

## Culture *in vitro* de la renoncule des fleuristes (*Ranunculus asiaticus* L). II. Production de plantes par culture d'anthers *in vitro*

J Meynet \*, A Duclos

INRA, station d'amélioration des plantes florales, La Gaudine, Fréjus, 83370 Saint-Ayulf, France

(Reçu le 5 septembre 1989 ; accepté le 7 janvier 1990)

**Résumé** — Des plantes viables sont obtenues par culture *in vitro* d'anthers de renoncules. Elles proviennent, soit de tissus superficiels par embryogenèse somatique (Em), soit des tissus internes par régénération de cals (C). Le génotype du donneur détermine presque toujours l'origine tissulaire des explants de façon exclusive. Cependant dans un cas (H1095) la présence de 2,4-D permet l'émergence conjointe des 2 types d'explants Em et C, alors qu'en l'absence de 2,4-D seuls les types C sont produits. Un passage des anthers à 28 °C et à l'obscurité pendant les 14 premiers jours de leur culture augmente significativement le rendement des embryons. L'obscurité en début de culture a très probablement un effet positif sur les taux d'embryogenèse et de callogenèse.

***Ranunculus asiaticus* / culture *in vitro* / anthere / embryon**

**Summary** — *In vitro* culture of Persian Buttercup (*Ranunculus asiaticus* L) II. Production of plants through *in vitro* anther culture. Plants are obtained through *in vitro* culture of anthers in *Ranunculus*. They arise either from superficial tissues by somatic embryogenesis (Em), or from internal tissues by callus regeneration (C). The donor genotype is nearly always the cause of the tissular origin of the explant; however, in 1 case the presence of 2,4-D allowed the conjoined emergence of both Em and C explant types while without 2,4-D, only the C types were produced. Treatment of anthers in darkness at 28 °C during the first 14 days of the culture significantly increased the embryogenesis rate. Darkness at the beginning of the culture period seems to have a positive effect on the embryogenesis and callogenesis rate.

***Ranunculus asiaticus* / *in vitro* culture / anther / embryo**

### INTRODUCTION

Après une phase de recherches fondamentales sur quelques plantes modèles, la culture *in vitro* d'anthers apparaît comme une voie privilégiée d'haploïdisation (Maheshwari *et al*, 1982). Cette méthodologie est maintenant bien intégrée dans de nombreux programmes de sélection de plantes maraîchères et de grande culture (Doré, 1987). Elle est en revanche peu appliquée aux espèces ornementales car celles-ci sont, pour la plupart, cultivées à l'état de variétés-clones. Du fait de son mode habituel de multiplication par semences, la renoncule occupe une situation particulière qui justifie la recherche de lignées

pures utilisables comme parents d'hybrides F<sub>1</sub>. Or cette espèce est auto-incompatible (Meynet, 1985), et de telles lignées ne peuvent être obtenues que par haplodiploïdisation.

Par ailleurs, la culture d'anthers *in vitro* peut produire des embryons somatiques et éventuellement une variation somaclonale. Cette voie de recherche originale est actuellement développée chez la vigne par exemple (Mauro *et al*, 1985). Elle trouverait des applications immédiates pour la diffusion et la diversification éventuelle de nos variétés hybrides de clones.

La culture *in vitro* d'anthers a déjà permis d'obtenir des plantes entières viables d'origine pollinique chez plusieurs espèces de renoncules.

\* Correspondance et tirés à part

cées : *Anemone virginia* (Johansson, Eriksson, 1977), 5 autres espèces du genre *Anemone* et 4 espèces de *Clematis* (Johansson *et al.*, 1982), plusieurs espèces du genre *Paeonia* (Sunderland *et al.*, 1975).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Quatre clones consanguins (2 à 5 générations de croisements frère x sœur) et 4 hybrides de clones ont servi aux expérimentations. La liste est présentée dans le tableau I avec leurs caractéristiques de fleurs (couleur et nombre d'étamines).

Les racines tubérisées (griffes) ont été implantées mi-octobre dans une serre dont la température est maintenue au-dessus de +4 °C. Les prélèvements se sont échelonnés du 15 février au 31 mars sur des plantes en début et en pleine floraison.

Les repères morphologiques permettant de caractériser les stades polliniques sont indiqués dans le tableau II. La taille du bouton est extrêmement variable et ne peut être retenue comme indicateur d'un stade de la microsporogénèse. Les premières fleurs terminales sont souvent très grosses, très doubles et, par conséquent, déficientes en étamines, par suite d'une transformation pétaloïde des étamines. Nous avons donc prélevé de préférence les anthères sur le premier bouton axillaire, la fleur apicale servant alors de référence.

**Tableau I.** Couleur et nombre d'étamines du matériel utilisé.

Génotypes	Couleur de fleur	Nombre d'étamines
S7002-6	jaune bordé rouge	45 ± 8
S118-4	rose	65 ± 10
S118-28	rose	63 ± 10
S5145-24	orange	42 ± 10
H1095 = R34 x S7002-6	blanc bordé rose	50 ± 13
H3059 = 5545 x S7002-6	jaune bordé rouge	63 ± 18
H4129 = R9 x S118-28	carmin	53 ± 23
H3065 = R41 x R18	rouge foncé	53 ± 14

**Tableau II.** Repères morphologiques du stade d'évolution de la microsporogénèse dans le premier bouton axillaire prélevé. (1) Synthèse anthocyanique dans les anthères et filets staminiques des génotypes colorés : - = nulle, + = faible, +++ = forte ; (2) Axe longitudinal de l'anthère.

Stade	Sac pollinique	Anthocyane (1)	Connectif	Axe L (2)	Bouton apical
méiose	blanc hyalin	-	bien visible	droit	serré
tétrade	blanchâtre	-	visible	droit	fermé
uninucléée	jaunâtre	+	recouvert	courbé	couleur apparente
mature	jaune	+++	caché	falciforme	épanoui

Après désinfection des boutons floraux par immersion dans une solution d'hypochlorite de calcium à 15 g.l<sup>-1</sup> pendant 20 min puis 2 rinçages à l'eau distillée stérile, on retire les sépales et pétales à l'aide d'un scalpel. Les anthères au stade «microspore uninucléée» sont prélevées et déposées à la surface d'un milieu gélosé à raison de 16 anthères par boîte de Petri de 55 mm de diamètre.

Les conditions culturales sont, selon les essais :

- +4°O = réfrigérateur à + 4 °C et obscurité
- +18°L = chambre de culture réglée à 18 °C éclairée pendant 12 h (tubes fluorescents fournissant environ 12 W.m<sup>-2</sup>)
- +18°O = chambre de culture réglée à 18 °C et obscurité
- +28°O = étuve à +28 °C et obscurité

## Les essais

### Prétraitement des boutons par le froid

Les boutons sont maintenus pendant 7 j à +4 °C (F+) ou ne subissent pas de froid (F-) avant d'être disséqués. Les anthères sont déposées sur un milieu de culture unique dépourvu d'auxine et contenant 1 mg.l<sup>-1</sup> de N<sub>6</sub>-Benzyladénine, puis placées à +18°L. Quatre essais ont été successivement réalisés, les 17 et 26 février 1987 et les 7 et 23 mars 1988 avec 3 génotypes non apparentés : S7002-6, S118-28, et H3059.

### Traitement thermique des anthères en culture

Les anthères mises en culture sur le même milieu que précédemment séjournent à +4 °C, +18 °C ou +28 °C à l'obscurité, pendant 1 ou 14 j, avant d'être toutes placées à +18°L jusqu'à l'apparition de formations organogènes.

### Milieus de culture

Tous les milieux expérimentés avaient en commun une composition de base comprenant : macroéléments de Murashige et Skoog dilués de moitié, microéléments de Skoog, et, pour 1 litre de solution, Fe EDTA : 65 mg, myo-inositol : 100 mg, acide nicotinique : 5 mg, pantothénate de calcium : 2 mg, thiamine HCl : 1 mg, pyridoxine HCl : 1 mg, glutamine : 100 mg, glycolle : 100 mg, saccharose : 20 g, agar : 8 g.

Des essais ont été réalisés durant 3 années consécutives. Les essais du 20 février 1987 et du 9 mars

1988 portent sur la comparaison de 3 cytokinines : 2 doses de N<sub>6</sub> Benzyladénine (BA), 2 doses de N<sub>6</sub> (2-isopentényl) adénine (2ip) et 2 doses de kinétine (K). Aucune auxine n'est ajoutée au milieu de culture. Les boutons floraux sont prétraités au froid et les anthères sont immédiatement placées à +18°C après ensemencement. L'essai du 24 mars 1989 permet de comparer 2 milieux, l'un contenant 1 mg.l<sup>-1</sup> de BA et l'autre 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de BA et 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D. Après leur prélèvement, les anthères sont placées pendant 2 semaines à +28°C puis 4 semaines à +18°C et enfin à 18°C.

### Remarques

– Dans tous les essais les anthères sont maintenues sans repiquage sur leur milieu initial pendant toute la phase d'incubation, elles sont transférées sur un milieu de base contenant 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de BA et 0,5 mg.l<sup>-1</sup> d'acide indole acétique (AIA) au fur et à mesure qu'apparaissent les formations organogènes.

– Les contaminations bactériennes sont très fréquentes et variables avec les donneurs (de 15% pour des plantes de semis à 60% et plus pour des clones parentaux multipliés par éclats de griffes depuis longtemps). Ces contaminations condamnent l'emploi de milieux de culture liquides ou la technique du double lit (phase liquide au-dessus d'un milieu gélosé contenant du charbon actif) préconisée par Johansson *et al* (1982).

### RÉSULTATS

Les anthères de renoncle mises en culture développent 2 types bien distincts de formations organogènes :

#### **Apparition d'embryons somatiques à la surface de l'anthère**

Six à 12 semaines après la mise en culture (avec un maximum à la 10<sup>e</sup> semaine) des embryons blancs apparaissent sur la surface de l'anthère qui est restée bien fermée, très rarement à la surface du connectif ou du filet staminique. La durée de l'évolution du stade globulaire au stade cordiforme n'excède pas 2 semaines. Ces embryons proviennent des tissus superficiels, probablement de l'épiderme, de l'anthère non déhiscente et sont donc d'origine somatique, ils seront notés "Em" par la suite.

#### **Apparition de cals issus de l'intérieur de l'anthère**

Après 10 à 18 semaines (avec un maximum à 13 semaines) des nodules et des cals globulaires denses sortent de l'intérieur de l'anthère par la fente de déhiscence, ils seront notés "C".

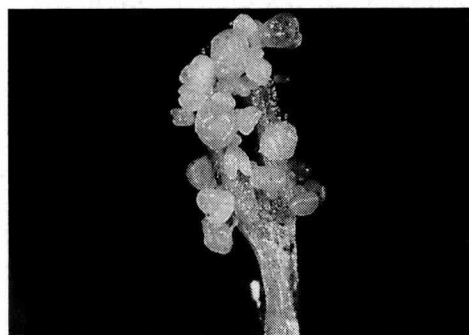


Fig 1. Embryons somatiques Em à la surface d'une anthère indéhiscence. a : 10 semaines après mise en culture (x 10) ; b : 16 semaines après mise en culture (x 2).

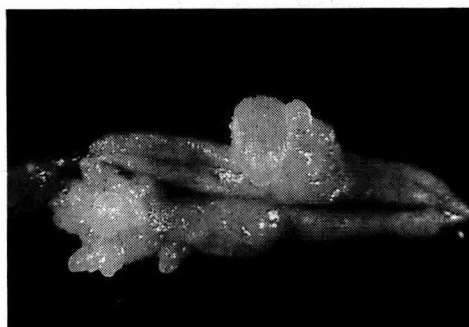


Fig 2. Cals C sortant de la fente de déhiscence 13 semaines après la mise en culture (x 15).

Ces 2 types de formations ont donné, par évolution embryogénétique directe ou par régénération de cals, des plantes entières cultivables en serre avec un pourcentage de survie de 60% des embryons Em et de 45% des cals C.

L'origine somatique des plantes Em sera discutée et confirmée dans un prochain article (Meynet, Duclos, 1990). Quant aux plantes C, leur très faible vigueur a beaucoup gêné leur analyse génétique : les dénombrements chromosomiques sur pointes de racines ont révélé 3 plantes haploïdes ( $n = 8$ ) et 5 diploïdes, leurs premières descendance sexuées sont en cours d'observation. Il est probable que les plantes C diploïdes proviennent d'un doublement spontané mais aujourd'hui on ne peut pas exclure la possibilité de régénération de quelques plantes à partir de cals provenant des parois somatiques de l'anthère.

### Prétraitement des boutons par le froid

L'effet des dates d'essais n'étant pas significatif, nous avons regroupé les résultats par génotype donneur tableau III. Malgré la faiblesse des effectifs et la grande variation des réponses à l'intérieur d'un même traitement, un effet positif du froid sur le nombre d'anthers réactives ( $\chi^2_1 = 7,1$ ) et le nombre d'embryons obtenus ( $\chi^2_1 = 10,9$ ) peut être observé globalement.

### Traitement thermique des anthers en culture

Les tableaux IVa et IVb indiquent que, seul un passage des anthers à 28 °C pendant 14 j aug-

mente de façon très significative la fréquence des anthers réactives ( $\chi^2_1 = 72,28$ ), des embryons Em ( $\chi^2_1 = 96,08$ ) et probablement des nodules et calcs C, les autres traitements testés, en particulier le froid, restant sans effet.

### Milieux de culture

Dans nos conditions expérimentales, les résultats de 1987 et 1988 sont convergents et ont été regroupés dans le tableau V, les 2 doses de 2ip et de K donnent des résultats comparables, seule la BA marque une différence significative par rapport au témoin sans substance de croissance ( $\chi^2_1 = 23,81$ ), la dose de 0,1 mg.l<sup>-1</sup> est ici légèrement plus inductrice que celle de 1 mg.l<sup>-1</sup> ( $\chi^2_1 = 7,66$ ).

**Tableau III.** Effet d'un prétraitement des boutons floraux par le froid sur le nombre d'embryons Em ou de calcs C produits. MC = nombre d'anthers mises en culture ; As = nombre d'anthers saines ; Ar = nombre d'anthers ayant donné au moins une formation morphogène ; Em = nombre d'embryons ; C = nombre de nodules et de calcs ; % = (Em + C) / 100 As.

Donneur	F +						F -					
	MC	As	Ar	Em	C	%	MC	As	Ar	Em	C	%
S7002-6	400	162	7	25	3	17,3	400	125	2	5	0	3,7
S118-4	400	278	4	0	5	1,8	400	297	1	0	3	1,0
H3059	688	497	15	25	0	5,0	688	491	7	17	0	3,5
Total	1488	937	26	50	8	6,2	1488	923	10	22	3	2,7

**Tableau IV.** Effet de différentes températures au début de la culture *in vitro* des anthers sur la production d'embryons et de calcs.

**IVa :** Essai du 20 février 87 : Les 14 premiers jours de culture se déroulent à l'obscurité soit à +18 °C soit à +28 °C.

Donneur	H3059		H4129		Total	
température	18 °C	28 °C	18 °C	28 °C	18 °C	28 °C
MC	240	240	240	240	480	480
As	206	195	180	192	386	387
Ar	5	18	2	5	7	23
Em	12	33	0	0	12	33
C	0	0	2	8	2	8
%	5,8	16,9	1,1	4,2	3,6	10,6

**IVb :** Essais du 17 février et du 14 mars 88. \* A = S7002-6 ; B = S118-4.

Conditions de température et d'éclaircissement	+4°O				+18°O				+28°O			
	1		14		1		14		1		14	
	A *	B *	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Donneur												
MC	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240
As	115	196	107	205	112	191	895	197	106	200	84	118
Ar	3	0	2	1	3	1	2	1	3	1	10	5
Em	5	0	3	0	3	0	3	0	6	0	24	0
C	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	11
%	4,3	0	2,8	0,5	2,7	0,5	3,2	0,5	5,7	0,5	28,6	5,9

Dans l'essai de 1989 dont les résultats sont rapportés tableau VI les anthères des meilleurs donneurs ont été placées dans les conditions physiques optimales (14 j à +28°C) ; les taux de production sont alors très élevés. Les effets des 2 milieux comparés varient avec le génotype du donneur :

– avec S118-28, H3065 et H4129 : aucune influence des milieux n'est décelable.

– avec H1095 : le milieu ne contenant que de la BA induit uniquement des nodules et cals C provenant de l'intérieur de l'anthère, alors que le milieu contenant à la fois de la BA et du 2,4-D permet, dans un premier temps, l'apparition d'un très grand nombre d'embryons Em puis, 2 à 4 semaines plus tard, des nodules C. Pour la première fois nous avons observé sur ce dernier milieu enrichi en 2,4-D des anthères capables de donner à la fois les 2 types de formations Em et C (fig 3).

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Chez la renouée, la culture *in vitro* d'anthères produit 2 types bien distincts de formations organogènes : les types Em d'origine somatique exclusivement, les types C en majorité d'origine gamétique.

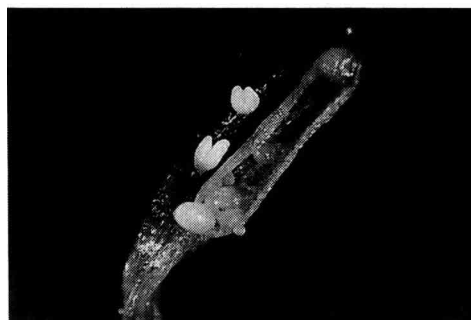


Fig 3. Anthère présentant les 2 types Em et C de formation embryogénétique après 12 semaines de culture *in vitro* (x 10).

Jusqu'à présent le génotype du donneur pré-détermine de façon quasi systématique l'origine tissulaire de l'explant produit ; une exception peut être notée avec le donneur H1095 qui exige du 2,4-D pour donner des types Em mais qui peut produire des types C aussi bien en présence qu'en absence de 2,4-D. A notre connaissance une situation aussi nettement tranchée n'a jamais été décrite. La renouée, par ses aptitudes morphogénétiques spécifiques, paraît être un matériel de choix pour l'étude des processus d'initiation de la morphogenèse.

L'effet positif d'un prétraitement des boutons floraux par le froid a déjà été mentionné, en particulier chez plusieurs espèces d'anémones

Tableau V. Influence des cytokinines contenues dans le milieu de culture sur le nombre d'embryons Em et de cals C produits sur les anthères de 3 génotypes (résultats cumulés des essais de 1987 et 1989).

Donneur	S5145				H3059				S118-10			
	As	Em	C	Em (%)	As	Em	C	Em (%)	As	Em	C	C (%)
0	95	0	0	0	440	14	0	3,2	379	0	0	0
BA 0,1					288	40	0	13,9	345	0	5	1,5
BA 1	155	2	0	1,3	318	36	0	11,3	356	0	6	1,7
2 ip 0,1					239	9	0	3,8	363	0	0	0
2 ip 1	123	2	0	1,6	254	12	0	4,7	336	0	0	0
K 0,1					286	11	0	3,8	375	0	3	0,8
K 1					330	22	0	6,7	353	0	2	0,6

Tableau VI. Effet de 2 milieux de culture distincts par leurs régulateurs de croissance, l'un contient 1 mg.l<sup>-1</sup> de BA l'autre 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de BA et 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D, sur le nombre d'anthères morphogènes et le taux d'embryons ou de cals produits par 100 anthères cultivées selon les génotypes donneurs (essai 1989).

Milieu	Ba = 1 mg.l <sup>-1</sup>			BA 0,5 mg.l <sup>-1</sup> +2,4-D 0,1 mg.l <sup>-1</sup>		
	Ar/As	Em (%)	C (%)	Ar/As	Em (%)	C (%)
S118-28	14/96	0	34	11/63	0	21
H1095	22/32	0	84	26/32	250	29
H3065	30/64	0	135	17/30	0	71
H4129	15/136	0	31	31/128	0	43

(Johansson, Eriksson, 1984) ; il est ici très limité et ne paraît pas déterminant.

En revanche, un passage des anthères dès le début de la culture pendant 14 j à +28 °C (température très élevée par rapport à l'optimum thermique de croissance de 18 °C environ) stimule très fortement la production de plantes pour tous les donneurs testés.

L'action positive de températures élevées en début de culture a souvent été décrite (Dumas de Vaulx *et al*, 1981 ; Dumas de Vaulx, Chambonnet, 1982 ; Maheshwari *et al*, 1982, par exemple). Chez *Anemone virginia*, Johansson, Eriksson (1977) observent que la température optimale pour la production d'embryons est de 25 °C (bien au-dessus de la température de croissance), mais surtout, que l'obscurité est nécessaire pour avoir des taux d'embryogenèse élevés : chez *R asiaticus*, l'effet favorable de l'obscurité n'est pas formellement démontré ; à 18 °C (tableau IVb) aucune différence n'apparaît après 1 ou 14 j à l'obscurité, mais la durée du traitement est peut-être trop courte. En revanche, si les anthères du génotype H4129 sont maintenues pendant 6 semaines à l'obscurité, le taux de formations C obtenues par rapport au nombre d'anthères en culture atteint 31% (essai de 1989, tableau VI) alors qu'il n'était que de 4,2% après 2 semaines à l'obscurité (essai de 1987, tableau IVa), toutes les autres conditions restant égales par ailleurs. Cette différence considérable suggère un effet positif important de l'obscurité en début de culture, pourvu qu'elle agisse pendant une durée suffisante supérieure à 2 semaines.

Le rôle des milieux de culture, et notamment des équilibres hormonaux, est loin d'être entièrement élucidé. Des plantes ont pu être obtenues sur de nombreux milieux très différents et en particulier sans aucune substance de croissance. Les résultats reportés ici indiquent un effet globalement favorable de la BA sur la fréquence d'émergence aussi bien des types Em que C alors que le 2,4-D favoriserait chez certains génotypes la production d'embryons Em (peut-être au détriment des types C).

## REMERCIEMENTS

Nous remercions F Pecate qui a participé à ce travail dans le cadre de la préparation de son mémoire de fin

d'études de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse au cours de son stage du 1<sup>er</sup> février au 25 août 1988.

## RÉFÉRENCES

- Doré C (1987) Intégration de la culture *in vitro* dans les méthodes de sélection de plusieurs espèces potagères. Thèse de doctorat d'Etat, Univ Paris-Sud Orsay, 301 p
- Dumas De Vaulx R, Chambonnet D, Pochard E (1981) Culture *in vitro* d'anthères de piment (*Capsicum annum*) : Amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à 35 °C. *Agronomie* 1, 859-864
- Dumas De Vaulx R, Chambonnet D (1982) Culture *in vitro* d'anthères d'aubergine (*Solanum melongena* L) : stimulation de la production de plantes au moyen de traitements à 35 °C associé à de faibles teneurs en substances de croissance. *Agronomie* 2, 982-988
- Johansson L, Eriksson T (1977) Induced embryo formation in anther cultures of several *Anemone* species. *Physiol Plant* 40, 172-174
- Johansson L, Eriksson T (1984) Effects of carbon dioxide in anther culture. *Physiol Plant* 60, 26-30
- Johansson L, Andersson B, Eriksson T (1982) Improvement of anther culture technique. Activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Physiol Plant* 54, 24-30
- Maheshwari SC, Rashid A, Tyagi AK (1982) Haploïds from pollen grains. Retrospect and prospect. *Am J Bot* 69, 865-879
- Mauro MCI, Nef C, Ambid C, Fallot J (1985) *Utilisation de l'embryogenèse somatique en vue d'augmenter la variabilité chez Vitis vinifera var Carbernet-Sauvignon*. Atti symposia di genetica della viti, Verona, 27-29
- Meynet J (1985) Multiplication et sélection de la renoucle. *PHM Rev Horti* 254, 55-62
- Meynet J, Duclos A (1990) Culture *in vitro* de la renoucle de fleuristes (*Ranunculus asiaticus*). III. Etude des plantes produites par embryogenèse somatique à partir de tissus superficiels de l'anthère. *Agronomie* 10 (accepté pour publication)
- Sunderland N, Dunwell JM, Roberts M (1975) Anther culture in the genus *Paeonia*. *Ann Rep John Innes Inst* 66, 57-60