981) et TRINH & TRAN THANH VAN (1981), sur tabac, l'idée selon laquelle les grains de pollen provenant de fleurs nées in vitro seraient plus embryogènes que des grains récoltés en serre ou au champ, est reprise par BOURDON (1982).

## B. MECANISME DE L'ANDROGENESE PAR CULTURE D'ANTHERES IN VITRO

### 1. Rappel de la microsporogénèse in situ

La gamétogénèse consiste en un changement de stade (passage du stade sporophyte au stade gamétophyte) avec une étape intermédiaire : la réduction chromatique ou méiose. Alors que les cellules mères du pollen appartiennent au sporophyte, avec les tétrades haploïdes débute le gamétophyte. Chaque cellule des tétrades contient initialement un noyau. Par une mitose, la microspore devient binucléée. Elle renferme alors une cellule végétative et une cellule reproductrice. La différenciation semble provenir d'une répartition inégale des protéines du noyau de la microspore uninucléée. La cellule végétative reçoit les protéines synthétisées juste avant la mitose. Cette distribution a lieu durant l'anaphase. Le noyau végétatif situé au milieu du grain de pollen ne se divise plus, tandis que le noyau reproducteur subit une seconde division qui donne naissance à 2 noyaux reproducteurs soit dans le grain avant l'anthèse (Graminées), soit dans le tube pollinique (Solanacées). Chacun d'eux est entouré par un faible volume de cytoplasme. L'ensemble d'un de ces noyaux et son cytoplasme constitue une petite cellule reproductrice. Parfois les 2 noyaux formés ne sont pas séparés par une membrane (SANGWAN & CAMEFORT, 1982).

## 2. Déviation de la maturation des grains de pollen

L'induction du processus d'androgénèse consiste à stopper la différenciation entreprise sur la plante par la microspore, en plaçant l'anthere en conditions artificielles sur milieu nutritif.

Chez le Datura metel L., SANGWAN (1981) observe au moment de la dédifférenciation cellulaire, en début de culture, des amas ribosomiques qui sont certainement le siège d'une activité métabolique particulière.

### 2.1. Quand se produit la déviation ?

= Au moment de la méiose.

C'est le cas chez la tomate (ZAGORSKA et al., 1982). L'induction du cal et de l'organogénèse dans les cultures d'anthers dépend exclusivement du stade de développement des cellules mères de pollen.

= Au moment de la première mitose pollinique.

Situation la plus fréquente. Les noyaux vont se différencier. Le choc de la culture est de produire les conditions environnementales qui feront que c'est le plus souvent la cellule végétative qui devra entrer en division.

Chez Datura, les jeunes grains de pollen ayant subi une mitose anormale (les 2 noyaux sont dans le même cytoplasme, non séparés par des cloisons), pourraient être à l'origine des embryons en culture d'anthers (SANGWAN & CAMEFORT, 1982).

Le noyau reproducteur peut parfois se diviser et produire de 2 à 6 cellules. Cependant, il n'est pas impossible, mais c'est un événement très rare, que le gamète mâle (un des produits de la première mitose pollinique) donne naissance à un haploïde, mais avec beaucoup de risques qu'il soit vitalement déficient, (DEVREUX, 1971, cité par PANDEY, 1973).

Chez Datura, l'embryon androgénétique a pour origine soit la cellule végétative seule, soit la cellule végétative et la cellule reproductrice (SANGWAN, CAMEFORT, 1982).

Les microspores appartiennent au groupe des IEDC (induced embryogenic determined cells) (SHARP et al., 1980). Elles doivent réentrer dans le cycle mitotique, se redifférencier en cellules précurseurs embryogéniques ou cellules mères embryogéniques (EMC)

= Du stade tétrade jusqu'à juste avant la formation des grains d'amidon dans le gamétophyte mâle.

C'est le cas rencontré chez Datura metel L. (SANGWAN, 1981).

## 2.2. Comment se produit la déviation

= Changement d'orientation de l'axe fusorial

Cette modification est le résultat d'une mitose pollinique perturbée (NITSCH, 1972 ; PANDEY, 1973). Ce dérangement empêcherait la différenciation en noyau végétatif et noyau reproducteur. "La première mitose très stratifiée in vivo produit in vitro deux cellules semblables. C'est de l'orientation du fuseau que dépend le maintien ou la suppression de la stratification" (DEMARLY, 1977).

Un choc thermique est à l'origine de la modification (NITSCH & NORREEL, 1973). Le même choc thermique peut en effet avoir un effet mécanique en modifiant la viscosité du cytoplasme. Cela pourrait gêner la migration du noyau, dans le cas des températures basses, qui précède toujours la mitose, d'où réalisation d'une mitose à axe fusorial modifié, d'où androgenèse (SANGWAN, 1981).

## 2.3. Résultats de la déviation

Le développement des microspores in vitro peut déboucher sur deux voies d'embryogenèse.

= L'embryogenèse directe.

Ce cas se rencontre surtout chez les Solanacées : Datura innoxia Mill. (GUHA & MAHESHWARI, 1964), Nicotiana tabacum L. (BOURGIN & NITSCH, 1967), Petunia hybrida Hort. (RAQUIN & PILET, 1972), Capsicum annum L. (SIBI et al., 1979). Les produits sont haploïdes ou diploïdes par doublement spontané.

= L'embryogenèse indirecte.

Elle est issue de la prolifération d'un cal. Pour PANDEY (1973), les cals sont des proliférations indifférenciées dues à des degrés variables de dédifférenciation, résultant de la première mitose. Cette voie se rencontre surtout chez les Graminées : Oryza sativa L. (NIIZEKI & OONO, 1968), Triticum aestivum L. (PICARD & DE BUYSER, 1973 ; WANG et al., 1973), Triticale (BERNARD et al., 1976), les Crucifères (KELLER et al., 1975 ; RENARD & DOSBA, 1980) et les Liliacées (PELLETIER et al., 1972).

Le passage par cal peut présenter plusieurs inconvénients dont le principal est l'instabilité chromosomique des produits obtenus : aneuploïdie, polyploïdie (DORE & LAMBERT, 1973 ; DORE & CORRIOLS-THEVENIN, 1979, GRUNEWALDT & MALEPSY, 1975 ; RENARD & DOSBA, 1980 ; KHODER et al., 1984).

Parfois chez la même espèce, l'une et l'autre voies peuvent se réaliser. C'est le cas chez les ligneux (RADOJEVIC, 1980) mais aussi les Solanacées (RAQUIN & ISOUARD, 1980 ; SANGWAN, 1981).

#### 2.4. Quels sont les facteurs qui agissent sur la déviation ?

C'est la combinaison de facteurs physico-chimiques appliqués aux microspores contenues dans l'anthere qui permet la déviation de la mitose.

= L'anthere

DICKINSON (1982) démontre le rôle important tenu par les tissus de l'anthere lors de la formation du pollen. En androgenèse in vitro, PELLETIER & ILLAMI (1972), PELLETIER (1979) énoncent la nécessité de conditionner les anthers de tabac en début de culture au moins. L'anthere serait seule responsable du déclenchement de l'androgenèse. Il doit se créer pendant les premières heures de culture une situation environnementale stable. Le développement des microspores est dû à des relations adéquates entre elles et les tissus somatiques. Ce sont les cellules du tapis qui permettent le passage des substances nutritives contenues dans le milieu, qui en synthétisent d'autres, et permettent les échanges gazeux. Cependant, CADIC & SANGWAN (1983), d'après RAQUIN (com. pers.), observent chez Datura une dégénérescence accélérée du tapis par les traitements favorisant l'androgenèse.



CHEN ZHENGHUA et al. (1979) cités par SANGWAN-NORREEL & DUHOUX (1982) ont mis en évidence des relations structurales entre les embryons polliniques de l'Hévéa et les tissus de l'anthere. Ceci suggère en effet l'existence d'échanges importants.

L'anthere conditionne le milieu de culture en début de culture au moins en l'enrichissant en acides aminés. Il y aurait ainsi fuite de métabolites de l'anthere vers le milieu.

#### = Les chocs thermiques

Après formation des microspores, avant mitose, s'établit une période de repos, variable selon les espèces, pendant laquelle le pollen est sensible aux températures.

"La phase G2 (caractérisée par l'état 4 chromatides par type de chromosome) du cycle de la cellule est considérée comme étant celle qui prépare la division. La sensibilité thermique est particulièrement grande. Un accroissement de synthèses marque cette phase" (ESSAD, 1974).

Chez Nicotiana tabacum L. "les traitements thermiques affectent surtout la survie des anthères et contrebalancent dans une certaine mesure l'effet négatif de la sénescence des tissus somatiques" (PELLETIER, 1979).

#### - L'action du froid

Elle est particulièrement étudiée chez les Graminées. Le froid (3° à 5°C) est appliqué aux épis. Chez Triticum vulgare L., il augmente la fréquence d'induction (PAN et al., 1975).

Chez le Ray-grass d'Italie, avec l'obscurité, le froid (3°C) augmente la production de structures androgénétiques. Mais le succès est subordonné au choix des anthères vertes et au génotype des plantes (PAGNEZ & DEMARLY, 1979).

Sur épis de Triticum aestivum L. provenant de plantes préalablement vernalisées pendant 2 mois, le froid synchronise les microspores et agit sur

le doublement spontané en l'augmentant (AMSSA et al., 1980). Cette observation renforce l'opinion de Mc COMB (1978) selon laquelle le froid est responsable de l'absence de fuseau d'où augmentation du taux de ploïdie.

Chez les Solanacées, il peut être appliqué :

- . sur hampes florales de Datura innoxia Mill. Le froid (3°C) produit alors une augmentation du nombre d'anthères embryogènes (NITSCH & NORREEL, 1973) ;
- . sur boutons de pétunia (6°C pendant 48 h) permet aux anthères cultivées à 27°C  $\pm$  1°C de produire une embryogenèse directe (MALHOTRA & MAHESHWARI, 1977) ;
- . sur boutons de piment, il augmente la production de cals (SACCARDO & DEVREUX, 1974) ;
- . sur boutons de piment, le froid (4°C pendant 48 h) induit également l'embryogenèse directe (SIBI et al., 1979) ;
- . sur boutons de tabac, le froid appliqué (10°  $\pm$  0,5°C) permet le développement direct en plantules (RASHID & REINERT, 1980).
- . sur boutons de Datura metel L., le froid permet une forte augmentation d'acides aminés libres due au stress provoqué par ce refroidissement, au changement d'environnement hydrique, et au début de sénescence des boutons. Les réserves d'amidon diminuent, cette source d'énergie pourrait être consommée par les microspores embryogènes sous l'effet du froid (SANGWAN, 1981).
- . sur les fleurs de pétunia (6°C), il agit également favorablement (RAQUIN, 1982) ;
- . chez la tomate, sous forme de préincubation des anthères à 5°C pendant 48 h, il favorise la formation de cals friables et la division nucléaire (LIEBERWIRTH et al., 1981).

Chez les Citrus, appliqué aux anthères, il permet l'obtention de cals haploïdes et diploïdes (DRIRA & BENDABIS, 1975, cités par SANGWAN-NORREEL & DUHOUX, 1982).

D'une manière générale, le froid a un effet synchronisant, stoppe le métabolisme existant, et si sa période d'application est assez longue, permet aux cellules de pollen de partir sur une nouvelle voie métabolique in vitro, en condition inductive pour la cellule végétative (NITSCH, 1981).

- L'action de la chaleur

Chez les Graminées, la chaleur appliquée sur épis de Triticum aestivum L. peut promouvoir l'induction de cals et l'aptitude à la différenciation des organes (PAN et al., 1975).

Chez les Crucifères, la chaleur (32°C) induit une embryogenèse directe, qu'elle soit appliquée sur boutons de Brassica napus L. (HANSSON, 1978) ou sur anthères de Brassica campestris L. (35°C) (KELLER & ARMSTRONG, 1978, 1979).

Sur anthères de piment (DUMAS DE VAULX et al., 1981a ; DUMAS DE VAULX et al., 1982) et sur anthères d'aubergine (DUMAS DE VAULX, CHAMBONNET, 1982), l'effet de la chaleur (35°C) est hautement embryogène.

Chez Brassica napus L., RENARD & DOSBA (1980) provoquent l'apparition directe d'embryons à partir d'anthères conservées à 4°C pendant 4 jours, puis cultivées ensuite à 30°C à l'obscurité pendant 14 jours et à 25°C à la lumière.

Les chocs thermiques appliqués sous forme de prétraitements avant la mise en culture ou pendant les premiers jours de culture, doivent être différenciés de la température à laquelle sont soumises les anthères par la suite.

= Les conditions de culture (lumière-obscurité)

Il semble que les Graminées s'accommodent mieux de l'obscurité et des températures basses (CLAPHAM, 1971, 1973 ; BERNARD, 1980), pourtant le Ray-grass d'Italie permet une embryogenèse directe lorsque les anthères sont soumises à l'action d'une température de 27°-28°C et 16 h d'éclairement.

Chez les Solanacées également, aucune loi générale ne peut être énoncée. Solanum tuberosum L. se comporte mieux sous l'influence de la lumière que sous celle de l'obscurité avec 26°C  $\pm$  1°C. L'aubergine, le piment supportent des alternances de températures ainsi qu'une photopériode de 12 à 16 h (ISOUARD et al., 1979 ; SIBI et al., 1979 ; DUMAS DE VAULX & CHAMBONNET, 1982).

Toutes ces conditions ne paraissent cependant pas constituer des facteurs limitants.

### = Le milieu de culture

#### - Les éléments minéraux :

L'influence spécifique de certains sels minéraux en androgenèse a été particulièrement étudiée chez les Céréales et le riz notamment par les chercheurs chinois.

Ainsi, bien qu'il existe une concentration optimum en macro-éléments dans le milieu de culture, des variations de ces éléments dans des proportions considérables, modifient peu l'effet d'induction de culture de pollen (CHU, 1978).

Les anthères sont sensibles aux sels d'ammonium. A ce propos, CHU (1978) et LIANG (1978) s'accordent à dire que des basses concentrations d'ions ammonium sont bénéfiques à la production de cals de pollen, alors que des concentrations légèrement plus hautes, suppriment ces formations. LIANG (1978) constate également une répercussion du taux d'ammonium sur le taux de pousses vertes différenciées à partir des cals.

Des études menées sur Graminées par CHU (1978), il ressort que pour un taux d'azote déterminé, il est préférable d'utiliser dans un milieu de culture conjointement  $\text{KN}_3$  et  $(\text{NH}_4)_2 \text{S}_4$  plutôt que séparément.

Selon le Kwangtung Institute of Botany et CHANGI et al., puis KUO et al., cités par LIANG (1978), il est absolument certain que le taux de fer influence la fréquence de cals induits de pollen chez le riz.

Le taux de  $\text{S}_4^-$  est sujet à variations selon que l'ion est apporté par  $(\text{NH}_4)_2 \text{S}_4$  ou  $\text{MgS}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ . La fréquence d'induction de cals est légèrement différente.

Le taux de concentration nécessaire en ions  $\text{Mg}^{++}$  est variable selon les chercheurs. Il influence significativement la fréquence d'induction des cals.

#### - Les vitamines et acides aminés :

On utilise en culture in vitro les vitamines du groupe B. Elles agissent à doses très faibles, de l'ordre du  $\text{mg.l}^{-1}$ . Le défaut de vitamines provoque des carences à l'origine de troubles graves.

- . La Thiamine ou vitamine B1 est synthétisée par certains tissus en culture, mais tous les tissus en ont besoin. Elle agit sur la rhizogenèse en corrélation avec l'auxine.
- . La Pyridoxine ou vitamine B6 agit aussi sur la croissance des racines.
- . Le Méso-Inositol est parfois nécessaire à l'efficacité des cytokinines, soupçonné d'être un régulateur de la perméabilité cellulaire.
- . L'Acide Pantothénique est assez mal synthétisé par les tissus en culture.
- . La vitamine B12 ou Cyanocobalamine semble être impliquée dans le métabolisme des protéines, des graisses, des hydrates de carbone, et des acides nucléiques. Son absence d'un milieu de culture où se trouvent des cellules de Euglena gracilis Z, provoque des déficiences dans l'évolution chromatique et l'organisation nucléolaire de ces micro-organismes (BERTAUX et al., 1978).
- . La Glycine intervient dans la réduction des nitrates et dans la synthèse des acides aminés principaux.
- . Glutamine et Sérine sont nécessaires chez les Solanacées pour amener les pro-embryons en plants (NITSCH, 1977).

La Sérine a quelque effet sur la dédifférenciation et le développement postérieur des grains de pollen de Nicotiana tabacum L. en culture de grains isolés. Toutefois si la sérine a été incorporée au milieu de culture, les grains peuvent à peine être induits à se développer en plantes entières, à moins qu'ils aient été précultivés en anthères (LU, 1978).

Toujours chez Nicotiana tabacum L., la sélection de pollen embryogène se fait sur un milieu de culture contenant Asparagine et Glutamine (RASHID & REINERT, 1980).

Chez Datura metel L., SANGWAN (1981) démontre que la concentration en proline libre qui était forte lors de l'induction de l'androgenèse, diminue pour devenir faible lorsque les jeunes plantes sont formées.

Chez les Graminées, c'est surtout sur les cultures d'anthères de maïs qu'ont porté les études. Ainsi pour MIAO et al. (1978), si 500 mg de glutamine sont incorporés à 1 l de milieu de culture, la fréquence de formation d'embryoïdes de pollen peut être augmentée. KU et al. (1978) amènent une dose plus élevée : 800 mg.l<sup>-1</sup> et complètent avec 200 mg.l<sup>-1</sup> de sérine.

La glutamine est toxique à 1g.l<sup>-1</sup> en milieu liquide, tandis que cette quantité peut être utilisée sans risque en milieu solide (HENRY & DE BUYSER, 1983).

Les mêmes auteurs ont montré qu'une forte concentration de glutamine et le remplacement d'agar par l'agarose permettent en l'absence d'extrait de pomme de terre d'obtenir une amélioration de l'efficacité en androgénèse chez le blé.

LICHTER (1982), initie l'embryogénèse chez Brassica napus L. en traitant les boutons au froid dans une solution sucrée qui contient  $800 \text{ mg.l}^{-1}$  de glutamine.

#### - Le sucre

Son rôle essentiel est certainement d'être la source de carbone la plus importante. COLLET (1968) pense que certains sucres ou une concentration particulière de l'un d'eux peuvent susciter à la manière d'une hormone, une action spéciale. Pour TRAN THAN VAN (1977) sur tabac, sous des conditions identiques par ailleurs, c'est-à-dire même rapport auxine/cytokinine, le type d'organogénèse dépend de la qualité et de la quantité de sucre. Et enfin pour DUNWELL (1981), c'est le composant le plus efficace pour maintenir en survie l'anthere et permettre l'induction de l'embryogénèse.

CLAPHAM (1973) pense que le sucre n'a pas d'influence sur la pression osmotique. En effet, utilisant indifféremment une solution concentrée à 6% de glucose, ou une solution concentrée à 6% de fructose, ou une solution à 3% de saccharose avec une substance neutre : le polyéthylène glycol dont la pression osmotique correspond à celle d'une solution de saccharose à 9%, il obtient un nombre élevé de cals d'Hordeum dans tous les cas. Son influence dans le maintien de la pression osmotique est admise par PAN et al. (1975).

Le saccharose est le sucre le plus couramment utilisé.

Chez les Graminées, les doses sont comprises entre  $60$  et  $120 \text{ g.l}^{-1}$

(CLAPHAM, 1971, 1973 ; MATSUBAYASHI & KURANAKI, 1975 ; PAGNEZ & DEMARLY, 1979 ; RAQUIN, 1980 ; ZENKTELER & STEFANIAK, 1982) dans le milieu de culture. Cependant, selon SUNDERLAND (1970), 12 % ne paraissent pas indispensables pour Hordeum vulgare L. Pour Triticum aestivum L. 6% de sucre augmentent la production de cals de pollen et diminuent celle de cals somatiques.

Toutefois, pour initier des plantes à partir de cals, ceux-ci doivent être transférés sur des milieux moins riches en cet élément. C'est le cas pour Triticum aestivum L. (PICARD & DE BUYSER, 1973).

Chez les Crucifères, pour Brassica napus L., HANSSON (1978) puis RENARD & DOSBA (1980) utilisent 10 g.l<sup>-1</sup>. LICHTER (1982) comparant les besoins d'une culture d'anthères et ceux d'une culture de pollen isolé de Brassica napus L., indique respectivement 00,23 M et 0,35 M.

Pour Brassica campestris L., KELLER & ARMSTRONG (1979) cultivent les anthères sur un milieu dont la teneur est 20 g.l<sup>-1</sup>.

Chez les Solanacées, ce sont 20 et 30g.l<sup>-1</sup> de saccharose qui sont généralement utilisés (SHARP et al., 1971 ; GEORGE & NARAYANASWAMY, 1973 ; MALHOTRA & MAHESHWARI, 1977 ; ISOUARD et al., 1979 ; SIBI et al., 1979).

Pour la tomate, le saccharose n'est pas morphogène bien qu'il y ait une corrélation entre le pourcentage d'anthères produisant des cals et sa concentration. Selon SHARP et al. (1971), les cals non morphogènes à fortes doses de saccharose, le deviennent à basses concentrations. SHARP et al. (1972) maintiennent le développement de clones haploïdes de tomate par utilisation d'un milieu de culture contenant 40 g de saccharose. Pour MATSUBAYASHI & KURANAKI (1975), cet élément n'est pas important pour cette espèce.

Chez le tabac, NOTH & ABEL (1971) remarquent le peu d'effet de sa présence ou de son absence sur la fréquence d'induction d'anthères cultivées au stade première mitose pollinique. Par contre, si les microspores sont cultivées alors qu'un supplément de lumière est administré, l'absence de sucre paraît favoriser la formation de cals.

Pour NITSCH (1972), 75% des anthères de tabac en culture sur un milieu ne contenant ni vitamines, ni substances de croissance, mais avec seulement 20 g de sucre et du fer, sont capables de produire des plantes.

Afin d'étudier l'androgénèse chez Solanum tuberosum L., SOPORY et al. (1978) travaillent à concentration élevée en sucre.

#### - Les substances de croissance

Certaines existent à l'état naturel. Synthétisées dans les tissus jeunes, elles sont véhiculées dans la plante. D'autres sont apportées par le milieu de culture. Elles interviennent dans les phénomènes de croissance, d'initiation, et de division cellulaire. Les connaissances sur leur mode d'action sont incomplètes.

On sait cependant que comme la température, l'influence hormonale est considérable sur la durée des phases du cycle mitotique (ESSAD, 1974).

#### + Les cytokinines

Elles interviennent sur les cellules ayant déjà entrepris la mitose. Elles ralentissent certaines phases de la mitose comme la métaphase, et en accélèrent d'autres telles que l'anaphase et la formation de la plaque équatoriale (XHAUFFLAIRE & GASPARD, 1968). Employées avec l'auxine, elles rehausseront son action. Ainsi, la division de cellules de tabac exige la présence simultanée d'auxine et de cytokinine (JOUANNEAU, 1971).

Elles stimulent la division cellulaire en initiant la prolifération de cellules différenciées à partir de tissus en repos mitotique et en prolongeant l'activité mitotique dans les populations en croissance. Il existe une corrélation entre la quantité de cytokinine extractible et l'activité mitotique d'un tissu (FOSKETT & TEPFER, 1978).

Elles agissent sur la phase prémitotique en G2 (FOSKETT & TEPFER, 1978 ; WANG et al., 1981) et induisent l'activation d'ARN cytoplasmiques qui interviennent dans la synthèse de protéines cytoplasmiques. Ainsi, après traitement de cultures de tabac par des cytokinines, il y a changement de spectre des protéines synthétisées. Cette synthèse qui a lieu avant la mitose peut être considérée comme un événement de G2 (SHARP et al., 1971).

Leur action se fait en des sites obligatoires spécifiques des ribosomes. Leur effet sur la synthèse des protéines est supposé être dû à une molécule réceptrice. Un tissu en croissance peut être riche en de tels récepteurs (KLAMBT, 1976).

Il est difficile d'envisager que toutes les hormones exercent leur influence directement à travers la même molécule réceptrice. Il pourrait y avoir un



nombre limité de molécules agissant sur les gènes qui contrôlent le développement des embryoïdes. Ce rôle pourrait être assuré par les cytokinines. Les cytokinines agissent à concentrations beaucoup plus basses que les auxines ou gibbérellines. Leur action serait directe ou primaire à l'inverse de celle des autres hormones (SOPORY & MAHESHWARI, 1976b).

La carence momentanée en cytokinine de cellules en culture permet d'obtenir la synchronisation partielle des mitoses. La synchronisation des divisions cellulaires des végétaux supérieurs peut apparaître spontanément en culture in vitro. Sur des organismes uni-cellulaires ou des cellules isolées d'animaux, la réalisation de la synchronisation a permis de savoir que les processus qui supportent la croissance proprement dite sont indépendants des phénomènes liés à la multiplication cellulaire : synthèse d'ADN et mitose (ESSAD, 1974).

#### + Les auxines

Elles amènent les cellules au point de division, ont un rôle catalyseur (XHAUFFLAIRE & GASPARD, 1968). L'auxine exogène est nécessaire pour initier les divisions du grain de pollen, et le mener à la voie haploïde (GEORGE & NARAYANASWAMY, 1973).

L'auxine exogène n'est pas selon SUN (1978) nécessaire à l'initiation de l'androgenèse et au développement ultérieur en plantes chez les Solanacées et les Céréales. Néanmoins, l'addition d'une certaine quantité d'auxine exogène peut amener une diminution de l'avortement du pollen multicellulaire.

De nombreux tissus montrent une phase d'adaptation. Après transfert sur un milieu contenant une auxine, ils sont capables de synthétiser la leur (WILKINS, 1969), mais dans certains cas, ils exigent pour cela de fortes doses de cytokinines (JORDAN & SKOOG, cités par HALL, 1973).

La régénération d'un cal de Medicago sativa L. se fait en absence d'auxine ou en présence de dose faible (KEITH et al., 1978).

Le 2,4-D est l'auxine la plus fréquemment utilisée (SANGWAN & NORREEL-DUHOUX, 1982), mais l'AIA et AG3 permettent aussi l'embryogenèse de plantes ligneuses.

L'AIA, notamment chez les plantes ligneuses, est très intensivement dégradé, aussi il est fort vraisemblable que sa faible efficacité soit liée à une très courte durée d'action (LEGUAY, 1979).

Travaillant avec une souche d'érable, LEGUAY (1979) démontre que la vitesse de métabolisation de l'ANA est 30 à 60 fois supérieure à celle du 2,4-D, d'où la moindre efficacité du premier produit par rapport au second.

Certains génotypes d'une espèce exigent pour entrer en divisions une auxine bien particulière. C'est le cas chez Phaseolus (MOK & MOK, 1977). Par contre, certaines microspores peuvent se développer sans hormone exogène Nicotiana tabacum L, Datura innoxia Mill. (MAHESHWARI et al., 1982).

Les récepteurs auxiniques pourraient aussi se situer au niveau du cytoplasme. Ce serait l'association auxine-récepteur qui rendrait l'hormone active. Ainsi la spécificité d'action résulterait :

- . de la présence ou de l'absence de tel ou tel récepteur ;
- . de l'affinité du récepteur pour l'auxine, certains étant occupés plus rapidement que d'autres (AUGE et al., 1982).

Pour SHARP et al. (1980), elles seraient nécessaires afin de déterminer les cellules embryogènes indéterminées. Les cellules embryogènes prédéterminées n'en auraient pas besoin en début de mitose.

Des modifications de synthèses protéiques s'observent sous l'action auxinique. On suggère que l'auxine a un effet sur la dérégulation de gènes spécifiques, et au niveau de la synthèse glucidique en provoquant l'hydrolyse et la métabolisation rapide de l'amidon. Il paraît également probable que les sites d'action du 2,4-D et de l'AIA ne sont pas les mêmes (MARGARA, 1982).

#### - Le pH

Le pH est une variable importante en milieu de culture. Les cellules des plantes requièrent un pH acide, et un pH initial de 5,5 à 5,8 est optimum. Le pH change pendant le cycle de croissance d'une culture de suspension de cellules. Initialement il y a un abaissement jusqu'à 5, ensuite, il croît et peut atteindre 6 (GAMBORG, 1981).

#### - La gélose et le charbon activé

La gélose est tout d'abord un agent solidifiant le milieu. Elle réalise un complexe colloïdal ayant un faible pouvoir de rétention vis-à-vis des ions. Son aération insuffisante inhibe la croissance de certains tissus. Elle peut apporter des éléments organiques ou minéraux. Les concentrations les

plus couramment utilisées se situent entre 6 et 10 g.l<sup>-1</sup>. WERNICKE & KOHLENBACH (1977) signalent l'effet négatif de certaines impuretés toxiques de la gélose.

Le charbon activé est apporté pour adsorber certaines substances excrétées (composés phénoliques, tanins) par l'explant qui provoquent un brunissement du milieu et inhibition de la croissance puis parfois nécrose. Son apport de l'ordre de 0,5 à 5 g.l<sup>-1</sup> favorise parfois la croissance des tissus en culture d'anthères (MARGARA, 1982).

Il produit un effet stimulant sur l'induction de l'androgenèse in vitro chez Capsicum annuum L. (VAGER & HAVRANEK, 1983).

#### = La plante donneuse

Les cellules de pollen doivent être saines, donc provenir de plantes mères poussant dans de bonnes conditions. Cependant, NITSCH (1981) préconise de stopper l'application de pesticides externes ou systémiques trois à quatre semaines avant prélèvement des boutons floraux.

Par ailleurs, il existe des différences variétales d'aptitude à la culture in vitro. L'expérimentation doit être menée sur une gamme élargie de génotypes.

### III - MATERIEL VEGETAL ET TECHNIQUES DE CULTURE IN VITRO

#### A. GENERALITES SUR LES SOLANACEES

Les 3 espèces étudiées appartiennent à la famille des Solanacées.

Dans la classification du Règne Végétal, les Solanacées appartiennent à l'ordre des Phanérogames, embranchement des Spermaphytes, sous-embranchement des Angiospermes, classe des Dicotylédones, sous-classe des Gamopétales.

Parmi cette famille, on distingue les Atropées et Hyoscyamées à embryon courbe, et les Nicotianées et Salpiglossidées à embryon droit.

Dans la tribu des Atropées, 900 espèces sont réunies parmi lesquelles sont rangées Solanum melongena L., Lycopersicon esculentum Mill. et Capsicum annuum L. (EMBERGER, 1960).

Les plantes de cette famille ont des fleurs hermaphrodites régulières ou très peu irrégulières. Le calice est à 5 divisions ordinairement gamosépale et persiste après la floraison. La corolle gamopétale est à 5 lobes égaux ou très peu inégaux. La fleur possède 5 étamines égales ou presque inégales soudées avec la corolle par la base du filet et alternant avec ses lobes. Les anthères sont soit à déhiscence poricide (tomate, aubergine), soit à déhiscence longitudinale (piment). L'ovaire est divisé en 2 loges notamment chez les variétés améliorées des espèces cultivées pour le fruit (parfois subdivisées chacune plus ou moins complètement en deux) et contient de nombreux ovules. Le style est terminal. Le fruit est tantôt charnu, tantôt sec et s'ouvre alors par des valves ou par un couvercle. Les graines en forme de rein ou de lentille renferment un embryon courbé ou enroulé en spirale au milieu d'un albumen charnu.

Ce sont des plantes à feuilles alternes, à fleurs de couleurs variées et diversement disposées.

Presque toutes les espèces de cette famille sont plus ou moins vénéneuses. Quelques unes cependant sont alimentaires. Un certain nombre d'espèces sont ornementales. Plusieurs Solanacées sont utilisées en médecine.

Ce sont des plantes herbacées ou ligneuses, dont les tiges contiennent un liber interne.

## B. LE PIMENT (Capsicum annuum L.)

### 1. Origine

C'est au Mexique méridional et en Amérique Centrale que se trouverait l'origine de Capsicum annuum L. et de C. frutescens Will. : l'Amérique du Sud (Pérou, Equateur, Bolivie en particulier) serait le berceau de C. frutescens L. et de C. pubescens Ruiz et Peir. (QUAGLIOTTI, 1969).

## 2. Botanique

Son système racinaire est pivotant, avec de nombreuses racines adventives sur axe hypocotylé.

La hauteur moyenne des plantes varie de 0,30 m à plus de 1 m selon les cultivars.

Les feuilles ont un pétiole long, un limbe ovoïde ou lancéolé.

Les fleurs, généralement solitaires, pendantes ou dressées se situent au départ de chaque ramification. Leur corolle blanche ou blanchâtre est formée de 5 pétales soudés. On compte 5 à 7 étamines par fleur. L'anthere de chaque fleur est constituée de 2 sacs polliniques à déhiscence latérale.

Le piment est préférentiellement autogame, mais avec un taux d'allogamie variant de 8 à 30% selon les cultivars. Dans nos conditions, ce taux ne dépasse guère 10%, mais un contrôle manuel avec fermeture des fleurs est réalisé si l'on veut garantir une autofécondation totale.

Le fruit est une baie jaune ou rouge à maturité.

Les graines sont plates et lisses. On en compte 50 à 200 ou 300 par fruit. Elles conservent leur pouvoir germinatif pendant 4 à 5 ans à température ambiante.

## 3. Intérêt économique (C.T.I.F.L., 1978)

La production française se situe aux alentours de 20 000 tonnes pour 1 100 ha cultivés. La région du Sud-Est : Vaucluse et Bouches-du-Rhône fournit 70% de la récolte nationale du 15 juin au 15 août. La région du Sud-Ouest essentiellement le Lot-et-Garonne, voit augmenter sa production. Celle-ci s'étale du 15 août au 10 octobre.

Les fruits sont commercialisés rouges mûrs, ou verts avant maturité.

#### 4. Cultivars de piment utilisés dans nos essais

Ce sont des cultivars à gros fruits de type poivron :

- Lignées B 107, 69-3 [6-3], 69-2 [1-9]. Ces deux dernières, haploïdes doublées ont servi de témoins pour les mises au point techniques, et sont par ailleurs d'excellentes productrices d'haploïdes parthénogénétiques.
- Hybrides F1 : ((YOLO WONDER x YOLO Y)  
(B 107 x YOLO WONDER)  
(69-2 [1-9] x 69-3 [6-3])
- Hybrides F1 entre des lignées de type poivron "YOLO WONDER", "FLORIDA VR2" et des cultivars à petits fruits proches du type sauvage qui sont des géniteurs de résistance à divers parasites : Phytophthora capsici Léon., virus Y de la pomme de terre, virus de la mosaïque du concombre, nématodes à galles :
  - (PM 687 x YOLO WONDER)
  - (PERENNIAL x YOLO WONDER)
  - (PM 217 x YOLO WONDER)
  - (RAMA x YOLO WONDER)
  - (DOUX DES LANDES x FLORIDA VR2)
  - (PERENNIAL x FLORIDA VR2).

### C. L'AUBERGINE (Solanum melongena L.)

#### 1. Origine

L'aubergine est originaire d'Asie, probablement de la région Indo-birmane sa culture est connue en Chine depuis plus de 1 500 ans.

#### 2. Botanique

Les tiges dressées velues ou épineuses s'élèvent à plus de 80 cm de hauteur.

Les feuilles sont oblongues.

Les fleurs à corolle violette ou blanche, solitaires ou en cymes de 2 à 5 unités sont opposées aux feuilles. Les étamines de 1 à 1,2 cm de long alternent avec les lobes de la corolle, et forment un cône qui encadre le style. Les anthères s'ouvrent par 2 pores terminaux laissant échapper un pollen abondant dont le diamètre des grains est de l'ordre de 20 à 23  $\mu$ .

Les fleurs d'aubergine très visitées par les insectes sont à l'origine d'un taux d'allogamie pouvant atteindre 47% (QUAGLIOTTI, 1976). L'autofécondation nécessite un contrôle manuel et la fermeture des fleurs.

Les fruits comestibles avant maturité, sont sphériques, allongés, ou en massue. Leur couleur peut être violette, blanche, jaunâtre ou bigarrée.

### 3. Intérêt économique (C.T.I.F.L., 1978)

La production nationale : 28 000 tonnes est fournie par 1 100 ha. Trois départements assurent 75% de la production, ce sont : les Bouches-du-Rhône : 12 000 T, le Vaucluse : 5 000 T, et le Lot-et-Garonne : 4 000 T.

Les fruits longs sont souvent préférés aux fruits ronds.

### 4. Cultivars d'aubergine utilisés dans nos essais

- Deux obtentions INRA :

DOURGA : lignée pure. Originale par la couleur blanche de ses fruits. Convient pour la culture en plein champ. Ses fruits de saveur douce ont une très bonne aptitude à la conservation après cueillette.

BONICA : hybride F1. Précoce, à tendance parthénocarpique à basse température nocturne. Convient pour la culture hivernale ou printanière en serre ou sous abri plastique.

- Deux lignées à tendance parthénocarpique, sélectionnées à la Station :

B 88-7 à fruits longs et violets.

BUCA à fruits globuleux et violets

## D. LA TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

### 1. Origine

*Lycopersicon esculentum* Mill. est originaire d'Amérique du Sud. Connue tout d'abord comme plante ornementale, sa culture en tant que légume ne s'est largement répandue qu'au 19<sup>e</sup> siècle.

### 2. Botanique

Sous nos climats, la tomate est une plante annuelle à système racinaire très développé. Les tiges herbacées à base parfois liégeuse ont un port rampant ou dressé. Les ramifications sont alternes.

Les feuilles sont composées imparipennées, les folioles le plus souvent composées. La pubescence varie selon les espèces.

L'inflorescence est une cyme en position terminale à sa formation, un bourgeon latéral la repousse ensuite, assure le développement végétatif et donne l'inflorescence suivante.

Les étamines sont de taille égale, les filets soudés à la base du tube de la corolle sont très courts. Les anthères sont allongées, nées sur des filets libres, soudées entre elles en un tube entourant le pistil. Chaque anthère comprend 2 sacs polliniques et se prolonge par un appendice stérile. La déhiscence est interne et longitudinale.

L'ovaire est globuleux à 2 ou plusieurs carpelles surmontés d'un long style enserré dans le tube staminal.

Le fruit est une baie charnue à placentation axile. La morphologie, la couleur, le nombre de loges, la pubescence de cet organe sont variables. Chaque fruit contient de nombreuses graines enveloppées d'une gaine mucilagineuse.

La tomate dans les conditions françaises, et pour les variétés adaptées à ces conditions, est presque totalement autogame. Cependant, l'ensachage des inflorescences constitue une garantie contre une allogamie accidentelle.



### 3. Intérêt économique (C.T.I.F.L. 1978)

La production française dont 300 000 tonnes pour la conserve, est assurée en grande partie par 5 départements du midi. Ce sont : le Vaucluse : 100 000 T, les Bouches-du-Rhône : 105 000 T., le Lot-et-Garonne : 85 000 T., le Gard : 65 000 T., les Pyrénées-Orientales : 45 000 T. Cinquante pour cent de la production du Vaucluse et des Bouches-du-Rhône sont consommés frais.

L'industrie de transformation utilise environ 200 000 T pour réaliser la fabrication de jus, de concentrés, ou de tomates pelées.

### 4. Cultivars de tomate utilisés dans nos essais

#### - Deux obtentions INRA :

PORPHYRE, qui est l'un des parents des hybrides F1 "Montfavet 63-4" et "Montfavet 63-5". Sa croissance est déterminée et sa précocité moyenne. Ses fruits de forme ronde et régulière sont sensibles à la marbrure et mal colorés.

MONALBO, de type Moneymaker avec résistance à la Verticilliose. Sa croissance est indéterminée. Les fruits ont une couleur uniforme, sont petits, réguliers, à 2 loges.

#### - Une variété française

MARMANDE. Ancienne, très cultivée il y a 15 ou 20 ans, à croissance indéterminée. Collet vert, fruit plat, côtelé, nombreuses loges (10), production précoce. Fleurs riches en pollen de bonne qualité même en mauvaises conditions. Pas de résistances.

#### - Une variété russe

SEVERIANIN. Variété précoce, à croissance déterminée, est le géniteur possédant le caractère de parthénocarpie.

Les plantes de piment, aubergine et tomate sur lesquelles les boutons sont prélevés sont produites de la manière suivante :

Les graines sont semées en serre en terreau désinfecté à la vapeur.

Les jeunes plantes au stade 2 feuilles étalées sont repiquées en pots de 7cm de diamètre dans du terreau enrichi en éléments nutritifs.

Au moment de l'épanouissement de la première fleur, les plantes sont rempotées en pots de 18 cm de diamètre ou plantées en serre de culture.

Leur bon état sanitaire est maintenu grâce à l'application de traitements fongicides et insecticides réguliers.

## E. LES TECHNIQUES DE LABORATOIRE

### 1. Les milieux de culture

Ils sont préparés à partir de produits chimiques provenant pour la plupart des Etablissements MERCK, sauf le 2,4-D. Les produits minéraux, pulvérulents ou cristallisés, sont conservés à température ambiante dans leur emballage d'origine en un local spécial, et les produits organiques sont stockés au réfrigérateur.

D'une manière générale, chaque élément entrant dans la constitution d'une solution est dissout séparément des autres dans l'eau distillée. Seule, la vitamine B12 est dissoute dans l'alcool absolu.

Les sels minéraux majeurs concentrés 10 fois par rapport à leur concentration dans le milieu final, constituent en mélange les solutions concentrées de macro-éléments (solutions S.N.G.M. et M.S., cf. Annexes 1 et 2).

Les sels minéraux mineurs concentrés 100 fois par rapport à leur concentration dans le milieu final, constituent en mélange les solutions concentrées de micro-éléments (solutions micro C, R, de HELLER, cf. Annexes 3, 4 et 5).

Afin d'éviter l'apparition de précipités, le pH des macro-éléments est abaissé à 4 par quelques gouttes d'acide chlorhydrique normal.

Les solutions concentrées réparties en fioles de 100 ml pour les macro-éléments, et en plus faibles volumes pour les micro-éléments et vitamines sont conservées au congélateur à température de -18°C.

Les solutions d'auxines et cytokinines de concentrations diverses sont conservées séparément au réfrigérateur.

Par préparation de 1 l de milieu de culture, il faut entendre niveau ajusté à 1 l avant l'apport de sucre et d'agar.

Le pH mesuré par un pH-mètre est toujours ajusté avant stérilisation à l'autoclave, par utilisation d'acide chlorhydrique ou de soude (solutions normales ou déci-normales).

La stérilisation des milieux de culture et divers matériels de verrerie s'effectue à l'autoclave à 112°C pendant 20 mn.

Les boîtes de Pétri en polystyrène de 5cm de diamètre sont reçues stérilisées par le fabricant et renfermées dans des gaines en plastique soudées.

Les milieux de culture gélosés, après stérilisation à l'autoclave sont coulés en boîtes de Pétri stériles sous la hotte à flux laminaire. Ils sont laissés à refroidir et solidifier à l'abri de la lumière jusqu'au lendemain. Ils sont conservés pendant 3 semaines à 1 mois, au réfrigérateur, dans les gaines d'origine scellées.

## 2. Techniques de prétraitement des boutons floraux au froid et de traitement des anthères à la chaleur

Elles se pratiquent à l'obscurité.

### 2.1. Prétraitement au froid

Dès prélèvement, les boutons sont enfermés dans un sac en plastique lui-même déposé au bas d'un réfrigérateur pendant 24 ou 48 h.

### 2.2. Traitement à la chaleur

Dès mise en culture des anthères, les boîtes de Pétri sont enfermées dans une étuve dont la température est maintenue à 35°C. La durée du traitement est de 2 ou 8 jours.

### 3. Désinfection du bouton floral

Elle s'effectue en 4 phases :

- Préparation d'une solution broyée et filtrée d'hypochlorite de calcium à 10%.
- Passage rapide (quelques secondes) des boutons dans cette solution additionnée de 2 à 3 gouttes de mouillant (Tween 80).
- Trempage pendant 10 mn des boutons dans la solution sans mouillant.
- Trois rinçages à l'eau distillée stérile.

La pratique de la désinfection ainsi que toutes les manipulations ultérieures des anthères et plantules se réalisent sous la hotte à flux laminaire.

### 4. Mise en culture des anthères

Les étamines débarrassées de leur filet sont déposées face dorsale convexe en contact avec le milieu nutritif gélosé.

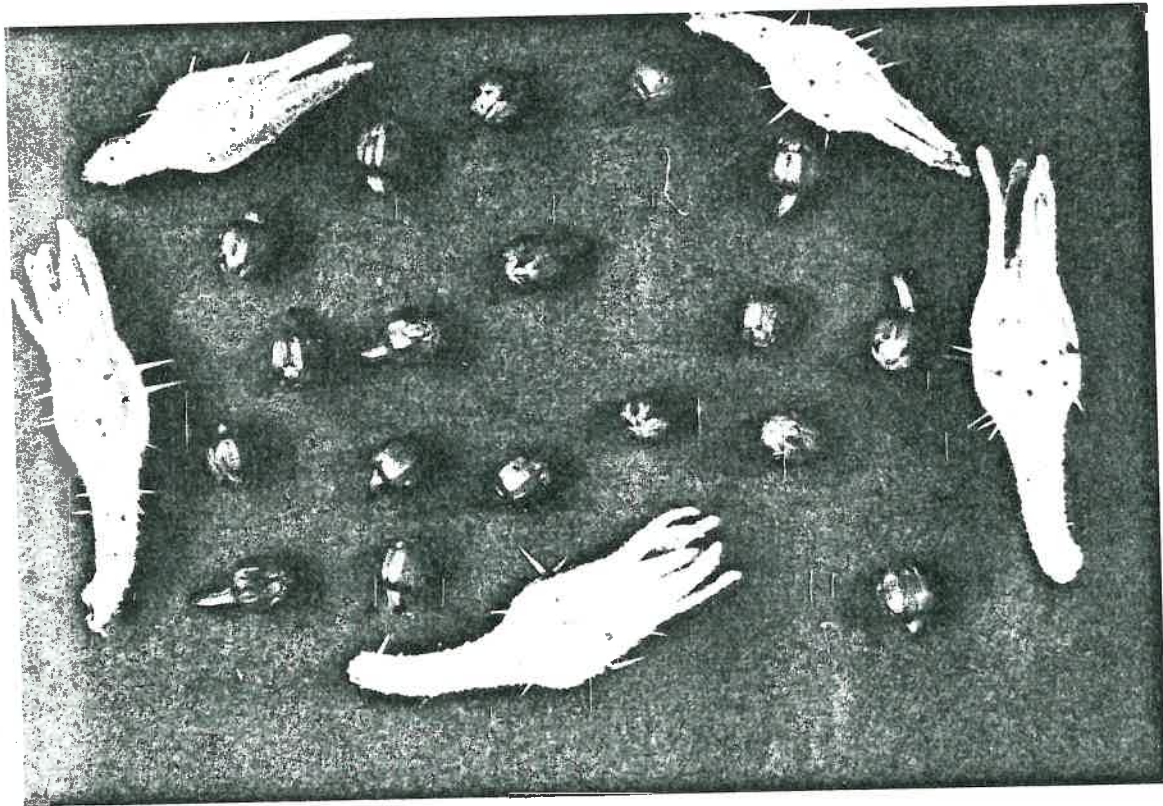
Par boîte de Pétri, les anthères de 2 boutons, soit 10 à 12 anthères, sont rangées en 2 lignes parallèles distantes d'un demi centimètre l'une de l'autre.

Chaque boîte est scellée par un ruban de film plastique étirable (scello-frais ou Reynolon) et porte sur son couvercle le nom de la variété, la nature du milieu de culture, la date et le numéro de l'essai.

La chambre de culture qui reçoit les boîtes est maintenue à température constante 24°-25°C. La photopériode est de 12 h et l'intensité lumineuse produite par des tubes fluorescents est en moyenne de 30 watts/m<sup>2</sup> au niveau des tablettes de culture.

### 5. Technique de détermination rapide du stade d'évolution des microspores après la mise en culture

L'anthère prélevée de la boîte de culture est plongée dans le colorant, carmin hydrochlorique de SNOW (1963) pendant 24 h au moins. Elle est écrasée entre lame et lamelle microscopiques dans une goutte de carmin acétique de BELLING.



Aspect des boutons de piment et d'aubergine au moment de la  
lère mitose pollinique.

## 6. Technique de détermination rapide du stade d'évolution des microspores sur la plante

Les microspores prélevées d'une anthère à l'aide d'une pointe lancéolée sont réparties dans une goutte de carmin acétique de BELLING, préalablement déposée sur une lame microscopique. L'ensemble est recouvert d'une lamelle. La coloration du noyau des cellules gamétiques permet l'observation microscopique.

### - Choix du bouton floral

Chez le piment, au stade première mitose pollinique, les boutons floraux ont un aspect particulier. En effet, les pétales encore verdâtres ainsi que les sépales ont la même taille. L'extrémité libre des anthères est légèrement anthocyanée.

Au stade première mitose pollinique, les pétales des boutons d'aubergine et de tomate sont masqués par le calice.

Des repères phénologiques précis n'existent pas pour ces 2 espèces, et une estimation rapide du stade d'évolution des microspores doit être effectuée les premières fois.

## 7. Observation des mitoses somatiques de piment, aubergine, tomate

En fin de matinée, sont prélevées les extrémités des racines en croissance active.

Elles subissent un prétraitement par l' $\alpha$  monobromonaphtalène en solution aqueuse saturée en 2 temps :

- 3 à 4 h à température ambiante
- 6 à 12 h à 4°C.

Elles sont ensuite placées dans l'alcool acétique 3-1 pendant au moins 12 h.

Les traces d'alcool acétique sont éliminées par un rinçage abondant à l'eau distillée. Ensuite intervient l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique normal maintenu à 60°C pendant 10 mn.

A ce niveau de la technique, les racines d'aubergine et de tomate sont mises à macérer dans une solution à 1% de Pectinase (Rapidase C) à pH acide pendant 50 mn à 35°C ou 1h30 à température ambiante.

Les racines d'aubergine et de tomate subissent un rinçage abondant à l'eau distillée.

Toutes les pointes de racines sont colorées par le réactif de SCHIFF pendant 1 h au moins à température ambiante.

L'écrasement se fait entre lame et lamelle dans une goutte de carmin acétique de BELLING.

#### F. TECHNIQUE DE DOUBLEMENT CHROMOSOMIQUE

Elle se pratique sur des plantes haploïdes jeunes ou adultes en pleine croissance et fraîchement repotées dont les fleurs de 2e ou 3e étage sont épanouies. Elles sont décapitées. Les yeux axillaires principaux situés à l'aiselle des feuilles sont enlevés à l'aide d'une pointe lancéolée. Sur les plaies ainsi pratiquées, est déposée une goutte de solution de colchicine à 5% dans l'eau. La pénétration de colchicine dans les tissus est améliorée si on incorpore à la solution une huile minérale PO7 (Seppic) à concentration de 1%. L'opération est renouvelée le soir ou le lendemain.

Le travail suivant est présenté en rappelant tout d'abord succinctement quels sont les facteurs importants ayant permis l'androgenèse par culture in vitro.

Le détail figure dans une publication (SIBI et al., 1979).

Ensuite est abordée la partie qui fait l'objet de ce mémoire et qui traite :

- Des améliorations de la technique de culture d'anthères chez le piment
- De la mise au point de l'androgenèse chez l'aubergine
- De la tentative de mise au point de l'androgenèse chez la tomate.

Les principales conclusions sont résumées en fin de chaque chapitre et une discussion générale des résultats obtenus sur les 3 espèces termine cet exposé.





Extrait de "Capsicum Newsletter".

L'original se trouve dans "Herbacio nuovo di Castore Durante"  
Venetia, MDCXXXVI

#### IV - ANDROGENESE PAR CULTURE D'ANTHERES DE PIMENT (Capsicum annuum L.)

##### A. RAPPEL DES FACTEURS PERMETTANT L'ANDROGENESE PAR CULTURE D'ANTHERES CHEZ LE PIMENT (et qui ont servi de point de départ à notre travail)

- Concernant les boutons floraux :

- . Prélèvement alors que les anthères contiennent des microspores ayant atteint le stade première mitose pollinique ;
- . Prétraitement par le froid (4°C) pendant 24 h.
- . Mise au point d'une désinfection efficace en utilisant l'hypochlorite de calcium.

- Concernant les anthères :

- . Mise en culture sur un milieu gélosé contenant du 2,4-D (2 mg.l<sup>-1</sup>) et de la kinétine (2 mg.l<sup>-1</sup>).
- . Transfert sur un milieu de repiquage sans 2,4-D et avec 0,10 mg.l<sup>-1</sup> de kinétine après 12 jours de culture.
- . Maintien d'une température homogène : 25°C et d'une photopériode de 12 h, à l'intérieur de la chambre de culture.

Cette technique permet l'obtention directe de plantes sans passage par cal. Leur développement est analogue à celui des embryons issus de la voie sexuée (plantes à 2 cotylédons).

Les comptages chromosomiques de 24 parmi les 35 premières plantes obtenues montrent que la plupart d'entre elles (68 %) sont haploïdes (n = 12).

Les taux d'androgénèse exprimés en nombre de plantes pour 100 anthères en culture, sont relativement faibles et variables d'un génotype à l'autre (0,6 à 1,3 %). C'est la raison pour laquelle nous avons cherché des facteurs améliorant la technique.

		A 4-2	A 35-2	F 4-2	F 35-2	Résultats globaux
(6-3)	A	180	374	153	62	769
	AE	13	32	18	0	63
	GI	68	241	33	0	342
	PI	3	14	3	0	20
	AE % A	7,22	8,56	11,76	0	8,19
	E % A	39,44	68,18	23,52	0	47,07
PI % A	1,70	3,74	1,96	0	2,60	
(1-9)	A	137	89	218	145	589
	AE	0	8	2	0	10
	GI	0	23	2	0	25
	PI	0	2	1	0	3
	AE % A	0	8,98	0,92	0	1,70
	E % A	0	28,09	1,38	0	4,75
PI % A	0	2,25	0,46	0	0,51	
(6-3)x(1-9)	A	123	304	318	-	745
	AE	0	21	5	-	26
	GI	0	149	5	-	154
	PI	0	10	2	-	12
	AE % A	0	6,91	1,57	-	3,50
	E % A	0	53,30	2,20	-	22,28
PI % A	0	3,29	0,63	-	1,61	
(36-x-364)	A	124	197	94	-	415
	AE	2	3	0	-	5
	GI	2	3	0	-	5
	PI	0	2	0	-	2
	AE % A	1,60	1,50	0	-	1,20
	E % A	1,60	2,50	0	-	1,69
PI % A	0	1,02	0	-	0,48	
Résultats globaux	A	564	964	783	207	2518
	AE	15	64	25	0	104
	GI	70	416	40	0	526
	PI	3	28	6	0	37
	AE % A	2,66	6,64	3,19	0	4,13
	E % A	12,94	46,06	5,87	0	22,36
PI % A	0,53	2,90	0,77	0	1,47	

**Tableau 1.** Comparaison des effets des traitements à +35°C et à +4°C appliqués aux boutons floraux (F) pendant 2 jours avant la mise en culture des anthères ou directement aux anthères (A) pendant les 2 premiers jours de culture in vitro.

**Légende**

A 42 Traitement sur anthères, +4°C-2 j  
A 352 Traitement sur anthères, +35°C-2 j  
F 42 Traitement sur boutons, +4°C-2 j  
F 352 Traitement sur boutons, +35°C-2 j.

A Nombre d'anthères mises en culture  
AE Nombre d'anthères embryogènes  
GI Nombre de globules et d'embryons  
PI Nombre de plantes

Par rapport au nombre d'anthères mises en culture :

AE % A Pourcentage d'anthères embryogènes  
E % A Pourcentage d'embryogenèse (globule + embryon + plante)  
PI % A Pourcentage de plantes

## B. FACTEURS AMELIORANTS

### 1. Changement de la nature du traitement physique et de la nature du matériel végétal traité

Les résultats obtenus sur Brassica par KELLER & ARMSTRONG (1978) nous ont incités à essayer l'action d'une température de 35°C. Quatre traitements ont été réalisés :

- . 4°C pendant 2 jours sur boutons : Témoin
- . 35°C pendant 2 jours sur boutons
- . 4°C pendant les 2 premiers jours de culture des anthères
- . 35°C pendant les 2 premiers jours de culture des anthères.

#### 1.1. Résultats

Le tableau 1 résume les résultats obtenus dans cet essai.

Les résultats globaux : 2,90 PI%A et 0,77 PI%A montrent l'intérêt de traiter les anthères à 35°C pendant 2 jours (A 35-2) plutôt que les boutons à 4°C pendant 2 jours (F 4-2).

Pour les cultivars (6-3), (1-9) et F1 (6-3)(1-9), le traitement A 35-2 produit plus de plantes que le traitement A 4-2. Il permet même d'obtenir 2 plantes haploïdes chez la lignée (36x 364) où les traitements à 4°C ont toujours été négatifs.

Sur boutons floraux, le traitement à 35°C n'a pas permis l'obtention de plantes. Les anthères sont devenues rapidement brunes en culture.

#### 1.2. Conclusion

Le traitement des anthères à 35°C pendant les 2 premiers jours de culture in vitro permet d'augmenter sensiblement la réussite de l'androgénèse par rapport aux traitements à 4°C appliqués aux boutons floraux.

Cette augmentation s'exprime par :

- . une augmentation du taux de plantes régénérées pour 100 anthères en culture, et cela pour les géotypes qui répondaient déjà au traitement à 4°C sur bouton floral.

Traitements			35°C-2 j					35°C-8 j				
Milieux mg.l <sup>-1</sup>	2,4-D	kin.	A	AE	GI+E	PI	PI%A	A	AE	GI+E	PI	PI%A
C <sub>A</sub>	0,1	2	477	59	171	7	1,46 0,6 3,02	343	52	98	18	5,25 3,11 8,30
C <sub>B</sub>	1	2	398	27	137	2	0,50 0,06 1,81	184	47	252	1	0,54 0,013 3,02
C <sub>E</sub>	2	2	2087	111	580	35	1,68 1,17 2,33	381	70	355	1	0,26 0,007 1,46

Tableau 2. Effets produits sur le rendement en plantes par le traitement à 35°C pendant 2 ou 8 jours d'anthers en culture. Les milieux contiennent : 0,1 ; 1 ou 2 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D et 2 mg.l<sup>-1</sup> de kinétine.

**Légende :** A Nombre d'anthers mises en culture  
 AE Nombre d'anthers embryogènes  
 GI Nombre de globules et d'embryons  
 PI Nombre de plantes  
 Par rapport au nombre d'anthers mises en culture :  
 AE % A Pourcentage d'anthers embryogènes  
 E % A Pourcentage d'embryogenèse (globule + embryon + plante)  
 PI % A Pourcentage de plantes

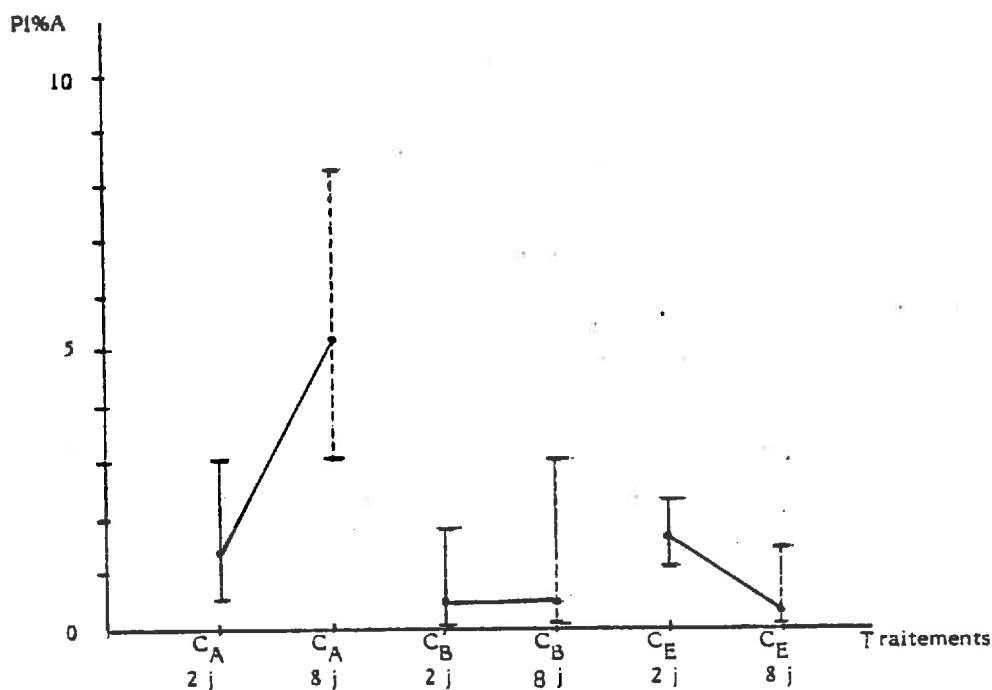


Figure 1. Rendements exprimés en plantes pour 100 anthers (PI%A) par les milieux de culture C<sub>A</sub>, C<sub>B</sub>, C<sub>E</sub> en fonction de la durée du traitement à 35°C.

┌─┐ Intervalle de confiance 35°C - 2 j  
 ┌─┐ Intervalle de confiance 35°C - 8 j

. l'obtention de plantes chez un génotype pour lequel jusqu'ici les prétraitements à 4°C sur boutons floraux n'avaient pas donné de résultats.

Le travail est poursuivi afin de déterminer la durée optimale d'application de la chaleur et les séquences de milieu les plus favorables à ce traitement.

## 2. Action d'un traitement par la chaleur pendant les 2 ou 8 premiers jours de culture

La teneur en 2,4-D des milieux est 0,10 ; 1 ; ou 2 mg.l<sup>-1</sup>. Leur concentration constante en kinétine est 2 mg.l<sup>-1</sup>.

### 2.1. Résultats

L'observation du tableau 2 montre que l'embryogenèse et la production de plantes sont possibles quels que soient le milieu et le régime testés.

Les anthères embryogènes sont nombreuses et les productions (globules et embryons) variables. Ainsi, concernant le milieu C<sub>A</sub> aux 2 régimes thermiques, pour des nombres d'anthères embryogènes sensiblement équivalents : 59 (35°C 2 j) et 52 (35°C 8 j) les productions gl +  $\Sigma$  varient dans la proportion 2:1. L'évolution en plantes est ensuite inversée, respectivement 7 et 18.

Pour le traitement 35°C-2 j, les rendements en Pl%A ne diffèrent pas significativement (les intervalles de confiance se recoupent) (fig. 1).

Pour le traitement 35°C-8 j, le rendement obtenu sur le milieu C<sub>A</sub> est significativement supérieur à ceux des milieux C<sub>B</sub> et C<sub>E</sub>, qui eux-mêmes ne sont pas différents l'un de l'autre.

Globalement, seul le rendement du milieu C<sub>A</sub> (35°C-8 j) est significativement supérieur à tous les autres.

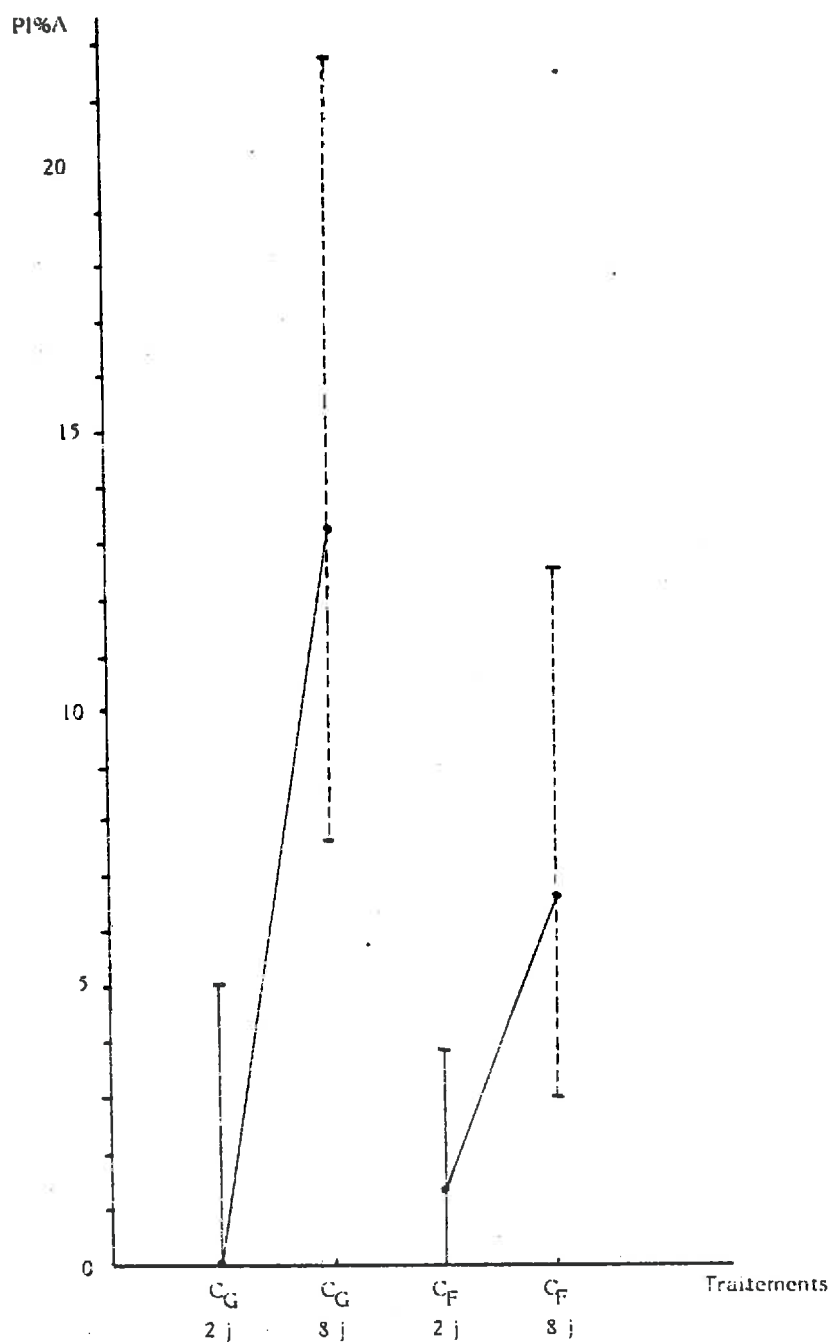
### 2.2. Conclusion

Ces résultats confirment ceux du tableau 1, à savoir que les anthères de piment en culture sur le milieu C<sub>E</sub> (2 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D et 2 mg.l<sup>-1</sup> de

Traitements			35°C-2 j					35°C-8 j				
Milieux mg.l <sup>-1</sup>	2,4-D	kin.	A	AE	GI+E	PI	PI%A	A	AE	GI+E	PI	PI%A
C <sub>G</sub>	0,01	0	73	7	16	0	0 <sup>0</sup> 5,05	120	46	84	16	13,30 7,62 21,65
C <sub>F</sub>	0,1	0	149	34	57	2	1,34 0,016 3,73	137	70	142	9	6,60 3,0 12,50

**Tableau 3.** Effets produits sur le rendement en plantes par un traitement à 35°C pendant 2 ou 8 jours d'anthers en culture. Les milieux dépourvus en kinétine contiennent 0,1 ou 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D.

**Légende :** id° tabl. 1, p. 37



**Figure 2.** Rendements exprimés en plantes pour 100 anthers par les milieux C<sub>G</sub> et C<sub>F</sub> en fonction de la durée du traitement à 35°C.

┆┆┆ Intervalle de confiance 35°C - 2 j

┆┆┆ Intervalle de confiance 35°C - 8 j

┆

kinétine), chauffées à 35°C pendant les 2 premiers jours produisent des plantes. Avec ce milieu, si la température est maintenue pendant 8 j, le rendement bien que non différent statistiquement, chute de manière appréciable 0,26 P1%A au lieu de 1,68.

Le rendement en plantes (P1%A) produit semble être fonction à la fois de la composition du milieu de culture (teneur en 2,4-D) et de la durée du traitement thermique appliqué.

### 3. Action d'un traitement par la chaleur pendant les 2 ou 8 premiers jours de culture

La teneur en 2,4-D des milieux est 0,10 mg.l<sup>-1</sup> ou 0,01 mg.l<sup>-1</sup>. Leur teneur en kinétine est nulle.

#### 3.1. Résultats

Tous les traitements induisent une embryogenèse dans certaines anthères et les productions sont de façon régulière, proches de 2 globules et embryons par anthère embryogène. Cependant, un traitement (milieu C<sub>G</sub> 35°C-2 j) ne permet pas leur évolution en plantes (tabl. 3).

Pour le traitement 35°C pendant 2 jours, les rendements obtenus sur les milieux ne se différencient pas significativement.

La figure 2 montre que pour chaque traitement thermique les rendements des milieux ne se différencient pas significativement.

Le rendement du milieu C<sub>F</sub> (35°C-8 j) n'est pas significativement différent du rendement des milieux C<sub>G</sub> et C<sub>F</sub> (35°C-2 j). Par contre le rendement du milieu C<sub>G</sub> (35°C-8 j) est significativement supérieur à ceux-ci.

#### 3.2. Conclusion

La kinétine n'est pas dans certaines conditions un élément indispensable à l'induction de l'embryogenèse chez le piment. Il paraît cependant qu'en son absence, les rendements en plantes sont plus importants si le traitement à



Traitements			35°C-2 j					35°C-8 j				
Milieux mg.l <sup>-1</sup>	2,4-D	kin.	A	AE	GI+E	PI	PI%A	A	AE	GI+E	PI	PI%A
C <sub>C</sub>	1	1	108	8	28	0	0 0,3,41	134	22	77	0	0 0,2,75
C <sub>H</sub>	0,1	0,1	189	32	72	5	2,6 0,86 6,20	32	8	11	1	3,1 0,08 17,4
C <sub>P</sub>	0,01	0,01	164	37	69	6	3,7 1,34 7,96	90	43	80	11	12,2 6,11 21,90

Tableau 4. Effets produits sur le rendement en plantes par un traitement à 35°C pendant 2 ou 8 jours d'anthers en culture. Les milieux contiennent des teneurs équilibrées en 2,4-D et kinétine.

Légende :

A Nombre d'anthers mises en culture  
 AE Nombre d'anthers embryogènes  
 GI Nombre de globules et d'embryons  
 PI Nombre de plantes  
 Par rapport au nombre d'anthers mises en culture :  
 AE % A Pourcentage d'anthers embryogènes  
 E % A Pourcentage d'embryogénèse (globule + embryon + plante)  
 PI % A Pourcentage de plantes

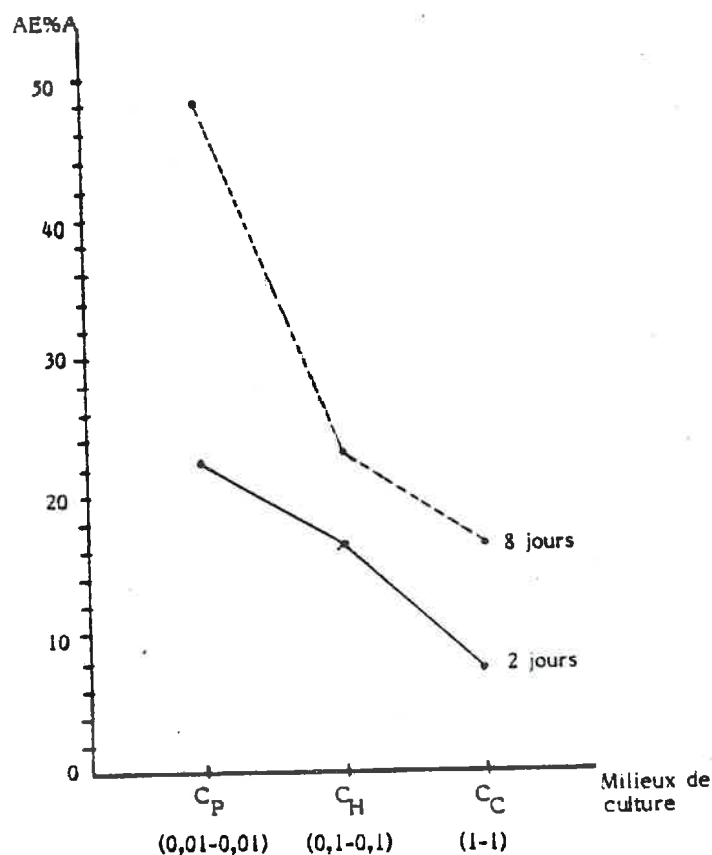


Figure 3. Anthers embryogènes pour 100 anthers (AE%A) en fonction des teneurs en substances de croissance des milieux de culture et de la durée du traitement à 35°C.

—— traitement pendant 2 j.  
 - - - - traitement pendant 8 jours

la chaleur est effectué pendant 8 jours et ce rendement est amélioré si la teneur en 2,4-D du milieu d'induction est très faible :  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Considérant le traitement  $35^{\circ}\text{C}$ -8 j, nous constatons que le milieu  $C_G$  est très nettement supérieur au milieu  $C_F$ , puisque dans le premier cas 19% des globules et embryons évoluent en plantes contre 6,34 % dans le second cas.

#### 4. Action d'un traitement à la chaleur pendant les 2 ou 8 premiers jours de culture.

Les teneurs en 2,4-D et kinétine des milieux sont équivalentes.

##### 4.1. Résultats

Des anthères sont embryogènes dans chacun des traitements, cependant quelle que soit la durée du traitement thermique, sur le milieu  $C_C$ , les globules et embryons ne peuvent évoluer en plantes (tabl. 4).

La proportion d'anthères embryogènes augmente systématiquement si les teneurs en substances de croissance baissent, et ceci pour chaque durée de traitement.

Nous notons toujours un effet favorable du traitement à  $35^{\circ}\text{C}$  pendant 8 jours même pour des teneurs élevées en substance de croissance.

La différence est la plus importante avec le milieu  $C_P$  puisque près de 50 % des anthères en culture traitées pendant 8 jours sont embryogènes, alors qu'avec le traitement pendant 2 jours 22,6 % seulement initient des globules et embryons (fig. 3).

Pour le traitement  $35^{\circ}\text{C}$  pendant 2 jours, les rendements obtenus sur les milieux ne se différencient pas significativement (fig. 4).

Au contraire, les rendements sur milieux  $C_C$  et  $C_P$  ( $35^{\circ}\text{C}$ -8 j) se différencient significativement.

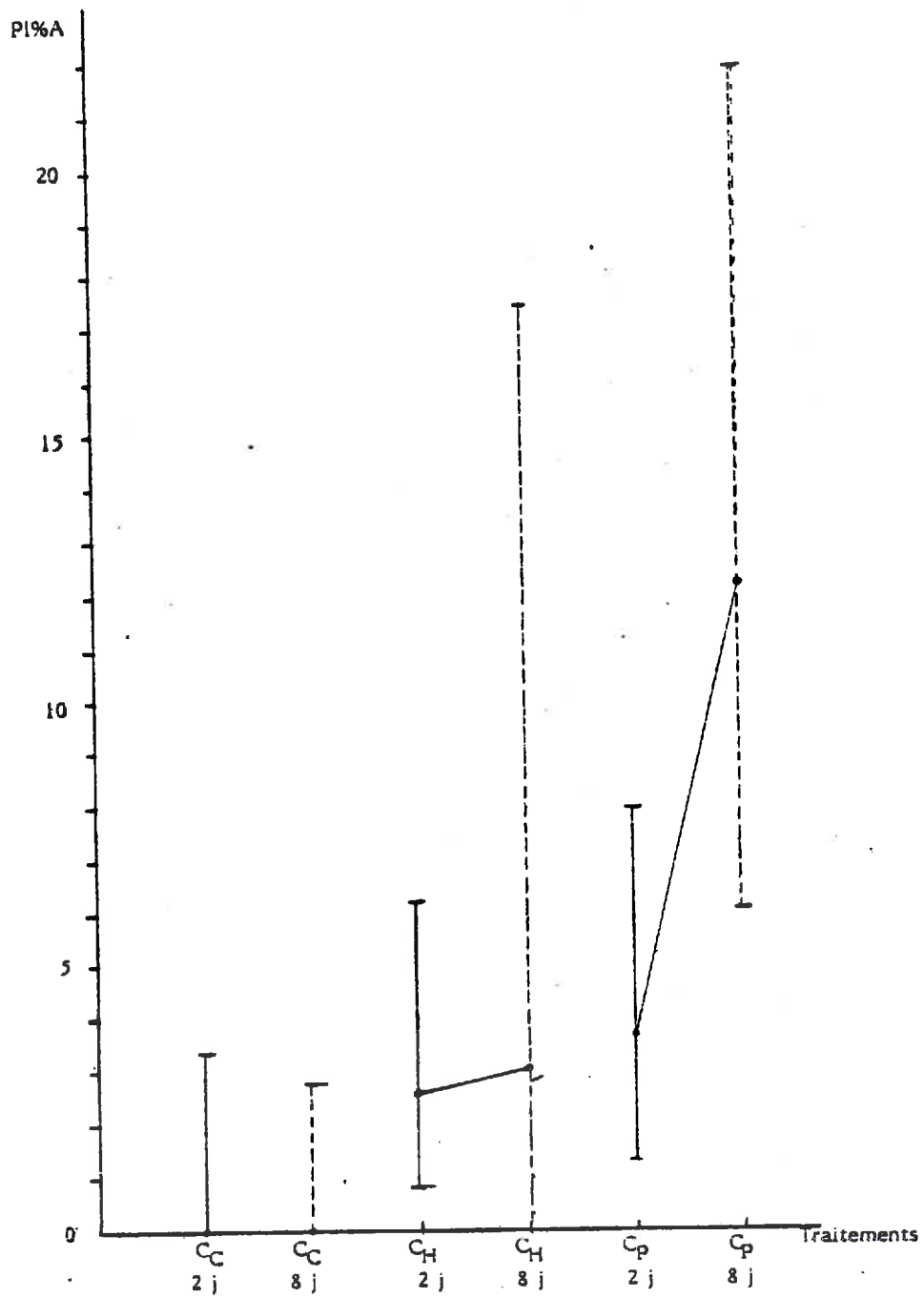


Figure 4. Comparaison des rendements exprimés en plantes pour 100 anthères (PI%A) par les milieux de culture C<sub>C</sub>, C<sub>H</sub> et C<sub>P</sub> en fonction de la durée des traitements à 35°C.

I Intervalle de confiance 35°C - 2 j  
 I Intervalle de confiance 35°C - 8 j

Par ailleurs, considérant les rendements des 2 milieux  $C_P$ , leur rapport varie dans la proportion de 1 à 3 en faveur du traitement pendant 8 jours.

Les rendements des 2 milieux  $C_C$  sont significativement inférieurs au rendement de  $C_P$  ( $35^\circ\text{C}$ -8 j).

#### 4.2. Conclusion

Des concentrations identiques ne sont pas la condition essentielle pour assurer la production de plantes même si les anthères reçoivent de la chaleur en début de culture. Au contraire, une concentration élevée en 2,4-D et kinétine ( $1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) induit l'embryogenèse mais pourrait engendrer une phytotoxicité.

Dans nos conditions de travail et avec les génotypes utilisés, le phénomène d'évolution des microspores en embryons puis en plantes s'accomode de teneurs en substances de croissance variant de 10 à 1 ( $0,10 \text{ mg.l}^{-1}$  à  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ ) mais avec des répercussions au niveau des rendements.

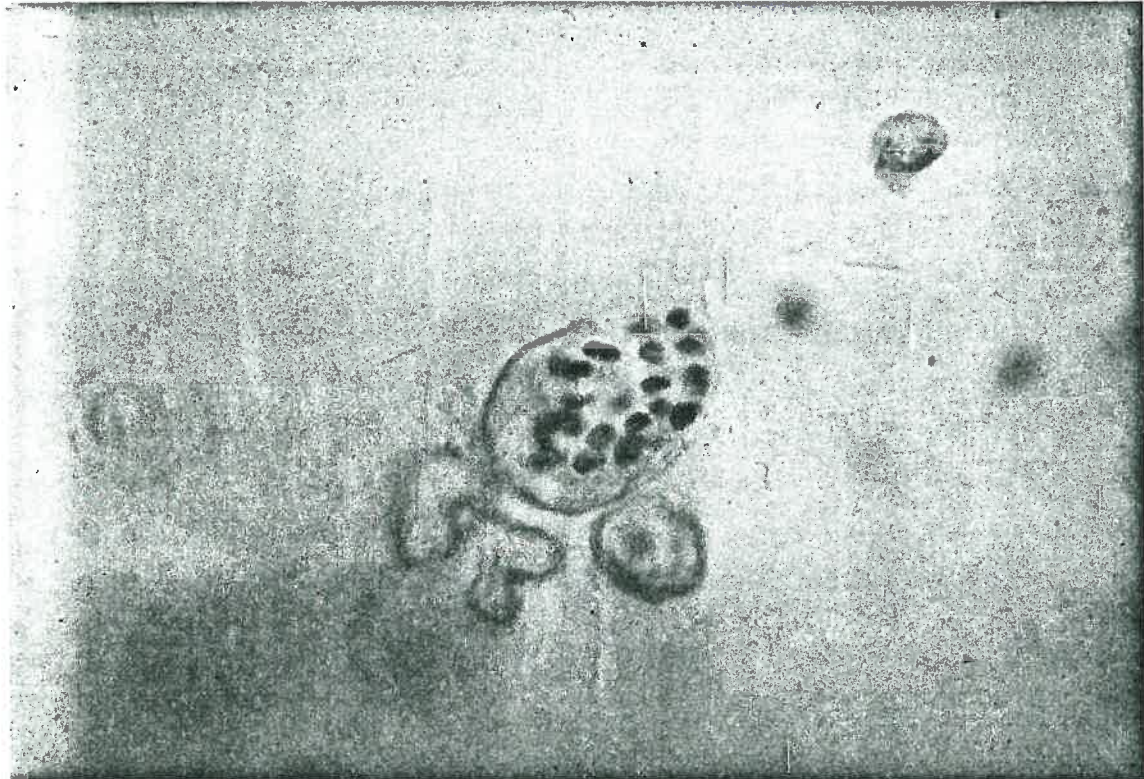
La meilleure combinaison est le traitement à la chaleur :  $35^\circ\text{C}$  pendant 8 jours, d'anthères en culture sur un milieu comprenant  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D et kinétine.

#### 5. Conclusion de ces 3 essais

Nous montrons partout l'intérêt d'appliquer un traitement long (8 jours) à  $35^\circ\text{C}$  sur les anthères en culture.

La présence de kinétine dans le milieu de culture d'induction n'est pas indispensable si la teneur en 2,4-D est au moins égale à  $0,10 \text{ mg.l}^{-1}$  pour un traitement à  $35^\circ\text{C}$  de 2 jours (milieu  $C_F$ ). Son absence d'un milieu comportant  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D permet un rendement élevé en plantes si les anthères sont traitées pendant 8 jours (milieu  $C_C$ ). Sa teneur la meilleure :  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  doit s'accompagner d'une teneur identique en 2,4-D, et cela quelle que soit la durée du régime thermique (milieu  $C_P$ ).

Pourtant sa présence semble avoir une influence sur la qualité des plantes



Intense activité mitotique dans une microspore de piment, 12 jours après mise en culture.

obtenues, notamment la régularité de leur conformation. Pour cette raison, ayant le choix entre 2 milieux inducteurs :  $C_G$  (2,4-D  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  et kinétine  $0 \text{ mg.l}^{-1}$ ) et  $C_P$  (2,4-D  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  et kinétine  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ ) à rendements identiques (en P1%A) respectivement 13,3 et 12,2, nous choisissons pour application à la sélection, le milieu  $C_P$ .

Il arrive cependant, dans des conditions indéfinies, mais qui peuvent être le résultat de la compétition que se livrent les embryons pour évoluer, leur nature génétique, leur emplacement à l'intérieur de l'anthere, ou tout simplement l'épuisement du milieu de repiquage  $R_1$  ou encore l'accumulation de produits du métabolisme de l'anthere, que certains d'entre eux bien conformés, n'évoluent pas.

Pour pallier à cet inconvénient, nous avons mis au point un nouveau milieu de repiquage, et défini les modalités de son utilisation.

#### 6. Mise au point du milieu $R_2$

La kinétine, comme nous l'avons vu précédemment, a pour effet de stimuler la division de cellules différenciées.

Nous avons pensé qu'il pouvait être bénéfique pour les embryons dont le développement est stoppé, de mettre ceux-ci en contact direct avec un milieu de repiquage  $R_2$  dont la concentration en kinétine est supérieure à celle du milieu  $R_1$ . A cet effet, nous avons testé  $2 \text{ mg.l}^{-1}$ . Dans ces conditions 50% des embryons reprennent leur développement en 24 à 48 h.

### C. APPLICATION DE LA TECHNIQUE A UNE GAMME ELARGIE DE GENOTYPES

Pendant que se perfectionne la technique, ANSELM (1980) met en culture sur le milieu  $C_A$  (2,4-D  $0,10 \text{ mg.l}^{-1}$ , kinétine  $2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) des anthers d'une gamme étendue de géotypes. Il compare l'effet des traitements à  $35^\circ\text{C}$  pendant 2 ou 8 jours, puis étudie les plantes obtenues. Ce travail fait l'objet de son mémoire de D.A.A.

Codes	Géotypes	35°C-2 j			35°C-8 j		
		A	PI	PI%A	A	PI	PI%A
A	Yolo Wonder x Yolo Y	157	7	4,46 1,79 9,18	193	37	19,17 13,44 26,86
B	B 107 x Yolo Wonder	139	27	19,40 13,23 27,60	207	56	27,05 21,10 33,67
C	PM 687 x Yolo Wonder	297	45	15,15 10,89 19,75	138	35	25,36 18,38 33,48
D	Pérennial x Yolo Wonder	231	66	28,57 22,96 34,62	142	41	28,87 21,27 37,18
E	PM 217 x Yolo Wonder	249	23	9,24 6,08 13,38	215	23	10,69 10,65 15,51
F	Rama x Yolo Wonder	77	0	0 0 4,79	242	12	4,96 2,59 8,18
G	Doux des Landes x Florida VR2	206	13	6,31 3,45 10,56	192	48	25,00 22,61 28,17
H	Pérennial x Florida VR2	82	2	2,44 0,29 8,80	304	46	15,13 10,92 19,67
	Totaux	1438	183	12,73	1633	298	15,66

Tableau 5. Rendements de géotypes variés. Les anthères sont en culture sur le milieu C<sub>A</sub> et sont traitées à 35°C pendant 2 ou 8 jours.

Légende A Nombre d'anthères mises en culture  
 PI Nombre de plantes  
 Par rapport au nombre d'anthères mises en culture :  
 PI%A Pourcentage de plantes pour 100 anthères

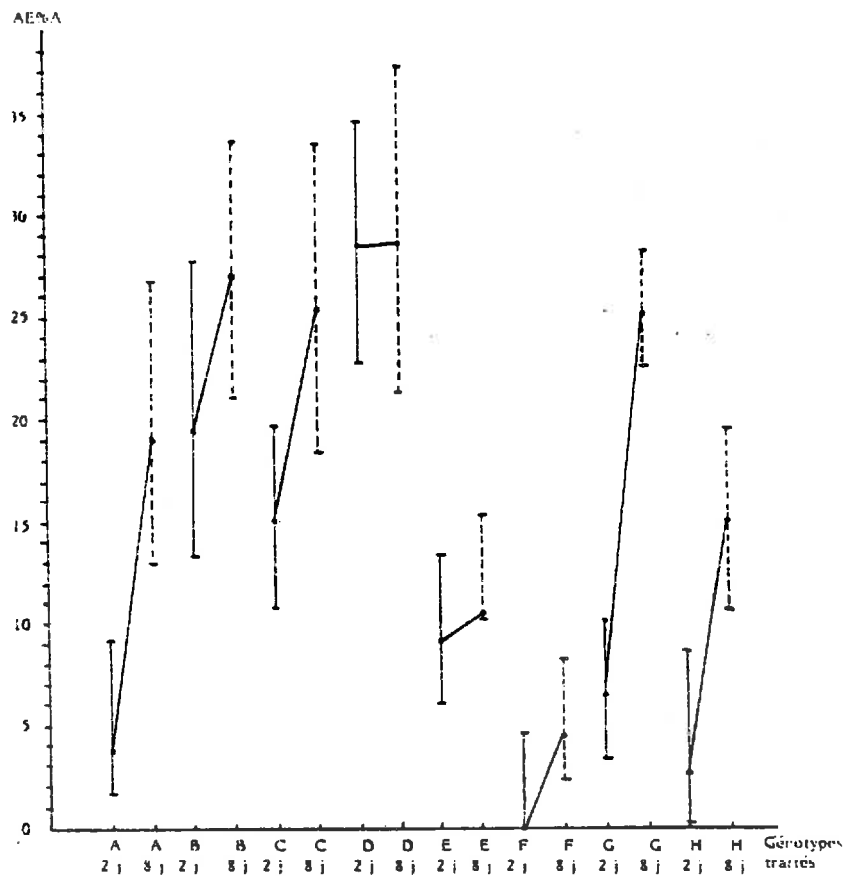


Figure 5. Rendements exprimés en anthères embryogènes pour 100 anthères (AE%) en culture sur le milieu C<sub>A</sub> après traitement à la chaleur pendant 2 ou 8 jours.

Intervalles de confiance 35°C - 2 j  
 Intervalles de confiance 35°C - 8 j

### 1. Résultats (tabl. 5)

Un seul génotype ("Rama" x "Yolo Wonder") ne produit pas de plante, et ceci après traitement à 35°C pendant 2 jours. Avec le traitement à 35°C 8 jours, le rendement n'est que de 4,96 P1%A malgré près de 250 anthères en culture.

Les rendements en P1%A varient (tous traitements confondus) de 0 à 28,87 et les capacités androgénétiques supérieures des anthères sont aussi élevées avec un traitement qu'avec l'autre : 28,57 P1%A pour 35°C 2 jours contre 28,97 P1%A pour 35°C 8 jours, avec le même génotype.

La figure 5 montre que 3 génotypes A, G et H ont des rendements en plantes par anthère embryogène différents. Dans ces cas précis, le traitement 35°C 8 jours est significativement supérieur au traitement pendant 2 jours. Il ne l'est pas pour les autres génotypes.

La répartition du niveau de ploïdie des plantes produites apparaît dans le tableau 6. Exception faite pour le génotype F, tous les hybrides produisent à la fois des haploïdes et des diploïdes quelle que soit la durée du traitement.

Les productions de plantes haploïdes et diploïdes sont comparées lorsque les effectifs sont suffisants.

- A l'intérieur du traitement 35°C 2 jours, entre les génotypes B, C, D, E, G.  $\chi^2 = 22,57$   $\mathcal{P} < 0,01$ .
- A l'intérieur du traitement 35°C 8 jours entre les génotypes A, B, C, D, E, G, H.  $\chi^2 = 22,17$   $\mathcal{P} < 0,01$ .

Ces valeurs  $\chi^2$  indiquent des répartitions statistiquement différentes.

- Entre les 2 durées de traitement pour le génotype :

$$B : \chi^2 = 0,07 \quad 0,70 < \mathcal{P} < 0,80$$

$$E : \chi^2 = 0,22 \quad 0,50 < \mathcal{P} < 0,70$$

$$G : \chi^2 = 0,0088 \quad 0,90 < \mathcal{P} < 0,95$$

$$C : \chi^2 = 4,74 \quad 0,02 < \mathcal{P} < 0,05$$

$$D : \chi^2 = 11,20 \quad \mathcal{P} < 0,01$$

Calculé sur l'ensemble des haploïdes et diploïdes, le  $\chi^2$  prend la valeur 6,02 et  $0,01 < \mathcal{P} < 0,02$ .



Codes	Génotypes	35°C-2 j			35°C-8 j		
		n	2n	%2n	n	2n	%2n
A	Yolo Wonder x Yolo Y	5	2	28,57	18	13	41,90
B	B 107 x Yolo Wonder	17	6	26,10	43	13	23,20
C	PM 687 x Yolo Wonder	29	14	32,56	15	20	57,10
D	Pérennial x Yolo Wonder	43	20	31,75	13	25	65,80
E	PM 217 x Yolo Wonder	11	12	52,17	11	9	45,00
F	Rama x Yolo Wonder	0	0	0	6	1	14,30
G	Doux des Landes x Florida VR2	6	7	53,85	21	26	55,30
H	Pérennial x Florida VR2	1	1	50,00	16	22	52,40

**Tableau 6 :** Pourcentages de plantes diploïdes à partir d'anthères de génotypes variés en culture sur le milieu C<sub>A</sub> et traitées à 35°C pendant 2 ou 8 jours.

Légende :

n nombre de plantes haploïdes  
 2n nombre de plantes diploïdes  
 %2n nombre de plantes diploïdes pour 100 plantes produites.

Génotypes	Milieu C <sub>A</sub>			Milieu C <sub>P</sub>		
	A	PI	PI%A	A	PI	PI%A
69-3 (36 x 364)	451	27	<sup>6</sup> 3,80 6,40	623	50	<sup>8,0</sup> 5,90 10,30
69-2 (6-3)	47	0	<sup>0</sup> 0 7,90	37	19	<sup>51,30</sup> 34,30 68,40
F1 (6-3) x (1-9)	108	9	<sup>8,30</sup> 3,89 15,10	22	5	<sup>22,70</sup> 7,80 46,30
B107	107	31	<sup>29,0</sup> 20,70 38,50	43	18	<sup>41,90</sup> 26,90 58,30
Totaux	713	67	<sup>9,40</sup> 7,30 11,70	725	92	<sup>12,70</sup> 10,30 15,20

**Tableau 7.** Rendements en plantes obtenus sur les milieux C<sub>A</sub> et C<sub>P</sub>, à partir d'anthères traitées à 35°C pendant 8 jours.

Légende A Nombre d'anthères mises en culture  
 PI Nombre de plantes.

Par rapport au nombre d'anthères mises en culture :  
 PI%A Pourcentage de plantes

## 2. Conclusion

Mis à part pour un génotype ("Rama" x "Yolo Wonder"), les anthères de tous les hybrides F1 cultivées sur le milieu  $C_A$  produisent des plantes après traitement à 35°C pendant 2 ou 8 jours.

Les rendements en plantes, ainsi que les rendements en diploïdes peuvent différer significativement entre génotypes à l'intérieur des traitements, et entre traitements. Il semble donc que ces éléments soient des caractéristiques de chaque génotype.

Dans un autre type d'essai, nous avons tenté de comparer à partir d'une gamme de génotypes de type poivron (hybrides F1 et lignées) les rendements en plantes et niveaux de ploïdie produits par des anthères en culture sur les milieux  $C_A$  et  $C_P$ . Le traitement à 35°C dure 8 jours.

### 1. Résultats (tabl. 7)

#### 1.1. Rendements en plantes

Seul le génotype "69-2(6-3)" n'induit aucune plante sur le milieu  $C_A$ . Le nombre d'anthères en culture est faible il est vrai : (47 anthères) mais pour le même génotype, 37 anthères en culture sur le milieu  $C_P$  produisent 19 plantes ! Par ailleurs, les rendements sont toujours plus importants si les anthères sont en culture sur  $C_P$ .

Considérant les résultats sur le milieu  $C_A$ , l'observation de la figure 6 montre clairement la supériorité significative du génotype B107.

#### 1.2. Niveau de ploïdie

Les rendements en plantes diploïdes : 18,2% (milieu  $C_A$ ) et 20,3% (milieu  $C_P$ ) ne diffèrent pas statistiquement,  $\chi^2 = 1,03$   $0,30 < \mathcal{P} < 0,50$

#### 1.3. Qualité des plantes produites

Parmi celles qui sont originaires du milieu  $C_A$ , nous observons des anomalies fréquentes de constitution. Ce sont :

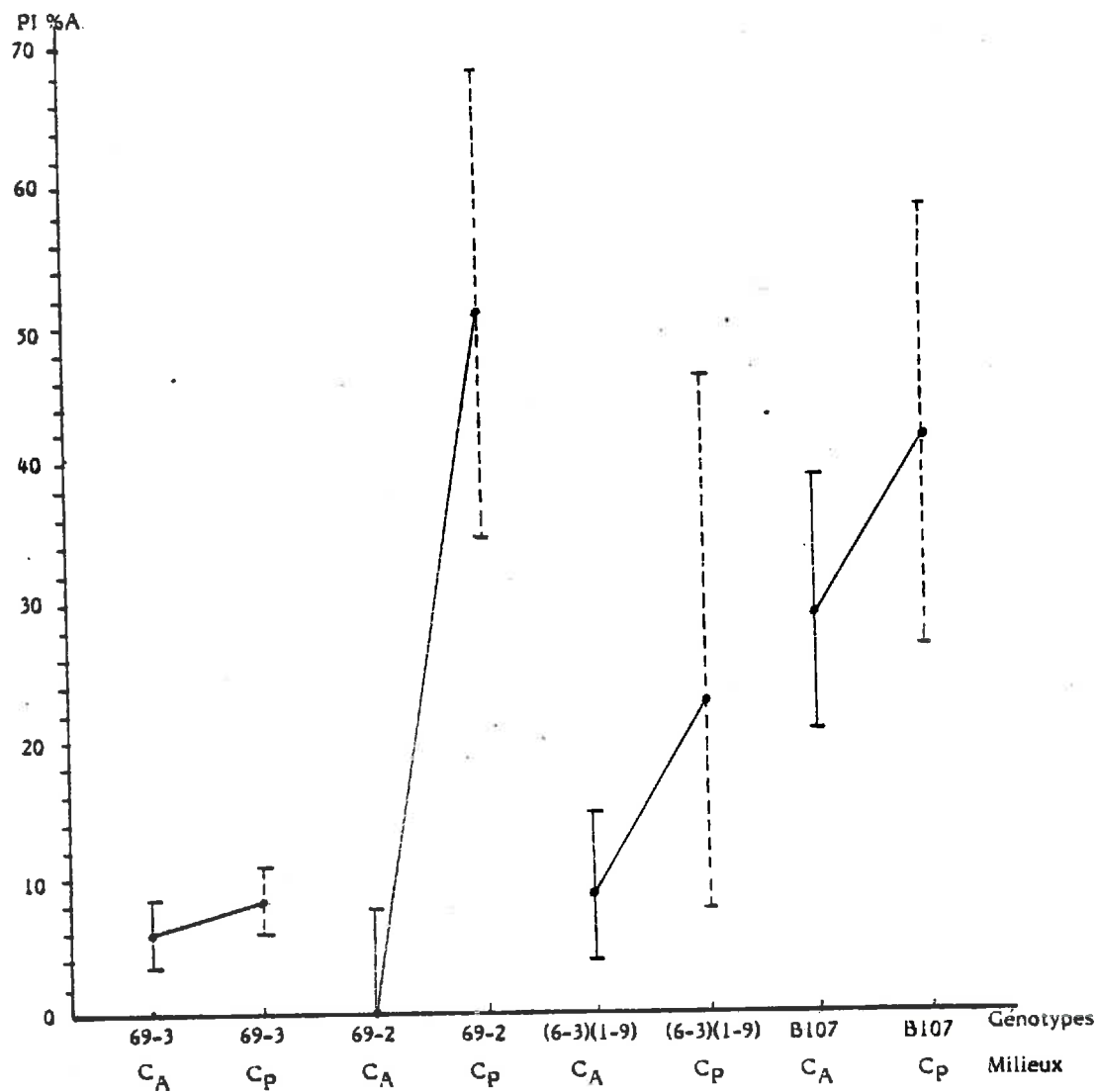




Figure 6. Rendements exprimés en plantes pour 100 anthères (PI%A) sur les milieux  $C_A$  et  $C_P$ , après traitement à  $35^\circ\text{C}$  pendant 8 jours.

 Intervalle de confiance milieu  $C_A$   
 Intervalle de confiance milieu  $C_P$

- une fasciation de la tige très prononcée, sur toute la hauteur, ou simplement sur la longueur d'un entrenoeud.
- une division anormale de la tige en plusieurs rameaux principaux.
- départ anticipé des yeux axillaires, malgré la présence de l'apex fonctionnel.

L'origine de ces anomalies doit être recherchée au niveau de la composition hormonale du milieu  $C_A$ . Il présente en effet, une concentration en kinétine 20 fois plus élevée qu'en 2,4-D.

Cependant, ces anomalies régressent au stade jeune, se corrigent par la suite, et n'empêchent pas d'effectuer des autofécondations.

#### D. DISCUSSION ET CONCLUSION SUR LES FACTEURS AMELIORANTS

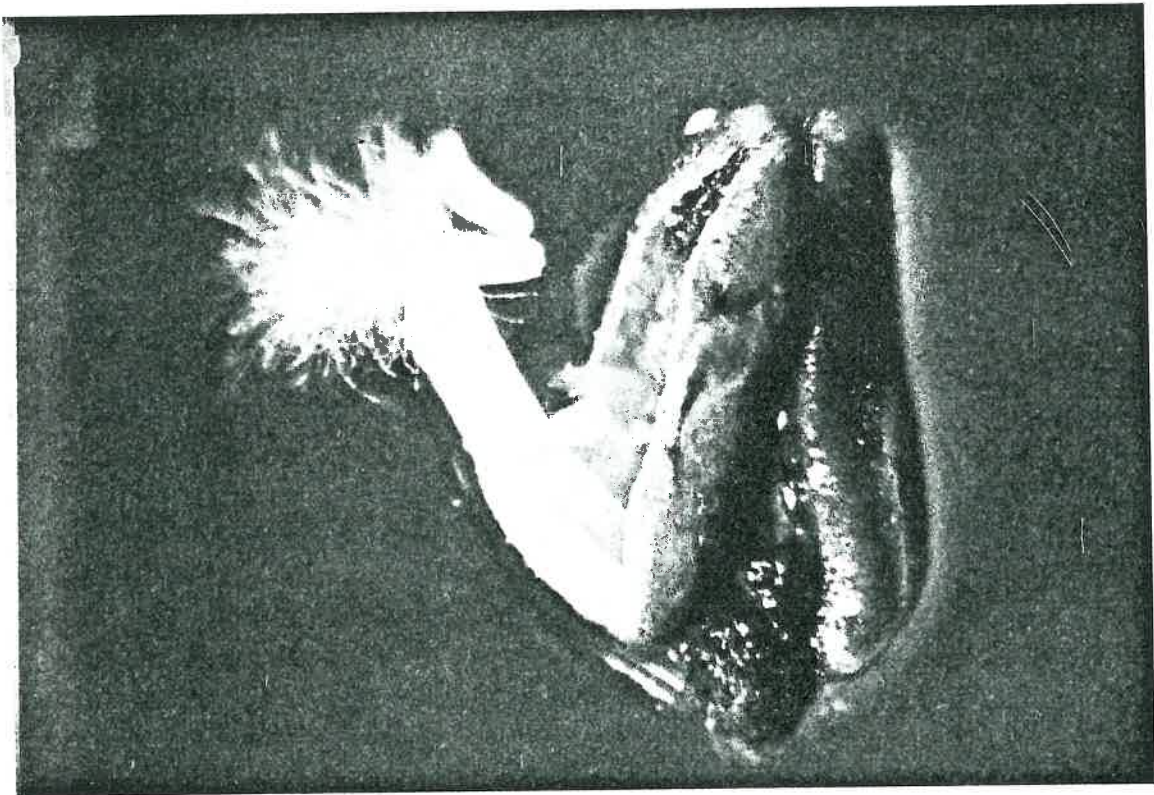
Il ressort de ce travail que l'évolution en plantes par la voie directe, des microspores de piment Capsicum annuum L. est possible selon un schéma unique : mise en culture des anthères sur un milieu d'induction, puis repiquage de celles-ci 12 jours plus tard, qui fait intervenir :

- soit un prétraitement des boutons floraux par le froid : 4°C et l'obscurité.
- soit un traitement des anthères par la chaleur, et absence de lumière.

Les résultats les plus intéressants dûs surtout au traitement long des anthères par la chaleur, sont à rapprocher de ceux obtenus par KELLER & ARMSTRONG (1978) avec Brassica.

Préalablement (1974), des cals régénérant des plantes étaient obtenus par SACCARDO & DEVREUX après prétraitement des boutons floraux par le froid. La même année, NOVAK induisait des cals haploïdes en soumettant ses cultures d'anthères à des alternances de températures 25°-33°C sous éclairage constant.

La kinétine n'est pas indispensable à l'induction des embryons si les anthères sont traitées à la chaleur, mais leur rendement en plantes est le meilleur, si le traitement à 35°C est long et la teneur en 2,4-D faible.



Embryogenèse pollinique directe dans une anthère  
de piment.

Les travaux de WANG Y.Y. et al. (1973), GEORGE & NARAYANASWAMY (1973), NOVAK (1974), SACCARDO & DEVREUX (1974) font intervenir les cytokinines, et d'après nos observations, la présence de kinétine à faible concentration dans le milieu d'induction paraît agir favorablement sur la qualité des embryons et donc des plantes produites.

Si la teneur en kinétine est faible, la durée du traitement à la chaleur longue, la concentration en 2,4-D du milieu d'induction doit être faible et égale à celle de la kinétine.

Dans ces conditions, les taux de production de plantes sont compris entre 12 et 13 plantes pour 100 anthères en culture.

Ainsi, pour un même matériel génétique expérimenté, considérant le rendement des anthères avant amélioration de la technique : 0,6 à 1,3 plante pour 100 anthères et après amélioration : 12 à 13 plantes pour 100 anthères, nous avons multiplié les performances par 10 à 20. Ces résultats ne tiennent pas compte des plantes développées sur le milieu R<sub>2</sub> et dont les nombres varient avec les cultures.

GEORGE & NARAYANASWAMY (1973) pensent que l'auxine exogène est nécessaire à l'entrée des microspores en division. Les concentrations testées par les divers auteurs sont souvent supérieures aux nôtres. Le 2,4-D est l'auxine la plus utilisée, cependant WANG (1981) induit des embryoïdes de piment avec l'ANA.

Les conditions incontrôlées qui interviennent dans l'arrêt de croissance de certains embryons bien constitués, et encore logés dans les anthères peuvent être définitivement levées, si ces embryons sont prélevés avant qu'ils ne commencent à dégénérer et sont mis en contact direct avec un milieu de repiquage enrichi en kinétine.



Dessin de 1653, extrait de "Vegetable Plants Fam. Solanaceae.

Editor of Vegetable Plants Division. Prof. D.R.D.D. BREZHNEV,  
Acad. Ag. Sci., State Agricultural Publishing Office, Moscow 1958,  
Leningrad.

## V - ANDROGENESE PAR CULTURE D'ANTHERES D'AUBERGINE (*Solanum melongena* L.)

A l'inverse du piment, chez cette espèce nous ne connaissons pas l'état haploïde naturel.

La culture in vitro étant une des voies possibles de production de telles plantes, et compte-tenu des progrès encourageants réalisés chez le piment, nous avons tenté d'obtenir des haploïdes par développement du gamétophyte mâle en culture d'anthers.

Avant nous, "The Research Group of Haploidy" de Pékin (1978), ISOUARD & RAQUIN (1979, 1980), ISOUARD (1981) avaient produit des plantes par culture d'anthers in vitro. Ces derniers avaient utilisé comme génotypes "Dourga" (obtention INRA), "Ronde-de-Valence", les hybrides F1 "Dourga" x "Ronde-de-Valence", "Ronde-de-Valence" x "Dourga".

Avec la variété "Dourga", nous avons transposé la technique et utilisé les milieux de culture mis au point pour l'androgenèse du piment.

Nous avons enfin cherché à connaître l'importance du traitement thermique, l'effet de l'absence de kinétine dans le milieu de culture, et l'effet de la nature de l'auxine.

Après avoir élargi l'éventail des origines testées, nous rendons compte des performances d'un milieu de culture particulièrement adapté à l'aubergine.

### A. EFFET PRODUIT SUR DES ANTHÈRES DE VARIÉTÉ "DOURGA" PAR UN TRAITEMENT À LA CHALEUR (35°C) PENDANT LES 8 PREMIERS JOURS DE CULTURE

Les milieux  $C_A$  et  $C_P$  contiennent respectivement :

- milieu  $C_A$  : 2,4-D  $0,10 \text{ mg.l}^{-1}$  ; kinétine  $2 \text{ mg.l}^{-1}$
- milieu  $C_P$  :  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  de chaque hormone.



Traitements	Milieux	A	PD	PE	PI	PD%PI	PI%A
35°C-8 j	C <sub>P</sub>	133	21	13	34	62	25,60
	C <sub>A</sub>	503	32	40	72	44	14,30
25°C	C <sub>P</sub>	238	7	26	33	21	13,90
	C <sub>A</sub>	249	0	0	0	0	0

Tableau 8. Rendements en plantes produits par des anthères du cultivar "Dourga" en culture sur les milieux C<sub>P</sub> et C<sub>A</sub> Efficacité du traitement par la chaleur.

Légende :

- A Nombre d'anthères en culture
- PD Nombre de plantes obtenues directement.
- PE Nombre de plantes obtenues après passage par la voie pré-embryogénique.
- PI Nombre total de plantes.
- PD % PI Nombre de plantes obtenues directement pour 100 plantes.
- PI % A Nombre total de plantes pour 100 anthères.

Un lot témoin d'anthères en culture sur les mêmes milieux est placé directement à 25°C.

## 1. Résultats

Des anthères d'aubergine, sur le milieu  $R_1$ , sortent indifféremment des plantes chlorophylliennes et(ou) des pseudo-cals originaires de microspores. Ceux-ci, en contact avec le milieu de repiquage  $R_1$  sont capables de régénérer des plantes. C'est ce que nous appelons la voie pré-embryogénique.

### 1.1. Rendements en plantes (tabl. 8)

Soumises à l'action de la chaleur, les anthères cultivées sur les milieux  $C_P$  et  $C_A$  produisent des plantes.

Placées à 25°C directement, seules, les anthères cultivées sur le milieu  $C_P$  initient des embryons qui évoluent en plantes, mais la qualité d'embryogénèse est affectée, puisque pour 100 plantes obtenues, 21 seulement sont produites directement.

Globalement (les milieux  $C_P$  et  $C_A$  confondus) la voie de développement suivie par les microspores (comparaison PD-PE) diffère selon le régime de température appliqué ( $\chi^2 = 8,51$   $\mathcal{P} < 0,01$ ). Le pourcentage de plantes directes (%PD) est supérieur si le traitement thermique est appliqué.

Remarque : Les anthères en culture sur le milieu  $C_P$  (rapport 2,4-D/kinétine = 1), sans traitement thermique, avec photopériode de 12 h ont un rendement (13,9 PI%A) équivalent à celui d'anthères en culture sur le milieu  $C_A$  (rapport 2,4-D/kinétine = 0,05) chauffées à 35°C pendant 8 jours à l'obscurité.

### 1.2. Niveau de ploïdie (tabl. 9)

Remarque : Les niveaux de ploïdie sont recherchés soit par observation phénotypique des plantes, soit par comptage chromosomique. Les plantes ont alors subi l'effet du repiquage en terre, et

Traitements	Milieux	PD			PE			PI		
		n	2n	2n%PD	n	2n	2n%PE	n	2n	2n%PI
25°C	C <sub>p</sub>	7	0	0	15	4	21,10	22	4	15,40
35°C-8 j	C <sub>p</sub>	18	2	10	9	4	30,80	27	6	18,20
	C <sub>A</sub>	9	5	35,70	16	23	59,00	25	28	52,80
		27	7	25,90	25	27	51,90	52	34	39,50

**Tableau 9.** Rendements en haploïdes et diploïdes en fonction du traitement, des milieux de culture et de la voie embryogénique.

<u>Légende</u>	n	Nombre de plantes haploïdes	
	2n	"	" diploïdes
	2n%PD	"	" pour 100 plantes produites directement
	2n%PE	"	" diploïdes pour 100 plantes produites par la voie embryogénique
	2n%PI	"	" diploïdes pour 100 plantes

certaines meurent en cette circonstance. Ceci explique les différences d'effectifs entre le nombre de plantes total, et le nombre de plantes identifiées  $\underline{n}$  ou  $\underline{2n}$ .

A 35°C, tous milieux confondus, 2n%PE > 2n%PD 51,90 > 25,90  
( $X^2 = 7,64$   $P < 0,01$ ).

Exprimé en pourcentage, le nombre total de plantes diploïdes est toujours plus élevé avec le milieu  $C_A$  qu'avec le milieu  $C_P$  52,80 > 18,20  
( $X^2 = 10,18$   $P < 0,01$ ).

Le rapport auxine/cytokinine égal à 1 semble donc mieux sélectionner la voie haploïde que le rapport 0,05.

A 25°C, la voie embryogène directe n'engendre pas de plantes diploïdes.

## 2. Conclusion

Les milieux de culture  $C_A$  et  $C_P$  mis au point pour produire l'androgénèse chez le piment, sont capables d'initier les voies haploïde et diploïde si des anthères de la variété "Dourga" au stade première mitose pollinique sont mises en culture.

La production de plantes ne nécessite pas l'action de la température élevée : 35°C en début de culture sur le milieu  $C_P$ , mais la chaleur est un facteur améliorant. Par contre, son action est indispensable si le milieu de culture  $C_A$  est utilisé.

Dans ces conditions, les taux de plantes diploïdes sont supérieurs si les anthères en culture sur le milieu  $C_A$  induisent la voie pré-embryogénique.

## B. EFFET DE L'ABSENCE DE KINETINE DANS LE MILIEU DE CULTURE

Deux milieux de culture  $C_{D1}$  (0,10 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D) et  $C_{D3}$  (0,01 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D) sont testés.

Traitements	Milieux	A	PD	PE	PI	PD%PI	PI%A
35°C-8 j	C <sub>D1</sub> (2,4-D : 0,1 mg.l <sup>-1</sup> )	108	13	0	13	100	12,0
	C <sub>D3</sub> (2,4-D : 0,01 mg.l <sup>-1</sup> )	248	0	0	0	0	0
25°C	C <sub>D1</sub> (2,4-D : 0,1 mg.l <sup>-1</sup> )	81	0	0	0	0	0
	C <sub>D3</sub> (2,4-D : 0,01 mg.l <sup>-1</sup> )	534	4	0	4	100	0,70
		971	17	0	17	100	

Tableau 10. Rendements en plantes produits par les milieux C<sub>D1</sub> et C<sub>D3</sub> dépourvus de kinétine, à teneurs variables en 2,4-D, avec ou sans traitement thermique.

Légende :

- A Nombre d'anthères en culture
- PD Nombre de plantes obtenues directement.
- PE Nombre de plantes obtenues après passage par la voie pré-embryogénique.
- PI Nombre total de plantes.
- PD % PI Nombre de plantes obtenues directement pour 100 plantes.
- PI % A Nombre total de plantes pour 100 anthères.

Le traitement à 35°C pendant 8 jours est comparé à l'absence de traitement à la chaleur.

## 1. Résultats

### 1.1. Rendements en plantes (tabl.10)

A 35°C, les 13 plantes sont obtenues par embryogenèse directe. A 25°C, seul le milieu  $C_{D3}$  est embryogène. Les microspores suivent également la voie directe. Le rendement est de 0,7 plante pour 100 anthères mises en culture.

### 1.2. Niveau de ploïdie

Dix plantes sur 13 sont haploïdes à partir du milieu  $C_{D1}$ , et 4 plantes sur 4 sont diploïdes à partir du milieu  $C_{D3}$ .

## 2. Conclusion

Dans 2 cas sur 4, la kinétine ne semble pas être indispensable à l'embryogenèse. Elle ne paraît pas intervenir sur le niveau de ploïdie, mais pourrait avoir un effet sur la voie de différenciation des microspores. La chaleur a une action favorable en début de culture si la concentration en 2,4-D est forte ( $0,10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) mais semble être inefficace si la teneur en cette hormone est faible ( $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ ).

En absence de traitement thermique, l'androgenèse est possible, mais à faible taux (0,7 PI%A) seulement, si la concentration en 2,4-D est faible ( $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ ).

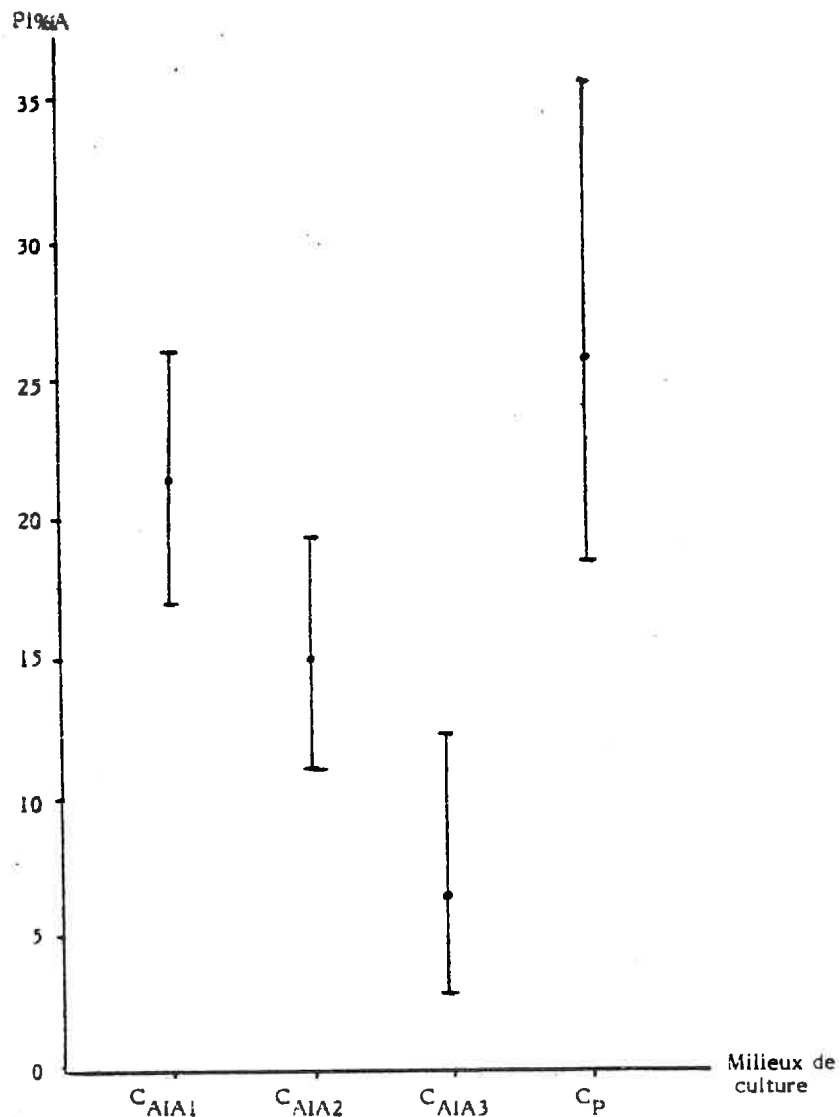
Remarque : En rapprochant les résultats du tableau 10 de ceux du tableau 8 nous remarquons :

- que seuls les milieux ne contenant que  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D produisent des plantes à 25°C ( $C_{D3}$  et  $C_P$ )
- que des milieux de culture contenant  $0,10 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D et  $0 \text{ mg.l}^{-1}$  de kinétine ( $C_{D1}$ ) ou  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  de kinétine ( $C_A$ ) produisent des taux comparables de plantes pour 100 anthères (respectivement 12 PI%A et 14,30 PI%A) si leurs anthères sont traitées à la chaleur en début de culture.

Milieux	AIA mg.l <sup>-1</sup>	2,4-D, mg.l <sup>-1</sup>	Kinét, mg.l <sup>-1</sup>	A	PD	PE	PI % A	n	2n
C <sub>AIA1</sub>	0,01		0,01	357	76	0	21,30 16,90 25,90	70	0
C <sub>AIA2</sub>	0,10		10	323	48	0	14,90 10,80 19,20	48	0
C <sub>AIA3</sub>	2,00		2,00	126	8	0	6,30 2,80 12,10	8	0
C <sub>P</sub>		0,01	0,01	133	21	13	25,60 18,41 35,72	27	6

**Tableau 11.** Effet produit par la nature de l'auxine dans le milieu d'induction et le traitement à 35°C, sur les rendements en plantes et leur niveau de ploïdie.

Légende : id<sup>o</sup> tabl. 8



**Figure 7.** Comparaison des rendements exprimés en plantes pour 100 anthères (PI%A) sur des milieux contenant de l'AIA (C<sub>AIA</sub>) ou du 2,4-D (C<sub>P</sub>).

## C. EFFET PRODUIT SUR LES ANTHÈRES DE LA VARIÉTÉ "DOURGA" PAR LE REMPLACEMENT DU 2,4-D PAR L'AIA.

Les anthères sont traitées à 35°C pendant 8 jours. Trois milieux de culture ( $C_{AIA}$ ) sont expérimentés ; le milieu  $C_P$  sert de témoin.

### 1. Résultats (tabl. 11)

#### 1.1. Rendements en plantes

Nous pouvons les observer sur la figure 7. Les milieux de culture  $C_{AIA1}$  et  $C_{AIA3}$  ont chacun un rapport AIA/kinétine égal à 1. Le rendement de  $C_{AIA3}$  est approximativement 1/3 de celui de  $C_{AIA1}$  (respectivement 6,3 PI%A et 21,3 PI%A et la différence est statistiquement significative).

Les milieux  $C_{AIA1}$  et  $C_P$  ont les mêmes teneurs en substances de croissance, et leurs rendements en plantes ne diffèrent pas significativement (respectivement 21,30 PI%A et 25,60 PI%A).

Seul le rendement obtenu sur le milieu  $C_{AIA2}$  n'est statistiquement pas différent des 3 autres rendements.

#### 1.2. Niveau de ploïdie et voies embryogènes

Avec l'AIA toutes les plantes sont haploïdes, et suivent la voie directe d'embryogenèse et de développement. Au contraire, avec 2,4-D les plantes empruntent les 2 voies embryogènes et certaines sont diploïdes.

### 2. Conclusion

Dans nos conditions d'expérimentation, le remplacement du 2,4-D par l'AIA n'est pas un obstacle à l'androgenèse.

Que les concentrations en AIA varient dans le rapport 1 à 200 ( $200 = 2 \text{ mg.l}^{-1}$ ), celles de la kinétine dans la proportion de 1 à 1000 ( $1000 = 10 \text{ mg.l}^{-1}$ ), que les rapports AIA/kinétine soient ou non égaux à 1, les microspores semblent être soumises au même mécanisme d'embryogenèse. Toutes les plantes naissent directement et sont haploïdes.



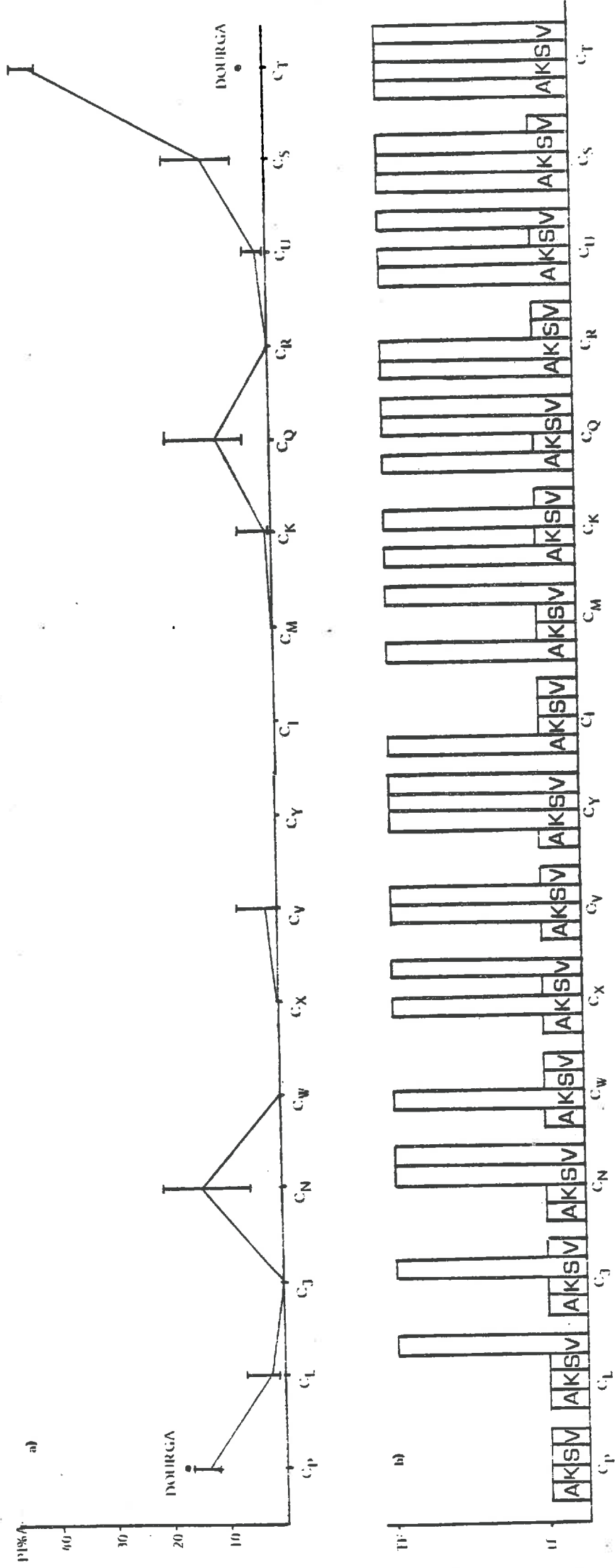


Figure 8. a) Rendements exprimés en plantes pour 100 anthers (PI%A) par milieu de culture.  
 b) La composition en 2,4-D, kinétine, vitamine B12 et saccharose de chaque milieu est représentée.

- I Intervalle de confiance
- Rendements du cultivar "Dourga" sur Cp et C1
- tf Teneur faible
- TF Teneur forte
- A Auxine : 2,4-D
- K kinétine
- S saccharose
- V vitamine B12

Pour une teneur déterminée :  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  d'auxine : AIA ou 2,4-D, associée à la même teneur en kinétine :  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ , le rendement en plantes pour 100 anthères mises en culture n'est pas statistiquement différent.

Chez la variété "Dourga", l'androgénèse n'est pas spécifique d'une auxine, d'ailleurs ISOUARD et al. (1979) utilisent l'ANA dans leur milieu de culture.

#### D. RECHERCHE D'UN MILIEU DE CULTURE PERFORMANT SUR UNE SERIE ETENDUE DE GENOTYPES

Les anthères de 13 variétés et hybrides F1 sont cultivées sur 16 milieux de culture différents. La chaleur est appliquée pendant les 8 premiers jours de culture.

##### 1. Les milieux de culture (fig. 8)

Conservant le milieu de base, nous attribuons 2 concentrations extrêmes à 4 éléments qui sont : 2,4-D, kinétine, saccharose et vitamine B12. Les milieux de mise en culture contiennent ces produits aux teneurs suivantes :

- 2,4-D ( $\text{mg.l}^{-1}$ )	0,01 ou 5
- kinétine ( $\text{mg.l}^{-1}$ )	0,01 ou 5
- vitamine B12 ( $\text{mg.l}^{-1}$ )	0,04 ou 0,20
- saccharose ( $\text{g.l}^{-1}$ )	30 ou 120

Nous étudions l'effet de ces teneurs sur la production de plantes.

##### 2. Résultats toutes variétés confondues

###### 2.1. Milieux embryogènes

Neuf milieux initient des embryons qui évoluent en plantes, après que les anthères aient été repiquées sur le milieu  $R_1$ . Parmi ceux-ci,  $C_P$  et  $C_T$ , extrêmes, contenant respectivement 2,4-D, kinétine, vitamine B12, et saccharose (0,01 ; 0,01 ; 0,04 ; 30 et 5 ; 5 ; 0,20 et 120) donnent des résultats différents. Le milieu  $C_T$  est plus embryogène que le milieu  $C_P$  ( $C_T > C_P$ ).

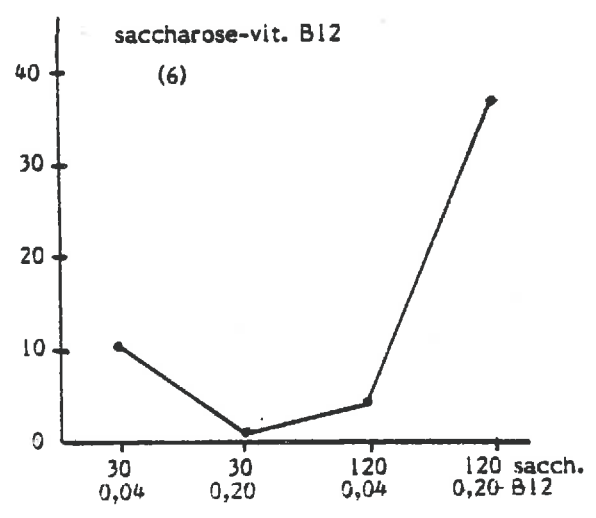
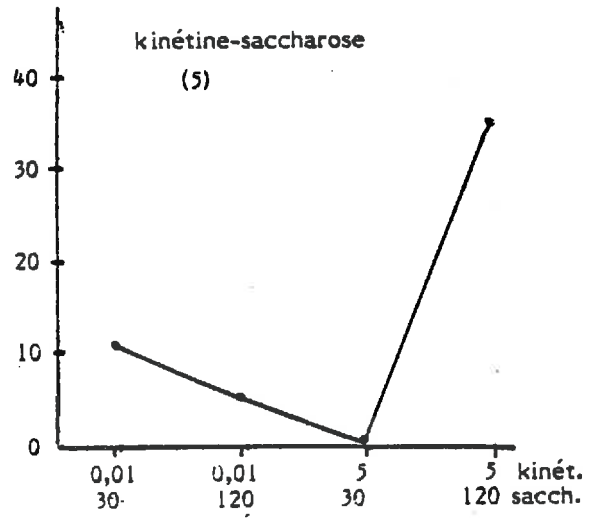
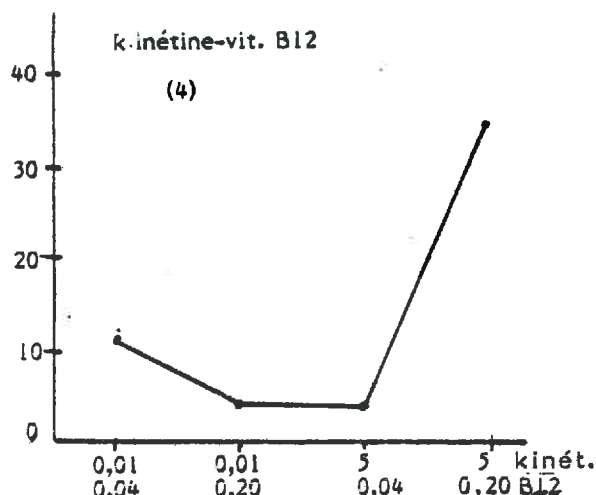
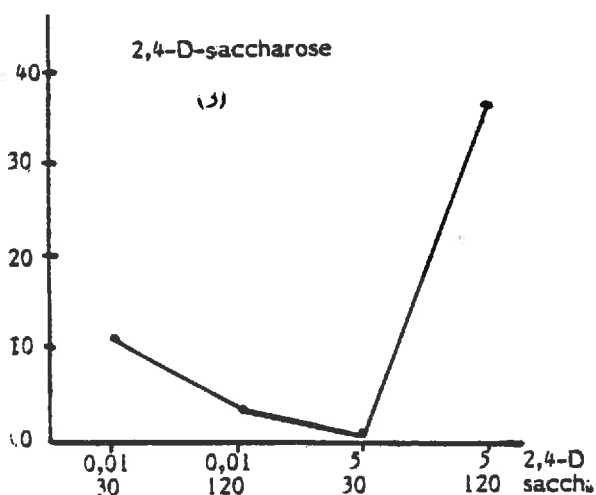
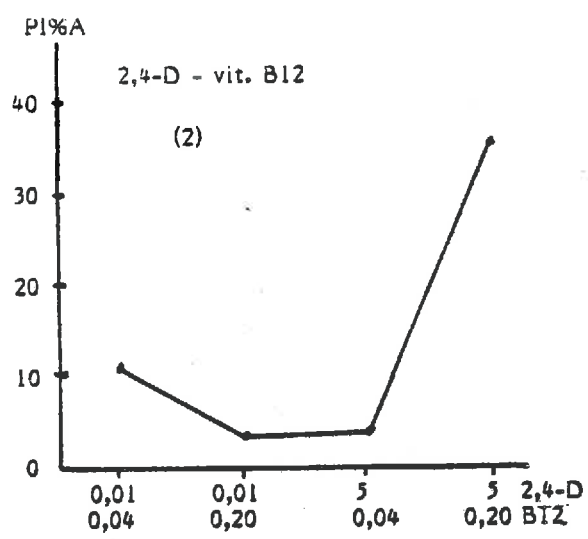
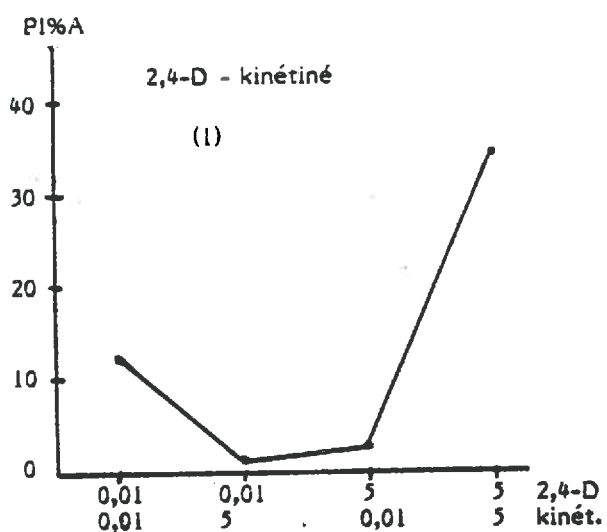


Figure 9. Effet de concentration des éléments associés 2 par 2 sur les rendements en plantes.

Sur 9 milieux :

- 6 milieux ont un rapport hormonal égal à 1,00.

$C_P$ ,  $C_L$ ,  $C_N$  ont de faibles concentrations

$C_U$ ,  $C_S$ ,  $C_T$  ont de fortes concentrations.

- 6 milieux contiennent 120 g de saccharose. Ce sont :

$C_N$ ,  $C_V$ ,  $C_Q$ ,  $C_K$ ,  $C_S$  et  $C_T$ .

- 5 milieux contiennent la concentration la plus élevée en vitamine B12.

Ce sont :  $C_L$ ,  $C_N$ ,  $C_Q$ ,  $C_U$  et  $C_T$ .

A ce propos, les milieux  $C_P$  et  $C_L$  puis  $C_S$  et  $C_T$ , comparés 2 à 2 sont significativement différents (fig. 8). Seule leur richesse en vitamine B12 les différencie.

## 2.2. Milieux non embryogènes

Ils sont au nombre de 7. Deux d'entre eux ont un rapport 2,4-D/kinétine = 1. Ce sont  $C_J$  (0,01/0,01) et  $C_R$  (5/5) et contiennent  $0,04 \text{ mg.l}^{-1}$  de vitamine B12.

## 2.3. Effet de concentrations des constituants associés 2 par 2 sur les rendements en plantes

Les 4 produits associés 2 par 2 forment 6 couples (2,4-D - kinétine ; 2,4-D - vitamine B12 ; 2,4-D - saccharose ; kinétine - vitamine B12 ; kinétine - saccharose ; vitamine B12 - saccharose). A chaque couple sont attribuées 4 associations de concentrations. Exemple : 2,4-D - kinétine : 0,01 - 0,01 ; 0,01 - 5 ; 5 - 0,01 ; 5 - 5. Pour chaque association, si nous établissons le rapport plantes obtenues/100 anthères mises en culture, nous pouvons tracer les courbes suivantes (fig. 9).

D'une manière générale, les 6 courbes présentent la même allure avec un pic de production aux 2 extrêmes. Pour chacun d'eux, les valeurs sont sensiblement les mêmes d'une courbe à l'autre.

L'intérêt des concentrations élevées de chaque composé ressort. Les autres associations de valeurs sont cependant intéressantes en particulier celles pour lesquelles les valeurs sont les plus faibles.

Variétés ou hybrides F1	Milieu C <sub>P</sub>					Milieu C <sub>T</sub>				
	A	AE	PI	PI/AE	PI % A	A	AE	PI	PI/AE	PI % A
F1 ADONA	44	0	0	0	0	154	10	15	1,50	9,74
F1 AUBRINA	11	0	0	0	0	220	14	25	1,79	11,36
F1 DOBRIX	11	0	0	0	0	88	12	74	6,17	84,09
F1 CLARESSE	110	0	0	0	0	110	25	134	5,36	121,82
TRACHIEZ	99	0	0	0	0	281	10	21	2,10	7,47
B 88-7	33	0	0	0	0	88	4	20	5,00	22,73
SHINKURO	33	0	0	0	0	77	3	264	88,00	342,86
RADJA	0	0	0	0	0	77	10	39	3,90	50,65
SICILIA	11	0	0	0	0	33	0	0	0	0
RONDE DE VAL.	11	0	0	0	0	88	0	0	0	0
DOURGA	358	6	63	10,5	17,60	174	5	8	1,60	4,60
DOURGA x RDV	176	0	0	0	0	33	0	0	0	0
RDV x DOURGA	66	5	77	15,40	116,67	17	2	16	8,00	94,12
Totaux	963	11	140	12,73	14,54	1440	95	616	6,48	42,78

Tableau 12. Rendements en plantes obtenus sur les milieux C<sub>P</sub> et C<sub>T</sub> par les anthères de 13 géotypes traitées à 35°C. pendant 8 j.

Légende :  
A nombre d'anthères en culture  
AE nombre d'anthères embryogènes  
PI nombre de plantes  
PI/AE nombre de plantes par anthère embryogène.  
PI % A nombre de plantes pour 100 anthères.

Nous constatons que nous pouvons pratiquement superposer les courbes 3 et 5 où apparaît l'avantage d'utiliser une teneur élevée en saccharose si la teneur en 2,4-D ou kinétine est faible.

### 3. Conclusions sur la composition des milieux

En produisant plus de 42 plantes pour 100 anthères en culture, le milieu  $C_T$  semble être le plus performant (CHAMBONNET & DUMAS DE VAULX, 1983). Il contient de chaque élément (2,4-D, kinétine, vitamine B12 et saccharose), la concentration supérieure.

La vitamine B12 joue un rôle important dans le milieu de culture. Nous montrons que sa concentration doit être en harmonie avec celle des autres éléments. Ainsi, à de faibles teneurs en 2,4-D, kinétine et saccharose, doit correspondre une faible teneur en vitamine B12 et réciproquement.

### 4. Résultats variétaux

Le tableau 12 présente le détail des résultats obtenus par les anthères des 13 cultivars en culture sur les milieux  $C_P$  et  $C_T$ .

Remarque : Les effectifs d'anthères en culture pour certains géotypes sont parfois bas et bien différents d'un milieu à l'autre. Ceci est dû à la disponibilité en boutons floraux au moment de l'essai.

Seuls les rendements en plantes par anthère embryogène sur les milieux  $C_P$  et  $C_T$  sont remarquables. Ils appellent cependant une remarque.

- sur le milieu  $C_T$ , la variété extrême-orientale "Shinkuro" a produit 264 plantes en 3 anthères (respectivement 198, 58 et 8) donc 88 plantes par anthère embryogène. Ce résultat pour exceptionnel/ illustre à la fois <sup>qu'il soit</sup> le potentiel embryogénique de l'anthère d'aubergine ainsi que sa faculté d'expression sur un milieu de culture adéquat. Nous notons aussi que les 3 anthères d'un même bouton qui en comportait 6, semblablement conditionnées sont très différemment embryogènes.

Sur le milieu  $C_T$  donc, le rendement par anthère embryogène est très nettement influencé par la performance de "Shinkuro".

Génotypes	A	AE	PI	PI/AE	PI%A
ADONA	154	10	15	1,50	9,74
DOURGA	174	5	8	1,60	4,60
CLARESSE	110	25	134	5,36	121,82
TRACHIETZ	281	10	21	2,10	7,47
Totaux	719	50	178	3,56	24,76

Tableau 13. Rendements en plantes obtenus sur le milieu C<sub>T</sub> après élimination du cultivar Shinkuro.

Légende: id° tabl. 12, p. 54

Milieux	A	AE	PI	PI/AE	PI%A	2n%PI	D	Cl	T	Sh	Ad
C <sub>P</sub> 0,01-0,01-0,04-30	644	6	63	10,50	9,78	14,30	63/358	0/110	0/99	0/33	0/44
C <sub>J</sub> 0,01-0,01-0,04-120	88	0	0	0	0	0	0/22	0/11	0/22	0/22	0/11
C <sub>L</sub> 0,01-0,01-0,20-30	145	1	4	4	2,76	0	4/79	0/11	0/22	0/22	0/11
C <sub>N</sub> 0,01-0,01-0,20-120	66	3	8	2,67	12,12	9,10	0/22	3/11	5/22	-	0/11
C <sub>W</sub> 0,01-5-0,04-30	55	0	0	0	0	0	0/22	0/11	-	-	0/22
C <sub>V</sub> 0,01-5-0,04-120	99	2	2	1	2,00	0	1/22	0/22	1/22	0/22	0/11
C <sub>X</sub> 0,01-5-0,20-30	110	0	0	0	0	0	0/22	0/11	0/33	0/33	0/11
C <sub>Y</sub> 0,01-5-0,20-120	77	0	0	0	0	0	0/22	0/11	-	0/22	0/22
C <sub>I</sub> 5-0,01-0,04-30	88	0	0	0	0	0	0/22	0/11	0/33	0/11	0/11
C <sub>K</sub> 5-0,01-0,04-120	132	4	3	0,75	2,27	0	1/22	1/22	1/44	0/22	0/22
C <sub>M</sub> 5-0,01-0,20-130	110	0	0	0	0	0	0/22	0/11	0/33	0/33	0/11
C <sub>Q</sub> 5-0,01-0,20-120	88	3	9	3	10,23	0	2/22	4/11	0/22	3/11	0/22
C <sub>R</sub> 5-5-0,04-30	121	0	0	0	0	0	0/22	0/11	0/44	0/22	0/22
C <sub>U</sub> 5-5-0,20-30	143	1	2	2	1,40	0	0/22	2/22	0/55	0/22	0/22
C <sub>S</sub> 5-5-0,04-120	132	9	15	1,67	6,70	6,70	0/22	2/11	13/55	0/22	0/22
C <sub>T</sub> 5-5-0,20-120	796	53	442	8,34	55,53	14,70	8/174	134/110	21/281	264/77	15/154

Tableau 14. Effet produit par la composition des milieux de culture et le traitement à 35°C sur les anthères de 5 génotypes. Etude du rendement en plantes et niveau de ploïdie.  
(D = Dourga ; Cl = Claresse ; T = Trachietz ; Sh = Shinkuro ; Ad = Adona).

Si nous éliminons le rendement obtenu par cette variété, et ne considérons que ceux des génotypes suivant "Adona", "Dourga", "Claresse" et "Trachietz", nous avons une idée beaucoup plus exacte des possibilités moyennes du milieu  $C_T$  (tabl. 13).

Dans un autre essai, les anthères des 4 cultivars à tendance parthénocarpique : "Claresse", "Trachietz", "Shinkuro" et "Adona, puis "Dourga" sont cultivées sur les 16 milieux (tabl. 14).

Nous observons que des anthères des 5 cultivars sont embryogènes uniquement sur le milieu  $C_T$ .

Celles de la variété "Trachietz" ont le meilleur rendement en plantes sur les milieux de culture contenant  $120 \text{ g.l}^{-1}$  de saccharose.

Pour induire l'embryogenèse, la F1 "Claresse" a besoin d'un rapport hormonal 2,4-D/kinétine = 1. Cependant, si les teneurs en ces composés sont faibles ( $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ ) la quantité de saccharose du milieu doit être élevée.

"Shinkuro" produit des plantes à partir de 2 milieux  $C_T$  et  $C_Q$  pour lesquels les teneurs en kinétine, vitamine B12 et saccharose sont les plus fortes.

"Adona" est la variété la plus sélective. Seul le milieu  $C_T$  induit l'embryogenèse.

Quant aux anthères de "Dourga", elles ne semblent pas avoir d'exigences particulières.

Les taux de plantes diploïdes de notre témoin "Dourga" sont identiques à partir des 2 milieux  $C_P$  et  $C_T$  (respectivement 14,30 et 14,70).



Milieux	AIA mg.l <sup>-1</sup>	2,4-D mg.l <sup>-1</sup>	kinét. mg.l <sup>-1</sup>	A	AE	PI%A
C <sub>AIA4</sub>	0,10		2,00	64	5	32,80
C <sub>P</sub>		0,01	0,01	238	0	0
C <sub>T</sub>		5,00	5,00	318	2	0,90

**Tableau 15.** Effet de la nature de l'auxine sur le rendement en plantes d'anthères de la variété "Ronde de Valence" traitées à 35°C.

**Légende :** A nombre d'anthères en culture  
 AE nombre d'anthères embryogènes  
 PI nombre de plantes

PI % A nombre de plantes pour 100 anthères.

Milieux	2,4-D mg.l <sup>-1</sup>	kinét. mg.l <sup>-1</sup>	F1	A	AE	PI	PI%A
C <sub>P</sub>	0,01	0,01	D x RDV	176	0	0	0
			RDV x D	66	5	77	116,67
C <sub>T</sub>	5,00	5,00	D x RDV	33	0	0	0
			RDV x D	17	2	16	94,12
C <sub>T</sub> *	5,00	5,00	D x RDV	306	27	69	22,50
			RDV x D	327	13	18	5,50

**Tableau 16.** Rendements en plantes d'hybrides F1 réciproques induits par les milieux C<sub>P</sub>, C<sub>T</sub> et le traitement à 35°C.

(D x RDV) = (Dourga ♀ x Ronde de Valence ♂)  
 (RDV x D) = (Ronde de Valence ♀ x Dourga ♂)

**Légende :** A nombre d'anthères en culture  
 AE nombre d'anthères embryogènes  
 PI nombre de plantes

PI % A nombre de plantes pour 100 anthères.

5. Cas particuliers du cultivar "Ronde de Valence" et des hybrides F1 réciproques ("Ronde de Valence" x "Dourga") et ("Dourga" x "Ronde de Valence").

5.1. "Ronde de Valence"

Les anthères mises en culture sur les milieux  $C_{AIA4}$  ;  $C_P$  et  $C_T$  sont traitées à 35°C pendant 8 jours.

= Résultats (tabl. 15)

Remarque : Les rendements sur le milieu  $C_T$  sont extraits du D.A.A. de CABANNES (1983).

Malgré des nombres importants d'anthères en culture (respectivement 238 et 318), nous constatons que l'androgenèse est irréalisable sur le milieu  $C_P$ , et très rare sur le milieu  $C_T$ .

Par contre, sur le milieu  $C_{AIA4}$  le rendement en plantes pour 100 anthères est élevé (32,80), et toutes les plantes produites directement sont haploïdes.

5.2. Les hybrides F1 réciproques ("Ronde de Valence" x "Dourga") et ("Dourga" x "Ronde de Valence")

= Résultats (tabl. 16)

Remarque :  $C_T^*$  : ces résultats sont extraits du D.A.A. de CABANNES (1983).

Nous notons une différence de comportement des anthères des 2 hybrides réciproques sur chaque milieu de culture.

Seules les anthères de ("Ronde-de-Valence" x "Dourga") produisent des plantes sur les milieux  $C_P$  et  $C_T$ . Les rendements sont élevés (respectivement 117 et 94 plantes pour 100 anthères).

Les anthères des 2 hybrides en culture sur le milieu  $C_T$  produisent des plantes. Le rendement ("Dourga" x "Ronde-de-Valence") est supérieur au rendement ("Ronde de Valence" x "Dourga") pour des nombres comparables d'anthères en culture.

## 6. Conclusions sur les résultats variétaux

Il faut garder présente à l'esprit l'idée selon laquelle le choix des boutons floraux est une réelle difficulté de l'androgénèse chez l'aubergine. Aussi, devons-nous nuancer l'appréciation sur le comportement variétal en fonction :

- d'un nombre suffisamment élevé d'anthères mis en culture, ainsi ISOUARD (1981) donne des résultats portant sur plus de 70 000 anthères.
- de la composition en auxine des milieux d'induction (teneur et nature).

Les anthères du cultivar "Dourga" (variété témoin), induisent des plantes à partir de milieux de culture contenant soit 2,4-D, soit AIA (ou ANA, ISOUARD, 1981). Les taux de plantes pour 100 anthères mises en culture, annoncés par ce dernier, sont faibles, mais la technique utilisée est différente de la nôtre.

Les anthères du cultivar "Ronde-de-Valence" ne sont pas du tout embryogènes si l'ANA est l'auxine employée (ISOUARD, 1981) ou le 2,4-D à faible dose ( $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Bien que le rendement soit faible (1 plante/100 anthères) cette variété exige une teneur élevée ( $5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) de 2,4-D pour être embryogène ; ou l'AIA ( $0,10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) pour produire de nombreuses plantes (33 pour 100 anthères).

Les anthères des hybrides F1 ("Ronde-de-Valence" x "Dourga") et ("Dourga" x "Ronde-de-Valence"), ont des comportements différents. Curieusement ("Dourga" x "Ronde-de-Valence") en culture sur le milieu  $C_p$  n'est pas embryogène, alors que "Dourga" l'est, et l'hybride inverse ("Ronde-de-Valence" x "Dourga") l'est, alors que "Ronde-de-Valence" ne l'est pas.

Sur milieu  $C_T$ , il faut accorder davantage de crédit aux résultats trouvés par CABANNES (1983) puisqu'un effectif plus important d'anthères est mis en culture.

Pour un nombre équivalent d'anthères, ISOUARD (1981) sur milieu avec ANA, produit un nombre plus grand de plantes avec ("Dourga" x "Ronde-de-Valence").

Codes	A	AE	PI	PI/AE	PI%A	Rendements en plantes par famille
A	45	2	3	1,50	6,67	12 → 7,95 PI%A
B	54	9	0	0	0	
C	52	12	9	0,75	17,31	
D	74	20	20	1	1,35	171 → 72,46 PI%A
E	48	8	22	2,75	45,83	
F	62	13	75	5,77	120,97	
G	52	22	54	2,57	87,10	
H	38	10	18	1,80	34,62	38 → 15,83 PI%A
I	73	6	6	1	2,63	
J	129	8	14	1,75	19,18	
K	167	26	23	0,88	17,83	214 → 49,20 PI%A
L	78	34	89	2,62	53,29	
M	80	15	94	6,27	120,51	
N	80	31	8	0,26	10,00	
O	96	19	24	1,26	25,00	313 → 96,90 PI%A
P	105	34	203	1,93	193,33	
Q	122	35	86	0,70	70,49	
Totaux	1337	304	748	2,46	55,95	

Tableau 17. Rendements en plantes produits par des géotypes en sélection en culture sur le milieu C<sub>T</sub>. Les anthères sont traitées à 35°C.

Légende :

- A nombre d'anthères en culture
- AE nombre d'anthères embryogènes
- PI nombre de plantes
- PI/AE nombre de plantes par anthère embryogène.
- PI%A nombre de plantes pour 100 anthères.

Certaines variétés semblent être particulièrement bien adaptées à la culture d'anthères, ainsi il n'est pas rare d'approcher ou même dépasser 100 plantes pour 100 anthères mises en culture. "Shinkuro" détient actuellement le record de rendement avec 198 plantes pour 1 anthère embryogène.

Les 6 variétés étudiées spécialement sont toutes embryogènes sur le milieu  $C_T$ .

Les taux de diploïdisation spontanée sont fonction de la nature de l'auxine, mais avec le 2,4-D, il avoisine 14 plantes  $2n$  pour 100 plantes. Les diploïdes ne présentent apparemment pas de caractères défavorables.

## E. APPLICATION DE LA TECHNIQUE A DU MATERIEL EN COURS DE SELECTION

### 1. Matériel végétal

Les anthères de 17 plantes codées A à Q appartenant à 5 familles issues d'une sélection récurrente, sont mises en culture sur le milieu  $C_T$ .

Les caractères agronomiques de ces plantes sont intéressants à l'état hétérozygote : production parthénocarpique en culture de printemps, fruits longs plus ou moins épais. La perte de vigueur due à l'homozygotie sera estimée sur les descendances des plantes haplodiploïdisées obtenues.

### 2. Résultats

#### 2.1. Rendements en plantes (tabl. 17)

Seule l'origine B ne produit pas de plantes mais avec seulement 54 anthères en culture. La famille qui regroupe les origines A, B, C, semble avoir des capacités androgénétiques plus faibles (rendement 7,96 P1%A) que les autres.

Remarque : Dans cet essai, nous appelons anthères embryogènes, toutes les anthères d'où sortent des plantes, ou des pseudo-cals pour lesquels l'évolution en plantes s'est ou ne s'est pas poursuivie.

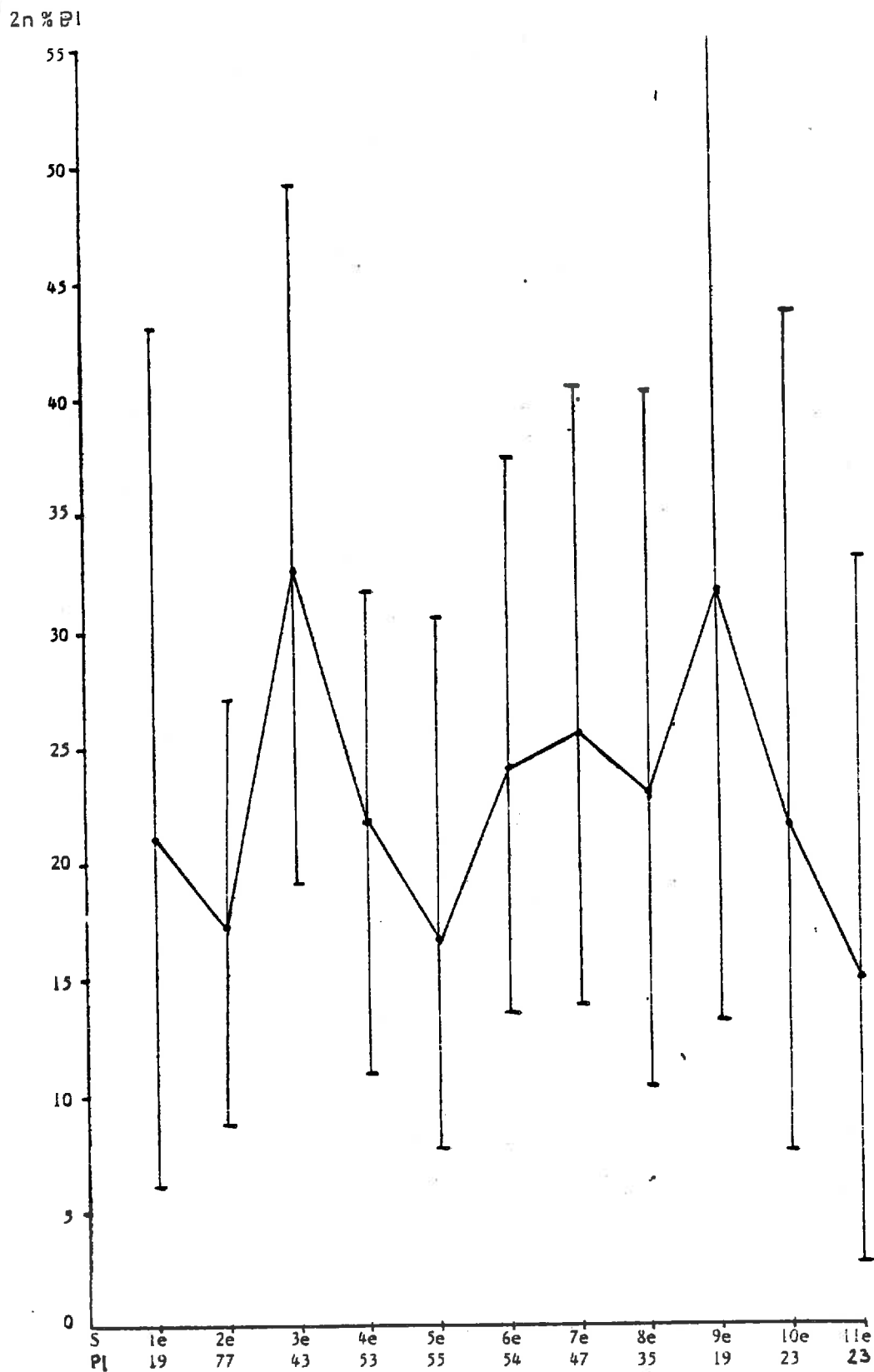


Figure 10. Rendements exprimés en pourcentages de plantes diploïdes (2n%PI), en fonction de la durée de l'essai.

S semaines

PI nombre de plantes pour chaque sortie

2n % PI Nombre de plantes diploïdes pour 100 plantes

I Intervalle de confiance au seuil 0,05.

Le sélectionneur ne peut donc compter que sur une production moyenne de 0,56 plante par anthère effectivement mise en culture.

## 2.2. Niveau de ploïdie (fig. 10)

Une fois par semaine, et pendant 11 semaines, les plantes sont extraites des boîtes et repiquées en tubes sur milieu  $V_3$ . Au moment de leur mise en terre nous séparons haploïdes et diploïdes.

Il n'existe pas de différence dans l'apparition spontanée de diploïdes, bien que 2 pics existent. La diploïdisation ne paraît ni s'accroître, ni diminuer avec le temps, et il est difficile d'établir une liaison avec le vieillissement du milieu en éléments nutritifs ou encore son enrichissement en produits sécrétés et rejetés par les anthères.

Dans ces conditions, le sélectionneur sait donc pouvoir compter sur un effectif diploïde spontané voisin de 25%.

## 3. Conclusion partielle

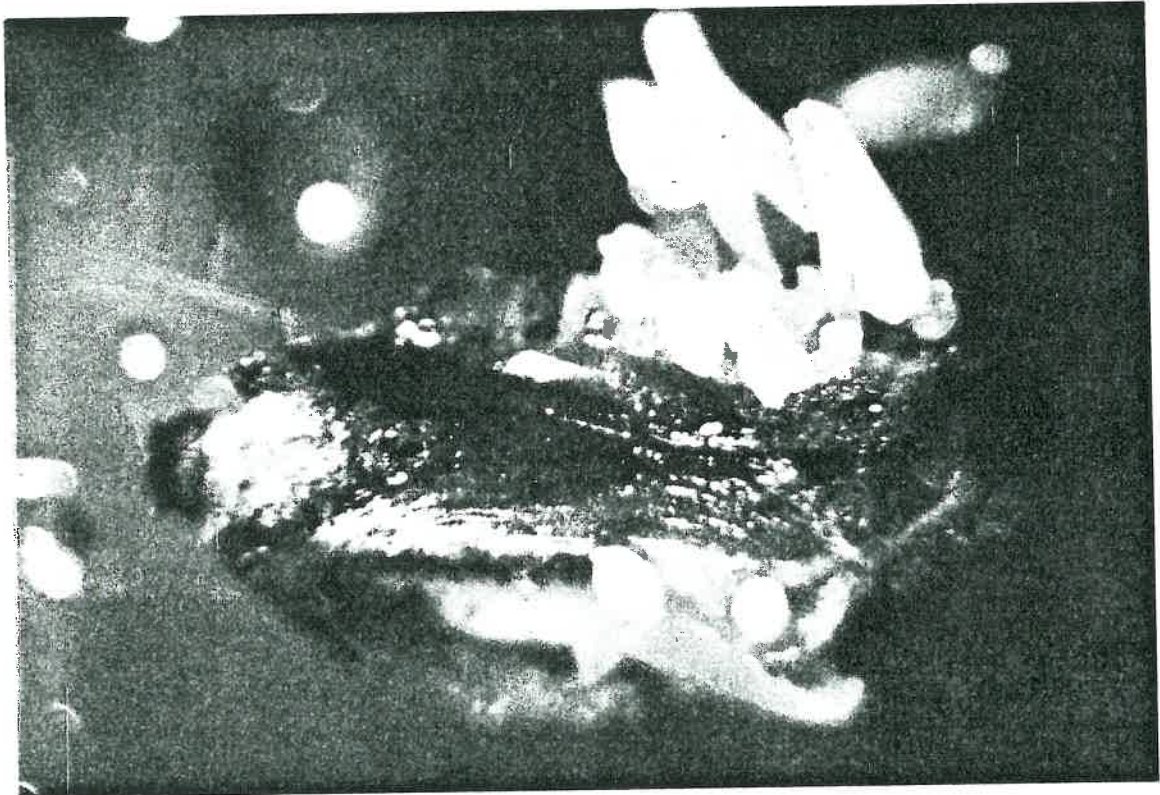
Les résultats de la technique (obtenus précédemment) se confirment sur du matériel en cours de sélection récurrente.

Les diverses pressions de sélection effectuées ne paraissent pas altérer les capacités androgénétiques des anthères d'aubergine.

## F. CONCLUSION GENERALE

Nous avons, tous essais confondus, à partir d'environ 12 000 anthères appartenant à des génotypes divers, obtenu plus de 3 000 plantes d'origine gamétique.

Les anthères de la variété "Dourga" et de ses hybrides F1 ("Ronde-de-Valence" x "Dourga") cultivées sur le milieu "androgénèse piment" et selon la "technique piment, améliorée" peuvent produire des plantes haploïdes et haploïdes doublées spontanément. L'aubergine n'exige pas d'apporter



Embryogenèse pollinique directe dans une anthère d'aubergine qui produit .....



de la chaleur aux anthères en culture, pour dévier le sens de la mitose pollinique. Ce facteur est uniquement améliorant.

Les chercheurs du "Research Group of Haploidy" (1978) utilisant des hybrides F1 chinois, procèdent en 3 étapes où interviennent successivement 3 auxines :

- 2,4-D et kinétine dans des milieux d'induction d'embryoïdes ou d'embryoïdes et cals ;
- ANA et kinétine dans un milieu de régénération sur lequel sont déposés les cals ;
- AIA dans un milieu d'enracinement.

L'auxine utilisée par ISOUARD (1981) est l'ANA, et il est intéressant de remarquer qu'elle produit sur les microspores de la variété "Dourga", les mêmes effets que le 2,4-D. Les plantes sont indifféremment produites directement ou après passage par pseudo-cals, mais ISOUARD ne traite pas les anthères par la chaleur et ses rendements sont faibles.

Pour une technique donnée, le 2,4-D et l'AIA agissant sur un même génotype "Dourga", ont des actions en partie différentes. L'AIA n'induit (au moins sur les génotypes testés) que la voie embryogénique directe et toutes les plantes sont haploïdes.

Une auxine particulière (l'AIA) peut être un facteur de réussite essentiel pour un génotype particulier ("Ronde de Valence").

Comme nous venons de le voir, les auteurs chinois incorporent également la kinétine dans leurs milieux d'induction et de régénération. ISOUARD (1981) incorpore de la 6-benzylaminopurine.

Nous avons montré que la kinétine n'est pas indispensable à l'induction des mitoses dans le milieu de culture, au moins pour le cultivar "Dourga". Cependant, si elle est absente, la teneur en 2,4-D doit être relativement élevée ( $0,10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) bien que le traitement thermique ait lieu. La kinétine pourrait avoir un effet sur la voie embryogénique et lorsqu'elle est absente de certains de nos milieux nous n'obtenons des plantes que directement.



..... de jeunes plantes, chlorophylliennes et racinées, quelques jours plus tard.

Le saccharose est utilisé à raison de  $30 \text{ g.l}^{-1}$  par les chercheurs chinois (sauf dans leur milieu d'enracinement :  $20 \text{ g.l}^{-1}$ ). ISOUARD (1981) emploie  $20 \text{ g.l}^{-1}$ . Dans nos milieux, avec ou sans kinétine, avec ou sans traitement thermique, c'est  $30 \text{ g.l}^{-1}$  que nous ajoutons.

Dans nos conditions de technique, et sur une gamme élargie de génotypes dont fait partie le cultivar "Dourga", il semble que la dose élevée de  $120 \text{ g.l}^{-1}$  puisse être un obstacle à l'androgénèse (milieu  $C_J$ ). Il en va tout autrement, si utilisant cette dose, nous augmentons parallèlement la teneur en vitamine B12 (milieu  $C_N$ ) ou bien encore la teneur en kinétine (milieu  $C_V$ ) ou la concentration en 2,4-D (milieu  $C_K$ ).

Le saccharose à dose élevée ne peut être seul un facteur améliorant bien au contraire.

La vitamine B12 n'est généralement pas un élément utilisé en androgénèse. Nous venons de voir son action en compagnie du saccharose. Elle est source d'amélioration très nette si sa concentration passe de 1 à 5 dans un milieu qui contient déjà des doses élevées de 2,4-D, kinétine et saccharose (milieux  $C_S$  : 5 - 5 - 0,04 - 120 et  $C_T$  : 5 - 5 - 0,20 - 120) puisque la production de plantes pour 100 anthères est alors multipliée par 8).

Il n'a pas été observé de plantes déficientes chlorophylliennes.

La détermination du niveau de ploïdie des plantes, effectuée sur méristèmes racinaires, révèle aux chercheurs du "Research Group of Haploidy" (1978) l'existence de cellules aneuploïdes et à 12, 24, 36 et 48 chromosomes, mais certaines plantes sont d'origine somatique.

ISOUARD (1981) relate pour un même individu l'existence de racines haploïdes et de racines diploïdes. Nous confirmons cette observation, mais rejetons le seul effet du bouturage des individus pour expliquer le doublement des chromosomes car nos plantes ne sont pas bouturées. Contrairement aux observations de cet auteur, nous n'avons jamais compté 17, 18, 19, 20, 21, 22 ou 23 chromosomes dans les cellules méristématiques de leurs racines.

Dans nos essais, avec le 2,4-D, les taux de ploïdie sont sans rapport avec la voie embryogénique suivie.

Si le phénotype des plantes obtenues est caractéristique, l'état haploïde est déterminé précocement. Il arrive cependant qu'au stade juvénile les feuilles ne soient pas allongées et étroites. Il y a alors confusion possible avec l'état diploïde. L'observation chromosomique nous renseigne de façon certaine. Si la réponse peut être différée, nous attendons l'apparition des pièces florales. Leur taille réduite ainsi que l'absence de pollen fonctionnel sont caractéristiques de l'état haploïde.



Dessin de 1653, extrait de "Tomaty"  
D.D. BREJNEV  
2e édition. Ed. Kolos, Leningrad, 1964.

## VI - CULTURE D'ANTHERES DE TOMATE

(Lycopersicon esculentum Mill.)

### A. GENERALITES

Les données bibliographiques reflètent les réelles difficultés auxquelles se heurtent les chercheurs pour faire produire des haploïdes aux anthères cultivées in vitro.

Les divers stades d'évolution des microspores au moment de la mise en culture, ont précédemment été cités.

Quel que soit le couple auxine-cytokinine utilisé en culture d'anthères de tomate, les divisions du noyau aboutissent toujours à la formation de cal.

Les concentrations en saccharose ne semblent pas influencer sur la voie embryogénique et l'aboutissement des divisions. Elles varient de 10 à 120 g.l<sup>-1</sup>, mais seuls SHARP et al (1971) puis PRIKHOD'KO (1979) utilisent des doses élevées.

Parfois des globules et des embryons apparaissent (DEBERGH & NITSCH 1973). Les premières plantes haploïdes issues de culture d'anthères ont été signalées par GRESSHOF & DOY, 1972. Depuis, GAO XIUYUN (1980), ZAMIR et al. (1982), ZAGORSKA et al. (1982) en ont produits.

Ces derniers accordent beaucoup d'intérêt au génotype.

Selon NITSCH (1977), le prélèvement de la fleur lorsque la microspore est en mitose, modifie la première division, et le nombre de microspores ainsi modifiées, est augmenté par une température basse ou une centrifugation.

Avec l'intention d'obtenir des plantes sans passer par la formation de cal, nous entreprenons une série d'essais.

Milieux	2,4-D mg.l <sup>-1</sup>	kinét. mg.l <sup>-1</sup>	vit. B12 mg.l <sup>-1</sup>	sacchar. g.l <sup>-1</sup>
C <sub>E</sub>	2	2	0,04	30
C <sub>A</sub>	0,10	2	0,04	30
C <sub>P</sub>	0,01	0,01	0,04	30

Tableau 18. Composition des milieux de culture de type piment.

Milieux de culture	Anthères prélevées après traitement à			Nbre de noyaux après 8 j
	4°C-8 j	35°C-2 j	35°C-8 j	
C <sub>E</sub>	20	10	40	0
C <sub>A</sub>	15	11		0
C <sub>P</sub>	17	22		0
C <sub>P</sub>			75	2
C <sub>A</sub>			68	2 à 4

Tableau 19. Effets de divers traitements thermiques associés aux milieux de culture.

Nous étudions en priorité l'effet du traitement thermique des anthères en culture. Le stade de prélèvement des boutons floraux correspond au moment de la première mitose pollinique.

Le jugement de l'efficacité conjointe d'un milieu de culture et du traitement thermique est réalisé par l'observation cytologique des microspores après des temps variables de culture. Une anthère par boîte de Pétri est prélevée au hasard. L'aspect des anthères restant en culture, est noté après leur transfert sur le milieu de repiquage.

## B. ESSAI DES MILIEUX DE CULTURE QUI DONNENT DE BONS RESULTATS CHEZ LE PIMENT

Deux traitements à 35°C pendant 2 ou 8 jours, efficaces sur l'entrée en mitose du noyau des microspores de piment, sont comparés à l'action du froid : 4°C pendant 8 jours.

Ces traitements sont appliqués à 4 000 anthères de la variété "Severianin" en culture sur les milieux de base C dont les teneurs en substances de croissance, vitamine B12 et saccharose sont les suivantes (tabl. 18)

### 1. Résultats (tabl. 19)

Les observations microscopiques ont lieu après 8 jours de culture.

Les anthères traitées au froid ou à la chaleur pendant 2 jours, ne contiennent que des microspores mortes.

Le traitement à 35°C pendant 8 jours induit 2 divisions seulement avec les milieux C<sub>P</sub> et C<sub>A</sub>.

Quelques jours après transfert sur le milieu R<sub>1</sub>, les autres anthères jaunissent, s'ouvrent et se nécrosent.



Milieux	2,4-D <sub>1</sub> mg.l <sup>-1</sup>	kinét. <sub>1</sub> mg.l <sup>-1</sup>	vit. B <sub>12</sub> mg.l <sup>-1</sup>	sacchar. g.l <sup>-1</sup>
C <sub>G</sub>	0,01	0	0,04	30
C <sub>F</sub>	0,10	0	0,04	30
C <sub>W</sub>	0,01	5	0,04	30
C <sub>U</sub>	5	5	0,20	30
C <sub>T</sub>	5	5	0,20	120
C <sub>S</sub>	5	5	0,04	120
C <sub>N</sub>	0,01	0,01	0,20	120
C <sub>J</sub>	0,01	0,01	0,04	120
C <sub>K</sub>	5	0,01	0,04	120
C <sub>Q</sub>	5	0,01	0,20	120

Tableau 20. Composition des milieux de culture de type "aubergine".

## 2. Conclusion

Les milieux de culture de type "piment" contenant  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  ou  $0,10 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D, ne peuvent induire plus de 2 divisions du noyau des microspores au stade première mitose pollinique malgré l'application de la chaleur pendant les 8 premiers jours de culture des anthères.

## C. ESSAI DES MILIEUX DE CULTURE QUI DONNENT DE BONS RESULTATS CHEZ L'AUBERGINE

Les traitements à  $35^{\circ}\text{C}$  pendant 2 ou 8 jours, efficaces sur l'entrée en mitose du noyau des microspores d'aubergine, sont comparés à l'action du froid :  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 4 jours. Ces traitements sont appliqués aux anthères en culture.

D'autres anthères, dès la mise en culture, subissent les conditions de température ( $25^{\circ}\text{C}$  en continu), et photopériode (12 h), de la pièce de culture. 2 300 anthères de l'hybride commercial "Montfavet 63-5" sont réparties sur 10 milieux (tabl. 20 ).

### 1. Résultats

Les observations cytologiques sont faites sur 150 anthères et donnent lieu à 3 séries : après 5 à 7 jours ; 15 et 21 jours de culture.

Sur certains milieux, les anthères traitées meurent avant que n'ait lieu au moins une série d'observations (fig. 11). Ces milieux nécrosant sont :

- . Pour le traitement à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 4 j :  $C_K$
- . "                     $25^{\circ}\text{C}$     "    " :  $C_F, C_V, C_T, C_J, C_Q$
- . "                     $35^{\circ}\text{C}$     "    2 j :  $C_K, C_Q$
- . "                     $35^{\circ}\text{C}$     "    8 j :  $C_U, C_S, C_N, C_J, C_K, C_Q$ .

Aucun traitement thermique ne permet au noyau des microspores d'entrer en division avec les milieux  $C_G, C_W$  et  $C_F$  qui ont en commun  $30 \text{ g.l}^{-1}$  de saccharose,  $0,04 \text{ mg.l}^{-1}$  de vitamine B12, et un rapport auxine/cytokinine différent de 1.

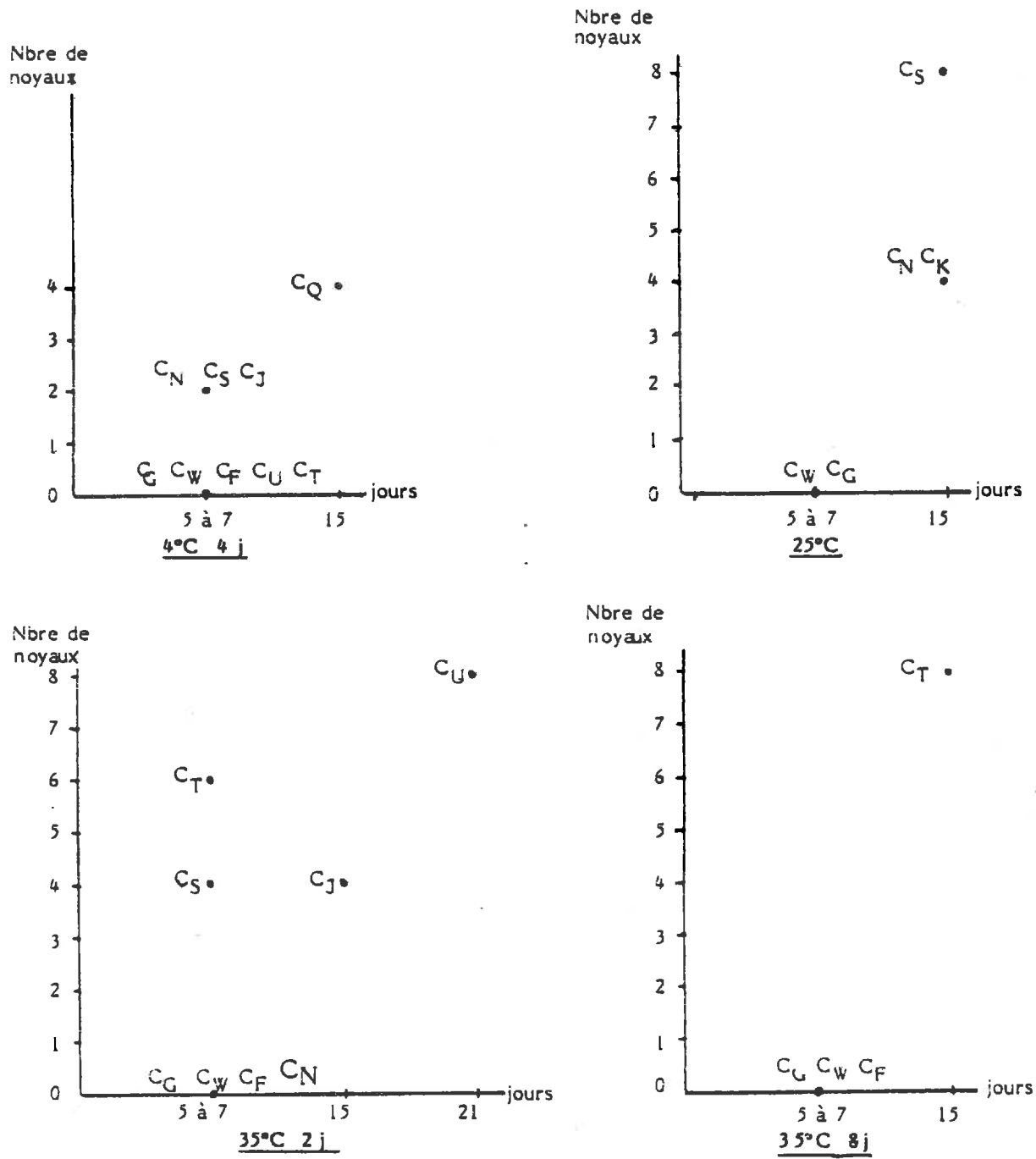


Figure 11. Nombre de noyaux par microspore en fonction du milieu de culture de type aubergine et du traitement physique appliqué.

Le traitement au froid n'induit pas de division pour les microspores contenues dans les anthères en culture sur les milieux  $C_U$  et  $C_T$  qui ne diffèrent que par leur teneur en saccharose : respectivement  $30 \text{ g.l}^{-1}$  et  $120 \text{ g.l}^{-1}$ . Leurs teneurs en 2,4-D, kinétine et vitamine B12 sont élevées. Seuls les milieux  $C_N$ ,  $C_J$  et  $C_S$  permettent une division en 5 à 7 jours. Leur rapport auxine/cytokinine égal à 1 et leur teneur en saccharose est forte. Deux divisions donnant 4 noyaux sont effectives en 15 jours de culture, si le milieu  $C_Q$  à fortes concentrations en 2,4-D, vitamine B12 et saccharose est utilisé.

Toutes les anthères meurent en se nécrosant, après 15 jours de culture.

En absence de traitement thermique (conditions de la chambre de culture:  $25^\circ\text{C}$  et photopériode de 12 h), après 15 jours de culture sur les milieux  $C_N$ ,  $C_K$  et  $C_S$ , 4 à 8 noyaux sont observables dans les microspores.

Les anthères vivent pendant 1 mois, mais s'ouvrent, laissant apparaître d'énormes cellules hyperhydriques prenant parfois l'aspect de formations globulaires.

Avec le traitement à  $35^\circ\text{C}$  pendant 2 jours, certains noyaux se divisent assez rapidement, puisqu'en 5 à 7 jours, nous pouvons en dénombrer de 4 à 6 si les anthères sont cultivées sur les milieux  $C_S$  et  $C_T$ . Ce traitement n'induit pas de division sur les milieux  $C_G$ ,  $C_W$ ,  $C_F$  et  $C_N$ . En 21 jours, avec le milieu  $C_U$ , nous comptons 8 noyaux. Toutes les anthères meurent en 3 semaines environ.

Si le traitement à  $35^\circ\text{C}$  est appliqué pendant 8 jours, les microspores des anthères en culture sur le milieu  $C_T$  montrent 8 noyaux en 15 jours.

Toutes les anthères meurent également en 3 semaines environ.

## 2. Conclusion

La composition des milieux de culture importe apparemment autant sur la division du noyau des microspores que les conditions physiques testées appliquées aux anthères.

D'une manière générale, et contrairement à ce qu'il se produit avec

les milieux de type "piment", certains milieux "aubergine" induisent des divisions quelles que soient les conditions physiques testées.

Nous notons en particulier, qu'en conditions de traitement au froid, et en absence de traitement thermique, des divisions sont induites uniquement sur des milieux de culture dont la teneur en saccharose est  $120 \text{ g.l}^{-1}$ .

#### D. ESSAI DE REMPLACEMENT DU 2,4-D PAR L'AIA ou l'ANA

##### 1. Remplacement du 2,4-D par l'AIA.

Les milieux de culture avec lesquels nous n'avons obtenu que des plantes haploïdes d'aubergine sont testés. Ils contiennent tous  $0,04 \text{ mg.l}^{-1}$  de vitamine B12 et  $30 \text{ g.l}^{-1}$  de saccharose.

Leur composition en substances de croissance est la suivante :

$C_{AIA1}$	AIA	$0,01 \text{ mg.l}^{-1}$	kinétine $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$
$C_{AIA2}$	AIA	$0,1 \text{ mg.l}^{-1}$	kinétine $10 \text{ mg.l}^{-1}$
$C_{AIA3}$	AIA	$2 \text{ mg.l}^{-1}$	kinétine $2 \text{ mg.l}^{-1}$
$C_{AIA4}$	AIA	$0,1 \text{ mg.l}^{-1}$	kinétine $2 \text{ mg.l}^{-1}$

Neuf cents anthères de la variété "Marmande" sont mises en culture. Les traitements qu'elles reçoivent sont le froid :  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 8 jours ou la chaleur :  $35^{\circ}\text{C}$  pendant 8 jours.

##### 1.1. Résultats

Le contenu de 90 anthères est observé cytologiquement en fin de traitement, et seuls des grains de pollen vides apparaissent.

##### 2. Remplacement du 2,4-D par l'AIA et de la kinétine par la zéatine

Un milieu de culture est expérimenté. Il contient : AIA :  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  zéatine :  $0,10 \text{ mg.l}^{-1}$ . Les autres composants sont inchangés.

Mille deux cents anthères de la variété "Marmande" sont cultivées et sont traitées au froid : 4°C pendant 4 jours ou la chaleur : 35°C pendant 2 jours.

Afin d'observer quel peut être l'effet prolongé du milieu d'induction sur la division du noyau, 160 anthères traitées par la chaleur ne sont pas transférées sur milieu de repiquage.

### 2.1. Résultats

Après 9 jours de culture, nous observons dans les anthères traitées par le froid, de nombreuses microspores à 2 noyaux.

Trente à 40 jours après le début de l'essai, toutes les anthères sont nécrosées dans tous les traitements.

### 3. Remplacement du 2,4-D par l'ANA

Les milieux de culture  $K_{A1}$ ,  $K_{A2}$ ,  $K_{A3}$ ,  $K_{A4}$  contiennent tous : 5  $\text{mg.l}^{-1}$  d'ANA ; 5  $\text{mg.l}^{-1}$  de kinétine ; 0,20  $\text{mg.l}^{-1}$  de vitamine B12. Les teneurs en saccharose sont respectivement : 30, 60, 90 et 120  $\text{g.l}^{-1}$ .

Cinq cents anthères de la variété "Marmande" sont réparties sur ces milieux et sont traitées à la chaleur pendant les 8 premiers jours.

### 3.1. Résultats

Après 6 jours de culture, nous observons :

- des microspores vides sur les milieux  $K_{A3}$  et  $K_{A4}$
- des grains plurinucléés, dont les noyaux (2 à 4) sont petits et plus ou moins dégénérés sur le milieu  $K_{A2}$ .
- des microspores d'assez bel aspect (5 à 6 noyaux) sur le milieu  $K_{A1}$ . Transférées sur le milieu  $R_1$ , les anthères de ce milieu se nécrosent en 20 à 30 jours.

### 4. Conclusion de ces essais

Les changements d'auxine (2,4-D remplacé par l'AIA ou l'ANA) sans

ou avec changement de cytokinine (kinétine remplacée par la zéatine), n'incident pas le noyau des microspores à se diviser activement malgré l'application de traitement au froid ou à la chaleur sur les anthères en culture.

Nous notons toutefois la supériorité du milieu  $K_{A1}$  ne contenant que  $30 \text{ g.l}^{-1}$  de saccharose, capable d'induire des mitoses de qualité en condition de traitement à  $35^\circ\text{C}$  pendant 8 jours.

### 5. Recherche de l'influence de la gibbérelline dans le milieu d'induction

Des anthères (2 400) de l'hybride F1 "Montfavet 63-5" sont réparties sur 5 milieux de culture dont les teneurs en 2,4-D, kinétine, vitamine B12 et saccharose sont respectivement :  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $0,20 \text{ mg.l}^{-1}$  et  $120 \text{ g.l}^{-1}$ .

Les concentrations de gibbérelline (qui est stérilisée par passage sur filtre millipore) sont : 0 ; 0,01 ; 0,10 ; 2 et  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Certaines anthères ne subissent pas de traitement à la chaleur, d'autres sont traitées à  $35^\circ\text{C}$  pendant 8 jours.

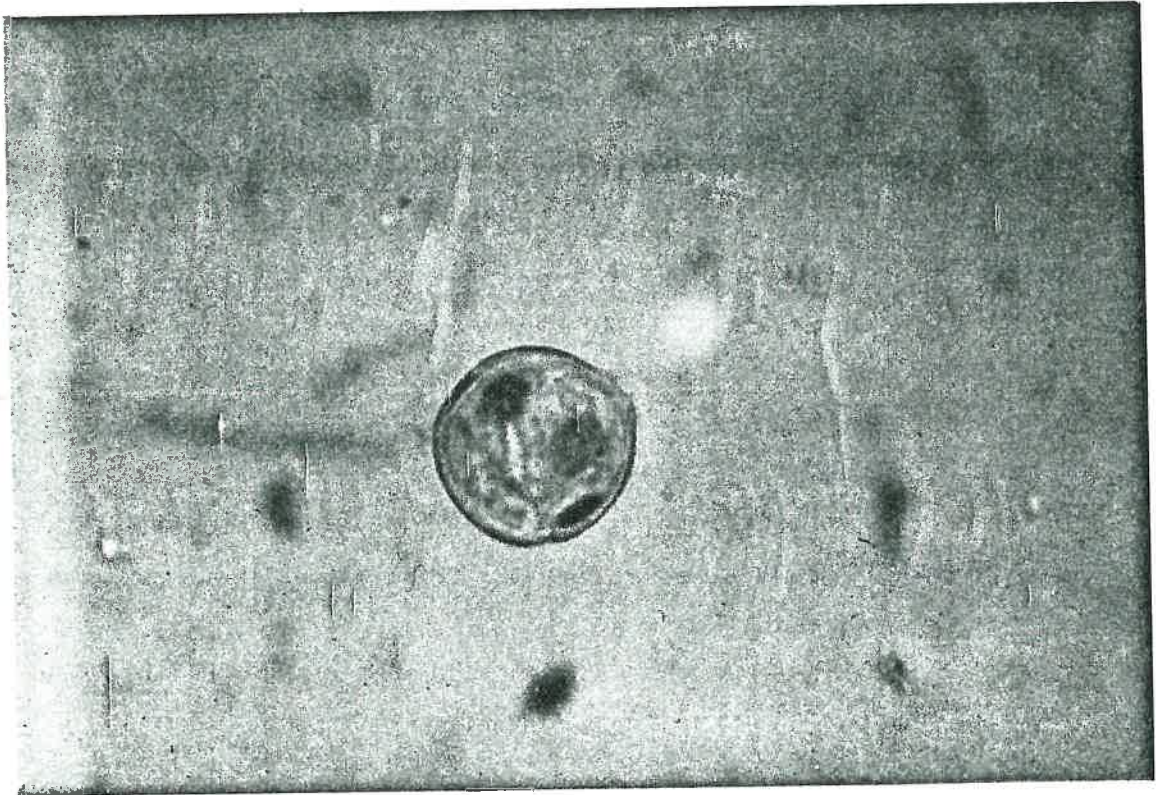
#### 5.1. Résultats

En 5 à 7 jours de culture, aucune division ne se produit. Toutes les anthères meurent rapidement après transfert sur milieu  $R_1$ .

### 6. Recherche de l'influence de la teneur en saccharose du milieu d'induction

Nous avons vu précédemment (en testant les milieux de type aubergine) l'intérêt d'un milieu  $C_U$  à fortes teneurs en 2,4-D, kinétine et vitamine B12 ne contenant que  $30 \text{ g.l}^{-1}$  de saccharose combiné au traitement à  $35^\circ\text{C}$  pendant 2 jours.

Nous venons de revoir (milieu  $K_{A1}$ ) l'effet d'une faible concentration en ce composant.



Le noyau végétatif d'une microspore de tomate a subi une mitose. Le noyau reproducteur (allongé) est encore visible.



Les anthères (7 000) de l'hybride "Montfavet 63-5" sont réparties sur 4 milieux de culture contenant : 10, 20, 30 ou 60 g.l<sup>-1</sup> de saccharose. Les teneurs en 2,4-D, kinétine et vitamine B12 sont respectivement : 5 mg.l<sup>-1</sup>, 5 mg.l<sup>-1</sup>, 0,20 mg.l<sup>-1</sup>.

Certaines anthères ne sont pas traitées, d'autres reçoivent un traitement à la chaleur 35°C pendant 2 ou 8 jours.

Après 10 jours de culture, toutes sont transférées soit sur le milieu R<sub>1</sub>, soit sur un milieu R<sub>Z</sub> pour lequel la kinétine est remplacée par la zéatine à même concentration : 0,10 mg.l<sup>-1</sup>.

### 6.1. Résultats

Après 21 jours de culture, le contenu de 15 anthères de chaque milieu est observé au microscope.

Une microspore du traitement : 20 g.l<sup>-1</sup> et 35°C pendant 2 jours, montre 7 à 8 noyaux. Cette anthère est prélevée d'une boîte de milieu R<sub>1</sub>.

### 6.2. Conclusion

De cet essai, il ressort que seule l'action conjointe d'une faible teneur (20 g.l<sup>-1</sup>) en saccharose du milieu de culture, et d'un traitement court à la chaleur (35°C - 2 jours) permet au noyau de rares microspores de l'hybride "Montfavet 63-5" d'entrer en divisions. La zéatine à la dose testée ne favorise pas la poursuite de ces divisions.

Le bilan de tous ces essais permet de dégager les idées suivantes :

- Le noyau des microspores de tomate ayant atteint le stade première mitose pollinique au moment de la mise en culture, peut se diviser :
  - . faiblement si les anthères sont traitées au froid.
  - . un peu plus activement si elles sont cultivées directement à température

Milieux	2,4-D <sub>1</sub> mg.l <sup>-1</sup>	kinét. <sub>1</sub> mg.l <sup>-1</sup>	vit. B12 mg.l <sup>-1</sup>	sacchar. g.l <sup>-1</sup>
C <sub>H</sub>	5	0,10	0,20	120
C <sub>G</sub>	5	0,10	0,20	30
C <sub>O</sub>	5	1	0,20	120
C <sub>D</sub>	5	1	0,20	30
C <sub>C</sub>	5	2	0,20	120
C <sub>B</sub>	5	2	0,20	30

Tableau 21. Composition de nouveaux milieux de culture à teneurs variables en kinétine et saccharose.

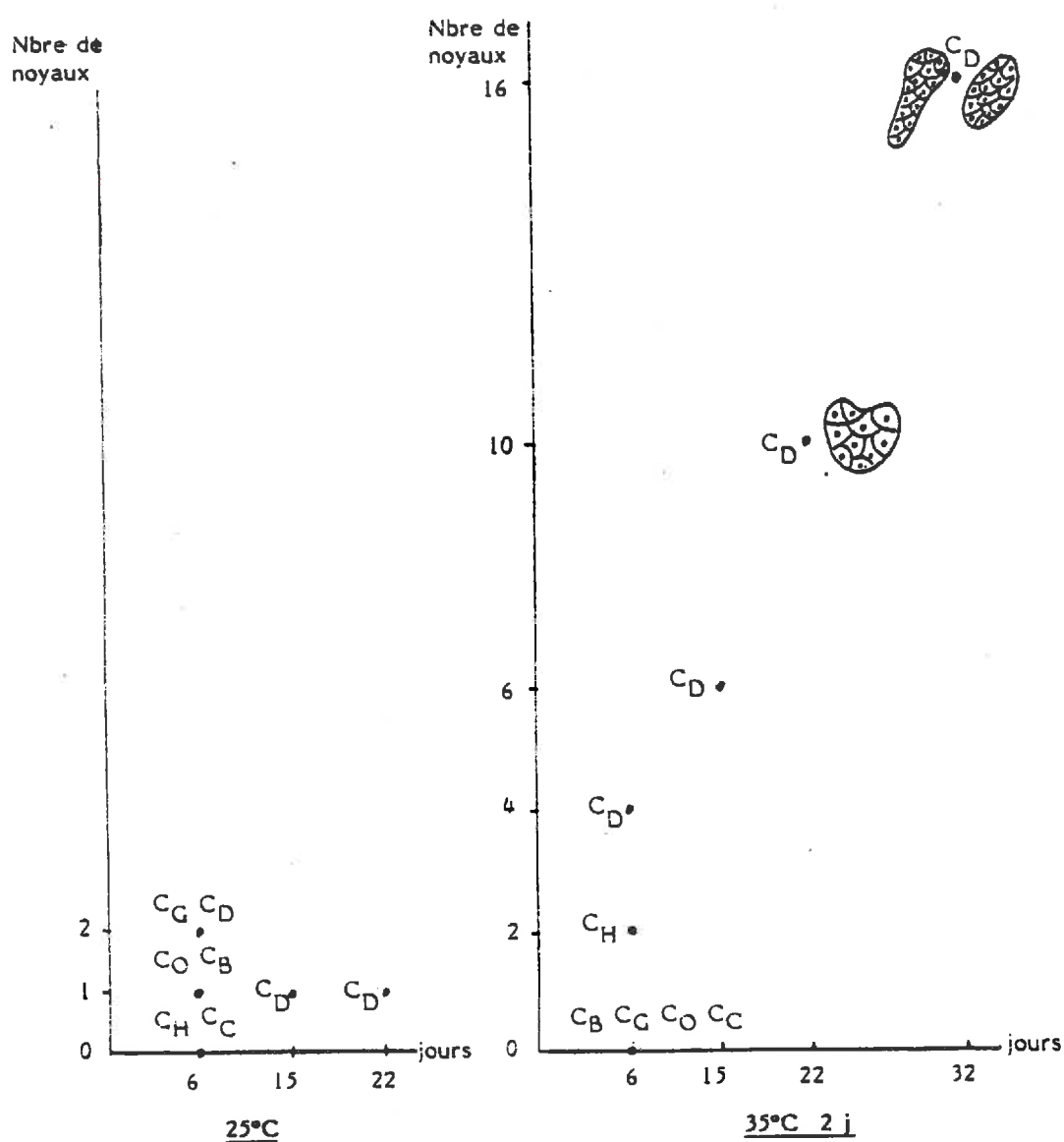


Figure 12. Nombres de noyaux visibles après 6, 15, 22 et 32 jours de culture dans les microspores et après traitement à la chaleur pendant 2 jours.

uniforme : 25°C avec photopériode de 12 h, ou si elles sont traitées à 35°C à l'obscurité pendant 2 ou 8 jours.

- L'auxine la plus efficace est le 2,4-D, bien que l'ANA à même teneur élevée : 5 mg.l<sup>-1</sup> induise des divisions du noyau.
- Les teneurs identiques faibles : 0,01 mg.l<sup>-1</sup> ou fortes : 5 mg.l<sup>-1</sup> en substances de croissance ne sont pas embryogènes, au moins sous les conditions testées.
- Le remplacement de la kinétine par la zéatine est néfaste aux concentrations essayées.
- Les faibles teneurs en saccharose 20 à 30 g.l<sup>-1</sup> du milieu de culture paraissent être les meilleures.
- Le transfert des anthères sur un milieu de repiquage semble être nécessaire à la poursuite des divisions.

Ces conclusions nous amènent à entreprendre :

## 7. La fabrication de nouveaux milieux de culture

Leur composition apparaît dans le tableau 21.

Les observations cytologiques pour chaque traitement sont faites après 6, 15, 22 et 32 jours de culture.

Parmi les 950 anthères des cultivars "Séverianin", "Marmande", "Porphyre" et "Monalbo", en culture sur les milieux dont la composition est présentée dans le tableau 21, certaines sont exposées directement à 25°C et une photopériode de 12 h ; d'autres sont traitées à 35°C pendant 2 jours.

### 7.1. Résultats toutes variétés confondues (Fig. 12)

En absence de traitement à 35°C, en 6 jours le noyau des microspores ne se divise jamais sur les milieux C<sub>H</sub> et C<sub>C</sub>.

Les grains vivants sont rares sur les milieux C<sub>O</sub> et C<sub>B</sub> et une division se produit sur les milieux C<sub>G</sub> et C<sub>D</sub>.

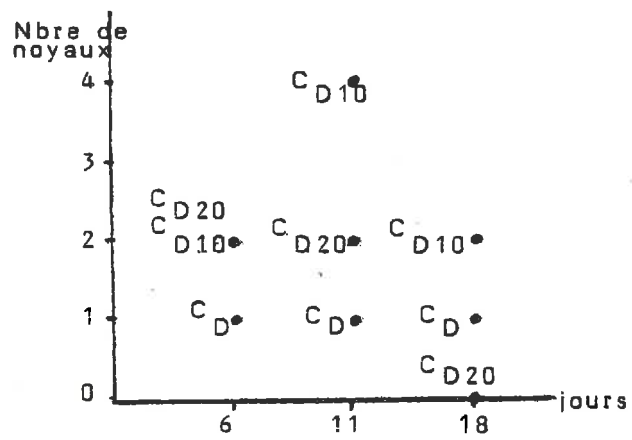


Figure 13. Nombre de noyaux dans les microspores en fonction du milieu de type  $C_D$  et du temps de culture.

Après 15 et 22 jours de culture, seules les microspores en culture sur le milieu  $C_D$  restent vivantes, mais sans poursuite de divisions.

Avec le traitement à 35°C pendant 2 jours, sur le milieu  $C_H$ , les noyaux subissent 1 division. Sur le milieu  $C_D$ , 2 mitoses au moins se produisent et la qualité des noyaux est excellente, de couleur rose pâle à contours diffus. Nous observons même la présence de cloisons. Après 22 jours de culture sans transfert, les mitoses s'étant poursuivies donnent à la microspore l'apparence d'un coeur. Dix cellules sont observables. Après 32 jours de culture, l'embryon s'allonge, nous dénombrons au moins 16 cellules.

Les autres anthères transférées sur les milieux  $R_1$  et  $R_2$  se nécrosent et les divisions cessent.

## 8. Essais d'amélioration du milieu $C_D$

### 8.1. Variation des teneurs en saccharose du milieu $C_D$

Des anthères (700) de la variété "Monalbo" sont traitées à 35°C pendant 2 jours, après avoir été mises en culture sur les milieux  $C_D$ ,  $C_{D10}$  et  $C_{D20}$  qui contiennent respectivement : 30 g.l<sup>-1</sup>, 10 g.l<sup>-1</sup> et 20 g.l<sup>-1</sup> de saccharose.

Les observations cytologiques effectuées après 6, 11 et 18 jours de culture portent sur 100 anthères de chaque traitement.

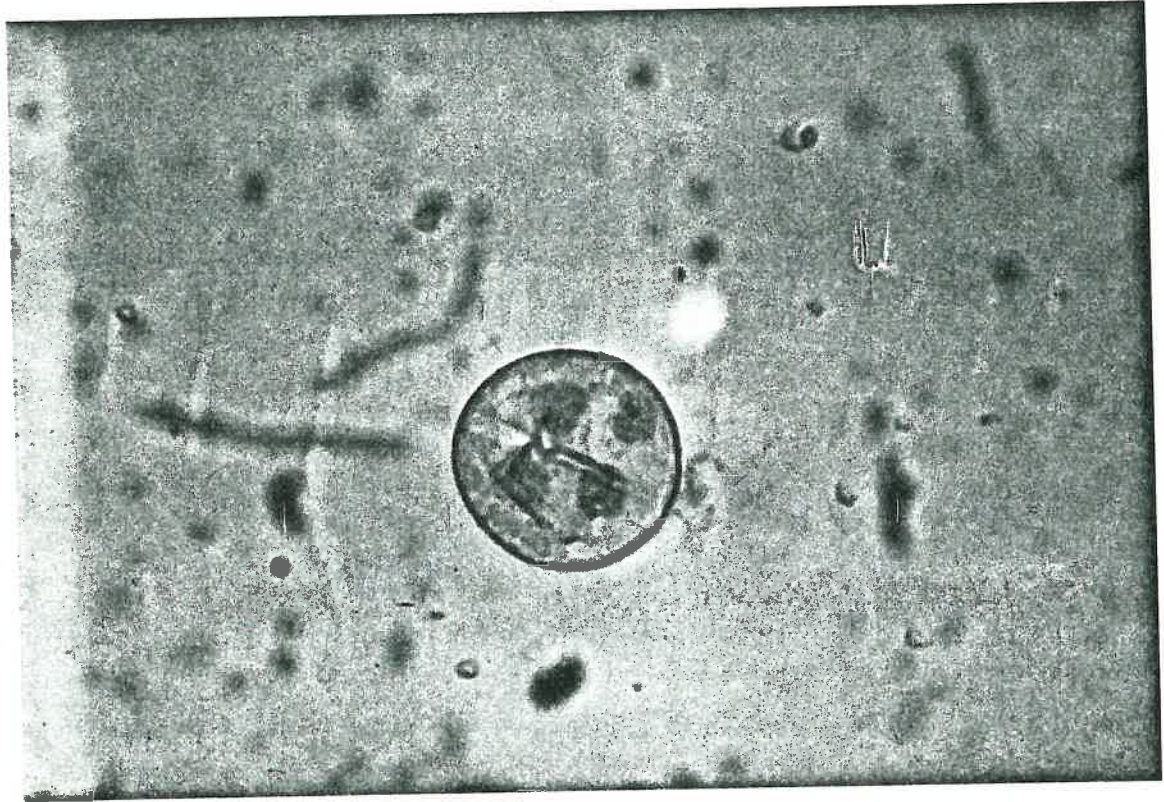
### 8.2. Résultats (Fig. 13)

Avec le milieu  $C_D$ , nous n'observons que des microspores non entrées en mitose après 6, 11 ou 18 jours.

En 6 jours, sur les milieux  $C_{D10}$  et  $C_{D20}$  une seule mitose a lieu, donnant naissance à des noyaux d'excellente qualité.

En 11 jours, la qualité est maintenue sur le milieu  $C_{D10}$ . Les microspores se divisent 2 fois.

En 18 jours, sur le milieu  $C_{D20}$ , les microspores dégénèrent.



Le noyau végétatif subit une seconde division. Le noyau reproducteur est en voie de disparition. La microspore n'est pas cloisonnée.

### 8.3. Conclusion

Les teneurs en saccharose étudiées n'amènent pas de progrès considérable sur le pouvoir embryogène des anthères, bien que la concentration de  $10 \text{ g.l}^{-1}$  semble être la meilleure après 11 jours de culture.

### 8-4. Recherche de l'effet d'acides aminés incorporés au milieu $C_D$

Trois acides aminés : L Sérine, L Glutamine, Asparagine sont incorporés au milieu  $C_D$ . Les nouveaux milieux ont la composition suivante :

Milieux de culture	L.sérine $\text{mg.l}^{-1}$	L.glutamine $\text{mg.l}^{-1}$	Asparagine $\text{mg.l}^{-1}$
$C_D$	0	0	0
$C_{DT}$	0,10	0,10	0
$C_{DTAA}$	0,50	0,50	0
$C_{DAA}$	400	0	400

Tableau 22. Composition et teneurs en acides aminés de milieux de culture de type  $C_D$ .

Ce sont 1 050 anthères de la variété "Monalbo" traitées à  $35^\circ\text{C}$  pendant 2 jours qui sont réparties sur ces 4 milieux de culture.

Après 6 jours de culture, les anthères du milieu  $C_D$  sont transférées sur le milieu  $R_{1G}$  (milieu  $R_1$  enrichi de  $0,10 \text{ mg.l}^{-1}$  de L.Sérine et de  $0,10 \text{ mg.l}^{-1}$  de L.Glutamine).

Des observations cytologiques à partir de 10 anthères par milieu et date de prélèvement, sont effectuées 5 à 7, 13 et 30 jours après la mise en culture.

### 8.5. Résultats (Fig. 14)

En 5 à 7 jours, la production de globules sur les milieux  $C_D$  et  $C_{DT}$ , puis d'un pro-embryon sur le milieu  $C_{DTAA}$  sont des évènements rares. Dans la majorité des cas, nous ne voyons dans les microspores que 2 à 4 noyaux vivants.

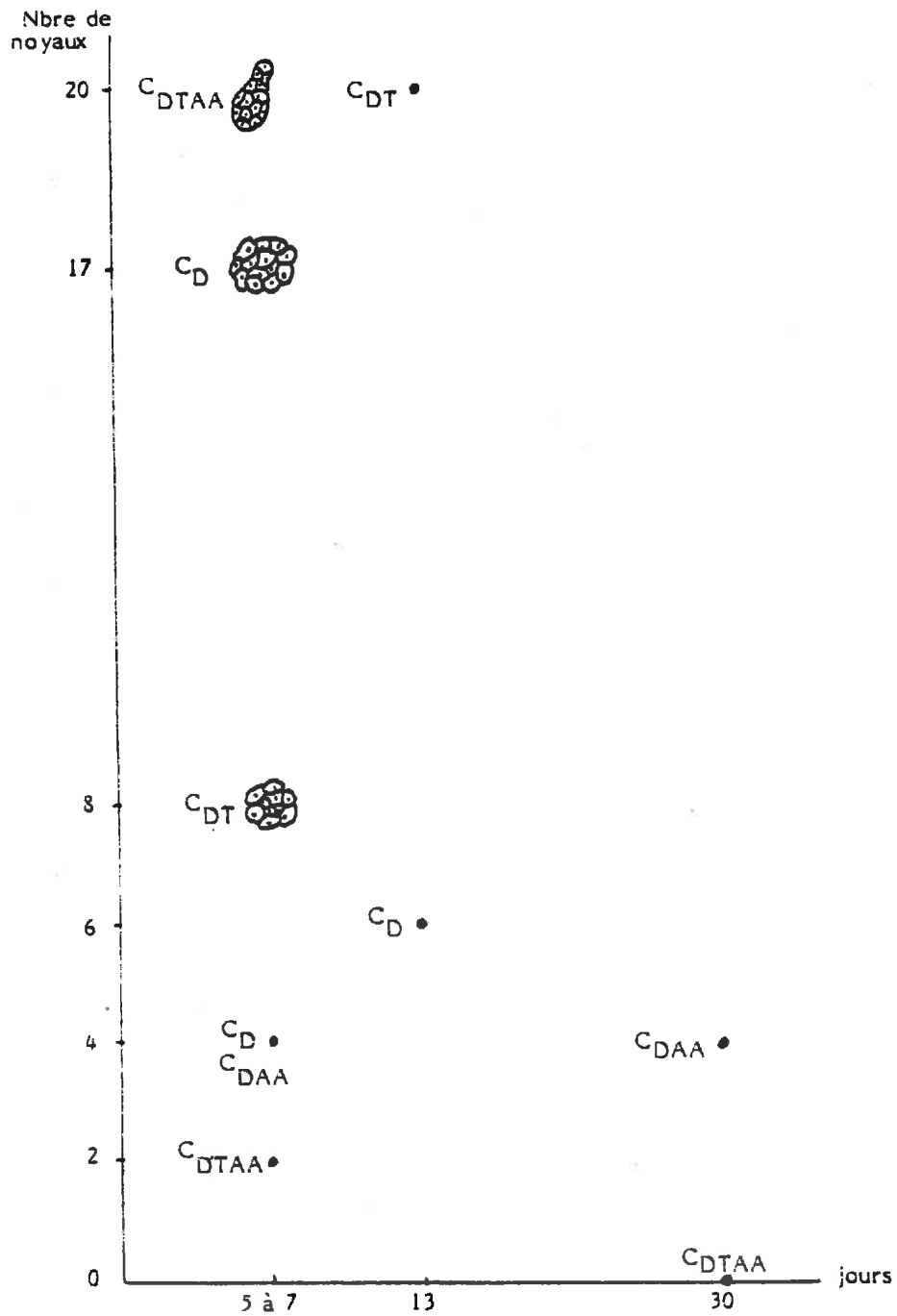


Figure 14. Effets conjoints de la teneur, de la nature des acides aminés ajoutés au milieu C<sub>D</sub> et du traitement à 35°C pendant 2 jours sur la division du noyau des microspores de la variété "Monalbo" en fonction de la durée de culture.



Mais l'observation d'un globule à 20 noyaux environ sur le milieu  $C_{DT}$  après 13 jours de culture, est notable. Elle indique le maintien prolongé d'une activité mitotique.

#### 8.6. Recherche de l'effet d'une dose élevée en chélate de fer $NaFeEDTA$ avec le milieu $C_D$

Des anthères (730) de la variété "Marmande" sont réparties sur le milieu  $C_D$  d'une part et le milieu  $C_{DF}$  d'autre part (qui contient 5 fois la teneur en chélate de fer du milieu  $C_D$ ). Le traitement  $35^\circ C$  pendant 2 jours leur est appliqué.

#### 8.7. Résultats

Les microspores des anthères en culture sur le milieu  $C_D$  subissent des mitoses. Un à 15 noyaux vivants ainsi que des cloisons sont observés. Sur le milieu  $C_{DF}$ , les microspores sont vides.

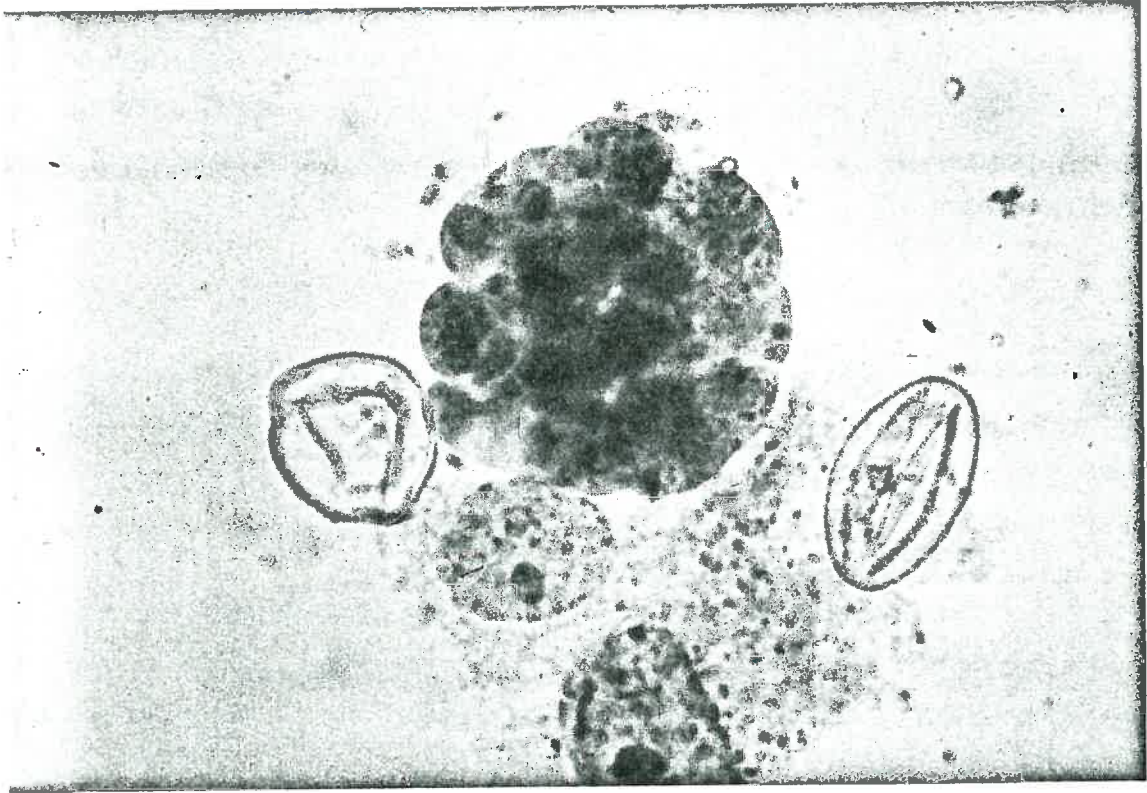
#### 9. Conclusion de ces essais

Sans traitement, ou avec traitement à  $35^\circ C$  pendant 2 jours, les microspores des anthères en culture sur un milieu dont la teneur en saccharose est  $120 \text{ g.l}^{-1}$ , ne subissent pas de divisions. Dans nos conditions, la meilleure concentration semble être  $30 \text{ g.l}^{-1}$ .

Une composition : le milieu  $C_D$  contenant donc  $30 \text{ g.l}^{-1}$  de saccharose, puis  $5 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D,  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de kinétine et  $0,20 \text{ mg.l}^{-1}$  de vitamine B12 peut produire (en moins de 10 jours) un globule d'une dizaine de cellules environ. Mais l'évolution cesse aux alentours de 30 jours de culture.

L'apport d'acides aminés aux taux expérimentés, accélère le rythme des mitoses. En 5 à 7 jours sur le milieu  $C_{DTAA}$  enrichi de L.Sérine et L.Glutamine, nous obtenons le même type de formation qu'en 32 jours sur le milieu  $C_D$ . Cependant, l'évolution ne se poursuit pas. Sur le milieu  $C_{DT}$ , le rythme des mitoses est maintenu et l'évolution des microspores, bien que progressive est relativement rapide.

Une teneur élevée en chélate de fer nuit à l'évolution des microspores.



Les mitoses donnent naissance à un globule de tomate, cloisonné, et à de nombreux noyaux.

## E. CONCLUSION GENERALE

Comme pour l'aubergine, l'absence de repère phénologique des boutons lié au moment de la première mitose pollinique, rend difficile leur choix. Il est certain que nous mettons en culture une population d'anthers pour lesquelles l'état de différenciation est proche de la première mitose, mais il est délicat de préciser davantage.

Nous pensons comme ZAGORSKA et al. (1982) que le génotype peut avoir une grande influence sur la réussite ou l'échec d'un tel travail. C'est la raison pour laquelle nous avons prélevé des anthers de variétés fixées et d'hybrides F1, dont les origines génétiques et les caractéristiques sont aussi diverses que la résistance à des maladies ("Monalbo") ou la tendance à la parthénocarpie ("Severianin").

Nous avons tenté d'exploiter les résultats des techniques mises au point pour l'androgénèse du piment et de l'aubergine. Les milieux "piment" sont à peu près incapables d'induire des divisions du noyau de microspores de tomate, même dans les meilleures conditions déterminées pour cette espèce. Par contre, certains milieux "aubergine" ont une très nette influence favorable sur les mitoses (les milieux riches en 2,4-D, en particulier  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Ordinairement, les chercheurs qui induisent des cals haploïdes utilisent dans leurs milieux de culture, des doses d'auxines inférieures aux nôtres. Ce sont par exemple  $0,50 \text{ mg.l}^{-1}$  d'ANA pour ZAMIR et al. (1980) et GAO XIUYUN et al. (1980),  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  d'ANA pour GULSHAN et al. (1981). Seuls GRESSHOFF & DOY (1972) incorporent  $5 \text{ mg.l}^{-1}$  d'ANA.

Après plusieurs essais de changement d'hormone, c'est le 2,4-D qui est retenu, bien que contrairement à l'AIA, l'ANA permette sous certaines conditions d'obtenir plusieurs noyaux de bel aspect.

Après avoir testé plusieurs teneurs en kinétine, nous concluons qu'une concentration relativement élevée :  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  est nécessaire au maintien des divisions des noyaux. GAO XIUYUN et al. (1980), puis GULSHAN et al. (1981) utilisent cette dose. Le remplacement de la kinétine par la zéatine aboutit à la nécrose des anthers. Seuls, ZAMIR et al. (1980) puis ZAGORSKA et al. (1980) introduisent cette cytokinine dans leurs milieux.

Certaines des publications mentionnées ci-dessus font état de 30 à 40 g.l<sup>-1</sup> de saccharose incorporés dans les milieux de culture. Nos observations sont en accord avec ces données. Notre meilleur résultat est obtenu avec 30 g.l<sup>-1</sup>.

La teneur en fer ne semble pas être un facteur particulièrement étudié. Nous avons vu l'effet négatif d'une concentration élevée dans notre expérimentation.

DEBERGH & NITSCH (1973) cultivant des grains de pollen isolés de Solanum pimpinellifolium (Jusl) Mill. amènent L.Glutamine dans leur milieu de culture et obtiennent des grains de pollen (18%) à 2 noyaux en 10 jours. ZAGORSKA et al. (1982) testent la présence de L.Glutamine et L.Sérine dans un milieu de base NITSCH. Ces acides aminés ne sont pas des additifs améliorant la technique, contrairement à nos observations. Dans nos conditions de travail, leur effet se répercute sur la rapidité de succession des mitoses. Il n'est pourtant pas certain que rapidité soit synonyme de "facteur améliorant".

Le traitement au froid des anthères en culture est à rejeter pratiquement quel que soit le milieu utilisé. Une température uniforme de 25°C et photopériode de 12 h sont un progrès dans la réalisation de la technique, mais le traitement le meilleur paraît être l'application de 35°C pendant les 2 premiers jours de culture.

C'est dans cette dernière condition que l'influence des teneurs en 2,4-D, kinétine, vitamine B12, saccharose et acides aminés remarquée prend toute son importance.

## VII . UTILISATION DES HAPLOIDES ET HAPLOIDES DOUBLES (HD) DE PIMENT ET AUBERGINE

Au sein de la Station d'Amélioration des Plantes Maraîchères de Montfavet, les raisons qui ont conduit à la mise au point de ces techniques d'androgénèse, sont leur intégration en sélection.

Il a cependant fallu au préalable :

- S'assurer de l'origine pollinique des diploïdes spontanés, en mettant en culture des anthères d'hybrides F<sub>1</sub>. Les plantes diploïdes issues, n'étant ni semblables entre elles, ni semblables à la plante mère, étaient bien d'origine pollinique.
- Tenter de vérifier que l'anthère ne favorise pas certaines microspores d'une nature particulière en les faisant évoluer en plantes. Car "Dans le pool des microspores cultivées in vitro, on a pu mettre en évidence (PELLETIER) un effet de la structure génétique de la microspore. Il est donc fort probable que les plantules produites ne représenteront pas la totalité de la ségrégation gamétique de la F<sub>1</sub>, mais le produit des compétitions et des éliminations qui s'exerceront sur cette population de microspores" (DEMARLY, 1977). Dans ce but, nous avons étudié la descendance de 212 lignées haploïdes doublées de piment issues de 6 hybrides hétérozygotes ( $L^+/L^1$ ) entre une lignée sensible ( $L^+/L^+$ ) et une lignée résistante ( $L^1/L^1$ ) au virus de la mosaïque du tabac. Sur les 6 descendances, celle de l'un des hybrides montra un déficit en lignées résistantes. Cependant, il arrive parfois que le même phénomène s'observe sans passage par la culture d'anthères. Ainsi chez la tomate, des hybrides hétérozygotes pour la résistance au Fusarium ne produisent qu'une quantité restreinte de grains de pollen normaux. Ceci entraîne alors des déviations de disjonction pour le gène de résistance (LATERROT, com. pers.). Il est alors difficile de conclure sur l'effet unique de la culture in vitro.
- Mettre en évidence l'absence d'effet d'inbreeding en comparant 7 lignées HD du cultivar d'aubergine "Dourga" à la lignée parentale. Les observations montrent que chacune des diverses lignées est homogène et qu'aux différentes cueillettes il n'existe pas de différences significatives pour le rendement en nombre de fruits et en poids.

L'intérêt le plus évident des HD est la réalisation rapide de l'homozygotie parfaite. Le gain de temps pour le sélectionneur est considérable puisqu'on considère généralement l'homozygotie acquise pour 1` gène par une dizaine d'autofécondations successives. Par ailleurs, certaines espèces peuvent être délicates à autoféconder, et l'haplodiploïdisation évite cet obstacle.

L'homozygotie est réalisée en fin de programme de sélection généalogique pour utilisation directe du matériel végétal sous forme de lignées pures ou plus vraisemblablement comme parents d'hybrides. Mais en cours, ou en fin d'un programme de sélection récurrente (SR), les HD sont exploités également pour les mêmes raisons.

En SR d'aubergine, les travaux menés consistent à créer des lignées parthénocarpiques à bonne fructification sous serre. L'androgenèse in vitro est utilisée pour la sortie de lignées fixées à partir des générations  $S_{R3}$  et  $S_{R4}$ .

Rappelons que la SR regroupe un ensemble de méthodes d'amélioration des populations qui reposent sur l'identification des meilleurs individus dans des populations de départ hétérogènes, et l'interfécondation, généralement en panmixie, de ces génotypes sélectionnés pour former des populations améliorées. La SR procède par cycles successifs. Le résultat d'un cycle sert immédiatement de matériel de départ pour le cycle suivant.

La création de lignées pures donne aussi le moyen de procéder à des analyses génétiques plus aisément que sur une population F2, mais encore faut-il que les gènes soient indépendants, et leur nombre restreint. Ainsi, par exemple, pour 2 couples d'allèles indépendants A/a et B/b, 1 lignée sur 4 obtenues par culture d'anthères portera théoriquement les 2 caractères récessifs a et b, tandis qu'en F2, 1 individu sur 16 sera double récessif. L'intérêt pour le sélectionneur est alors de manipuler moins de matériel végétal.

ABAK et al. (1982) étudient la transmission de la résistance au Phytophthora capsici (Léon.) sur racines et tiges de plantes de piment. L'étude porte sur des lignées HD issues de cultures d'anthères. Un seul croisement est étudié.

Ils déterminent le caractère polygénique de la résistance et mettent en évidence l'absence de corrélation entre les 2 modes d'inoculation.

Chez l'aubergine, CABANNES (1983) observant des lignées HD issues du croisement ("Ronde de Valence" x "Dourga") confirme la présence de gènes connus contrôlant la coloration des fruits et complète la connaissance du génotype de "Dourga" pour des gènes qui ne s'expriment pas (gènes de l'anthocyane et gènes d'anthocyane sous le calice). Des gènes nouveaux sont mis en évidence.

Les sujets de recherches sur l'aubergine sont moins nombreux que sur le piment, aussi un travail original a-t-il été entrepris sur la première espèce par CABANNES (1983) consistant à provoquer l'apparition de mutations intéressantes pour le sélectionneur.

L'irradiation par une source de Co60 des boutons floraux avant culture des anthères n'a pas mis en évidence une stérilité mâle, ni l'absence d'épines recherchées. Cependant des conclusions portant sur les doses d'irradiation à utiliser et leur répercussion sur l'androgénèse ont été tirées.

### VIII . DISCUSSION ET CONCLUSION

En culture de cellules in vitro, la morphogénèse peut suivre 2 processus de développement : l'organogénèse et l'embryogénèse.

Si l'organogénèse consiste en une différenciation unipolaire menant à la naissance d'une racine, une tige, ou autre organe, l'embryogénèse somatique ainsi que gamétique (embryon issu du gamétophyte mâle ou femelle) initie une double différenciation : un pôle racinaire, un pôle aérien.

Pour évoluer en plantes, les cellules haploïdes du sac embryonnaire paraîtraient a priori plus proches de la voie embryogène que les microspores. C'est en effet l'oosphère qui in situ, mais après fécondation, donne naissance à un embryon. Et pourtant, d'une manière générale, l'androgénèse in vitro par culture d'anthers est la plus répandue actuellement. Il semblerait que les chercheurs aient privilégié la voie dont le potentiel de production d'haploïdes était la plus prometteuse.

Dans la suite de la discussion, l'analyse des données sur le piment, l'aubergine et la tomate sera volontairement comparée à l'analyse des résultats obtenus chez d'autres Solanacées. Dans certains cas précis, pourtant, nous mentionnerons les références bibliographiques récentes ne concernant pas cette famille.

Chez la tomate, pour amorcer une embryogénèse, puis chez le piment et l'aubergine pour évoluer en plantes, les microspores doivent avoir atteint le stade première mitose pollinique. Ces espèces sont pour cela, à rapprocher de Datura (GUHA & MAHESHWARI, 1964) et du Pétunia (RAQUIN & PILET, 1972). Dans la plupart des cas, la cellule reproductrice ne contribue pas à la formation de tissu haploïde ou d'embryoïde. Toutefois, RAGHAVAN (1977) a montré que des divisions continues de la cellule reproductrice seule, donnent naissance à une proportion intéressante d'embryoïdes chez Hyoscyamus niger L. (VASIL, 1979).

SUNDERLAND & WICKS (1971) constatent que chez certaines espèces, telles que Nicotiana tabacum L., il y a formation d'embryons depuis la libéra-



tion des microspores jusqu'aux grains bicellulaires (ce dernier état est le meilleur). TOMES & COLLINS étendent la remarque aux espèces de Nicotiana tout en exceptant Nicotiana stocktonii (Jusl.) Mill.. Selon eux, les microspores engendrent des cals qui initient des haploïdes.

Nos fréquentes observations du contenu des anthères nous ont appris qu'il peut exister un décalage assez important dans l'évolution des microspores. Nous ne nous étonnerons plus alors des différences de faculté androgénétique existant entre 2 boîtes de Pétri pour un même matériel végétal. Nous partageons l'avis de PELLETIER & ILLAMI (1972) qui insistent sur la grande fluctuation existant dans l'état de différenciation d'une étamine à l'autre. Cela pourrait d'ailleurs être confirmé par le résultat mentionné précédemment : 5 anthères d'un même bouton d'aubergine produisent respectivement : 198, 58, 8 et 0 plantes.

Il semble aussi qu'il y ait possibilité d'adaptation du matériel végétal. En effet, en absence de prétraitement, les anthères de Hyoscyamus doivent être cultivées au moment de la première mitose. Avec prétraitement, la mise en culture doit se situer avant mitose.

Ceci nous amène à considérer notre second facteur de réussite : le traitement physique.

Les microspores sont soumises à de nombreux chocs. Parmi ceux-ci, le premier stress pour SANGWAN & NORREEL (1977) est sans doute la séparation du bouton floral de la plante, car il constitue une rupture des relations physiques entre le pollen et la plante.

Mais hormis ce prélèvement qui reste un évènement obligatoire, est-il nécessaire de faire subir un traitement physique au matériel végétal ?

Chez Datura, GUHA & MAHESHWARI (1964) n'en signalent pas. Cependant, les traitements thermiques sont les plus fréquemment utilisés chez les Solanacées.

Le froid a pour effet selon NITSCH & NORREEL (1973) de modifier la position de l'axe fusorial dans le pollen de Datura innoxia L. Il constitue le second stress qui se traduit par une augmentation des acides aminés dans les anthères de Datura, mais aussi de Nicotiana tabacum L. Ceci pourrait être, selon SANGWAN & NORREEL (1977), l'expression d'une inhibition totale ou partielle des synthèses protéiques qui ordinairement ont lieu in situ lors de la formation du gamétophyte mâle.

L'application du froid sur un même matériel végétal peut cependant avoir des effets inverses. Ainsi sur pétunia (MALHOTRA & MAHESHWARI, 1977) le taux d'induction d'embryoïdes est augmenté par un traitement des anthères à 6°C pendant 48 h. Le froid supprimerait un inhibiteur présent dans les anthères non traitées. L'inhibition serait diversement efficace selon les espèces et en outre serait réduite ou éliminée selon le prétraitement. RAQUIN (com. pers.) abaisse son rendement en plantes de manière très significative en appliquant 3°C pendant 48 h.

A la notion de température, doit s'ajouter celle de durée d'application. SUNDERLAND & WILDON (1979) en donnent un exemple précis. Ils prétraitent en effet des boutons de Hyoscyamus à 15°C pendant 5 jours, et d'autres à 7°C pendant 15 jours et montrent la supériorité du premier prétraitement, comme nous montrons l'intérêt de traiter nos anthères (celles de tomate exceptées), à 35°C pendant 8 jours au lieu de 2.

Le piment se distingue des autres espèces par l'obligation d'appliquer le froid aux boutons ou la chaleur aux anthères en culture. Ainsi, le choix d'un bon couple : nature du traitement-nature du matériel végétal traité, prend-il toute son importance lors de la mise au point d'une technique.

Chez les Solanacées, les chocs thermiques ne sont pas à notre connaissance utilisés par d'autres équipes. Leur effet est spectaculaire sur anthères de piment et d'aubergine. Ce sont KELLER & ARMSTRONG (1979) qui avaient mis au point cette technique sur anthères de Brassica campestris L.

Chez l'aubergine, l'inhibition ne serait que partielle, puisqu'en absence de traitement, les anthères peuvent produire des embryons. Les travaux du "Research Group of Haploidy" (1978), ceux d'ISOUARD & RAQUIN (1979) et les nôtres, illustrent ce propos. Cependant, selon nos observations, l'importance du rendement en plantes est alors fonction du rapport 2,4-D/kinétine du milieu d'induction.

Dans le règne animal, existent des protéines de chocs thermiques (au nombre de 10) mises en évidence par traitement des cellules de drosophile par la chaleur. Leur rôle est inconnu, mais résultent d'une activité particulière de certaines zones de chromosomes.

Par ailleurs, le déclenchement de la parthénogenèse chez la Souris, en absence de fécondation, se fait sous l'action d'un choc thermique. Il provoque la division, et le début de développement embryonnaire (BENSAUDE & MORANGE, 1984).

D'après PHILIPPS & COLLINS (1977) les substances de croissance ne sont pas nécessaires aux cultures d'anthères de Nicotiana. Ces auteurs citent ANAGNOSTAKIS et al. qui pensent qu'en absence de substances de croissance dans le milieu de culture, la production de plantes est augmentée par apport de charbon activé.

GUPTA (1983) initie des embryons haploïdes, diploïdes et triploïdes de pétunia sur un milieu ne contenant que de la kinétine.

Dans nos conditions de travail, les embryons de piment et aubergine peuvent être induits sur des milieux de culture démunis en kinétine après que les anthères aient été traitées par la chaleur. On ignore toutefois quelle est la teneur des milieux en substances de croissance et diverses vitamines après stérilisation par la chaleur.

Quoiqu'il en soit, le 2,4-D est favorable au déclenchement de l'androgénèse chez le piment, l'aubergine et la tomate.

Nos expériences montrent clairement qu'il y a interférence pour le rendement androgénétique entre la composition des milieux de culture (milieux

d'induction, et milieu de repiquage) et les conditions physiques de la culture.

Le transfert des anthères de piment et aubergine est un facteur important dont dépend leur survie. Il peut se caractériser par plusieurs effets :

- L'atmosphère ambiante est renouvelée. Ainsi, HENRY & DE BUYSER (1983) améliorent leur production d'embryons par le simple fait d'ouvrir les boîtes de culture sans repiquer les anthères.
- Elimination des produits du métabolisme des anthères.
- Suppression de l'action conjointe de la chaleur et la lumière qui ont pu modifier la nature du milieu d'induction par disparition rapide des vitamines et(ou) dénaturation de certains composés.
- Remédier à un éventuel et rapide appauvrissement en éléments tels que le saccharose.

Chez les Solanacées commé chez les autres espèces, il n'existe pas de loi générale tendant à uniformiser la technique d'haploïdisation par culture d'anthères. Ainsi, notre technique "piment-aubergine" est inefficace pour la tomate.

On peut se demander si l'androgenèse est un phénomène possible chez toutes les espèces. Pour 9 espèces, parmi 80 répertoriées, les microspores n'évoluent qu'en cals, et quelques divisions sont produites pour l'une d'entre elles (MAHESHWARI et al., 1982). L'expérimentation doit être conduite sur une gamme variétale élargie. ZAGORSKA et al. (1982), ZIV et al. (1984) GUPTA (1983) accordent beaucoup d'importance aux génotypes.

Il peut aussi exister des impossibilités (non déterminées) à l'évolution des microspores en embryons viables. Ainsi, les embryons androgénétiques de Graminées sont souvent albinos. On a aussi coutume de placer les plantes mères dans les meilleures conditions de croissance, à l'abri des attaques parasitaires, mais en situation non ou moins protégée, ne les préparerions-nous pas à l'androgenèse ? Nous savons pourtant que les piqûres de pucerons directement faites dans le bouton floral des piments notamment, favorisent la pénétration des bactéries et champignons qui se fixent sur les anthères. Mais quel peut être l'effet d'un virus systémique sur l'androgenèse ?

Pour notre part (données non publiées) cultivant des anthères de piment (alors que les plantes étaient fortement parasitées par des mélanges de virus), nous avons obtenu de nombreuses plantes haploïdes et diploïdes spontanées indemnes de virus.

Les techniques de production d'haploïdes de piment et d'aubergine sont certainement encore perfectibles, mais néanmoins utilisées par nos collègues sélectionneurs français et étrangers. Notre plus grande satisfaction serait qu'elles contribuent à la compréhension du phénomène androgenèse.

**ANNEXES**

## Annexe 1

**Solution de  
Macroéléments S.N.G.M.**

$\text{KNO}_3$	2 150 $\text{mg.l}^{-1}$
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1 238
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	412
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	313
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	142
$\text{Ca (NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50
$\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	38
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	34
KCl	7

Ces doses sont concentrées 10 fois et dissoutes séparément dans 1 litre d'eau distillée.

Utiliser 100 ml de solution par litre de milieu final de type C et R.

## Annexe 2

### Solution de Macroéléments de Murashige & Skoog

$\text{KNO}_3$	1 900 $\text{mg/l}^{-1}$
$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	1 650
$\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	170

Ces doses sont concentrées 10 fois et dissoutes séparément dans 1 litre d'eau distillée.

Utiliser 100 ml de solution par litre de milieu final tel que  $V_3$ .



## Annexe 3

**Solution de  
Microéléments**

$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	22,130 $\text{mg.l}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	3,625
$\text{H}_3\text{BO}_3$	3,150
KI	0,695
$\text{Na}_2 \text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	0,188
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,016
$\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,016

Ces doses sont concentrées 100 fois et dissoutes séparément dans 1 litre d'eau distillée.

Utiliser 10 ml de solution par litre de milieu final de type C.

## Annexe 4

### Solution de Microéléments

$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	20,130 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	3,225
$\text{H}_3\text{BO}_3$	1,550
KI	0,330
$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	0,138
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,011
$\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,011

Ces doses sont concentrées 100 fois et dissoutes séparément dans 1 litre d'eau distillée.

Utiliser 10 ml de solution par litre de milieu final de type R.

## Annexe 5

**Solution de  
Microéléments de Heller**

$\text{H}_3\text{BO}_3$	1,000 $\text{mg.l}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	1,000
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	0,076
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,030
$\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$	0,050
KI	0,010
$\text{NiCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,030

Ces doses sont concentrées 1000 fois et dissoutes séparément dans 1 litre d'eau distillée.

Utiliser 1 ml de solution par litre de milieu final tel que  $V_3$ .

## Annexe 6

### Solution de Vitamines de Fuji (modifiées piment)

Méso Inositol	0,500 mg.l <sup>-1</sup>
Acide nicotinique	0,500
Pyridoxine HCl	10,000
Thiamine HCl	0,100
Glycine	0,200

Ces doses sont concentrées 50 fois et dissoutes séparément dans 100 ml d'eau distillée.

Utiliser 1 ml (dose 1/2) de solution par litre de milieu final de types C et R.

## Annexe 7

**Solution de  
Vitamines de Morel**

Méso Inositol	100,00 mg.l <sup>-1</sup>
Pantothénate de calcium	1,00
Acide nicotinique	1,00
Pyridoxine HCl	1,00
Thiamine HCl	1,00
Biotine	0,01

Ces doses sont concentrées 50 fois et dissoutes séparément dans 100 ml d'eau distillée.

Utiliser 1 ml (dose 1/2) de solution par litre de milieu final de type<sup>S</sup>C et R et 2 ml par litre de milieu final tel que V<sub>3</sub>.

## Annexe 8

### Solution de Fer chélaté

Na <sub>2</sub> EDTA	3 720 mg
FeSO <sub>4</sub>	2 780 mg.

Solution mère.

Dissoudre séparément chaque produit dans 100 ml d'eau distillée.

Chauffer les 2 solutions à 45-50°C.

Verser Na<sub>2</sub>EDTA dans FeSO<sub>4</sub>.

Agiter. La solution doit alors être transparente.

Utiliser 1 ml (dose 1/2) de solution par litre de milieu final de types C et R et 2 ml par litre de milieu final tel que V<sub>3</sub>.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- ABAK, K.**  
Study on the anther culture in vitro of pepper (Capsicum annuum L.). Capsicum newsl., 1983, 2, 72-73.
- ABAK, K., POCHARD, E., DUMAS DE VAULX, R.**  
Transmission of resistance to Phytophthora capsici on roots and stems of pepper plants : study of doubled haploid lines issued from the cross "PM 217" x "Yolo Wonder" through anther culture.- Capsicum newsl., 1982, 1, 62-64.
- AMSSA M., DE BUYSER J., HENRY Y.**  
Origines de plantes diploïdes obtenues par culture in vitro d'anthères de blé tendre ; influence du traitement au froid et de la culture in vitro sur le doublement.  
C.R. Acad. Sci. Paris, 1980, 290, Série D, 1095-1097.
- ANDRE I.**  
Variabilité observée sur les haploïdes doublés de riz (Oriza sativa L.).  
Le Tocsin du Radiateur, 1978, 3, 185-188.
- ANSELM A.**  
Etude de la parthénogenèse induite chez le melon et de l'androgenèse in vitro chez le piment : influence du génotype sur l'haploïdisation. Analyse des haploïdes issus d'hybrides de piment.  
Mémoire de fin d'études de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 1980, 35 p.
- ASSELIN DE BEAUVILLE M.**  
Obtention d'haploïdes in vitro à partir d'ovaires non fécondés de riz (Oryza sativa).  
C.R. Acad. Sci. Paris, 1980, 290, Série D, 489-492.
- AUGE R., BEAUCHESNE G., BOCCON-GIBOD J., DECOURTYE L., DIGAT B., MINIER R., MORAND J.C., OUDIN Y., VIDALIE H.**  
"La culture in vitro et ses applications horticoles".  
Coll. Technique et Documentation. Edit. Lavoisier, Paris, 1982.
- BARCLAY I.R.**  
High frequency production in wheat (Triticum aestivum) by chromosome elimination.  
Nature, 1975, 256, 410-411.
- BENSAUDE O., MORANGE M.**  
A quoi servent les protéines de choc thermique.  
La Recherche, 1984, 161 (15), 1589-1590.
- BERNARD S.**  
In vitro androgenesis in hexaploid triticale. Determination of physical conditions increasing embryoid green plant production.  
Z. Pflanzenzüchtg., 1980, 85, 308-321.
- BERNARD S., PICARD E., DE BUYSER J.**  
Obtention de plantes haploïdes de triticale hexaploïdes (Triticosecale Wittmack) par culture in vitro d'anthères.  
C.R. Acad. Sci., Paris, 1976, 283, Série D, 235-238.
- BERTAUX O., MOYNE G., LAFARGE-FRAYSSINET C., VALENCIA R.**  
The nucleus of Euglena Part 2 ultrastructural modifications of the nucleus of B12 deprived Euglena-Gracilis Z.  
J. ultrastruct., 1978, 62 (3), 251-259.
- BOSSOUTROT D., HOSEMANS D.**  
Induction of haploid plants from in vitro culture of unpollinated beet ovules (Beta vulgaris L.).  
Z. Pflanzenzüchtg., 1983, 91, 74-78.



- BOUQUET A.**  
Effect of some genetic and environmental factors of spontaneous polyembryony in grape (Vitis vinifera L.).  
Vitis, 1980, 19, 134-150.
- BOURDON C.**  
Etude préliminaire d'une nouvelle approche de l'androgenèse de Lycopersicon esculentum.  
D.E.A. "Développement et Amélioration des végétaux", Université d'Orsay, 1982, 11 p.
- BOURGIN J.P., NITSCH J.P.**  
Obtention de Nicotiana haploïdes à partir d'étamines in vitro.  
Ann. Physiol. Vég., 1967, 9, 377-382.
- CABANNES M.**  
Utilisation des haploïdes issus de culture in vitro d'anthers chez l'aubergine (Solanum melongena L.).  
Mémoire de fin d'étude de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 1983, 41 p.
- CAGNET-SITBON M.**  
Haploid plants production by in vitro culture of unfertilized ovules in Gerbera jamesonii Hook.  
Agronomie, 1981, 1 (9), 807-812.
- CHAMBONNET D., DUMAS DE VAULX R.**  
A new anther culture medium performant on various eggplant (Solanum melongena L.) genotypes.  
Eucarpia "Capsicum and Eggplant 83". Vth Meeting, 4-7 July 1983, Plovdiv, Bulgaria. Ed. Institute of Genetics-Sofia Bulgarie, 38-41.
- CHASE S.S.**  
Utilization of haploids in plant breeding : breeding diploid species.  
Proc. Avist. Int. Symp. Guelph Ontario, Canada, June 10 to 14, 1974. In : "Haploids in higher plants, advances and potential", 211-230.
- CHEN Y, WANG R.F., TIAN W.Z., ZUO Q.X., ZHENG S.W., LU D.Y., ZHANG G.H.**  
Studies on isolated pollen culture and induction of plantlets in Oriza sativa Subsp. Keng.  
Fourth John Innes Symp. Second Int. Haploid Conference, Norwich, September 1979, 1980, 245-246.
- CHRISTENSEN H.M.**  
Haploid in twin seedlings of pepper.  
J. Hered., 1943, 34, 1-43.
- CHU C.C.**  
The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops.  
Proc. Symp. on Plant Tissue Culture. The Australian symp. on Plant Tissue Culture, May 25-30, 1978, Peking. In : "Plant tissue culture", INC London, 1981, 43-50.
- CLAPHAM D.**  
In vitro development of callus from the pollen of Lolium and Hordeum. Z. Pflanzenzüchtg., 1971, 65, 285-292.
- CLAPHAM D.**  
Haploid Hordeum plants from anthers in vitro.  
Z. Pflanzenzüchtg., 1973, 69, 142-155.
- COLLET G.F.**  
Le rôle des phytohormones dans le développement végétal.  
Rech. Agron. Suisse, 1968, 7 (3/4), 371.

- COOPER D.C.**  
Haploid diploid twin embryos of Lilium and Nicotiana.  
Amer. J. Bot., 1943, 30, 408-413.
- CORNU A., MAIZONNIER D.**  
Origine et comportement méiotique d'un pétunia haploïde.  
C.R. Acad. Sci. Paris, 1970, 270, Série D, 310-313.
- C.T.I.F.L.**  
"Le mémento Fruits et Légumes", Paris, France, 1978.
- DEBERGH P., NITSCH C.**  
Premiers résultats sur la culture in vitro de grains de pollen isolés  
chez la tomate.  
C.R. Acad. Sci. Paris, 1973, 276, Série D, 1281-1284.
- DEMARLY Y.**  
Anther and pollen culture for production of haploids. Their utilization in plant breeding.  
In : "Ploidy and fodder plants". Proc. Congr. Eucarpia, Zurich, Suisse, April 23-25, 1975, 142-154.
- DEMARLY Y.**  
Génétique et amélioration des plantes.  
Ed. Masson Paris, France, 1977, 171.
- \*\* DICKINSON H.G.**  
The development of pollen.  
Rev. Cytol. Biol. Veg. Bot., 1982, 5, 5-19.
- DORE C.**  
In vitro techniques as an efficient tool in Asparagus breeding.  
Acta Hortic., 1977, 78, 89-93.
- DUBLIN P.**  
Les "fèves plates" : une nouvelle source d'haploïdie chez le cacaoyer (Theobroma cacao).  
Café, Cacao, Thé, 1973, 17 (1), 25-36.
- DULIEU H.**  
Détection des plantes haploïdes parmi la descendance du croisement entre Nicotiana tabacum L. et Nicotiana sanderae Hirt. après irradiation du pollen.  
C.R. Acad. Sci., Paris, 1964, 259, Série D, 4126-4129.
- DUMAS DE VAULX R.**  
Embryogenèse de plantules haploïdes chez le piment.  
In : "Capsicum 77". C.R. 3e Congr. Eucarpia Piment, Avignon, France, 5-8 juillet 1977, 67-73.
- DUMAS DE VAULX R.**  
Obtention de plantes haploïdes chez le melon (Cucumis melo L.) après pollinisation par Cucumis ficifolius A. Rich.  
C.R. Acad. Sci. Paris, 1979, 289, Série D, 875-878.
- DUMAS DE VAULX R., CHAMBONNET D.**  
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, 1982, 2 (10), 983-988.
- DUMAS DE VAULX R., CHAMBONNET D., POCHARD E.**  
Culture in vitro d'anthers de piment (Capsicum annum L.) : amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à 35°C.  
Agronomie, 1981b, 1 (10), 859-864.
- \*\* DE PAEPE R., NITSCH C., GODARD M., PERNES J.,**  
Potential from haploid and possible use in agriculture.  
In : "Plant Tissue Culture and its Bio technological Application".  
Eds., W. BARZ, E. REINHARD and M. ZENK, 1977, 341-352.

- DUMAS DE VAULX R., CHAMBONNET D., SIBI M.**  
Stimulation of in vitro androgenesis in pepper (Capsicum annuum-L.) by elevated temperature treatment.  
In : "Variability in plants regenerated from tissue culture", Ed. Praeger Scientific, New York U.S.A., 1982, 92-98.
- DUMAS DE VAULX R., POCHARD E.**  
Essai d'induction de la parthénogenèse haploïde par action du protoxyde d'azote sur les fleurs de piment (Capsicum annuum L.).  
Ann. Amélior. Plantes, 1974, 24 (3), 283-306.
- DUNWELL J.M.**  
Stimulation of pollen embryo production in tobacco by pretreatment of excised anthers in a water saturated atmosphere.  
Plante Sci. lett., 1981, 21, 9-13.
- EMBERGER L.**  
Traité de botanique systématique. Tome II. Les végétaux vasculaires, Ed. Masson Paris, 1960, 1539 p.
- ESSAD S.**  
Le cycle mitotique et le cycle chromosomique.  
Sél. Fr., 1974, 19, 41-58.
- FOSKET D.E., TEPFER D.A.**  
Hormonal regulation of growth in cultured plants cells.  
In vitro, 1978, 14 (1), 63-75.
- GALLAIS A.**  
Place de l'haploïdie dans un schéma de sélection.  
Sél. Fr., 1978, 26, 39-49.
- GAMBORG O.**  
Nutrition media and characteristics of plant cells and tissue cultures. Plant tissue culture. Methods and applications in Agriculture. Ed. T.A. Thorpe, Acad. press., New York, U.S.A., 1981, 115-154.
- GAO XIUYUN**  
Obtention de plantules de tomate par culture in vitro d'anthers.  
Acta Hortic. Sin., 1980, 37-41.
- GEORGE L., NARAYANASWAMY S.**  
Haploid Capsicum through experimental androgenesis.  
Protoplasma, 1973, 78, 467-470.
- GRESSHOF P.M., DOY C.H.**  
Development and differentiation of haploid Lycopersicon esculentum (tomato).  
Planta, 1972b, 107, 161-170.
- GRUNEWALDT J., MALEPSY S.**  
Biobachtungen and antherenkallus von Hordeum vulgare L.  
Z. Pflanzenzüchtg., 1975, 75, 55-61 (résumé anglais).
- GU Z.P., CHENG K.C.**  
In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of lily and its embryogenesis observations.  
Acta Bot. Sin., 1983, 25 (1), 28-32.
- GUHA S., MAHESHWARI S.C.**  
In vitro production of embryo from anthers of Datura.  
I. Nature, 1964, 204, 497.
- GULSHAN T., VARGHESE T.M., SHARMA D.R.**  
Studies on anthers culture of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.). Biol. Plant (Praha), 1981, 23 (6), 414-420.
- GUPTA P.P.**  
Microspore derived haploid diploid and triploid plants in Petunia violacea Lindl.  
Plant. Cell. Rep., 1983, 2 (5), 255-256.

- HALL R.H.**  
Cytokinins as a probe of developmental processes.  
Ann. Rev. Plant. Physiol., 1973, 24, 415-444.
- HANDRO W.**  
Mutagenesis and in vitro selection.  
In : "Plant tissue culture. Methods and application in Agriculture".  
Ed. T.A. Thorpe, Acad. press, New York, U.S.A., 1981, 155-180.
- HANSSON B.**  
Temperature shock a method of increasing the frequency of embryoid formation in anther culture of swede rape (Brassica napus L.).  
Sver. Utsaedsfoören Tidskr, 1978, 88 (3), 141-148.
- HARN C., KIM M.Z.**  
Induction of callus from anthers of Prunus armeniaca.  
Korean J. Breed., 1972, 4 (1), 49-53.
- HARN C., KIM M.Z., CHOI K.T., LEE Y.I.**  
Production of haploid callus and embryoid from the cultured anther of Capsicum annuum.  
Sabrao J., 1975, 7 (1), 71-77.
- HAYASE H.**  
Cucurbita crosses. V. Occurrence of a haploid twin pair from a F1 progeny C. maxima x C. moschata.  
Jpn. J. Breed., 1954, 4, 121.
- HENRY Y., DE BUYSER J.**  
Androgenèse chez le blé tendre. Analyse théorique et utilisation en sélection.  
Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences naturelles. Univeristé de Paris Sud, Centre d'Orsay, 23 septembre 1983, 132 p.
- ILLIES Z.M.**  
Introduction of haploid parthenogenesis aspen by postpollination treatment by Toluidine.  
Sylvae Genet., 1974, 23 (6), 167-226.
- ISOUARD G.**  
Contribution à la mise au point de l'androgenèse in vitro chez Solanum melongena L. et utilisation des haploïdes pour la définition du caryotype de l'espèce.  
Thèse de Docteur-Ingénieur, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, Juin 1981, 89 p.
- ISOUARD G., RAQUIN C., DEMARLY Y.**  
Obtention de plantes haploïdes et diploïdes par culture d'anthers d'aubergine (Solanum melongena L.).  
C.R. Acad. Sci. Paris, 1979, 288, Série D, 987-989.
- JOUANNEAU J.P.**  
Contrôle par les cytokinines de la synchronisation des mitoses dans les cellules de tabac.  
Exp. Cell. Res., 1971, 67, 329-337.
- KANEKO Y.K.**  
Haploid plant of Raphanus sativus/  
Chromosome Inf. Serv., 1980, 28, 21.
- KASHA K.J., KAO K.N.**  
High frequency haploid production in barley (Hordeum vulgare L.).  
Nature, 1970, 225, 874-876.
- KEIT A.W., POLI C.Y., SATO S.J., JAWORSKI E.G.**  
The hormonal control of organ formation in callus of Medicago sativa L. cultured in vitro.  
Am. J. Bot., 1978, 65 (6), 654-659.

- KELLER W.A., ARMSTRONG K.C.**  
High frequency production of microspore derived plants from Brassica napus anther cultures.  
Z. Pflanzenzüchtg., 1978, 80, 100-108.
- KELLER W.A., ARMSTRONG K.C.**  
Stimulation of embryogenesis and haploid production in Brassica campestris anther cultures by elevated temperature treatments.  
Theor. Appl. Genet., 1979, 55, 65-67.
- KELLER W.A., RAJHATHY T.A., LACAPRA J.**  
In vitro production of plants from pollen in Brassica campestris.  
Can. J. Genet. Cytol., 1975, 17 (4), 655-666.
- KHODER M., VILLEMUR P., JONARD R.**  
Obtention de plantes monoploïdes et triploïdes par androgenèse in vitro chez le Begonia x hiemalis Fotsch cv. (A).  
Bull. Soc. bot. Fr. 131, Lettres bot., 1984, (1), 43-48.
- KLAMBT D.**  
Cytokinins effects on protein synthesis of in vitro systems of higher plants.  
Plant Cell. Physiol., 1976, 17, 73-76.
- KU M.K., CHENG W.C., KUO L.C., KUAN Y.L., AN H.P., HUANG C.H.**  
Induction factors and morpho-genetical characteristics of pollen derived plants in maize (Zea mays).  
Proc. Symp. on Plant Tissue Culture. The Australian symp. of Plant Tissue Culture, May 25-30, 1978, Péking. In : "Plant Tissue Culture", INC London, 35-42.
- KUO J.S., WANG Y.Y., CHIEN N.F., KI S.J.**  
Investigations of the anther culture in vitro of Nicotiana tabacum L. and Capsicum annum L.  
Acta Bot. Sin., 1973, 15 (1), 43-47.
- LANGE W.**  
Crosses between Hordeum vulgare and Hordeum bulbosum. II. Elimination of chromosomes in hybrid tissues.  
Euphytica, 1971, 20, 181-194.
- LEGUAY J.J.**  
Régulation de la division cellulaire par les auxines : recherche du mode d'action du 2,4-D sur la division des cellules d'érable (Acer pseudoplatanus L.) cultivées en suspension.  
Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences naturelles. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 23 novembre 1979.
- LIANG H.M.**  
The advance of studies on medium for anther culture of rice in China. Proc. Symp. on Plant Tissue Culture. The Australian symp. of Plant Tissue Culture, May 25-30, 1978, Peking. In : "Plant Tissue Culture", INC London, 57-64.
- LICHTER R.**  
Induction of haploid plants from isolated pollen of Brassica napus.  
Z. Pflanzenphysiol., 1982, 105, 427-434.
- LIEBERWITH F., NOVER L., SIEGMUND F., TEWES A.**  
Futile attempts to obtain haploid cell lines.  
Plant Mol. Biol. Newsl., 1981, 3 (1), 14-15.
- LU W.L.**  
Study on the induction of haploid plants derived from isolated pollen grains of Nicotiana tabacum L. cultured in vitro.  
Proc. Symp. on Plant Tissue Culture. The Australian symp. of Plant Tissue Culture, May 25-30, 1978, Peking. In : "Plant Tissue culture", INC London, 109-115.

**Mc COMB J.A.**

Variation in ploidy levels of plants derived from anther culture. Proc. Symp. on Plant Tissue Culture. The Australian Symp. of Plant Tissue Culture, May 25-30 1978, Peking. In : "Plant Tissue Culture", INC London, 167-180.

**MAHESHWARI S.C., RASHID A., TYAGI A.K.**

Haploid from pollen grains. Retrospect and prospect. Special paper. Ann. J. Bot., 1982, 69 (S), 865-879.

**MALHOTRA K., MAHESHWARI S.C.**

Enhancement by cold treatment of pollen embryoid development in *Petunia hybrida*.

Z. Pflanzenphysiol., 1977, 85, 177-180.

**MARGARA J.**

Bases de la multiplication végétative.

Ed. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, 1982, 262 p.

**MATSUBAYASHI M., KURANAKI K.**

Embryogenic responses of the pollen to varied sucrose concentrations in anther culture.

Sci. Rept. Fac. Agr. Kobe Univ., 1975, 11, 215-230.

**MEREDITH W.R. jr, BRIDGE R.R., CHISM J.F.**

Relative performance of F1 and F2 hybrids from doubled haploids and their parent varieties in Upland Cotton, *Gossypium hirsutum* L. Crop. Sci., 1970, 10, May-June.

**MEYNET J., SIBI M.**

Haploid plants from in vitro culture of unfertilized ovules in *Gerbera jamesonii*.

Z. Pflanzenzüchtg., 1984, 93, 78-85.

**MIAO S.H., KUO C.S., KWEI Y.L., SUN A.T., KU S.Y., LU W.L., WANG Y.Y., CHEN M.L., WU M.K., HANG L.**

Induction of pollen plants in maize and observations on their progeny. Proc. Symp. on Plant Tissue Culture, May 25-30, 1978, Peking. In : "Plant Tissue Culture", INC London, 1981, 23-33.

**MOK M.C., MOK D.W.S.**

Genotypic responses to auxins in tissue cultures of *Phaseolus*.

Physiol. Plant, 1977, 40, 261-264.

**MOLHOVA E.**

Cytoembryology of the genus *Capsicum*.

Institut za genetika i selktsivny na rasteniyata, Sofia, Bulgaria, 1977, 191-197.

**MONTELONGO-ESCOBEDO H., ROWER P.R.**

Haploid induction in potato cytological basis for the pollination effect.

Euphytica, 1969, 18 (1), 116-123.

**MONTEZUMA DE CARVALHO J.**

The effect of N2O on pollen tube mitosis in styles and its potential significance for inducing haploidy in potato.

Euphytica, 1967, 16, 190-198.

**NIIZEKI H., OONO K.**

Induction of haploid rice plant from anther culture.

Proc. Jpn. Acad., 1968, 44, 554-557.

**NITSCH C.**

The use of in vitro microspore culture for the modification of plants. Comm. Eur. Com. EUR. 5815, 1977, 417-422.

- NITSCH C.**  
Production of isogenic lines basic technical aspects of androgenesis.  
In : "Plant Tissue Culture. Methods and applications in Agriculture",  
Ed. Acad. Press, New York, U.S.A., 1981, 241-252.
- NITSCH C., NORREEL B.**  
Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène du pollen  
de Datura Innoxia cultivé dans l'anthère ou isolé de l'anthère.  
C.R. Acad. Sci. Paris, 1983, 276, Série D, 303-306.
- NITSCH J.P.**  
Haploid plants from pollen.  
Z. Pflanzenzüchtg., 1972, 67, 3-18.
- NOTH M.H., ABEL W.O.**  
Zur Entwicklung haploider Pflanzen aus unreifenmikrosporen ver-  
schiedener Nicotiana-Arten.  
Z. Pflanzenzüchtg., 1971, 65, 277-284.
- NOVAK F.J.**  
Induction of haploid callus in anther cultures of Capsicum sp.  
Z. Pflanzenzüchtg., 1974, 72, 46-51.
- PAGNEZ M., DEMARLY Y.**  
Obtention d'individus androgénétiques par culture in vitro d'anthères  
de ray-grass d'Italie (Lolium multiflorum am.).  
Ann. Amélior. Plantes, 1979, 29 (6), 631-637.
- PAN J.L., PAI S.H., KUAN C.L., YU H.M.**  
Certain factors affecting the frequency of induction of wheat  
(Triticum vulgare) pollen plants.  
Acta Bot. Sin., 1975, 17 (2), 161-166.
- PANDEY K.K.**  
Theory and practice of induced androgenesis.  
New Phytol., 1973, 72, 1129,1140.
- PELLETIER G.**  
Haploïdie et amélioration des plantes. Etude de l'androgenèse in vitro  
chez Nicotiana tabacum et utilisation des haploïdes en sélection.  
Thèse de Doctorat ès-Sciences, Université de Paris-Sud, Centre  
d'Orsay, 1979, 86 p.
- PELLETIER G., ILLAMI M.**  
Les facteurs de l'androgenèse in vitro chez Nicotiana tabacum.  
Z. Pflanzenphysiol., 1972, 68 (5), 97-114.
- PHILIPPS G.C., COLLINS G.B.**  
The influence of genotype and environment on haploid production  
from anther cultures of Nicotiana tabacum.  
Tobacco Int., 1977, 179 (19), 69-73.
- PICARD E.**  
Phénomènes nouveaux liés à l'haploïdie.  
Le Tocsin du Radiateur, 1978, 3, 179-184.
- PICARD E., DE BUYSER J.**  
Obtention de plantes haploïdes de Triticum aestivum L. à partir  
de cultures d'anthères in vitro.  
C.R. Acad. Sci. Paris, 1973, 277, Série D, 1463-1466.
- PICARD E., DE BUYSER J., PAGNEZ M., LEEB-BLANCHET C.**  
La culture in vitro d'anthères de Triticum aestivum. Application  
à l'amélioration des plantes.  
Semaine d'étude Int. Céréaliculture, Gembloux, 1976,
- POCHARD E.**  
Utilisation de l'haploïdie en amélioration des plantes. Application  
à une plante autogame : le piment (Capsicum annuum L.).  
Sél. Fr., 1979, 6, 25-35.

**POCHARD E.**

Localization of genes in Capsicum annuum by trisomic analysis.  
Ann. Amélior. Plantes, 1977, 27 (2), 255-266.

**POCHARD E.**

Description des trisomiques du piment (Capsicum annuum L.) obtenus dans la descendance d'une plante haploïde.

Ann. Amélior. Plantes, 1970, 20 (2), 233-256.

**POCHARD E., DUMAS DE VAULX R.**

La monoploïdie chez le piment (Capsicum annuum L.). Réalisation pratique de sélection accélérée par passage à l'état monoploïde en 3<sup>e</sup> génération.

Z. Pflanzenzüchtg., 1971, 65, 23-46.

**PREIL W., HUHNKE W., ENGELHARDT M., HOFFMANN F.**

Haploid in Gerbera jansesonii from in vitro culture of capitulum explants.

Z. Pflanzenzüchtg., 1977, 79, 167-170.

**PRIKHOD'KO N.I.**

Embryoid production in the process of culturing anthers of tomato.

Inst. Rastredievdstva Imeni NI Vavilova, 1979, 89, 74-76.

**QUAGLIOTTI L.**

Floral biology of Capsicum and Solanum melongena.

In : "The Biology and Taxonomy of the Solanaceae". Ed. Acad. Press, London, 1979, 399-419.

**RADOJEVIC L.**

Haploid embryos plantlets and callus formation in woody species.

In : "The Plant Genome". Second Int. Haploid Conf., Norwich, September 1980, 259.

**RAINA S.K., IYER R.D.**

Differentiation of diploid plants from pollen callus in anther cultures of Solanum melongena L.

Z. Pflanzenzüchtg., 1979, 70, 275-280.

**RAQUIN C.**

Les haploïdes chez les plants supérieures : origines, méthodes d'obtention, utilisation en amélioration des plantes.

In : "La multiplication des plantes supérieures". Ed. Gauthiers-Villars, Paris, 1980, 223-232.

**RAQUIN C., ISOUARD G.**

Production de plantes haploïdes chez Solanum melongena L.

In : "Applications de la culture in vitro à l'amélioration des plantes potagères". C.R. réunion Eucarpia, section "Légumes", Versailles, 16-18 avril 1980, 138-142.

**RAQUIN C., PILET V.**

Production de plantes à partir d'anthers de Petunia cultivées in vitro.

C.R. Acad. Sci. Paris, 1972, 274, Série D, 1019-1022.

**RASHID A., REINERT J.**

Sélection of embryogenic pollen from cold treated buds of Nicotiana tabacum var. Badisher Burley and their development into embryos in cultures.

Protoplasma, 1980, 161-167.

**RENARD M., DOSBA F.**

Etude de l'haploïdie chez le colza (Brassica napus L. var. Olifera Metzger).

Ann. Amélior. Plantes, 1980, 30 (2), 191-209.



**RESEARCH GROUP OF HAPLOIDY, INSTITUTE OF VEGETABLE, PEKING ACADEMY OF AGRICULTURE.**

Observations of the production of pollen plants and its progeny in Solanum melongena L. var. grossum.

Acta Bot. Sin., 1978, 20, 154-159.

**SACCARDO F., DEVREUX M.**

In vitro production of plantlets from anther culture of Capsicum annum.

In : "Genetics and Breeding of Capsicum", C.R., Congr. Eucarpia Lequel ?

**SANGWAN R.S.**

Etude physiologique biochimique et cytologique de l'induction et du développement du pollen androgénétique chez quelques espèces de Solanaceae (principalement Datura metel L.).

Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences naturelles, Université de Paris VII, 1981, p.

**SANGWAN R.S., CAMEFORT M.**

Microsporogenesis in Datura metel L.

Rev. Cytol. Biol. Veg., 1982, 5, 265-282.

**SANGWAN-NORREEL B.S.**

Androgenetic stimulating factors in the anther and isolated pollen grains culture of Datura innoxia Mill.

J. Exp. Bot., 1977, 28 (105), 843-852.

**SANGWAN-NORREEL B.S., DUHOUX E.**

Les conditions de la gynogenèse et de l'androgenèse expérimentales in vitro chez les arbres..

Rev. Cytol. Biol. Veget. Bot., 1982, 5, 171-187.

**SAN NOEUM L.L.**

Haploïdes d'Hordeum vulgare L. par cultures in vitro d'ovaires non fécondés.

Ann. Amélior. Plantes, 1976, 26 (4), 751-754.

**SAN NOEUM L.H.**

In vitro induction of gynogenesis in higher plants.

Proc. Conf. Broodening Genet. Base Crops, Wageningen, 1978. Ed. Predoc. Wageningen, 1979, 327-329.

**SARKAR K.R., COE J.R.**

A genetic analysis of the origin of material haploids in maize.

Genetics, 1966, 54, 453-464.

**SHARP W.R., DOUGALL D.K., PADDOCK E.F.**

Haploid plantlets and callus from immature pollen grains of Nicotiana and Lycopersicon.

Bull. Torrey Bot. Club, 1981, 98, 219-222.

**SHARP W.R., RASKIN R.S., SOMMER H.E.**

The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato.

Planta, 1972, 104, 357-361.

**SHARP W.R., SONDHAL M.R., CALDAS L.S., MARAFFA S.B.**

The physiology of in vitro asenual embryogenesis.

Hortic. Rev., 1980, 2, 268-310.

**SIBI M., DUMAS DE VAULX R., CHAMBONNET D.**

Obtention de plantes haploïdes par androgenèse in vitro chez le piment (Capsicum annum L.).

Ann. Amélior. Plantes, 1979, 29 (5), 583-606.

- SOPORY S.K., JABOBSEN E., WENZEL G.**  
Production of monohaploid embryoids and plantlets in coloured anthers of Solanum tuberosum.  
Plant Sci. Lett., 1978, 12, 47-54.
- SOPORY S.K., MAHESHWARI S.C.**  
Development of pollen embryoids in anthers cultures of Datura Innoxia. I. General observations and effect of physical factors.  
J. Exp. Bot., 1976a, 27 (96), 49-57.
- SOPORY S.K., MAHESHWARI S.C.**  
Development of pollen embryoids in anther cultures of Datura Innoxia. II. Effects of growth hormones.  
J. Exp. Bot., 1976b, 27 (96), 58-68.
- SNAPE J.W., SIMPSON E., BENNETT M.D., CHAPMAN V.**  
Haploid production in wheat by hybridisation with Hordeum bulbosum.  
Abstr. in "Fourth John Innes Symp. Second Int. Haploid Conf., Norwich, September 1979, 1980, 247.
- SNOW R.**  
Alcoholic hydrochloric acid carmine as a stain for chromosomes in squash preparations.  
Stain technol., 1963, 38, 9-13.
- SUNJ S., ZHU Z.G., WANG J.J., TIGERSTEDT P.M.A.**  
Studies on the anther culture of Triticale.  
In : "The Plant Genome", second Int. Haploid Conf., Norwich, September 1979, 1980, 243-244.
- SUNDERLAND N., WICKS F.M.**  
Embryoid formation in pollen grains of Nicotiana tabacum.  
J. Exp. Bot., 1971, 22 (70), 213-226.
- SUNDERLAND N., WILDON D.C.**  
A note of the pretreatment of excised flower buds in float culture of Hyoscyamus anthers.  
Plant Sci. Lett., 1979, 15, 169-175.
- TAGIUCHI T., MII M.**  
Effects of chilling anther preculture and growth regulators on embryogenesis isolated pollen culture in Nicotiana rustica.  
Jpn. J. Breed., 1982, 32 (4), 303-310.
- TOMES D.T., COLLINS G.B.**  
Factors affecting haploid plant production from in vitro anther cultures of Nicotiana species.  
Crop. Sci., 1976, 16, 837-840.
- TRAN THANH VAN K.**  
Regulation on morphogenesis.  
Plant tissues culture and its biotechnological application, 1977, 367-385.
- TRAN THANH VAN K., TRINH T.H.**  
Capacité embryogénétique des anthères des fleurs néoformées à partir des couches cellulaires minces et celles des anthères des fleurs prélevées sur la plante mère chez le Nicotiana tabacum L. et Nicotiana plumbaginifolia Viv.  
Z. Pflanzenphysiol., 1981, 100 (5), 379-388.
- TRINH T.H., TRAN THANH VAN K.**  
Formation in vitro de fleurs à partir de couches cellulaires minces épidermiques et sous-épidermiques diploïdes et haploïdes chez le Nicotiana tabacum et chez le Nicotiana plumbaginifolia Viv.  
Z. Pflanzenphysiol., 1981, 101 (5), 1-8.

**TULECKE W.**

A haploid tissue culture from the female gametophyte of Gingko biloba L.

Nature, 1964, 203, 94-95.

**TURCOTTE E.L., FEASTER C.V.**

Semigametic production of haploids in Pina cotton.

Crop Sci., 1969, 9, 653-655.

**UCHIMIYA H., KAMEYA J., TAKAHASHI N.**

In vitro culture of unfertilized ovules in Solanum melongena and ovaries in zea mays.

Jpn. J. Breed., 1971, 21 (5), 247-250.

**VAGERA J., HAVRANEK P.**

Stimulating effect of activated charcoal in the induction of in vitro androgenesis in Capsicum annuum L.

Capsicum Newsl., 1983, 2, 63-65.

**VASIL I.K., AHUYA M.R., VASIL V.**

Plant tissue cultures in genetics and plant breeding.

Adv. Genet., 1979, 20, 127-215.

**WANG T.L., EVERETT N.P., GOULT A.R., STREET H.E.**

Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. III. The effect of cytokinin.

Protoplasma, 1981, 106, 23-35.

**WANG Y.Y.**

New development in anther culture of Capsicum annuum and Capsicum annuum var. grossum.

Acta Hortic. Sin., 1981, 8 (2), 41-46.

**WANG Y.Y., KUO C.S.**

A preliminary report on the study of pollen plants of sweet peppers (Capsicum annuum var. grossum Bell.).

Proc. Symp. on Plant Tissue Culture, May 25-30, 1978, Peking. In: "Plant Tissue Culture", INC London, 1981, 243.

**WANG Y.Y., SUN C.S., WANG C.C., CHIEN N.F.**

The induction of the pollen plantlets of Triticale and Capsicum annuum from anther culture.

Sci. Sin., 1973, 16, 147-151.

**WENZEL G., SOPORY S.K.**

Production and utilisation of dihaploid or monohaploid potatoes.

In: "Production of natural compounds by cell culture methods", Eds. A.W. Algermann & E. Reinhard, G.S.F. Munchen, 1978, 303-305.

**WERNICKE W., KOHLENBACH H.W.**

Experiments on the culture of isolated microspores in Nicotiana and Myoscyamus.

Z. Pflanzenphysiol., 1977, 81, 330-340.

**WILKINS M.B.**

Physiology of plant growth and development.

Ed. Mc Graw-Hill, Publishing Company Limited midenthead-Berkshire, England, 1969, 97.

**XHAUFFLAIRE A., GASPARD T.**

Les cytokinines.

Ann. Biol., 1968, 7 (1-2), 40-71.

**YAKOULEV M.S.**

Polyembryony in higher plants and principles of its classification. Phytomorphology, 1968, 17 (5), 278-282.

**ZAGORSKA N., ABADJIEVA M.D., GEORGIEV H.A.**

Induced regeneration in anther cultures of tomatoes (Lycopersicon esculentum Mill.).

C.R. Acad. Bulgarie SC, 1982, 35 (1), 97-100.

**ZENKTELLER M.A., STEFANIAK B.**

Induction of androgenesis in anthers of Hordeum vulgare L. cultured in vitro on leaves and callus.

Plant Sci. Lett., 1982, 26, 219-225.

**ZHAMIR D., RICHARD A., KEDAR N.**

Anther culture of male-sterile tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) mutants.

Plant Sci. Lett., 1980, 17, 353-361.

**ZHONGEHUN Z., HAISHAN W.**

In vitro production of haploid plantlets from unpollinated ovaries of Triticum aestivum and Nicotiana tabacum.

Acta Genet. Sin., 1979, 6, 181-184.

**ZIV M., HADARY H., KEDAR N., LADINZINSKY G.**

Lycopersicon esculentum : trifoliate plants recovered from anther cultures of heterozygous tf tf plants.

Plant Cell. Rep., 1984, 3 (1), 10-13.

## R E S U M E

Ce mémoire fait mention des principaux résultats de nos essais d'obtention d'haploïdes par culture in vitro d'anthers chez le piment, l'aubergine et la tomate.

Pour le piment, nous avons cherché à améliorer la technique mise point précédemment, par l'action de traitement thermique dont le plus efficace est le traitement des anthers à 35°C pendant 8 jours. Parallèlement, nous avons recherché le milieu de culture le plus performant en faisant varier les teneurs en 2,4-D et kinétine. La technique piment a été appliquée avec succès sur aubergine ; cependant, nous avons mis en évidence des facteurs spécifiques à cette espèce, notamment l'effet favorable de fortes teneurs en 2,4-D, kinétine, saccharose et vitamine B12 au cours des premiers jours de culture toujours en association avec le traitement thermique à 35°C. Les différents essais de culture d'anthers de tomate ont permis d'induire des divisions dans les microspores, mais aucune plante haploïde n'a pu être obtenue.

### Mots clés :

Androgenèse ; Culture in vitro ; Anthers ; Haploïdes doublés ; Piment ; Capsicum annum ; Aubergine ; Solanum melongena ; Tomate ; Lycopersicon esculentum ; Traitements thermiques. ; Vitamine B12.

15 OCT. 1980

