

Culture *in vitro* d'étamines d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) — II — Etablissement de cultures de tissus et organogénèse ⁽¹⁾

J.-P. MARTIN (2) et H. RABÉCHAULT (2)

Résumé : Des étamines d'arachide, cultivées *in vitro*, produisent des cals de tissus différenciés constitués de cellules : haploïdes, diploïdes (85 p. 100) et polyploïdes. La différenciation débute le plus souvent à la base du filet ou du connectif de l'an-thère. La division du pollen semble bloquée dès le prélèvement comme chez d'autres Légumineuses (Lotier) car elle n'a été observée qu'une seule fois. Le meilleur milieu nutritif, pour la croissance des cals, renferme du 2,4-D, de l'ANA et de la kinétine à la concen-tration de 2.10⁻⁶ chacun. L'organogénèse a été peu importante ; des plantules grêles, en majorité albinos, ont été produites en pré-sence de lait de coco.

Mots clés : Arachide, Culture de tissus, Etamines, Physiologie cellulaire, Organogénèse, Substances de croissance.

La culture des étamines *in vitro* est à présent une technique courante utilisée pour l'amélioration des plantes ; elle a donné lieu à de nombreuses publications [voir Sunderland, 35]. Nous en avons énuméré les avantages dans l'article précédent [Martin *et al.*, 22] et, parmi ceux-ci, l'obtention d'haploïdes.

Cependant, si les solanées en général permettent d'obtenir facilement des cultures de tissus et des plantules diploïdes ou haploïdes, à partir des tissus de l'an-thère ou du pollen, il n'en est pas de même pour les autres familles. A l'intérieur de certains genres on a remarqué des espèces ou même des variétés prédis-posées et d'autres totalement réfractaires [Niizeki et Oono, 26]. Iyer et Raina [15], par exemple, n'ont eu des plantules haploïdes qu'avec les anthères d'une seule variété de riz sur 15.

La famille des Légumineuses, qui nous intéresse ici, ne compte pas malheureusement parmi les plus douées. Cependant, des cultures de tissus diploïdes ont été obtenues par divers auteurs à partir d'organes végé-tatifs. Citons : la fève et le haricot par Liau et Boll [20], le soja par Blaydes [3], le fenugrec par Subramaniam *et al.* [36], le petit pois par Torrey [37], Torrey et Shigemura [38], Gamborg *et al.* [6], la luzerne par Clement [4], Graham [9] et Saunders et Bingham [34], le niébé (*Vigna unguiculata* L.) par Padmanabhan *et al.* [30] et par Subramaniam *et al.* [36], le *Trifolium repens* L. par Pelletier et Pelletier [31], le *Trifolium subterraneum* L. par Graham [9].

La culture d'an-thères en vue de la production d'haploïdes n'a été tentée que chez quelques genres de Légumineuses. Il n'a pas été possible de provoquer la formation de cals et de plantules haploïdes à partir des étamines de lotiers (*Lotus corniculatus* L. et *L. caucasicus* Kupr.) [Niizeki et Grant, 25] ou de luzerne [Saunders et Bingham, 34]. Chez les lotiers, la division du pollen était bloquée dès le prélèvement des étamines et les plantules di-, tétra-, poly- ou aneuploïdes étaient originaires des autres tissus. De même, plus récemment, Ivers *et al.* [14] n'ont pas eu plus de succès avec les étamines de soja.

En ce qui concerne l'arachide, des cultures de tissus ont été réalisées en utilisant du parenchyme foliaire par Ball et Joshi [2, 16, 17] et Jullien [18]. Ces tissus se développent très bien *in vitro*. Ils peuvent donner des protoplastes et des cellules isolées dont la culture est relativement facile. Ils sont capables d'assurer la fonction chlorophyllienne. C'est pourquoi Verma, van Huystee *et al.* [13, 40, 41, 42, 43] ont utilisé ce matériel pour leurs études sur le métabolisme. Mais Joshi et Ball [16] ont signalé qu'ils avaient été inca-pables de provoquer la différenciation et l'organogénèse de ces tissus en faisant varier le rapport auxines/cytokinines.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel végétal utilisé, sa provenance, son mode de culture ont été définis dans l'article précédent [22]. De même, nous avons décrit cinq stades de développe-ment des boutons floraux en relation avec l'évolution du pollen des étamines. De ces cinq stades, trois seulement ont été utilisés en raison de leur importance physiologique.

a) Les boutons les plus jeunes, fusiformes verts, de quelques millimètres, correspondant aux stades 2 ou 3 précédemment décrits, ce dernier ayant des étamines dont le pollen est au stade tétrades.

b) Les boutons verts, piriformes, dits « de l'avant-veille », correspondant au stade 4. Leur section trans-versale est arrondie et leurs étamines renferment du pollen mononucléé en forme de ballon de rugby.

c) Les boutons jaunes, aplatis latéralement, dits « de la veille » de l'an-thèse, et qui correspondaient au stade 5. Leur section transversale est elliptique. Le pollen de leurs étamines est binucléé.

Selon les divers auteurs, le passage du pollen mononucléé (stade 4) au pollen binucléé (stade 5) est très important, car c'est à ce moment que peuvent se poursuivre les divisions permettant d'aboutir à une colonie cellulaire, puis à un embryon ou à un cal haploïde. Le terme de passage est difficile à contrôler chez l'arachide car, en période chaude et ensoleillée, il peut s'effectuer en quelques heures, de sorte qu'on trouve alors une certaine proportion de pollen binucléé dans les étamines des boutons de l'« avant-veille » (stade 4).

Les boutons floraux étaient prélevés de préférence dans la matinée, période pendant laquelle les plantes présentaient le maximum de turgescence. Ils étaient ensuite désinfectés avant le prélèvement des étamines. Plusieurs méthodes ont été essayées. Celle ayant donné les meilleurs résultats comporte un traitement de 20 à 30 mn par le chlorure mercurique à 0,1-0,2 p. 100 suivi de 3 rinçages à l'eau distillée stérile.

Nous avons observé que les pourcentages de conta-mination étaient d'autant plus importants que les boutons étaient plus âgés (Tabl. I).

TABLEAU I

Stades du développement	Expérience I p. 100	Expérience II p. 100
Boutons jeunes, stade 2-3....	49	18
Boutons de l'« avant-veille »..	71	40
Boutons de la « veille ».....	92	54

17 MAI 1978

(1) La première partie a été publiée dans *Oléagineux*, 29, n° 3 (mars 1974).
(2) Laboratoire de Physiologie végétale des Services scientifiques centraux de l'O. R. S. T. O. M. (70, route d'Aulnay, 93140 Bondy).

O. R. S. T. O. M. Ex 1
Collection de Référence
B n° 2220 Bio Amel

Une amélioration très spectaculaire a été apportée en trempant les boutons dans l'alcool éthylique à 70° pendant 1 mn, avant de procéder à la désinfection par le chlorure mercurique, au cours de laquelle nous avons appliqué à deux reprises un vide modéré. Sur 500 boutons floraux disséqués, 10 p. 100 seulement pour les trois stades considérés furent contaminés.

Dans le but de produire une réorientation des divisions nucléaires lors du passage du pollen mononucléé au pollen binucléé et d'augmenter ainsi les chances de production de colonies cellulaires haploïdes, nous avons, à l'exemple de Nitsch et Noreel [29], soumis les étamines ensemencées à un froid relatif de + 6 °C pendant 48 h.

Dans le même but de provoquer un choc physiologique pour déclencher la division et la prolifération cellulaire à partir du pollen nous avons, comme Gresshoff et Doy [10], soumis les anthères à l'action de la lumière continue pendant les premières 24 h suivant l'ensemencement.

Réipients de culture.

Nous avons utilisé plusieurs sortes de réipients en verre : tubes 24 × 160 mm avec capuchon, erlenmeyers, fioles cylindro-coniques, flacons à vis, etc. Ceux qui nous ont donné le plus de satisfactions, parce que peu profonds, sont les petits flacons de 15 ou 30 ml obturés avec un bouchon à vis en aluminium.

Milieux de culture.

Pour cette première approche, il n'a pas été mis au point de milieu minéral particulier. Les solutions, diluées ou non, utilisées sont celles trouvées dans la littérature relative à la culture des étamines : Knop, White [selon Gautheret, 8], Hildebrandt, Riker et Duggar [12], Murashige et Skoog [24] et Miller « b » selon Blaydes [3]. Après plusieurs expériences, c'est cette dernière formule que nous avons adoptée en définitive.

Les oligo-éléments ont été apportés selon la formule de Murashige et Skoog modifiée par Nitsch *et al.* [28] et le fer sous forme d'EDTate à la dose préconisée par Murashige et Skoog (*loc. cit.*).

Diverses formules de compléments (vitamines, acides aminés, etc.) ont été essayées : Nitsch *et al.* [28], Kameya et Hinata [19] et surtout Dulieu [5].

La dédifférenciation et la différenciation ont été induites et stimulées grâce à l'utilisation de divers régulateurs de croissance seuls ou en mélanges en proportions diverses. Citons, les auxines : l'acide β indole acétique (AIA) à la concentration 0 à $4 \cdot 10^{-6}$, l'acide α naphthalène acétique (ANA) 0 à $2 \cdot 10^{-5}$, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) 0 à $2,5 \cdot 10^{-6}$; diverses cytokinines : la kinétine (kin.) 0 à $1,5 \cdot 10^{-5}$, la 6-benzylaminopurine (BAP) 0 à 10^{-6} , la 6-diméthylallylaminopurine (DMAAP) 0 à 10^{-5} ; la gibbérelline (GA_3) 0 à 10^{-5} , le sulfate d'adénine 40 mg/l et des extraits naturels : le lait de coco (LC) 10 à 20 p. 100, l'extrait de levure Difco 500 à 2 500 mg/l et l'hydrolysate de caséine enzymatique 500 mg/l.

Nous avons également fait varier la proportion de saccharose de 20 à 100 p. 1 000 et essayé le glucose.

Nos milieux constituent finalement un certain nombre de variantes autour de formules utilisées par des auteurs ayant cultivé avec un certain succès des étamines de Solanées, Graminées, Légumineuses... [Saunders et Birgham, Nizeki *et al.*, Abo El Nil et Hildebrandt, Picard et de Buiyser, Gresshoff et Doy, etc...].

Le pH était ajusté à 6,0 avant l'addition de 8 à 10 p. 1 000 de Bacto-Agar Difco nécessaire à la solidification du milieu. Quelques essais ont été effectués en rendant le milieu semi-solide avec seulement 2,5 p. 1 000 d'Agar.

Après distribution dans les réipients, ces derniers ont été autoclavés 20 mn à 120 °C. Cependant certaines substances thermolabiles ont été stérilisées par filtration et ajoutées après autoclavage. Afin de déclencher la différenciation après une période de dédifférenciation, diverses méthodes ont été suivies : les étamines et

leurs cals ont ainsi été transférés sur des milieux de compositions différentes dans lesquels la balance auxines-cytokinines était inversée. Imitant Gresshoff et Doy [10] les tissus, après un certain temps de culture en présence d'ANA 10^{-5} + Kinétine $4 \cdot 10^{-8}$, ont été transférés sur un milieu renfermant ANA $5 \cdot 10^{-7}$ + Kin. $5 \cdot 10^{-6}$. Nous avons également expérimenté pour des cultures déjà âgées le passage des cals sur AIA $4 \cdot 10^{-6}$ + Kin. $15 \cdot 10^{-6}$.

Conditions de culture.

La température de la salle de culture était de $27^{\circ} \pm 0,5$ °C. En général la dédifférenciation ayant eu lieu à l'obscurité, les cultures ont été transférées à la lumière en vue de stimuler la différenciation. Elles étaient alors placées sous des tubes fluorescents « Gro lux » de 40 W Sylvania, qui dispensaient un éclairage de 7 000 lux au niveau des explants pendant 10 h par jour.

RÉSULTATS

A. — Formation de cals.

La production d'un cal ou la tuméfaction générale de l'étamine (Fig. 3 et 4) sont les premiers signes extérieurs de la dédifférenciation cellulaire. La tuméfaction générale était un phénomène peu répandu dans nos cultures. Par contre très rapidement dans les premiers 15 jours suivant l'ensemencement, un petit cal prenait naissance à l'extrémité sectionnée du filet de l'étamine. La formation de ce petit cal ferme et blanc était d'autant plus précoce que l'étamine était plus jeune. Il prenait rapidement un développement considérable au point de déborder le reste des tissus apparemment intacts de l'étamine. Bientôt l'anthère était complètement englobée, alors qu'elle n'avait semble-t-il pas sensiblement évolué.

Nous avons donc décidé d'éliminer ces cals primaires ainsi que le reste du filet non encore dédifférencié, ce qui était très facile à ce stade, de manière à ne laisser sur le milieu de culture que l'anthère. Dans ce cas, c'est le connectif qui prenait le relai et qui commençait à augmenter considérablement de volume alors que les loges de l'étamine n'évoluaient pas ou très peu (Fig. 2). L'étude cytologique a permis de confirmer la division active des cellules du connectif, alors que les autres parties de l'anthère ne se modifiaient pas.

Ce qui étonne le plus c'est la diversité des formes, des couleurs et de consistance des cals obtenus. On doit à notre avis en chercher l'origine dans la multiplicité des tissus de l'étamine à partir desquels ils se forment. Mais nous avons également observé que ces différents caractères étaient en relation avec la composition du milieu de culture.

Précisons tout d'abord que la nature, la proportion et la concentration des sels minéraux n'ont guère eu d'influence. Il n'en a pas été de même des auxines et des cytokinines. Les témoins sans auxine ni cytokinine ont eu un très faible développement et le plus souvent sont devenus brun foncé et sont morts (Fig. 5). La kinétine seule fait brunir encore davantage et plus rapidement lorsque la dose dépasse un certain niveau (cals d'aspect brun-roux sec), alors que l'auxine sans cytokinine donne des cals en forme de cratère dont le pourtour en couronne était plus ou moins brun et le centre vert mélangé d'îlots blanchâtres. Ces cals constituaient une forme caractéristique en « assiette » assez régulière dont la surface sèche était finement granulée, ou veloutée.

Le meilleur développement a été obtenu lorsqu'une auxine et une cytokinine étaient présentes dans le milieu. L'association de l'ANA avec une cytokinine provoque une prolifération active des cellules du cal en tous sens. Les tissus prennent un aspect humide très lâche, sans consistance, de sorte que ces cals peuvent s'étaler très facilement comme une crème. Les plus clairs sont ceux obtenus avec les mélanges ANA-BAP en bonnes proportions ; ce sont ceux qui prolifèrent aussi avec le

plus de rapidité (Fig. 6) ; ils remplissent très vite toute la surface disponible du milieu dans le tube de culture. Certains ont parfois une coloration vert pâle ; ils sont capables de biosynthétiser de la chlorophylle.

L'addition de 2,4-D aux mélanges précédents a pour résultat de rendre les tissus plus fermes ; l'aspect devient sec, le cal prend la forme en « assiette » décrite précédemment, sa structure est dense et dure, la surface est veloutée et finement granuleuse le plus souvent verte en son centre.

Les colorations étaient donc très variées allant du blanc au brun en passant par le jaune et le vert, selon l'origine des tissus et la composition du milieu ; et la consistance était en rapport avec la présence ou non d'auxines et de cytokinines dans le milieu. Ces tissus peuvent verdifier donc synthétiser de la chlorophylle comme ceux obtenus par Ball [1], Joshi et Ball [16 et 17], Jullien [18], Verma, Van Huystee *et al.* [13, 40, 41, 42, 43] à partir du mésophylle des feuilles de l'arachide. Qui dit synthèse de chlorophylle, donc présence de chloroplastes, dit retour des cellules vers la spécialisation, donc vers la différenciation.

B. — Comportement des cultures de tissus dédifférenciés.

La croissance des différentes souches de tissus varie considérablement pour un matériel de même âge ; la durée du cycle de culture influence aussi le développement ultérieur. A partir d'une même souche nous avons souvent observé entre les descendants des différences très importantes dans l'aspect et la vitesse de croissance. Les cultures de tissus obtenues à partir d'un seul tissu, comme le parenchyme palissadique des feuilles par les auteurs précités, étaient certainement un matériel moins varié et plus stable. Cependant nos observations, qui ont porté sur un grand nombre de cultures (nous avons fait une quinzaine d'expériences et la dernière comportait plus de 800 flacons), nous ont permis de préciser les proportions d'auxine et de cytokinine qui assurent une croissance optimale.

Nous décrirons successivement les effets principaux de la concentration des milieux en sucres, en auxines et cytokinines.

1) Effets de la concentration en sucres.

Plusieurs auteurs ont fait état de l'effet bénéfique de fortes concentrations en sucre pendant la phase de dédifférenciation aussi bien que dans celle intéressant la différenciation et l'organogénèse.

L'augmentation de la teneur en saccharose a retardé la formation des cals (Tabl. II) et ralenti leur croissance. Mais, comme nous le verrons plus loin, l'effet final des doses élevées est nettement positif à la condition de revenir au niveau 20 p. 1 000 pour la différenciation.

TABLEAU II. — Effet de la concentration en saccharose sur le pourcentage d'étamines ayant formé des cals après 30 jours de culture (p. 100 calculés sur 210 étamines par variante)

Régulateurs de croissance (concentration 10 ⁻⁶ chacun)	Saccharose p. 1 000		
	20	60	100
2,4-D	5	0	0
ANA + Kin.	50	41	35
ANA + 2,4-D + Kin. (*)	57	47	19

(*) A titre de comparaison cette formule ANA + 2,4-D + Kin. utilisée en présence de 30 p. 1 000 de glucose a permis la formation de cals à partir de 22 p. 100 des étamines.

2) Effets des auxines et cytokinines.

Plusieurs expériences ayant pour but de provoquer et d'accélérer la dédifférenciation des tissus des étamines ont été effectuées en tenant compte des données recueillies dans la littérature. Elles nous ont amené à retenir des concentrations supérieures ou égales à 10⁻⁶ pour les auxines et 10⁻⁷ pour les cytokinines et à expérimenter, en présence de plusieurs concentrations en saccharose, des formules variant autour de celle utilisée par Saunders et Bingham [34] pour la luzerne (2,4-D 2.10⁻⁶ + ANA 2.10⁻⁶ + Kin. 2.10⁻⁶).

Figures 1 à 16 :



1. — Etamines, avec cu sans filet, destinées à l'ensemencement.
2. — Anthères tuméfiées après 80 j de culture : l. loge, c. connectif tuméfié.
- 3 et 4. — Etamines entièrement tuméfiées.
5. — Cal d'anthere (connectif) sans auxine ni cytokinine.
6. — Même tissu que la figure précédente mais milieu de base M. S. additionné d'ANA 10⁻⁶ et de BAP 10⁻⁷. Après 35 j de culture les tissus emplissent le tube.
7. — Cal organogène issu d'une anthere cultivée sur milieu de Miller « b » : dédifférenciation 30 j en présence de glucose 30 p. 1 000, kin. 2.10⁻⁶, ANA 2.10⁻⁶ et 2,4 D 2.10⁻⁶ (formule de Saunders) et 57 j de différenciation sur le même milieu minéral additionné de saccharose 20 p. 1 000 avec suppression du 2,4 D et diminution de la kinétine.
8. — Organogénèse après 100 j de culture sur milieu de Miller « b » additionné de saccharose 20 p. 1 000, d'ANA 2.10⁻⁶ et de kinétine 2.10⁻⁶.
9. — Plusieurs anthères placées sur un milieu gélosé incliné M. S. 1/2 + 2,4 D 10⁻⁶ + BAP 10⁻⁷. Après 80 j de culture on remarque un cal en organogénèse : p = pseudo-pousse, r = racines. Les cals qui n'ont pas évolué ont souvent brunis.
10. — Plantules grêles obtenues au bout de 120 j de culture sur milieu additionné de lait de coco (15 p. 100).

11 à 16. — Explications dans le texte. Dans les tissus en différenciation on trouve des groupes de cellules : haploïdes n = 20, diploïdes 2n = 40 ou polyploïdes.

(Grossissements : Fig. 1 à 4 x 3 ; Fig. 5 à 10 x 1 ; Fig. 11 à 16 x 900)

Le 2,4-D seul (2.10^{-6}) a eu relativement peu d'effet et les cals sont devenus bruns, ce qui explique peut-être le peu d'influence de cette auxine dans les processus de réjuvenation que nous avons tentés par ailleurs. La kinétine a toujours provoqué un fort brunissement. L'addition d'ANA 2.10^{-6} à un milieu renfermant 2.10^{-6} de kinétine a donné des cals plus clairs, plus friables et une meilleure croissance. L'addition de 2,4-D à ce mélange a permis un développement plus important des cals, dont la couleur est encore devenue plus claire.

Il apparaissait donc : que le milieu préconisé par Saunders et Bingham [34] était l'un des meilleurs, mais qu'il fallait l'adapter aux exigences des tissus de l'arachide, que l'auxine seule ne suffisait pas, et que la dose de cytokinine était certainement trop importante. C'est ce qui ressort d'ailleurs d'une expérience dans laquelle nous avons comparé les effets de l'AIA ou de l'ANA (0 à 10^{-6}) utilisés seuls ou en mélange avec de la kinétine ou de la benzylaminopurine (0 à 10^{-6}), soit au total 25 combinaisons.

La croissance des cals (volume) au bout de 5 semaines est traduite par les figures 17 à 22. On remarque (Fig. 17, 20) le faible rendement obtenu avec les 2 auxines sans cytokinines (Fig. 17) ou avec les 2 cytokinines sans auxines (Fig. 20). Les combinaisons auxines-cytokinines donnent de meilleurs résultats, mais l'effet de l'AIA (Fig. 18, 21) est nettement moins bon que celui de l'ANA (Fig. 19, 22), auxine avec laquelle l'accroissement dépasse les 200 p. 100. De même, en présence d'AIA (Fig. 21) et d'ANA (Fig. 22) la benzylaminopurine donne de meilleurs rendements que la kinétine aux doses utilisées. Ces résultats ont fait l'objet d'une analyse statistique : la lettre s indique sur ces figures les valeurs qui se sont montrées significativement différentes pour une probabilité d'erreur de 5 p. 100. La comparaison des moyennes deux à deux à l'aide du test de Keuls a permis de confirmer l'impression recueillie par le seul examen des graphiques, et d'arriver aux conclusions suivantes :

a) L'effet global moyen de l'ANA est très significativement supérieur à celui de l'AIA, et celui de BAP significativement supérieur à celui de la kinétine.

b) En l'absence d'auxine, 10^{-7} de Kin. ou de BAP ont un effet positif significatif ; 10^{-6} de kinétine est une dose limite ou excessive.

c) En présence d'auxine, la dose 10^{-7} de cytokinine a un effet accru lorsque la teneur en auxine passe de 10^{-7} à 10^{-6} . Mais si l'on augmente la dose de cytokinine celle-ci n'est favorable que pour BAP en présence d'AIA ou d'ANA 10^{-7} ; elle est dépressive dans les autres combinaisons.

d) La combinaison de BAP 10^{-7} et d'ANA 10^{-6} est la meilleure. Elle est significativement supérieure à toutes les autres mais comme elle ne marque pas la limite en ce qui concerne l'auxine, il est permis de penser qu'une augmentation de cette dernière peut encore améliorer le rendement. C'est ce qui a été constaté dans d'autres essais.

3) Prolongation de l'effet des fortes doses de sucres et d'auxines.

Lorsque les cals ont été cultivés en présence de fortes doses de sucres ou d'auxines pendant la phase de dédifférenciation, les effets de ces substances se sont prolongés pendant la phase de différenciation, alors que leur teneur avait été diminuée. En ce qui concerne la teneur en sucres, les étamines ont été ensemencées sur des milieux renfermant 20, 60 ou 100 p. 1 000 de saccharose auxquels on a ajouté : soit du 2,4-D, soit de l'ANA et de la kinétine, soit du 2,4-D, de l'ANA et de la kinétine chacun à la dose 2.10^{-6} . Après 4 semaines les étamines ont été transférées sur des milieux de différenciation dans lesquels le niveau d'auxine avait été abaissé et celui de la kinétine élevé, la teneur en saccharose étant ramenée à 20 p. 1 000. Au bout de 4 semaines de culture sur ces milieux, nous avons observé les croissances consignées dans le tableau III.

TABLEAU III. — Prolongation de l'effet de fortes doses de saccharose utilisées au cours de 4 semaines de dédifférenciation (augmentation de la croissance p. 100 sur le milieu de différenciation en présence de 20 p. 1 000 de saccharose)

Régulateurs de croissance (concentration 2.10^{-6} chacun)	Teneur des milieux de dédifférenciation en saccharose p. 1 000		
	20	60	100
2,4-D	34	44	64
ANA + kinétine	89	117	112
2,4-D + ANA + Kin.	178	235	222

Lorsque les cals provenaient des milieux avec 2,4-D seul, les augmentations de croissance étaient donc en rapport avec celle de la teneur en sucre du milieu de dédifférenciation, mais pour les deux mélanges ANA + Kin., plus favorables à la croissance, l'optimum était déjà atteint lorsque les explantats provenaient de milieux ayant renfermé 60 p. 1 000 de saccharose. On remarquera l'effet de synergie provoqué par l'addition de 2,4-D au mélange ANA + Kin. du milieu de dédifférenciation.

La teneur 60 p. 1 000 de saccharose des milieux de dédifférenciation, malgré le ralentissement de la croissance constaté au départ de la mise en culture des étamines, nous a semblé la plus favorable à une organogenèse ultérieure. L'effet bénéfique de cette concentration se fait sentir lorsque les tissus sont différenciés ensuite en présence de 20 p. 1 000 de saccharose ; leur transfert sur des milieux riches en sucres a été néfaste.

L'effet des fortes concentrations en régulateurs de croissance utilisées pendant la dédifférenciation s'est également prolongé chez les explantats transférés sur des milieux dans lesquels ces concentrations avaient été diminuées pour favoriser l'organogenèse. Des explantats, cultivés en présence des trois combinaisons d'auxines et cytokinine de l'essai précédent, ont été transplantés sur des milieux pauvres en auxine. Au bout de 4 semaines, l'accroissement de leur volume était de 15 p. 100 pour les milieux avec 2,4-D seul, 54 p. 100 avec ceux renfermant de l'ANA + Kin. et 115 p. 100 sur ceux avec 2,4-D + ANA + Kin.

C. — Différenciation et organogenèse.

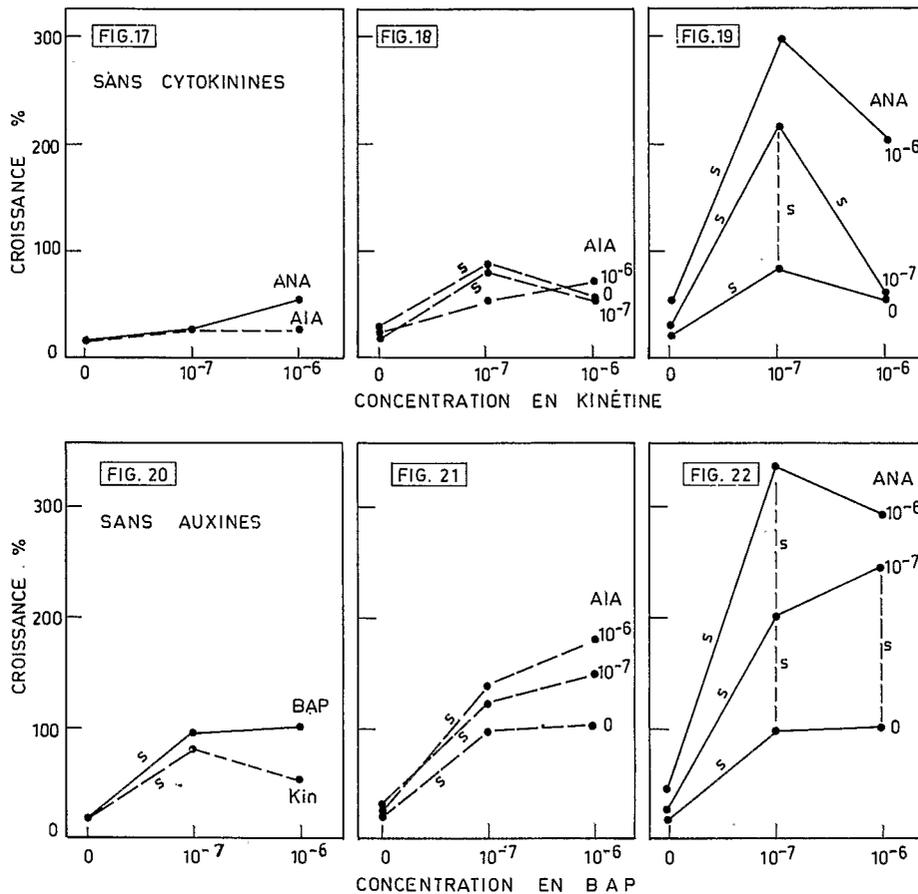
La faculté d'organogenèse des tissus dédifférenciés n'a jamais été très importante (3 à 5 p. 100). Ce sont les étamines des boutons les plus jeunes, au stade 4 (boutons de « l'avant-veille ») qui ont donné les meilleurs résultats.

L'apparition précoce de racines, en relation avec la vigueur des cals, indique que les possibilités d'organogenèse de ces tissus sont de courte durée. D'ailleurs leur culture prolongée au-delà de 3 mois sur des milieux riches en auxines et pauvres en cytokinines fait disparaître complètement cette faculté. Des cals soumis à une dédifférenciation prolongée (plus de 2 mois) ont produit uniquement des racines qui ont eu une croissance limitée : ces racines ont survécu plusieurs mois, puis les plus fines se sont desséchées, tandis que les autres ont été le plus souvent englobées par le foisonnement des cellules du cal.

1) Effets de divers traitements et substances.

Les facteurs physiques : température, chocs de température, passage de l'obscurité à la lumière n'ont pas donné les résultats escomptés. La culture en lumière continue a cependant légèrement amélioré l'organogenèse par rapport aux cultures faites entièrement à l'obscurité.

Aucune conclusion valable n'a pu être dégagée des expériences mettant en jeu divers milieux minéraux.



Figures 17 à 22.

La concentration en sucres est importante à considérer. La teneur 20 p. 1 000 de saccharose habituelle ayant été portée à 60 p. 1 000 dans le milieu de différenciation, nous avons obtenu ensuite trois fois plus de pousses et de racines sur le milieu de différenciation avec 20 p. 1 000 de saccharose.

Le sulfate d'adénine (30 à 60 mg/l) n'a eu aucun effet. L'acide citrique (50 mg/l), utilisé comme le préconisent Loewenberg et Skoog [21], afin de lever l'inhibition éventuelle de la formation des bourgeons imputable en partie à l'auxine, s'est montré néfaste. L'acide gibbérellique ajouté aux milieux de différenciation, en vue de « réveiller » les méristèmes éventuels, a eu tendance à augmenter le brunissement des tissus et n'a pas amélioré l'organogenèse.

Enfin si le lait de coco n'a pas influencé la différenciation, il a par contre été bénéfique à la différenciation lorsqu'il était employé en mélange avec une ou plusieurs auxines ainsi que nous le verrons ci-après.

2) Effets des auxines et cytokinines.

Pour déclencher la différenciation et l'organogenèse, la plupart des auteurs conseillent de diminuer ou même de supprimer les auxines et d'augmenter éventuellement la teneur en cytokinines. Ainsi Saunders et Bingham [34] pour la luzerne ont préconisé de remplacer l'auxine par 2,5 g/l d'extrait de levure. Cette opération a ralenti la croissance de nos cals et n'a pas provoqué d'organogenèse.

L'augmentation de la teneur des milieux en cytokinines (Kin. ou BAP) conformément aux résultats obtenus par d'autres auteurs [Gresshoff et Doy, 10; Abo El Nil et Hildebrandt, 1; Niizeki *et al.*, 25, 26 etc.], c'est-à-dire l'inversion de la balance auxines-cytokini-

nes au profit de ces dernières, s'est traduite par une diminution sensible de la croissance des cals. Le passage des explantats d'un milieu avec ANA 10^{-5} + Kin. $4 \cdot 10^{-8}$ sur un milieu avec ANA $5 \cdot 10^{-7}$ + Kin. $5 \cdot 10^{-5}$ n'a pas amélioré l'organogenèse et les tissus se sont colorés. Cet effet dépressif sur la croissance des cals, proportionnel à la concentration en kinétine, peut d'ailleurs être effacé par l'augmentation de la teneur du milieu en auxine (Tabl. IV). Mais si la croissance en volumé est améliorée de cette manière, elle implique davantage le poids frais que le poids sec, lequel diminue légèrement : 9,5 p. 100 pour les plus faibles concentrations en ANA et 8,0 à 8,6 p. 100 pour les plus fortes.

TABLEAU IV

Combinaisons		Croissance p. 100 après 4 semaines
ANA	Kin.	
$2,5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	65
$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	144
10^{-5}	$5 \cdot 10^{-6}$	154
$2 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-6}$	150

Contre toute attente le maximum d'organogenèse (20 p. 100 des cals) a été observé sur le milieu à forte teneur en ANA (10^{-5}) et faible teneur en kinétine ($4 \cdot 10^{-8}$).

Seuls des cals obtenus sur un milieu renfermant du lait de coco (15 p. 100), du 2,4-D ou de l'ANA ($2 \cdot 10^{-6}$) et de la kinétine (ou de la BAP) ($2,5 \cdot 10^{-6}$) ou du lait de coco (15 p. 100) et de l'ANA $5 \cdot 10^{-7}$ ont formé des

plantules grêles, et albinos pour la plupart, lorsqu'ils étaient transférés sur un milieu sans lait de coco. Ces plantules n'ont pas survécu.

3) Examen cytologique des cultures.

Des coupes effectuées dans les étamines après 15 j de dédifférenciation ont permis de confirmer les observations morphologiques : les cals avaient le plus souvent pour origine le filet ou le connectif, et plus rarement les cellules de la paroi des loges dans le cas de la tuméfaction généralisée de l'étamine (Fig. 3 et 4).

Nous n'avons observé la division de grains de pollen qu'une seule fois sur plusieurs centaines d'examen. Nos observations sont donc identiques à celles faites sur les étamines de soja par Ivers *et al.* [14] et sur les étamines de lotier corniculé par Niizeki et Grant [25]. Chez le lotier, grâce à l'utilisation de ¹⁴C-thymine, ces derniers auteurs ont montré que la biosynthèse des acides nucléiques était bloquée dès que l'étamine était séparée de la plante.

Le fait que nous n'ayons presque jamais rencontré de pollen en division explique la rareté des cellules haploïdes dans les cals, les pousses et les racines (Fig. 11) et la grande fréquence (85 p. 100) des tissus et organes diploïdes : $2n = 40$ (Fig. 12 et 13). Il a été rencontré très peu de cellules polyploïdes dans les organes néoformés, mais nous en avons observé plus de 20 p. 100 dans les tissus des cals : $3n = 60$, $5n = 100$ et même $6n = 120$ (Fig. 14, 15 et 16).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Des cals, constitués de tissus dédifférenciés, et leur organogenèse ont été obtenus à partir de cultures d'étamines d'arachide. Les étamines, provenant de boutons floraux parvenus au stade 4 de leur développement, sont celles qui ont donné les meilleurs résultats.

Le milieu de dédifférenciation le plus valable renfermait du 2,4-D, de l'ANA et de la kinétine (ou de la BAP) à la concentration de $2 \cdot 10^{-6}$ chacun. Il était identique à celui utilisé par Saunders et Bingham [34] pour les étamines de luzerne. La croissance des cals était inhibée par une trop forte quantité d'auxine ou de cytokinine dans les mélanges où il n'y avait qu'une seule auxine. Dans ce cas l'ANA 10^{-6} était supérieur à l'AIA et la BAP supérieure à la kinétine (conc. 10^{-7}).

La concentration en saccharose la plus favorable à une différenciation ultérieure était de 60 p. 1 000. Les fortes teneurs des milieux de dédifférenciation en sucre ou en auxine ont eu un effet sur la croissance des cals qui s'est prolongé après le retour des tissus sur des milieux plus pauvres (différenciation).

L'inversion de la balance auxines-cytokinines au profit de ces dernières, préconisée par la majorité des auteurs, n'a pas amélioré l'organogenèse. En présence d'ANA 10^{-5} et de kinétine $4 \cdot 10^{-8}$, 20 p. 100 des cals ont formé des organes (surtout des racines).

La plupart des extraits et des substances complémentaires ajoutés aux milieux en vue de déclencher ou de stimuler l'organogenèse : extrait de levure, hydrolysats de caséine, méso-inositol, adénine, acide citrique, gibbérelline, n'ont eu aucun effet bénéfique à l'exception du lait de coco dont nous parlerons plus loin.

Aucune amélioration non plus n'a été apportée par divers facteurs physiques (thermopériodisme, photopériodisme...). Cependant, les cultures effectuées en lumière continue ont formé 3 fois plus d'organes que celles à l'obscurité.

L'organogenèse, dans l'ensemble, a été peu importante (3 à 5 p. 100 des cals) : il s'agissait surtout de racines et plus rarement de pseudo-pousses comme celles obtenues par Ivers *et al.* [14] avec les étamines de soja. Des plantules grêles, en majorité albinos, se sont formées à partir de fragments de cals cultivés sur un milieu renfermant du lait de coco (10 à 15 p. 100) associé à un mélange de 2,4-D, d'ANA et de kinétine (ou de BAP) ou à de l'ANA $5 \cdot 10^{-7}$ puis transférés sur des milieux identiques mais sans lait de coco. Ces plantules n'ont pas survécu.

L'examen cytologique a permis de constater que les cals ont eu surtout pour origine les tissus du filet ou du connectif et plus rarement ceux des loges. Le pollen a gonflé pendant la culture mais on ne l'a vu se diviser qu'une seule fois. C'est la raison pour laquelle les tissus et organes diploïdes étaient les plus fréquents (85 p. 100). La proportion de cellules polyploïdes a cependant souvent dépassé 20 p. 100. Ces résultats rappellent ceux de Ivers *et al.* [14] sur les étamines de soja et ceux de Niizeki et Grant [25] sur celles de lotier. De plus, comme Saunders et Bingham [34] sur la luzerne nous avons obtenu des plantules albinos.

Les tissus provenant d'étamines d'arachide ont produit de la chlorophylle comme ceux du limbe des feuilles qui a servi de matériel pour l'étude du métabolisme par d'autres auteurs [Joshi et Noggle, 17 ; Jullien, 18 ; Verma, van Huystee *et al.*, 13, 40, 41, 42, 43] : c'est un indice de différenciation.

Il est certain que les nombreuses expériences que nous avons faites n'ont pas épuisé toutes les possibilités d'investigations sur ce matériel. L'organogenèse que nous avons provoquée de façon sporadique ou incomplète est l'indication que le phénomène est possible car ce qui a été obtenu une fois doit pouvoir, en principe, être répété et généralisé. Dans le domaine des cytokinines et des auxines, nous n'avons utilisé que les plus courantes dans cette première approche. Mais il en existe bien d'autres dans la panoplie des régulateurs de croissance, comme les zéatines, l'AIB, le 2,4,5-T, etc., qui mériteraient des recherches ultérieures. A noter aussi que nous nous sommes attachés à provoquer l'organogenèse des étamines d'une seule variété alors qu'il serait intéressant de s'adresser aussi à d'autres, et en particulier aux variétés sauvages, comme d'autres auteurs l'ont fait chez le tabac ou le riz.

Si l'on parvient à débloquent la division du pollen, non seulement ce matériel pourra servir à la production d'haploïdes mais aussi de plantes di et polyploïdes du fait de la présence dans les tissus de groupes de cellules avec des nombres chromosomiques différents.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ABO EL NIL M. M., HILDEBRANDT A. C. (1973). — *Can. J. Bot.*, 51, 2107-2109.
 [2] BALL E., JOSHI P. C. (1965). — *Nature*, 207, 4993, 213-214.
 [3] BLAYDES F. F. (1966). — *Physiol. Plant.*, 19, 748-753.
 [4] CLEMENT W. M. (1964). — *Amer. J. Bot.*, 51, 670, suppl.
 [5] DULIEU H. L. (1963). — *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 256, 3344-3346.
 [6] GAMBORG O. L., CONSTABEL F., SHYLUK J. P. (1974). — *Physiol. Plantar.*, 30, 2, 125-128.
 [7] GAUTHERET R. (1955). — *Ann. Biol.*, 31, 345-371.
 [8] GAUTHERET R. J. (1959). — *La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations*, 963 p. (Masson et Cie Edit.), Paris.
 [9] GRAHAM P. H. (1968). — *Phyton*, 25, 159-162.
 [10] GRESSHÖFF P. M., DOY C. H. (1972). — *Austr. J. Biol. Sci.*, 25, 259-264.
 [11] HELLER R. (1953). — *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég.*, 11^e série, 14, 1-219.
 [12] HILDEBRANDT A. C., RIKER A. C., DUGGAR B. M. (1946). — *Ann. J. Bot.*, 33, 591-597.
 [13] HUYSTEE R. B. VAN, TURÇON G. (1973). — *Can. J. Bot.*, 51, 6, 1169-1175.
 [14] IVERS D. R., PALMER R. G., FEHR W. R. (1975). — *Crop Sci.*, 14, 6, 891-893.
 [15] IYER R. D., RAINA S. K. (1972). — *Planta*, 104, 146-156.
 [16] JOSHI P. C., BALL E. (1968). — *Develop. Biol.*, 17, 3, 308-325.

- [17] JOSHI P. C., NOGGLE G. R. (1967). — *Sciences*, U. S. A., 158, 3808, 1575-1577.
- [18] JULLIEN M. (1970). — *C. R. Acad. Sci.*, Paris, D, 270, 25, 3051-3054.
- [19] KAMEYA T., HINATA K. (1970). — *Japan J. Breeding*, 20, 2, 81-87.
- [20] LIAU D. F., BOLL W. G. (1970). — *Can. J. Bot.*, 48, 1119-1130.
- [21] LOEWENBERG J. R., SKOOG F. (1962). — *Plant Physiol.*, suppl. 37, paper 915.
- [22] MARTIN J.-P., CAS S., RABÉCHAULT H. (1974). — *Oléagineux*, 29, 3, 145-149.
- [23] MURASHIGE T., NAKANO R. (1966). — *J. Hered.*, 57, 114-118.
- [24] MURASHIGE T., SKOOG F. (1962). — *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
- [25] NIIZEKI M., GRANT W. F. (1971). — *Can. J. Bot.*, 49, 2041-2051.
- [26] NIIZEKI H., GONO K. (1968). — *Proc. Jap. Acad.*, 44, 554-557.
- [27] NITSCH C. (1974). — *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 278, 8, 1031-1034.
- [28] NITSCH J. P., NITSCH C., HAMON S. (1969). — *C. R. Acad. Sci.*, Paris D., 1269, 1275-1277.
- [29] NITSCH C., NOREEL B. (1973). — *C. R. Acad. Sci.*, Paris D. 276, 3, 303-306.
- [30] PADMANABHAN V., SUBRAMANIAM M. K. (1973). — *Amer. J. Bot.*, 60, 4, suppl. p. 11.
- [31] PELLETIER G., PELLETIER A. (1971). — *Ann. Amélior. Plantes*, 21, 2, 221-233.
- [32] PICARD E., BUYSER J. DE (1973). — *C. R. Acad. Sci.*, Paris, ser. D, 277, 1463-1466.
- [33] REDDY K. B. S. M., NARAYANA R. (1974). — *Physiol. Plant.*, 32, 1-9.
- [34] SAUNDERS J. W., BINGHAM E. T. (1972). — *Crop. Sci.*, 12, 6, 804-808.
- [35] SUNDERLAND N. (1971). — *Sci. Prog. Oxf.*, 59, 527-549.
- [36] SUBRAMANIAM M. K., ROYAN-SUBRAMANIAM G. P. M., GUPTA K. C., VASANTHA S. (1968). — *Curr. Sci.*, 37, 14, 398-399.
- [37] TORREY J. C. (1954). — *Plant Physiol.*, 29, 279-287.
- [38] TORREY J. C., SHIGEMURA Y. (1957). — *Amer. J. Bot.*, 44, 334-344.
- [39] VASIL V., WEST S. H. (1970). — *Can. J. Bot.*, 49, 2, 327-328.
- [40] VERMA D. P. S., VAN HUYSTEE R. B. (1970). — *Can. J. Biochem.*, 48, 4, 444-449.
- [41] VERMA D. P. S., VAN HUYSTEE R. B. (1970). — *Can. J. Bot.*, 48, 2, 429-431.
- [42] VERMA D. P. S., VAN HUYSTEE R. B. (1971). — *Exper. Cell. Res.*, 69, 2, 402-408.
- [43] VERMA D. P. S., VAN HUYSTEE R. B. (1971). — *Radiat. Res. fis*, 3, 518-530.

SUMMARY

The culture *in vitro* of groundnut stamens (*Arachis hypogaea* L.). — II. Establishment of Tissue Cultures and Organogenesis.

J. P. MARTIN and H. RABÉCHAULT, *Oléagineux*, 1976, 31, N° 1, p. 19-25.

Groundnut stamens, cultured *in vitro* produce callosities of dedifferentiated tissue composed of haploid, diploid (85 p. 100) and polyploid cells. The dedifferentiation usually starts at the base of the filament or of the connective of the anther. Pollen division seems blocked as soon as the stamen is removed, as with other *Leguminosae* (Lotier), as it has only been observed once. The best nutritive medium for growth of the callosities contains 2,4-D, ANA and Kinetine at a concentration of $2 \cdot 10^{-6}$ each. Organogenesis has been very small; spindly seedlings, mostly albinos, have been produced in the presence of coconut milk.

RESUMEN

Cultivo *in vitro* de estambres de maní (*Arachis hypogaea* L.). — II. Establecimiento de cultivos de tejidos y organogénesis.

J. P. MARTIN y H. RABÉCHAULT, *Oléagineux*, 1976, 31, N° 1, p. 19-25.

Unos estambres de maní, cultivados *in vitro*, producen callos de tejidos dediferenciados formados por células: haploides, diploides (85 %) y poliploides. La dediferenciación empieza las más veces en la base del filamento o del conectivo de la antera. La división del polen parece detenida a partir de la toma como en otras leguminosas (Lotier) porque ha sido observada una vez solamente. El mejor medio nutritivo para el crecimiento de los callos, contiene 2,4-D, ANA y Kinetina a la concentración de $2 \cdot 10^{-6}$ para cada constituyente. La organogénesis ha sido poco importante; hubo una producción de plántulas delgaduchas, con una mayoría de albinas, en presencia de leche de coco.

Extrait de *Oléagineux*, 31^e année, n° 1, Janvier 1976, p. 19-21.