

# Culture *in vitro* de la renoncule des fleuristes (*Ranunculus asiaticus* L). III Étude des plantes produites par embryogenèse somatique à partir des tissus superficiels de l'anthere

J Meynet \*, A Duclos

INRA, station d'amélioration des plantes florales, la Gaudine, Fréjus, 83370 Saint-Aygulf, France

(Reçu le 5 septembre 1989 ; accepté le 29 janvier 1990)

**Résumé** — Les tissus superficiels de l'anthere de *R. asiaticus* peuvent donner par embryogenèse directe, sans cal apparent, des plantes vigoureuses, généralement diploïdes, rarement tétraploïdes ou aneuploïdes, jamais haploïdes, de même structure allélique S (sauf mutation) que leur donneur. Malgré leur origine somatique, ces plantes présentent une variation somaclonale extrêmement importante qui affecte, notamment, la couleur des fleurs pour 2 donneurs bicolores. Une plante s'est révélée autofertile. Les caractères nouveaux sont stables après 1 année de culture en serre ou de multiplication *in vitro*, ils se transmettent dans les descendance sexuelles par la voie mâle.

***Ranunculus asiaticus* / anthere / culture *in vitro* / variation somaclonale / embryogenèse**

**Summary** — *In vitro* culture of Persian buttercup (*Ranunculus asiaticus* L). III. Study of plants regenerated by somatic embryogenesis from the anther superficial tissues. Plants without apparent callus can be obtained by direct embryogenesis from the superficial tissues of anthers in *R. asiaticus*. The plants are vigorous, generally diploid, rarely tetraploid or aneuploid, never haploid. They have the same allelic S structure as their donor (except for mutation). In spite of their somatic origin, these plants present a very important somaclonal variation which especially concerns the flower colour for 2 bicoloured donors (table I). In particular among the 17 somatic issues from a yellow with red fringe genotype, 10 have a homogeneous red colour and 7 remain bicoloured but the anthocyanic border of their petals is fairly wide. One plant appears self-compatible and cross-compatible with the 5 plants tested and used as females which were of the same donor origin (table II). The new characters are stable after cultivation under greenhouse conditions and *in vitro* multiplication for 1 year. Nine crosses between different plants obtained through somatic embryogenesis and an acyanic test plant indicate a very good transmissibility of the new specificities (colour and self-compatibility) from 1 generation to the next (table III).

***Ranunculus asiaticus* / anther culture / *in vitro* culture / somaclonal variation / embryogenesis**

## INTRODUCTION

La culture *in vitro* d'anthers de renoncule a permis d'obtenir 2 types d'explants selon le génotype du donneur :

— des embryons «Em» adhérents à l'épiderme de l'anthere indéhiscence et évoluant directement en plantes,

— des cals ou nodules «C» provenant de l'intérieur du sac pollinique et capables de régénérer des plantes viables (Meynet et Duclos, 1990b). L'étude présentée ici ne porte que sur les plants Em. A défaut d'observations histologiques décisives, nous nous attacherons dans un premier temps à démontrer l'origine somatique de ces plantes Em, puis nous analyserons la variation

phénotypique observée. Cette étude nécessite la connaissance d'un certain nombre de marqueurs génétiques stables et mesurables qui ont fait l'objet de travaux antérieurs (Meynet, 1974) et que nous rappelons ici sommairement.

— La richesse des coloris (peu dépendants du milieu environnant) exprime une grande diversité d'équilibres pigmentaires. La présence d'anthocyanes est contrôlée par un gène dominant A, les types acyaniques étant récessifs aa, par ailleurs la présence de delphinidine (généralement associée à la cyanidine) est monogénique (Dp) et dominante par rapport à l'absence. En revanche, les concentrations et répartitions anthocyaniques sont déterminées par une hérédité polygénique compliquée.

\* Correspondance et tirés à part

— l'auto-incompatibilité gamétophytique contrôlée par une seule série allélique S est de règle chez cette espèce. Cependant ce caractère est parfois imparfait et fluctuant : dans nos conditions expérimentales, quelques graines (en général moins de 50, à comparer à plusieurs centaines possibles après croisement) peuvent être obtenues après autofécondation, en mars-avril lorsque le temps est frais et couvert, alors qu'aux Pays-Bas et en Angleterre la plupart des renoncules se révéleraient généralement autofertiles (Godart, communication personnelle).

— les effets de la consanguinité sont très nets sur les dimensions de différents organes végétatifs ou floraux, le nombre de feuilles de la rosette, la duplication, la production grainière, mais ils affectent peu la précocité de floraison.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Les géotypes donneurs*

#### **La plante H3059.7**

Elle est issue d'une population hybride Friandine caractérisée en particulier par des fleurs bicolores : sur un fond homogène jaune (caroténoïdes) les pétales sont marginés d'une étroite plage anthocyanée. L'anthocyane présente est la cyanidine et la plante est homozygote AA, dpdp. De ce géotype nous avons obtenu 17 plantes Em qui ont fleuri dès le printemps 1987.

Deux plantes dérivées de H3059.7 : A1 et A4 ont été réutilisées pour un 2<sup>e</sup> cycle d'embryogenèse.

#### **Le clone parental S7002.6**

Ses pétales présentent un liseré anthocyané (delphinidine) sur fond jaune pâle. Cette plante est hétérozygote Aa, Dpdp; 21 plantes Em ont fleuri en 1989.

#### **Le clone S4032.23**

Il produit de grosses fleurs orange très doubles; 2 plantes Em issues d'individus de ce clone ont fleuri en 1989.

#### **Le clone S5145.24**

Il présente des fleurs vermillon; la face inférieure des feuilles juvéniles est fortement anthocyanée et les in-

florescences sont relativement courtes; 3 plantes Em issues de ce clone ont fleuri en 1989.

### **La production des embryons *in vitro***

La technique de culture *in vitro*, déjà décrite dans un précédent article (Meynet et Duclos, 1990b), est simplement résumée ici.

Les anthères sont prélevées en mars sur le 1<sup>er</sup> bouton axillaire alors que les sépales du bouton terminal s'entrouvent et laissent apparaître la couleur. Elles sont disposées sur un milieu gélosé contenant notamment des macroéléments de Murashige et Skoog dilués de moitié et 1 mg.l<sup>-1</sup> de benzyladénine. Les cultures sont placées pendant 14 j à 27 °C et à l'obscurité, puis demeurent dans une chambre éclairée pendant 12 h à 18 °C jusqu'à l'émergence des embryons. Ceux-ci sont transplantés sur un milieu de prolifération où ils se développent directement en plantules. On obtient ainsi pour chaque embryon 2 à 6 plantes qui sont observées dans une serre en verre dont la température minimale est de 4 °C.

### **Les notations**

Les phénotypes, en particulier les caractères floraux, des plantes obtenues sont observés sur des plantes sorties de tubes; pour H 3059-7, nous avons pu renouveler ces notations l'année suivante sur des plantes provenant de griffes produites par les vitroplants ou issues de matériel entretenu *in vitro* pendant 1 année entière après 8 repiquages successifs.

Les coloris sont notés d'après des critères visuels (ton - répartition anthocyanique); la nature des anthocyanidines est parfois déterminée par chromatographie sur couche mince de cellulose; la concentration moyenne en anthocyane est mesurée par densité optique. Les pigments contenus dans 15 pétales (représentant un poids frais moyen de l'ordre de 1 g) sont alors extraits dans 50 ml d'éthanol avec 0,2% d'HCl; après broyage et filtration, la densité optique est déterminée à 525 nm.

Des comptages chromosomiques sont réalisés sur pointes de racines, selon la technique de Feulgen.

Par ailleurs, les 17 plantes dérivées de H3059-7 ont été systématiquement autopollinisées (elles produisent toutes beaucoup de pollen); 3 d'entre elles servent de parents mâles dans un programme d'intercroisements à l'intérieur de cette population H3059.7 (A1 - A4 - A15), chaque famille issue d'autofécondation sera représentée par 40 plantes en serre. Enfin 9 de ces plantes ont été utilisées comme parents mâles dans un programme de croisements avec un testeur commun S4032-1 acyanique (jaune pur), mâle-stérile et non apparenté à H3059.7. Chaque famille hybride sera représentée par 72 plantes.

## RÉSULTATS

### Comptage chromosomique

Au total, 25 plantes ont fait l'objet d'un comptage chromosomique :

- 22 sont diploïdes ( $2n = 16$ ),
- 1 est trisomique ( $2n + 1 = 17$ ), elle a un faciès floral particulier qui suggère une structure en chimère, elle produit néanmoins du pollen normal et fonctionnel.
- 1 est tétraploïde
- 1 est mixoploïde (32/16), mais le doublement chromosomique de ces 2 dernières plantes n'affecte probablement que le système racinaire car elles ne se distinguent pas phénotypiquement de leurs voisins diploïdes, de plus, elles restent autostériles et leur descendance en croisement est normale.

### Variations observées

#### Synthèse anthocyanique

Le tableau I montre que sur 17 plantes dérivées de H3059.7, 10 présentent des pétales de couleur plus ou moins homogène et 7 restent bicolores, mais la taille du secteur anthocyané varie

comme l'indiquent les valeurs de densité optique. En fait, tous les dérivés embryogénétiques apparaissent distincts de leur donneur et différents entre eux.

Cette observation se confirme chez les plantes dérivées de S7002.6 : sur les 21 plantes observées, 11 ont des fleurs homogènes pourpres, 3 pourpres striées, 2 jaunes sans anthocyane apparente et 5 bicolores; parmi ces dernières 1 plante est à cyanidine seule, contrairement à toutes les autres plantes anthocyanées qui possèdent de la delphinidine.

En revanche les dérivés de S4032-23 et S5145-24 à fleur de couleur homogène sont identiques à leur donneur respectif pour ce caractère.

Par ailleurs la confrontation des phénotypes observés sur le matériel H3059-7 (élevé à partir de griffes ou après une année de propagation *in vitro*) avec des photographies couleur prises l'année précédente sur des vitroplants révèle une grande stabilité phénotypique. De même, nous n'avons jamais observé de variation à l'intérieur des petits clones issus d'embryons isolés.

#### Autofertilité

La plante A15 dérivée de H3059-7 produit autant de graines en autofécondation (ou lors-

Tableau I. Quelques caractéristiques de H 3059.7 et de ses 17 dérivés embryogéniques.

	Couleur	DO <sub>525</sub>	Nbre chromosomique	Nbre anthères/fleur
H3059.7	jaune + orange	0,350		50 à 70
A1	orange + rouge	0,507	16	50 à 70
A2	jaune + rouge	0,331	16	50 à 70
A3	rouge orange strié			30 à 50
A4	rouge vermillon	1,378	16	50 à 70
A5	rouge orange	0,585	16	50 à 70
A6	rouge orange strié		16	50 à 70
A7	rouge striures foncées		17	30 à 50
A8	jaune + rouge			30 à 50
A9	jaune + liseré rouge		16	50 à 70
A10	jaune orange + rouge	0,862	32/16	50 à 70
A11	jaune + rouge	0,306		50 à 70
A12	rouge orange		16	50 à 70
A13	jaune + rouge			50 à 70
A14	orange + rouge	0,366	16	50 à 70
A15	rouge	1,040	16	50 à 70
A16	rouge foncé	1,520		50 à 70
A17	rouge			30 à 50

qu'elle est utilisée comme pollinisatrice de ses homologues dérivées du même H 3059-7) qu'en intercroisement par une plante non apparentée (tableau II). A15 est diploïde et elle est la seule plante devenue autofertile parmi celles testées.

### Autres caractères

De nombreux autres caractères paraissent modifiés dans toutes les familles observées.

Ainsi la duplication varie sensiblement : 5 plantes dérivées de S7002-6, 1 de S4032-23 et 2 de S5145-24 sont restées entièrement doubles c'est-à-dire mâle-stériles.

Une plante S7002-6 bicolore présente des sépales très allongés.

Une dérivée de S5145-23 a des feuilles juvéniles relativement peu anthocyanées.

Les graines récoltées sur 1 clone provenant de S5145-23, malgré leur apparence normale, manifestent une dormance inhabituelle et n'ont pas encore pu germer.

### Autofécondation et croisements consanguins par A15

Ces descendance présentent une dépression de vigueur uniforme et qui se traduit par un vo-

lume foliaire, une taille et un nombre de fleurs réduits, une stérilité mâle très fréquente. Seules 5 plantes ont produit du pollen en fin de cycle, 3 d'entre elles se sont révélées autofertiles.

Ces familles montrent par ailleurs une très grande diversité phénotypique, traduisant une très forte hétérozygotie des parents.

### Hybridations par S4032-1

Les hybrides retrouvent une grande vigueur, comparable à celle des dérivés de H3059-7. Les coloris plus ou moins hétérogènes sont distribués de façon continue. La concentration anthocyanique est déterminée par mesure de densité optique, chaque hybride est représenté par un échantillon moyen (chaque individu hybride fournissant 3 pétales). La très forte corrélation établie entre les 9 dérivés embryogéniques de H3059-7 et leurs hybrides respectifs par un testeur commun ( $r = 0,945$  - tableau III) indique une bonne transmission génétique des caractères nouveaux par la voie mâle.

L'hybride S4032-1 x A15 a fait, par ailleurs, l'objet d'une analyse concernant l'hérédité de l'autofertilité. Trente-neuf plantes ont pu être autofécondées, les autres étant mâle-stériles comme leur parent femelle, 17 plantes sont autofertiles comme A15. L'hypothèse d'un détermi-

**Tableau II.** Nombre de graines produites après autopollinisation (AF), croisements entre dérivés de H 3059.7, hybridation par S4032.1.

Parent issu de H 3059.7	Autre parent				
	AF	A4 (♂)	A11 (♂)	A15 (♂)	S40 32.1 (♀)
A1	15				490
A2	26;0	0	0	284	348;433
A3	0	2	28		
A4	0	0	8;0		531
A5	0;0	42	0	495	405
A6	0;0	10	0		
A7	0;8		10		
A8	12;2	0	0	293	
A9	0				
A10					430
A11	0;0	19		327;410	326
A12	0;4				
A13	0				
A14	0		0		324
A15	343;314;380				290;387
A16	0			370	395
A17	0;39				

**Tableau III.** Valeurs des mesures de densité optique à 525 nm d'extraits alcooliques de pétales de 9 dérivés embryogénétiques H 3059.7 et de leurs hybrides relatifs par le testeur S 4032.1.

Embryons	DO (plantes Em)	DO (4032.1 x Em)
A11	0,306	0,366
A2	0,331	0,404
A14	0,366	0,862
A1	0,507	0,860
A5	0,586	1,749
A10	0,862	1,552
A15	1,040	1,928
A4	1,378	2,701
A16	1,520	2,550

nisme monofactoriel (pollen S\* capable de germer sur tout stigmate S x S\*) rend compte de cette ségrégation 1/1 ( $\chi^2 = 0,64$ ).

### Deuxième cycle d'embryogenèse

La plante A1 bicolore ( $DO_{525} = 0,507$ ) donne 2 dérivés bicolores et 7 rouge foncé. La moyenne des densités optiques de ces 9 plantes est évaluée à 1,022 et l'écart type  $\sigma^2 = 0,624$ . Ce résultat rappelle beaucoup celui enregistré avec le donneur originel H3059-7.

La plante A4 rouge ( $DO = 1,378$ ) ne donne pas de bicolore typique. La valeur moyenne des DO des 19 EmII issus de A4 est estimée à 1,385, donc égale à celle du donneur; cependant la variation autour de cette moyenne reste élevée :  $\sigma^2 = 0,589$ .

### DISCUSSION

Les disjonctions et les nets effets d'inbreeding observés chez les descendances autofécondées et consanguines de A15 prouvent que cette plante ne provient pas de pollen réduit.

L'hypothèse selon laquelle, certaines plantes Em proviendraient de noyaux spermatiques non réduits pourrait alors être formulée; la renoncule présente en effet des grains de pollen de taille très hétérogène.

Cependant :

— les anthères qui engendrent des embryons Em sont généralement indéhiscents, aucun pollen n'est visible dans leur voisinage ou à leur sur-

face; par contre, lorsque par écrasement, s'échappe du pollen qui entoure l'anthère nous n'avons jamais observé d'embryons (peut-être le stade de prélèvement est-il alors trop tardif).

— les plantes C provenant de l'intérieur de l'anthère sont presque toujours très peu vigoureuses et stériles, plusieurs sont haploïdes ( $n = 8$ ) et donc issues obligatoirement du pollen réduit. L'absence totale d'haploïdes ou d'haploïdes doublés parmi les plantes provenant de la surface de l'anthère exclut une origine pollinique de ces plantes Em.

— Les noyaux spermatiques non réduits devraient faire apparaître des structures homozygotes SxSx, SySy et en conséquence des combinaisons consanguines intercompatibles (SxSx x SySy; SxSx x SxSy...) qui n'ont jamais été observées.

Compte tenu de tous ces faits, seule l'origine somatique des plantes Em est vraisemblable et la variation relatée est d'origine somaclonale.

Les caractères nouveaux sont stables et se transmettent sexuellement par la voie mâle, ils sont donc probablement portés par l'ADN nucléaire. C'est le cas en particulier du système d'auto-incompatibilité. Plusieurs auteurs ont déjà relaté des mutations d'allèles S après culture *in vitro* d'anthères : Cappadocia *et al* (1986) chez *Solanum chacoense*, Sree Ramulu (1982) chez *Lycopersicon peruvianum*. Dans nos essais le comportement de la plante diploïde A15 et de ses descendants s'interprète bien par une mutation d'un allèle S en une forme d'autofertilité.

Sree Ramulu (1982) remarque également que la fréquence des altérations au locus S est très élevée chez les plantes provenant d'anthères, nulle chez les plantes issues d'entre-nœuds de tiges. Une telle incidence de l'organe d'origine sur l'importance de la variation somaclonale est soulignée par d'autres auteurs; ainsi Khalid *et al* (1989) montrent que chez *Chrysanthemum morifolium* les pétales régénèrent des plantes beaucoup plus diversifiées que les feuilles. Dans le cas de la renoncule, les plantes régénérées à partir de tronçons de thalamus sont conformes à leur donneur (et en particulier S7002-6) (Meynet et Duclos, 1990a), au contraire les plantes provenant d'anthères par embryogenèse somatique révèlent une très grande variation.

L'importance considérable de la variation décrite chez cette espèce suggère l'existence d'un phénomène de transposition. Contrairement aux exemples fameux d'éléments transposables affectant un gène de synthèse anthocyanique et

se manifestant spontanément par le phénotype de bigarrure (Nevers *et al*, 1986), la renoncule posséderait des éléments transposables qui seraient activés dans les tissus somatiques de l'anthere (épiderme) peut-être sous l'influence de la culture *in vitro* ou du traitement à la chaleur, mais qui resteraient inactifs dans le thalamus. De plus, il existerait une relation entre la présence d'un élément transposable susceptible d'affecter l'intensité et la répartition pigmentaire et le caractère bicolore du génotype donneur.

Nous devons remarquer enfin que seul le donneur hétérozygote S7002-6 a fait apparaître des plantes dérivées acyaniques ou à cyanidine correspondant à une perte fonctionnelle des allèles dominants A et Dp. Cette observation suggère une relation probable entre la production de variants et l'état hétérozygote du matériel de départ.

## CONCLUSION

La culture *in vitro* d'anthere révèle chez la renoncule une variation somaclonale extrêmement spectaculaire. Bien que son déterminisme ne soit pas connu, le phénomène est très intéressant pour le sélectionneur :

— les caractères nouveaux apparus sont stables et héréditaires, les variants peuvent donc être exploités immédiatement, soit comme cultivar, soit comme géniteur.

— la variation ne semble pas aléatoire; par exemple seules les plantes bicolorées ont donné une très grande variation de coloris. L'extrapolation de cette observation à l'ensemble de l'espèce et à d'autres espèces ornementales qui

présentent le même phénotype bicolore serait d'un intérêt évident.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions E Berthélé pour son aide technique et F Pécate qui a participé à ce travail dans le cadre d'un stage de fin d'étude de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse.

## RÉFÉRENCES

- Cappadocia M, Cheng DSK, Ludlum-Simonette R (1986) Self-compatibility in doubled haploids and their F1 hybrids, regenerated *via* anther culture in self-incompatible *Solanum chacoense* Bitt *Theor Appl Genet* 72, 66-69
- Khalid N, Davey MR, Power JB (1989) An assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium*: the generation of plants of potential commercial value. *Sci Hortic* 38, 287-294
- Meynet J (1974) Travaux d'amélioration de la renoncule. Eucarpia, Fréjus 5-6 mars 1974, 4-17
- Meynet J, Duclos A (1990a) Culture *in vitro* de la renoncule des fleuristes (*Ranunculus asiaticus* L) I. Néof ormation et multiplication végétative *in vitro* de plantes à partir de tronçons de thalamus. *Agronomie* 10, 157-162
- Meynet J, Duclos A (1990b) Culture *in vitro* de la renoncule des fleuristes (*Ranunculus asiaticus* L) II. Production de plantes par culture *in vitro* d'anthers. *Agronomie* 10
- Nevers P, Shepherd NS, Saedler H (1986) Plant transposable elements. *Adv Bot Res* 12, 103-203
- Sree Ramulu K (1982) Genetic instability at the S locus of *Lycopersicon peruvianum* plants regenerated from *in vitro* culture of anthers : Generation of new S specificities and S allele reversions. *Heredity* 49, 319-330