

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



**MEMOIRE pour l'obtention d'un
DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES**

Présenté à la Faculté des Sciences
Département de Biologie Végétale

Par

TALLA GUEYE

Maître ès-Sciences

SUJET:

Mise en place d'une méthodologie
d' Androgenèse *in vitro* chez le riz *Oryza sativa* L.

Soutenu le 22 Novembre 1995

Devant la Commission d'Examen composée de:

Président: M. Amadou Tidiane BA Professeur titulaire

Membres: M. Alain BORGEL chargé de recherche ORSTOM

Mme Yaye Kene DIA Maître-assistante

M. Nicolas DIALLO Maître-assistant

M. Moussa SIE Dr Ingénieur ADRAO

REMERCIEMENTS

Ce travail a été entièrement réalisé au Centre de Recherche ISRA/ORSTOM de Bel Air au sein de l'Unité de Recherche Commune en Culture *in vitro* (URCI), qui est un laboratoire commun entre l'ISRA et l'ORSTOM.

Le sujet proposé par ce laboratoire, avec la collaboration étroite du Département de Biologie végétale de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, a été fait sous la responsabilité scientifique de Monsieur Alain BORGEL, chargé de recherche ORSTOM et Madame Yaye Kène DIA, Maître-assistante au Département de Biologie Végétale de l'Université Cheikh Anta Diop.

Nous tenons ici à remercier toutes les personnes qui nous ont permis de mener à bien ce travail et en particulier:

- Monsieur Amadou Tidiane BA, Professeur, Chef du Département de Biologie Végétale, pour la confiance dont vous nous avez témoigné en facilitant notre admission à l'ORSTOM

- Monsieur Philippe MATHIEU, Représentant de l'ORSTOM au Sénégal, pour avoir accepté notre admission dans votre établissement

- Monsieur Alain BORGEL, responsable de l'URCI, Chargé de Recherche ORSTOM, pour avoir accepté de suivre ce travail dans le laboratoire. Votre esprit critique nous a permis de mener à bien ce travail

- Madame Yaye Kène DIA, Maître-assistante au Département de Biologie Végétale pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de diriger ce travail. Nous avons apprécié votre courtoisie, votre patience, et le sens pédagogique dont vous avez fait montre, tout au long du stage

- Monsieur Nicolas DIALLO, Maître-assistant au Département de Biologie Végétale pour avoir accepté d'être membre du jury de ce mémoire

- Monsieur Moussa SIE, Docteur ingénieur à l'ADRAO, pour avoir accepté d'être membre du jury de ce mémoire

- Monsieur Miezzan KOUAME, Responsable du Programme Riz irrigué au Sahel, à l'ADRAO, pour avoir généreusement mis à notre disposition les différentes variétés ayant fait l'objet de cette étude

Nous osons croire que les résultats auxquels nous avons abouti pourront en parti, vous être utile

- Monsieur Paul Thérance Senghor pour votre disponibilité et vos conseils. Votre grande expérience nous a été bénéfique

- Monsieur Poussin chercheur à l'ORSTOM pour ses conseils sur l'agronomie du riz

Nos remerciements vont également vers l'ensemble du, personnel de l'URCI, notamment, Amy BA, Mahecor DIOUF, Sidy NDIAYE, Maurice SAGNA, Pierre SAGNA, et Ngagne SOW.

Nos vifs remerciements s'adressent également à nos frères et amis Chercheurs comme Stagiaires du centre de Bel Air, notamment Ousmane MBODJI, Djibril SANE, Alioune DIALLO, Marie Claire DA SYLVA, Khadidiatou NDOYE, Mamour SECK, et Moussa SIDIBE.

Nous avons beaucoup apprécié la parfaite harmonie qui a toujours caractérisé nos relations.

DEDICACE

A la mémoire de mon grand frère.

A mes parents pour leur amour et leur soutien constant

A mes frères et soeurs qui n'ont jamais cessé de m'apporter leurs encouragements et soutien

RESUME

Nous avons mis en place une méthode de production de plantes haploïdes doublées par culture d'anthers *in vitro* ou androgenèse.

Deux variétés de riz *Oryza sativa* L. ont été utilisées durant les différentes expériences; la variété IR 13240-108-2-2-3 qui est une variété asiatique, de culture irriguée, appartenant au groupe indica, et la variété africaine de culture pluviale, Moroberekan qui est du groupe japonica.

Le stade optimal de mise en culture est celui des anthers contenant des microspores uninuclées.

Nous avons observé une influence du génotype, du milieu de culture ainsi que du renouvellement du milieu de base sur la capacité des anthers à produire un ou plusieurs cals (ou plantes).

Pour la variété IR 13240-108-2-2-3, le meilleur milieu d'induction de cals à partir d'anthers à microspores uninuclées, est un milieu modifié N6 + 1 mg/l ANA + 3 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN.

Pour la variété Moroberekan, le milieu modifié N6 + 2 mg/l ANA + 0,5 mg/l KIN a donné le meilleur pourcentage d'anthers callogènes.

La néoformation des plantules s'effectue sur un milieu Murashige et Skoog modifié.

La présence d'un ou de deux auxines dans le milieu d'induction influe de façon significative sur la capacité des cals à régénérer une ou plusieurs plantules.

Les taux les plus élevés sont obtenus avec des auxines du milieu d'induction que l'on retrouve ensemble dans le milieu de régénération.

Les meilleurs rendements en plantules néoformées à partir de cals varient de 1,11 à 1,94 plantules néoformées pour cent anthers mises en culture, suivant les milieux MS + 0,5 mg/l ANA + 1 mg/l BAP ou MS + 0,5 mg/l ANA + 1 mg/l KIN.

Au moment du sevrage, les plantules androgénétiques se sont bien développées dans du sable d'acacia non stérile et dans un mélange sable / tourbe. Les plantes androgénétiques présentent une plus grande vigueur dans le 1er type de substrat.

Au cours de cette étude, nous avons réussi à régénérer au total 232 plantes androgénétiques dont 132 appartiennent à la variété IR 13240-108-2-2-3 et 100 à la variété Moroberekan.

Mots clés : *Oryza sativa* L. , androgenèse, anthere, microspore, embryon, bourgeon, induction, néoformation, diploïde, haploïde, haploïde doublée.

SOMMAIRE:

INDEX DES SIGLES ET ABREVIATIONS DU TEXTE:.....	7
LISTE DES FIGURES DU TEXTE:.....	8
LISTE DES PLANCHES DU TEXTE :.....	9
LISTE DES TABLEAUX DU TEXTE :.....	10
INTRODUCTION GENERALE:.....	11
A - PRESENTATION DE LA PLANTE MERE:.....	14
1.1-Aspect systématique:.....	14
1.2-Morphologie et phénologie:.....	14
B - ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE :	18
I - LES TECHNIQUES DE SELECTION:.....	18
1 - Sélection pendant la phase d'autofécondation:.....	18
1.1 - sélection généalogique:.....	18
2-Sélection après obtention de lignées:.....	18
2.1-Méthode "Bulk" (= mélange):.....	18
2.2-SINGLE SEED DESCENT (ou Filiation unipare):.....	19
2.3-Haplodiploïdisation :	19
II - BIOLOGIE DE L'HAPLODIPLOIDISATION:.....	20
1 - Polyembryonie:.....	20
2 - Hybridation interspécifique:.....	20
3 - Traitement des gamétophytes avec du pollen irradié:.....	21
4 - Androgenèse <i>in vitro</i> :.....	21
5 - Gynogenèse <i>in vitro</i> :.....	21
III - L' ANDROGENESE DU RIZ :	22
1 - Production de plantes haploïdes doublées de riz:.....	22
1.1 - Culture d'anthères et de microspores isolées:.....	22
2 - Androgenèse et stérilité mâle:.....	23
3-Influence de différents facteurs sur l'androgenèse:.....	23
3.1 - Génotype de la plante mère:.....	23
3.2 - Stade de prélèvement des microspores:.....	23
3.3 - Prétraitement des anthères:.....	24
3.4 - Préculture des anthères:.....	24
3.5 - Action de régulateurs de croissance:.....	24
4 - Restauration du niveau de ploïdie initial:.....	25
4.1 - Doublement des chromosomes:.....	25
4.2 - Contrôle du niveau de ploïdie initial:.....	25
5 - Variation somaclonale:.....	26

C - MATERIELS ET METHODES:	28
1- Présentation du matériel végétal :	28
2 - Conduite des expériences:	28
2.1-Les cultures:	28
2.2 - Le stade de prélèvement :	28
2.3 - Prétraitement et stérilisation:	29
2.3.1 - Prétraitement:	29
2.3.2 - Stérilisation:	29
2.4 - Préparation des milieux de culture:	29
2.4.1 - Composition des milieux de cultures:	30
2.4.2 - Les substances minérales :	30
2.4.3 - Substances organiques :	30
2.4.4 - Les Vitamines :	30
2.4.5 - Les hormones :	30
2.4.6 - Autres :	31
2.5 - Induction de la callogenèse:	31
2.6 - Néoformation d'embryons:	31
2.7 - Elongation et enracinement des plantules androgénétiques:	33
3 - Les paramètres physiques des chambres de culture:	33
4 - Sevrage des plantules androgénétiques:	33
5 - Doublement chromosomique par la colchicine:	33
D - RESULTATS :	34
1- Induction de cals :	34
1.1 - Influence de 3 milieux minéraux :	34
1.2 - Influence du renouvellement du milieu de base:	34
1.3 - Influence de la nature hormonale du milieu :	35
2 - Néoformation de plantules:	35
2.1- Influence de la préculture sur différents milieux d'induction	35
3-Sevrage:	6
3.1-Influence du type de substrat :	36
4 - Doublement des chromosomes par la colchicine:	36
E - DISCUSSION:	38
1- Les milieux minéraux:	38
2 - Le renouvellement du milieu de base:	38
3 - La nature hormonale du milieu :	39
4 - Néoformation de plantules androgénétiques:	40
5 - Acclimatation:	41
5.1- Nature du substrat:	41
6 - Doublement des chromosomes :	41
F - CONCLUSION:	43
G - PERSPECTIVES:	44

INDEX DES SIGLES ET ABREVIATIONS DANS LE TEXTE:

A.D.R.A.O: Association pour le développement de la riziculture en Afrique de l'Ouest

A.N.A: Acide Naphtalène acétique

B.A.P: 6-Benzyl-Aminopurine

C.I.R.A.D.: Centre International de Recherche pour l'Agriculture et le Développement

D.R.P.F: Direction de Recherche sur les Productions Forestières

D.M.S.O: Dimethyl sulfoxyde

2,4-D: Acide 2,4 Dichlorophénoxyacétique.

I.R.R.I: Institut International de Recherche sur le Riz

I.S.R.A.: Institut Sénégalais de Recherche Agricole

O.R.S.T.O.M.: Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en
Coopération

KIN.: Kinétine

IR: variété IR 13240-108-2-2-3

Moro: variété Moroberekan

LISTE DES FIGURES DU TEXTE:

- Figure 1: La production mondiale de Paddy (F.A.O. 1990)
- Figure 2: Evolution de la production de riz au Sénégal (CILSS 1990; SAED 1994; Senghor 1994)
- Figure 3: Evolution des superficies, de la production et des rendements de riz dans la vallée du fleuve Sénégal.
- Figure 4: Les types d'effets géniques chez un individu diploïde (Demarly, 1970)
- Figure 5: Schéma d'une sélection généalogique avec sélection dès la F2 (Gallais, 1990).
- Figure 6: Méthode des "bulk"(dès la F2) (Valdeyron, 1961)
- Figure 7: La sélection en SINGLE SEED DESCENT (SSD) (Gallais, 1990)
- Figure 8: Schéma d'une sélection avec haploïdisation dès la F1 (Gallais, 1990)
- figure 9: Influence de 3 milieux minéraux sur l'induction de cals à partir d'anthères issues de deux variétés de riz
- figure 10: Influence du renouvellement du milieu de base (N6) sur la production de cals.
- Figure 11: Influence de la nature hormonale du milieu d'induction sur la production de cals.
- Figure 12: Influence de préculture d'anthères sur différents milieux d'induction callogènes (I1, I2, I3, I4). sur le taux de néoformation d'embryons à partir de cals subcultivés sur le milieu R1(MS + 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA)
- Figure 13: Influence de la préculture d'anthères sur différents milieux d'induction callogènes (I2,I2,I3,I4) sur le taux de néoformation d'embryons à partir de cals subcultivés sur le milieu R2 (MS + 1 mg/l KIN + 0.5 mg/l ANA) .

LISTE DES PLANCHES DU TEXTE:

Planche 1: Résumé des 4 hypothèses actuellement proposées d'après Second, 1982.

Planche 2: Schéma d'une feuille de riz (source : Vergara, 1984)

Planche 3: Schéma de l'ordre de succession des talles (source : Vergara, 1984)

Planche 4: Présentation d'une panicule de riz (source : Vergara, 1984).

Planche 5: Schéma d'un épillet (fleur) de riz. (Source : Vergara, 1984)

Planche 6: Schéma d'un pied de riz (Source : Vergara, 1984).

Planche 7: Induction de la formation de cals .

Photo a : Tétrade formée de 4 microspores colorées au DAPI.

Photo b : Microspore uninuclée jeune colorée au carmin acétique.

Photo c : Formation de cals, 3 semaines après mise en culture des anthères sur un milieu d'induction N6 modifié.

Planche 8: Néoformation de plantules androbenétiques.

Photo a : Néoformation de plantules androgénétiques chlorophyllienne à partir de cals induits sur un milieu N6 modifié, 3 semaines après leur subculture sur un milieu MS modifié.

Photo b : Régénération de plantules albinos

Planche 9: Elongation, enracinement et sevrage des vitroplants régénérés.

Photo a : plantules androgénétiques en phase d'élongation et d'enracinement sur un milieu MS sans hormones.

Photo b : plantules androgénétiques en croissance dans du sable prélevé sous un Acacia.

Planche 10: Plantes androgénétiques en fin de cycle (épillets mûrs).

Photo a : plantes androgénétiques haploïdes (H)

Photo b : plantes androgénétiques haploïdes doublées (HD).

Planche 11: Les épillets des plantes androgénétiques régénérés

photo a : épillets mûrs (HD) de la variété Moro après doublement des chromosomes par la colchicine.

Photo b : épillets de plantes androgénétiques (HD) de la variété Moro, présentant une aristation au niveau des graines après doublement des chromosomes par la colchicine.

LISTE DES TABLEAUX DU TEXTE :

Tableau 1: Développement de la panicule ou étapes de l'organogenèse de l'inflorescence du riz (Matsuo; Matsuo et al. 1957)

Tableau 2: Caractéristiques de la variété IR13240-108-2-2-3 (ADRAO, 1995)

Tableau 3: Milieux d'induction de cals de riz.

Tableau 4: Milieux d'androgenèse riz.

Tableau 5: Résultats des mises en cultures d'anthères.

Tableau 6: Comparaison des compositions ioniques des macroéléments des milieux d'induction

Tableau 7: Effets du substrat sur la réussite du sevrage.

Tableau 8: Traitement à la colchicine

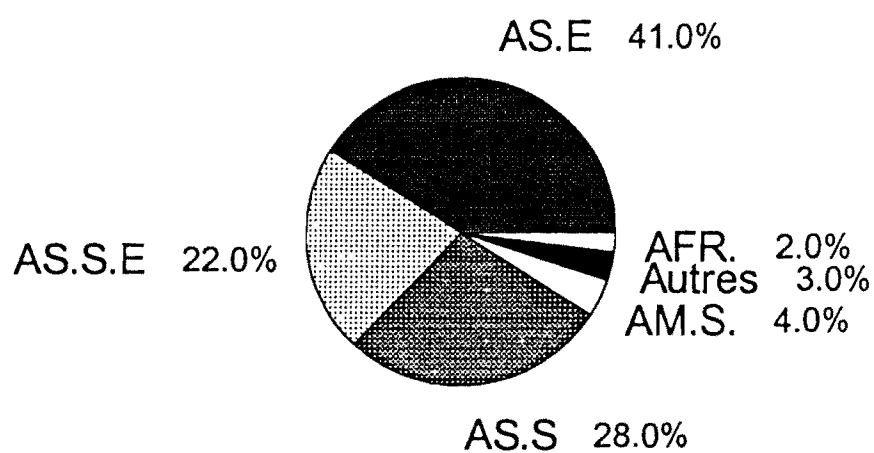


Figure1: Production mondiale de Paddy 1988.Total 490.2MT.

Source: FAO 1990

INTRODUCTION GENERALE:

Le riz est l'une des céréales les plus importantes de part le monde. C'est l'aliment principal de plus de 3 milliards d'individus, constitués pour la plupart de populations du tiers monde.

Pendant ces 25 dernières années, avec l'avènement de nouvelles technologies, la production mondiale en riz a doublé en passant de 257 millions de tonnes en 1965 à 520 millions de tonnes en 1990 (Kush and Toenniessen, 1991).

L'essentiel de cette production est réalisée en Asie où se trouve plus de 90% du riz produit dans le monde (figure 1).

Sur l'ensemble de la production mondiale, l'Afrique ne fournit que 2%, ce qui représente le plus faible taux.

La grande majorité des surfaces rizicoles cultivées se trouve concentrée dans le continent asiatique. La Chine et l'Inde renferment 50 % de ces superficies et réalisent 56% de la production mondiale.

L'ensemble des aires de culture de riz enregistré en Amérique latine est inférieur à celle de pays asiatiques comme le Bangladesh, l'Indonésie, et la Thaïlande.

En Afrique, l'ensemble des surfaces rizicoles est légèrement inférieur à celui d'un pays, le Vietnam dont les 2/3 de la production nationale sont supérieures à la production africaine.

Toutes ces considérations montrent la nette suprématie du continent asiatique sur les autres continents en matière de pratiques rizicoles.

Cependant, une grande partie de la production asiatique est consommée sur place. C'est la principale source de nourriture des populations qui ont ainsi réussi l'autosuffisance alimentaire malgré un taux démographique élevé. Seule 5% de cette production est utilisée pour les échanges avec l'extérieur (Kush and Toenniessen, 1991).

Cette autosuffisance alimentaire n'a pu être réalisée que grâce aux échanges de technologies combinés avec la maîtrise de l'eau, qui leur ont permis d'augmenter rapidement la productivité.

En Afrique, par contre, l'autosuffisance est loin d'être réalisée. L'importation demeure le seul recours pour satisfaire à une demande sans cesse croissante et de loin supérieure aux productions nationales.

Dans bon nombre de pays de l'Afrique de l'Ouest, des études récentes ont montrée que la consommation du riz augmentait de façon vertigineuse, alors que dans le même temps, les productions nationales marquaient le pas ou progressaient à un rythme de loin inférieur à l'accroissement de la demande intérieure.

En plus, il a été établi que l'augmentation régulière et soutenue de la consommation du riz était un phénomène lié à l'urbanisation et aux changements dans les habitudes alimentaires causées par l'aide et les importations alimentaires constituées dans une large proportion de blé et de riz bon marché (F.A.O., 1993).

Cette situation particulière de dépendance alimentaire accrue, avec un élargissement continu de l'écart entre la production et la consommation, constitue, pour divers pays africains, une source de préoccupations.

Dans le cas du Sénégal, grand consommateur, la production nationale reste relativement modeste par rapport aux besoins toujours croissants et estimés à 400.000 tonnes/an.

Pourtant, durant ces dernières années, des efforts ont été consenti pour l'aménagement de nouvelles superficies cultivables avec une moyenne de 73.457 ha/an aménagées de 1981/1982 à 1992/1993. Cela a permis de doubler la production nationale qui passe de 103.300 tonnes en 1981/1982 à 229.024 tonnes en 1991/1992.

Figure 2: Evolution de la production du riz au Sénégal

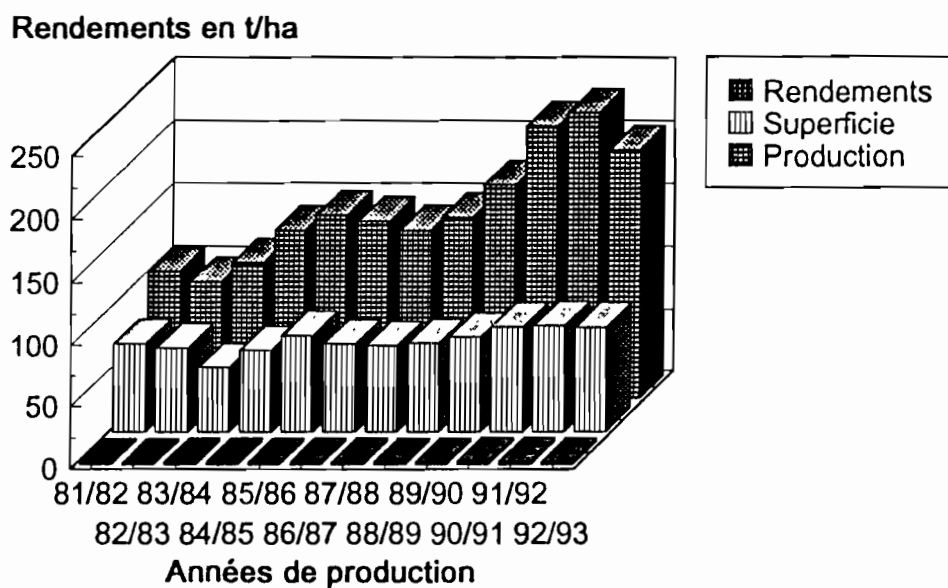
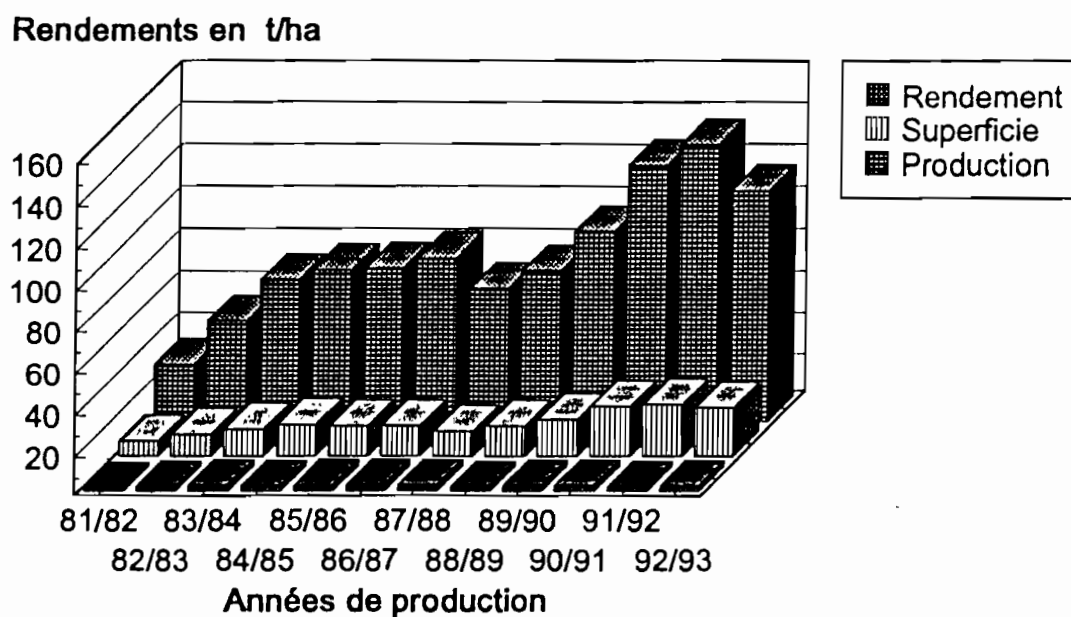


Figure 3: Evolution des superficies, de la production, et des rendements de riz dans la vallée du fleuve Sénégal



Cependant, les rendements n'ont subi qu'une faible évolution et passent de 1,44 t/ha à 2,66 t/ha durant la même période (figure 2).

Au Sénégal, on distingue principalement deux grandes régions à tradition rizicole:

- au Sud en Casamance, où on pratique trois types différents de riziculture :

1- riziculture pluviale stricte;

2- riziculture de submersion (bas-fond, mangrove);

3- riziculture irriguée (en zone humide).

Le riz pluvial est cultivé sur les défriches de forêts ("riz pam pam"). Ses possibilités d'extension sont cependant limitées par les mesures de protection des zones forestières.

En moyenne et basse Casamance, la remontée de la langue salée et le niveau de la nappe, constituent deux obstacles majeurs, à la progression des surfaces cultivables.

- au Nord, dans la vallée du fleuve Sénégal, où la riziculture est essentiellement irriguée.

La pratique de la riziculture avec maîtrise totale de l'eau, couplée avec l'aménagement de terrains, présente l'avantage de permettre la double culture annuelle.

Dans cette vallée, avec les aménagement hydro-agricoles, les superficies cultivables ont beaucoup évolué. Elles passent de 10.601 hectares en 1981/1982/ à 32 340 hectares en 1992/1993, soit trois fois plus (figure 3).

Cela se traduit par une augmentation de la production qui est multipliée par quatre : de 36.884 tonnes en 81/82, Elles passent à 145.287 tonnes en 92/93 avec un maximum de 174.999 tonnes en 91/92.

Cependant, malgré tout, les rendements n'ont pas augmenté et tournent autour de 4,5 t/ha au moment où en Asie on enregistre des rendements potentiels de près de 15 t/ha.

Pour atteindre ce taux, il est nécessaire de promouvoir, par les Biotechnologies, à l'image des pays asiatiques, des variétés améliorées à bon rendement.

Pour relever ce défi majeur, les sélectionneurs utilisent divers outils, souvent classiques, à leur disposition :

- exploitation de collections de riz cultivées traditionnellement, et qui ont subi une sélection empirique paysannale. Cette première étape a permis, l'identification, en Côte d'Ivoire, de variétés comme Moroberekan.

- hybridation dans le but d'associer des caractères complémentaires identifiés chez différentes lignées ou bien pour le transfert de gènes particuliers à des variétés dont on veut corriger certains défauts. C'est le cas des variétés pluviales "IRAT 112" et "IRAT 136", qui sont issues des croisements "IRAT 13" x "Douradou précoce" et "IRAT 13" x Moroberekan, respectivement.

Pour la riziculture irriguée, la variété "Jaya" a été obtenue par hybridation des variétés "Taichung native 1" et "T 141".

- La mutagenèse artificielle qui a permis d'obtenir du matériel végétal amélioré et performant chez plusieurs espèces (AIEA, 1981).

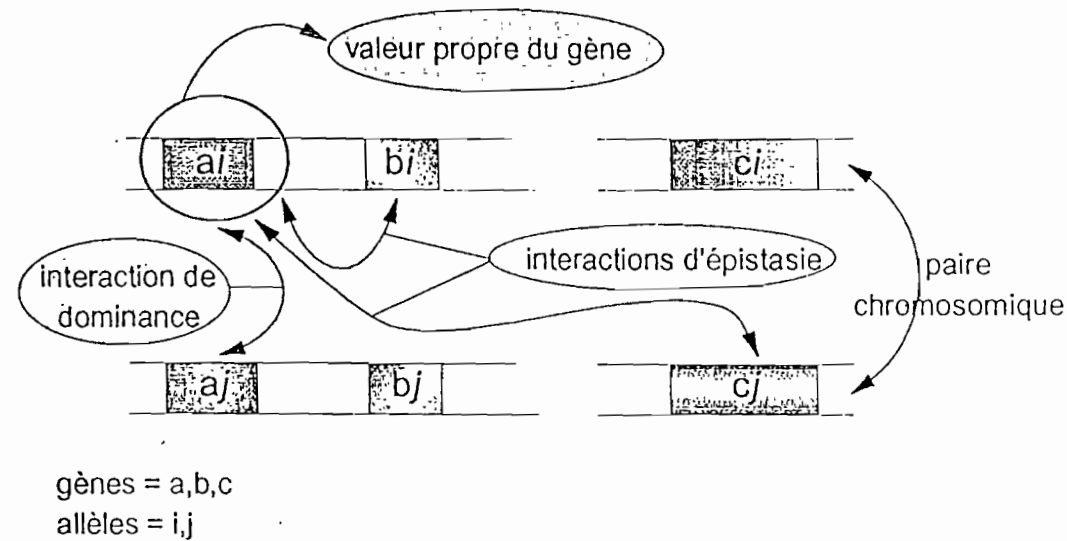
Sur le riz, le traitement de la variété traditionnelle "63-83", aux rayons gamma, a donné naissance à la "IRAT 13" (Jacquot, 1975; Marie, 1973).

Avec l'arrivée de la culture *in vitro*, de nouveaux outils d'amélioration des espèces végétales ont vu le jour. Ils constituent un appoint important et viennent soutenir et compléter les autres techniques déjà mises au point, pour une meilleure exploitation de la variabilité génétique des espèces en amélioration.

Parmi ces outils biotechnologiques on peut citer : le sauvetage d'embryons, l'hybridation somatique, l'androgenèse ou la gynogenèse, et le génie génétique.

L'objectif du travail décrit dans ce mémoire est d'étudier une de ces techniques : l'androgenèse.

Les types d'effets géniques chez un individu diploïde



d'après Demarly (1970)

A. Borgel - M.-J.L. Chevallier 1994

Figure 4 : Les types d'effets géniques chez un individu diploïde d'après Demarly, 1970

C'est une méthode qui consiste à mettre en culture des cellules sexuelles mâles (microspores dans l'anthere) dans un ou une succession de milieux de cultures artificiels afin de régénérer des plantes fertiles.

Contrairement aux plantes hybrides où de nombreuses interactions agissent sur l'expression des gènes (figure 4.), ces plantes haploïdes doublées, possèdent des chromosomes homologues identiques, portant les mêmes allèles de leurs gènes. L'effet de dominance est ainsi éliminé. Cela se traduit par une véritable homozygotie avec une bonne expression propre de chaque allèle. Pour chaque gène au niveau d'une paire de chromosomes homologues, les deux copies sont identiques.

Lorsqu'une mutation favorable apparaît au sein de ces plantes, elle va donc s'exprimer pleinement; ce qui peut aboutir à l'apparition d'une nouvelle variété.

L'intérêt de cette méthode c'est qu'elle permet de raccourcir le temps nécessaire pour fixer une lignée en une seule génération, contrairement aux autres méthodes classiques qui aboutissent aux mêmes résultats mais pendant 9 à 10 générations d'autofécondation et de tris.

Dans la vallée du fleuve Sénégal, des organismes de recherche comme l' ISRA et l'ADRAO, travaillent pour la promotion du riz irrigué.

Diverses variétés à bons rendements et à cycle plus ou moins court ont été sélectionnées, notamment par le tandem ISRA/ADRAO qui viennent de vulgariser 3 espèces appréciées par les paysans à cause de leurs caractères agronomiques appréciables.

Dans l'éventualité d'une utilisation ultérieure de la culture d'anthers comme un moyen rapide de sélection de lignées performantes, nous avons essayé dans notre étude, de voir l'aptitude à l'androgenèse d'une de ces variétés asiatiques, la IR 13240-108-2-2-3, par comparaison à une autre variété africaine, la Morberekan, déjà étudiée par cette technique.

O. rufipogon → *O. sativa* → *O. sativa* (Les Arabes 1^{er} siècle) → *O. sativa* (Les Portugais 16^e siècle) → *O. sativa* × *O. glaberrima* → *O. breviligulata*
 AFRIQUE → *O. sativa* → *O. glaberrima*

```

graph LR
    A[Figule longue : O. rufipogon] --- B[Asie]
    A --- C[Océanie]
    A --- D[Amerique]
    A --- E[Afrique : O. Longistaminata]
    B --- F[Perenne]
    B --- G[Annuelle]
    G --> H[O. sativa]
    H --- I[Indica]
    H --- J[Japanica]
  
```

ligule courte : *O. breviligulata* → *O. glaberrima*
 ↗ ecotype dressé
 ↘ ecotype flottant

O. glaberrima
 X
O. breviligulata

 } *O. breviligulata* adventice

Phylogenetic tree showing relationships between *Oenothera* species and their geographical origins:

- Asie** (Asia) leads to *O. rufipogon*.
- Indes** (Indes) leads to *O. rufipogon*.
- ONDOWANA** (ONDOWANA) leads to *O. rufipogon*.
- Afrique** (Africa) leads to *O. longistaminata*.
- O. rufipogon* leads to *O. nivara*.
- O. nivara* leads to *O. spontanea*.
- O. nivara* leads to *O. sativa*.
- O. spontanea* leads to *O. sativa*.
- O. longistaminata* leads to *O. breviligulata*.
- O. breviligulata* leads to *O. gibberica*.
- O. breviligulata* leads to *O. stapfii*.
- O. stapfii* leads to *O. gibberica*.
- O. sativa* leads to **Indica** (Indica).
- O. sativa* leads to **Japonica** (Japonica).
- O. sativa* leads to **Javanica** (Javanica).

notre commun	↗	<i>O. rufipogon</i>	CHINE	→	Japanica	X } <i>O. sativa</i>	
	→	<i>O. rufipogon</i>	ASIE	Sud et Sud-Est	→		Indica
	↘	<i>O. breviligulata</i>	AFRIQUE	→	<i>O. glaberrima</i>		

O. glaberrima X *O. sativa* —————→ } *O. breviligulata*
O. breviligulata X *O. glaberrima* —————→ } (adventice)

A - PRESENTATION DE LA PLANTE MERE:

1.1-Aspect systématique:

Le riz est une plante Monocotylédone, herbacée, annuelle qui appartient à la famille des Graminées ou Poacées. Son génome est diploïde ($2n = 2x = 24$) et son mode de reproduction est autogame. C'est l'une des plus anciennes plantes vivrières cultivées.

Les riz cultivés appartiennent à deux espèces principales :

- *Oryza sativa*, originaire d'Asie et dont l'aire d'extension est mondiale
- *Oryza glaberrima*, originaire d'Afrique et dont l'extension est limitée à ce continent.

Le riz a été domestiqué il y a plusieurs millénaires en Asie (*Oryza sativa*) à partir de formes annuelles d'*Oryza rufipogon*, et en Afrique (*Oryza glaberrima*) à partir de l'espèce annuelle *Oryza bréviligulata* apparentée à *Oryza rufipogon* (CIRAD, 1995). De ces centres de domestications, *Oryza sativa* se propage rapidement à travers le monde en commençant par la Chine et puis l'ensemble de l'Asie et grâce à l'ouverture des grandes voies maritimes, à travers les autres parties du monde; mais beaucoup plus tard.

Oryza glaberrima, quant à elle reste sur le continent africain, où elle est supplantée progressivement par l'espèce *Oryza sativa*

L'espèce *Oryza sativa* est subdivisée en 2 groupes principaux : indica et japonica.

- le groupe indica, originaire du sud-ouest de l'Himalaya, se caractérise par un tallage fort, des feuilles étroites, et des grains longs et minces. Ce sont des variétés adaptées à la culture aquatique en zone tropicale de basse altitude.

- le groupe japonica, originaire de l'Est de l'Himalaya, possède 3 types morphologiques :

- * un type tempéré, japonica sensu stricto, à tallage moyen, feuille fine, grains arrondis et courts. Ce type correspond aux variétés de culture aquatique des régions tropicales et tempérées.

- * un type tropical, javanica, à tallage réduit, à feuilles larges et à grains longs et larges correspond aux variétés de culture pluviale, des régions tropicales, mais également de culture aquatique aux Etats Unis.

- * un type intermédiaire entre les deux précédents, représenté par les variétés de culture aquatique des régions tropicales de hautes altitudes.

A la suite d'études morphologiques et cytologiques sur les différentes espèces de riz ainsi que leurs hybrides, et aussi après des analyses électrophorétiques d'enzymes, les principales hypothèses émises sur l'origine des riz par NAYAR (1973), OKA (1974), CHANG (1976) et SECOND (1982) sont présentées schématiquement sur la planche 1.

1.2 - Morphologie et phénologie du riz:

Les graines mises à germer font émerger en premier lieu soit leur coléorhize soit leur coléoptile.

La première feuille à apparaître est incomplète (absence de limbe foliaire). Les autres feuilles sont par contre toutes complètes avec une gaine foliaire, un collier, l'auricule, la ligule et la limbe foliaire (planche 2)

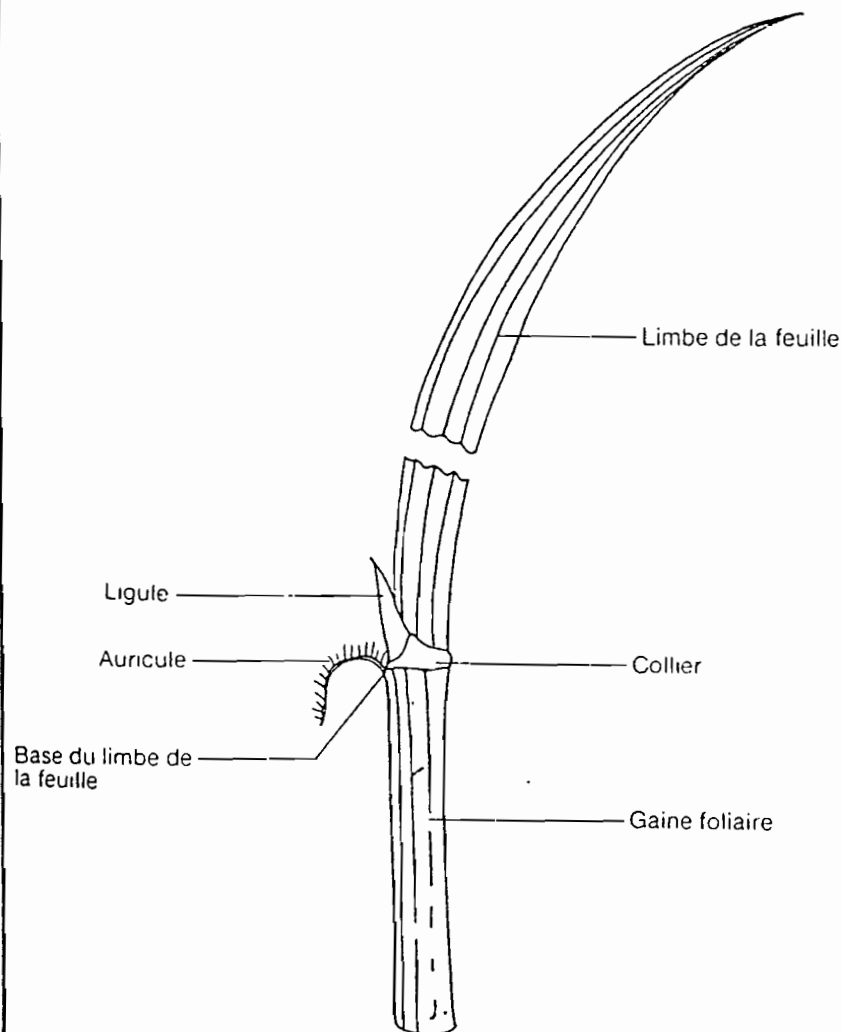
Une feuille de riz se distingue d'une feuille d'herbe par la présence simultanée de la ligule et de l'auricule.

Six à dix jours après les semis, la levée est totale.

Les plantules âgées de trois semaines sont repiquées au champ.

Planche 2 : schéma d'une feuille de riz. Source Vergara

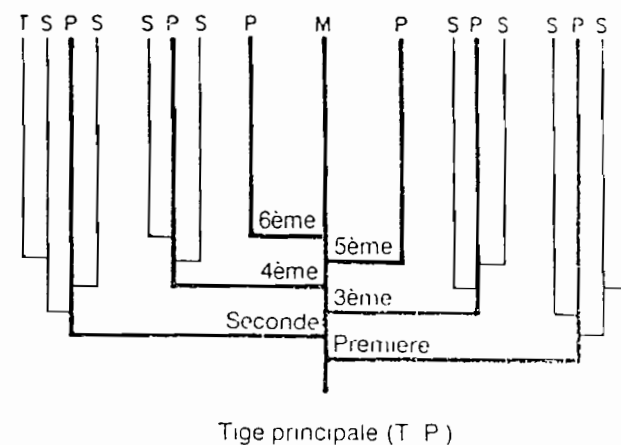
LA FEUILLE DE RIZ



- La feuille de riz se distingue d'une feuille d'herbe par la présence de la ligule et de l'auricule.
- Une feuille d'herbe a un "collier" mais n'a qu'une ligule ou qu'une auricule ou ni l'une ni l'autre; mais pas les deux à la fois.
- La feuille de riz, comme celle des herbes, a des nervures parallèles.

Planche 3 : schéma de l'ordre de succession des talles

ORDRE D'APPARITION DES TALLES



- Les talles primaires (P) proviennent de la tige principale
- Les talles secondaires (S) se développent à partir des talles primaires.
- Les talles tertiaires se développent à partir des talles secondaires.
- La talle est d'autant plus âgée que son point d'origine est bas sur la tige principale.

Le tallage (apparition de nouvelles tiges à partir de la tige principale et des tiges successives) débute 5 à 10 jours après le repiquage. Une talle est une pousse qui comporte des racines, une tige et des feuilles. Elle peut porter ou non une panicule.

L'apparition successive des talles se fait suivant un ordre précis (Planche 3). Les talles primaires proviennent de la tige principale, les talles secondaires, des talles primaires, et les talles tertiaires des secondaires.

La vitesse de formation des talles dépend de la longueur du cycle, de la variété, et des conditions du milieu. Le nombre de talle est maximum entre 50 et 60 jours (Vergara, 1984).

Après avoir atteint sa valeur maximale, le nombre de talles diminue par suite de la perte des talles les moins résistantes.

Le nombre total de talle émise au moment de l'entrée de la plantule dans la phase reproductive est une composante importante du rendement et une caractéristique variétale.

Les talles tardives sont habituellement stériles. Soit elles meurent, soit les panicules sont trop petites et trop tardives pour mûrir en même temps que les autres et les épillets sont seulement à moitié remplis au moment de la moisson.

L'intérêt des variétés modernes c'est qu'elles produisent plus de talles au moment de la floraison et en perdent moins après.

Le tallage est dit faible (inférieur à 10 talles) ou fort (supérieur à 20).

La durée de la phase végétative diffère suivant les variétés.

Trente jours avant l'émergence de la panicule, une simple dissection de la tige permet de mettre en évidence son initiation.

La panicule se forme à l'extrémité du point de croissance de la tige. Elle devient visible à l'oeil nu, après dissection, lorsque sa taille atteint environ 1mm. Elle présente en ce moment, de fines structures blanches à son extrémité, en forme de poils.

Lors de la montée de la panicule, il se forme un renflement à la base de la gaine foliaire.

Entre le moment où la panicule à l'intérieur de la gaine foliaire mesure environ 1mm et le moment où elle sort de cette gaine, il y'a trois feuilles qui se forment (Vergara, 1984).

L'intervalle de l'initiation paniculaire à l'épiaison, est la période la plus vulnérable dans la vie de la plante de riz.

Du 10ème au 16ème jours avant l'épiaison, soit approximativement au milieu de la période allant de l'initiation à l'émergence de la panicule, se différencient les cellules mères du pollen et de celles du sac embryonnaire (Matsuo; Matsushima et al., 1957) (tableau 1).

Les deux divisions nucléaires qui constituent la méiose, aboutissent à la formation d'une tétrade constituée de quatre microspores qui s'individualisent, s'agrandissent et s'arrondissent pour évoluer en grains de pollen.

Le pore germinatif se forme avant que la division du noyau pollinique ne commence.

Les produits de la première division nucléaire pollinique ont un noyau reproducteur aplati et un gros noyau végétatif. La deuxième division du noyau reproducteur donne deux gamètes mâles cunéiformes.

L'inflorescence est un racème ou panicule (planche 4) dont le rachis, à chaque noeud donne naissance à un ou plusieurs branches primaires portant chacune à son tour plusieurs ramifications secondaires: celles-ci différencient un ou plusieurs épillets.

Chaque épillet renferme une fleur simple, parfaite, qui se compose, de l'extérieur vers l'intérieur d'une paire de glumes, une paire de glumelles, six étamines, et un ovaire contenant un seul ovule (planche 5). L'ovaire est surmonté de deux stigmates plumeux.

La floraison a lieu 35 jours après le début de la formation de la panicule. La longueur de cette dernière est variable d'une variété à l'autre ainsi que le nombre de grains par unité de longueur ou densité de la panicule.

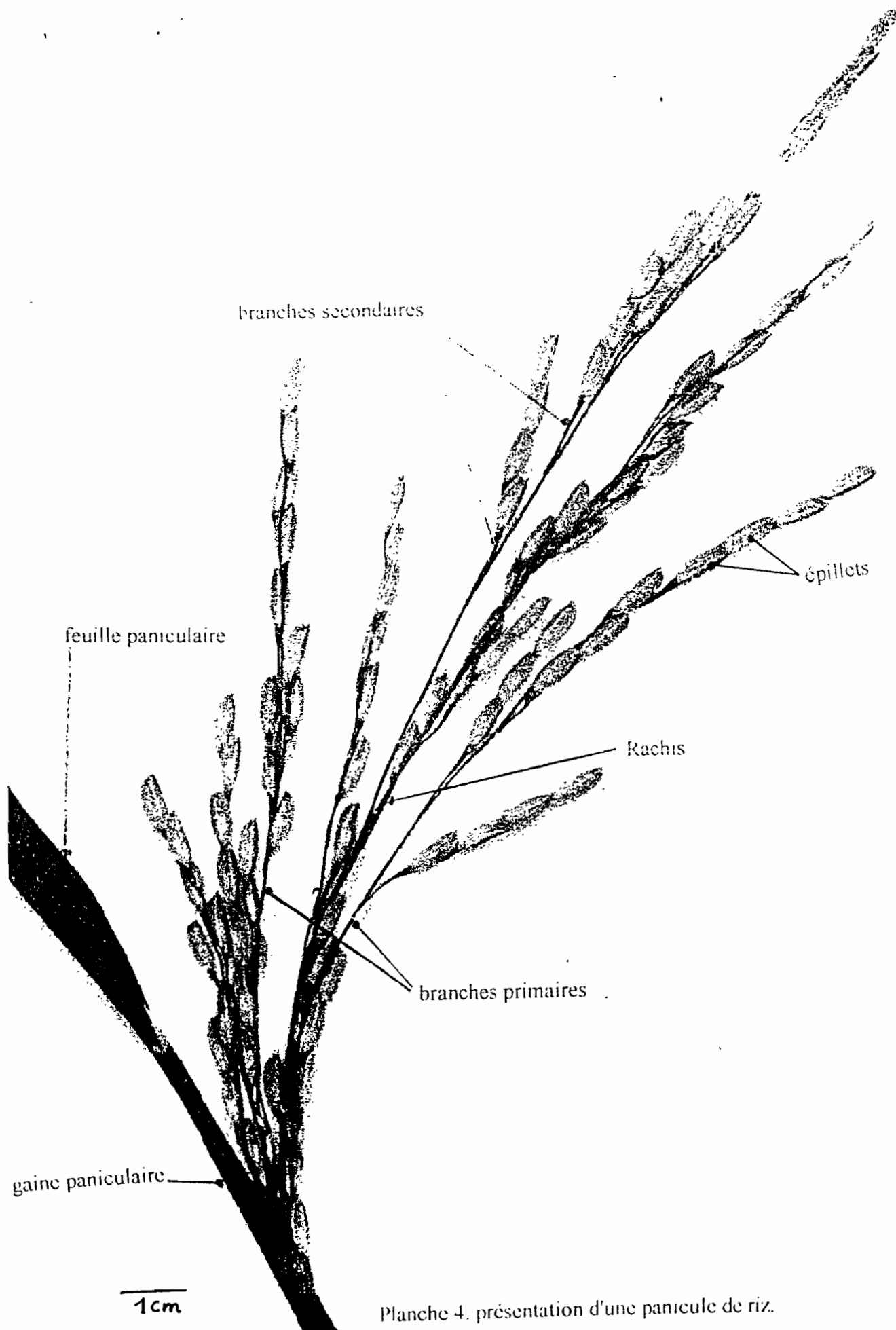
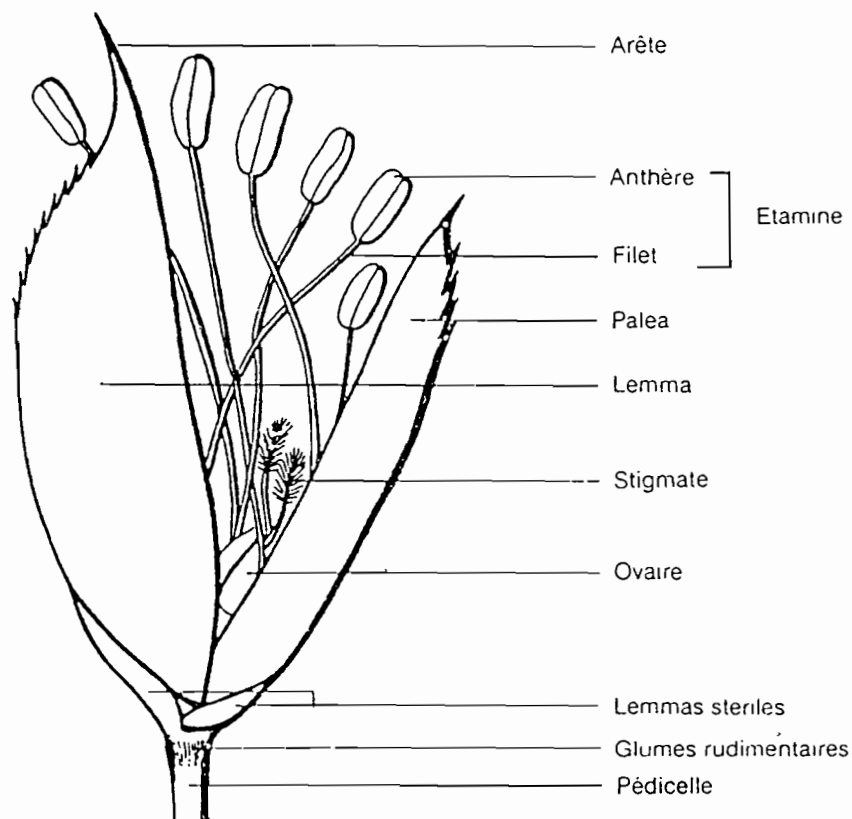


Planche 4. présentation d'une panicule de riz.

Tableau 1: Développement de la panicule ou étapes de l'organogénèse de l'inflorescence du riz (d'après Matsuo; Matsuo et al., 1957)

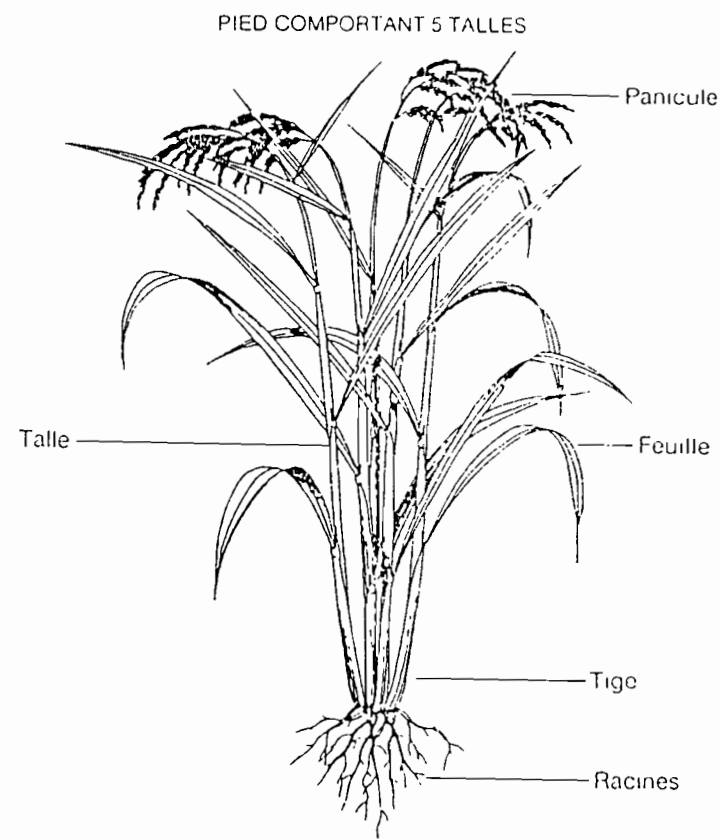
Stade	Nb. de jours avt. épiaison	longueur panicule (cm)	Differentiation
I	30	-	Initiation du noeud paniculaire
II	24	0,2	Primordia des pistils, étamines, lemma, et Paléa
III	20	0,5	Differentiation totale de l'épillet
IV	16	1,5	Début de la differentiation des cellules mères du pollen et du sac embryonnaire
V	14	2,5	Differentiation à peu près complète des cellules mères du pollen : anthères visibles
VI	12	8	Début de la division réductionnelle des cellules mères du pollen et du sac embryonnaire
VII	10	13	Division réductionnelle maximale
IIIIV	8	18	Differentiation complète de l'exine du pollen
IX	6	19	Continuation du développement du grain de pollen
X	4	20,5	Grain de pollen encore de taille irrégulière. Divisions nucléaires du sac embryonnaire terminée. Ovules, Synergides, noyaux polaires et cellules antipodes ont leurs positions respectives
XI	2	-	Augmentation de la taille du sac embryonnaire; le noyau polaire se déplace près de l'ovule

L'EPILLET



- L'anthere s'ouvre 1 jour après que la panicule soit sortie.
- Une température basse retarde l'ouvertures des anthères
- Le pollen des anthères tombe sur le stigmate et féconde l'oeuf à l'intérieur de l'ovaire qui se transformera en graine

LE PIED DE RIZ



- Une talle est une pousse qui comporte des racines, une tige et des feuilles. Elle peut porter ou non une panicule

Deux à trois jours après l'émergence, les épillets à l'extrémité de l'inflorescence s'autopollinisent et se fécondent (autogamie prédominante). Le processus se poursuit progressivement jusqu'à la sortie complète de la panicule. Les épillets du bas, qui s'ouvrent en dernier, ne sont habituellement pas complètement remplis dans les panicules volumineuses.

Les variétés modernes ont 100 à 120 épillets par panicule.

Après la fécondation, l'ovaire gonfle très rapidement et le caryopse ou graine de riz atteint sa longueur maximale en 7 jours.

Vingt et un jours après la fertilisation, l'épillet atteint son poids maximum.

Comme il faut 7 jours pour que tous les épillets s'ouvrent, la pleine maturité de la panicule ne se produit pas avant le 10^{ème} jour après la floraison. Quelques jours de plus sont nécessaires au mûrissement de la récolte étant donné que les panicules ne s'ouvrent pas toutes en même temps. La durée de la phase de mûrissement est de 30 jours.

A maturité, la hauteur totale de la plante (de l'extrémité de la panicule du maître brin au collet) est un paramètre important qui intervient dans la résistance de la plante à la verse et constitue un critère de sélection toujours pris en compte.

Le grain de riz mûr se présente enveloppé par des glumes et glumelles persistantes que le rizier appelle "balle". L'ensemble grain muni de balle constitue le riz paddy ("rough rice" pour les anglophones).

A l'intérieur du grain se trouve l'albumen ou endosperme, riche en amidon; c'est la réserve de nourriture de l'embryon. Ce dernier est localisé à la partie inférieure de la graine.

Le décorticage du paddy consiste à enlever les glumes et les glumelles ou "balle". On obtient alors un riz brun appelé "cargo" ("brown rice") c'est à dire, constitué par l'albumen encore enveloppé de son tégument.

Le riz blanchi, prêt à la consommation ("milled rice"), est obtenu lorsque le tégument de la graine est enlevé.

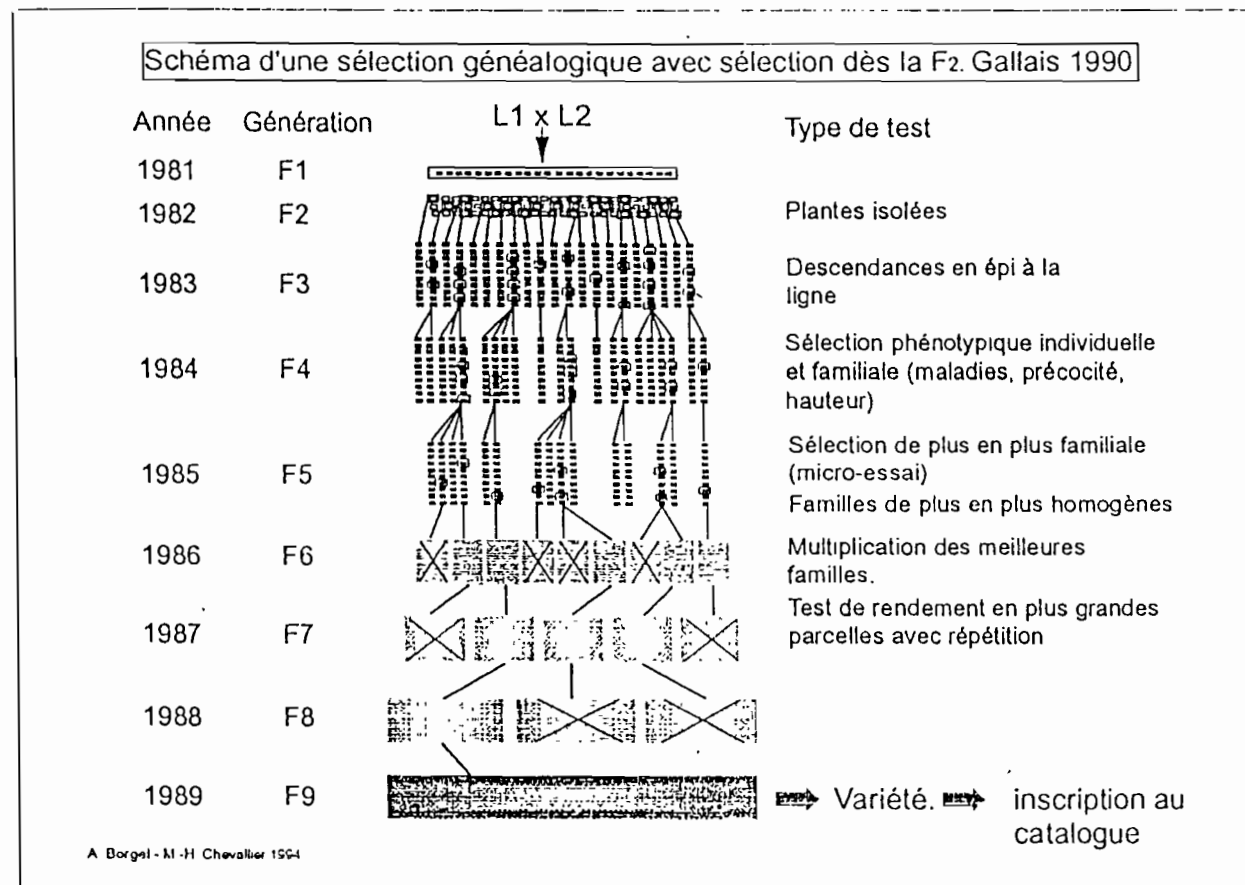


Figure 5 : Schéma d'une sélection généalogique avec sélection dès la F₁ d'après Gallais, 1990.

B - ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE:

I - LES TECHNIQUES DE SELECTION:

Chez les espèces autogames, le principe de création variétale consiste à dériver à partir d'une hybride simple ou issue de sélection cumulative, des lignées dont les performances agronomiques sont supérieures à celles des lignées parentales

Bien avant l'arrivée de la culture *in vitro*, les sélectionneurs parvenaient à isoler des lignées homozygotes par différentes étapes:

- élargissement de la variabilité génétique par la création de populations artificielles à fort taux d'hétérozygotie.
- autofécondations successives.
- sélection des meilleurs unités génétiques de la population.

Chez les plantes autogames, différentes méthodes de sélection de lignées sont connues :

- une sélection pendant la phase de consanguinisation (autofécondation).
- une sélection après obtention de lignées pures.

1 - Sélection pendant la phase d' autofécondation:

1.1 - La sélection généalogique (ou sélection pendant la fixation):

La sélection généalogique chez une plante autogame, c'est une sélection pendant la phase d'autofécondation pour aboutir à de nouvelles lignées apportant un progrès.

La figure 5. illustre le schéma de sélection généalogique à partir d'un croisement de deux lignées.

Avantages :

La sélection généalogique peut être très efficace pour les caractères peu influencés par le milieu.

Inconvénient :

- Perte de variabilité génétique

L'essentiel de la sélection porte sur du matériel encore fortement hétérozygote entre la F2 et la F4 d'où un risque de perte des caractéristiques intéressantes à la génération suivante.

- sélection trop tardive pour le rendement.

2 - Sélection après obtention de lignées (ou après une phase d'autofécondation sans sélection):

Elle favorise une sélection directe pour des caractères peu héritable au niveau de familles pratiquement homozygotes, éliminant ainsi le biais dû aux effets de dominance, liés à l'hétérozygotie.

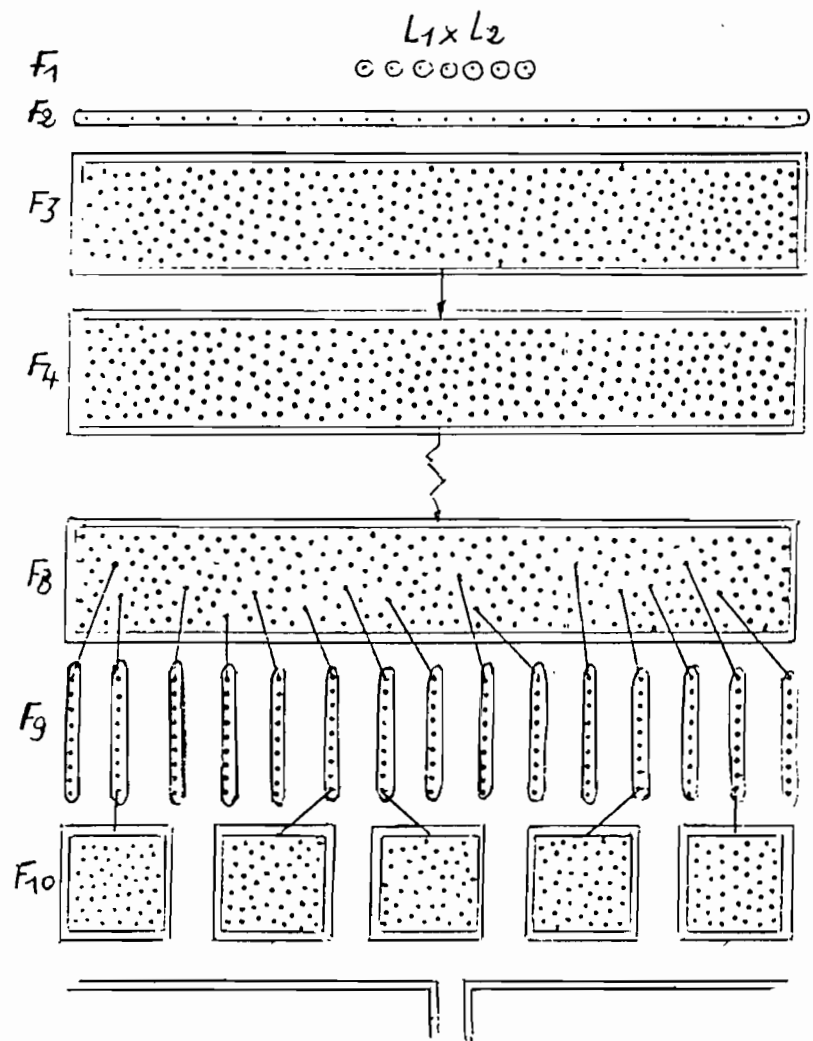


Figure 6 : Méthode des "bulk" (dès la F_2) d'après Valdeyron, 1961.

2.1 - La méthode des "bulk" (= mélange):

Dans cette méthode le passage d'une génération à une autre est effectué par récolte en mélange de l'ensemble des grains d'une génération et prélèvement aléatoire des grains pour constituer la génération suivante (figure 6).

Le processus peut se poursuivre jusqu' en F5-F6 ou s'arrêter plus tôt. La sortie est réalisée par sélection généalogique.

Pour une plante autogame, l'avantage de cette méthode c'est qu'elle est simple, peu coûteuse et l'autofécondation se fait naturellement. En outre elle permet de travailler sur un grand nombre de croisements.

Elle présente cependant un défaut car elle donne prise à la sélection naturelle. Par conséquent les génotypes qui donnent le plus de descendants par une fertilité plus grande ou par une agressivité plus grande sont favorisés.

2.2 - La Single Seed Descent (SSD):

Le but de cette méthode est essentiellement de limiter la perte de variabilité génétique : le taux de multiplication de chaque génotype est ramené à un (le passage d'une génération à une autre se fait sans sélection en ne retenant qu'une graine par génotype) (figure 7).

Comme la méthode en "bulk", elle peut s'arrêter plus ou moins tôt et être suivie d'une sélection généalogique.

Avantages : elle supprime le problème d'échantillonnage et minimise la perte de variabilité.

Inconvénients : elle est plus coûteuse que la méthode "bulk" car elle demande une récolte par plante.

2.3 - L'haplodiploïdisation (HD):

C'est l'équivalent d'un système de reproduction en consanguinité qui permet à partir d'un génotype hétérozygote, d'obtenir directement les lignées homozygotes dérivées de ce génotype (figure 8). C'est donc une méthode qui donne rapidement accès à la valeur en lignée d'un croisement.

Par rapport aux autres méthodes de création de lignées l'haplodiploïdisation présente des avantages certains :

- gain de temps dans la fixation avec une possibilité d'obtention de lignées homozygotes en une seule génération éliminant ainsi la longue phase de consanguinisation.

- la fixation précède la sélection car le tri porte sur des lignées fixées, stables au cours des générations. L'efficacité de la sélection est donc renforcée.

Cependant, l'haplodiploïdisation, pour être vraiment performante, ne doit être induite qu'après une à deux cycles d'autofécondations. Cela permettra d'augmenter les chances d'obtenir un nombre suffisant de recombinaisons efficaces durant les méioses, et la probabilité d'obtention du meilleur génotype recombinaisonnel sera beaucoup plus grande.

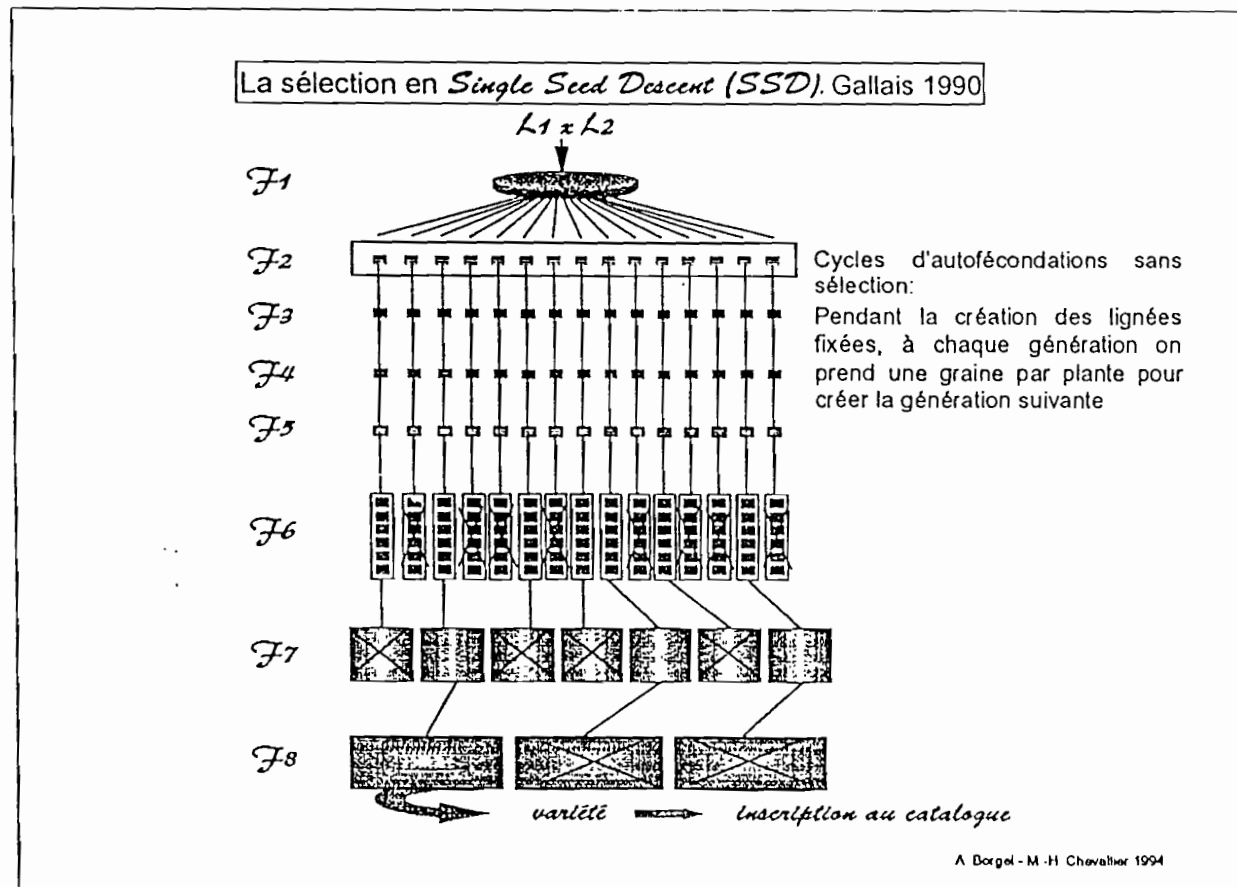
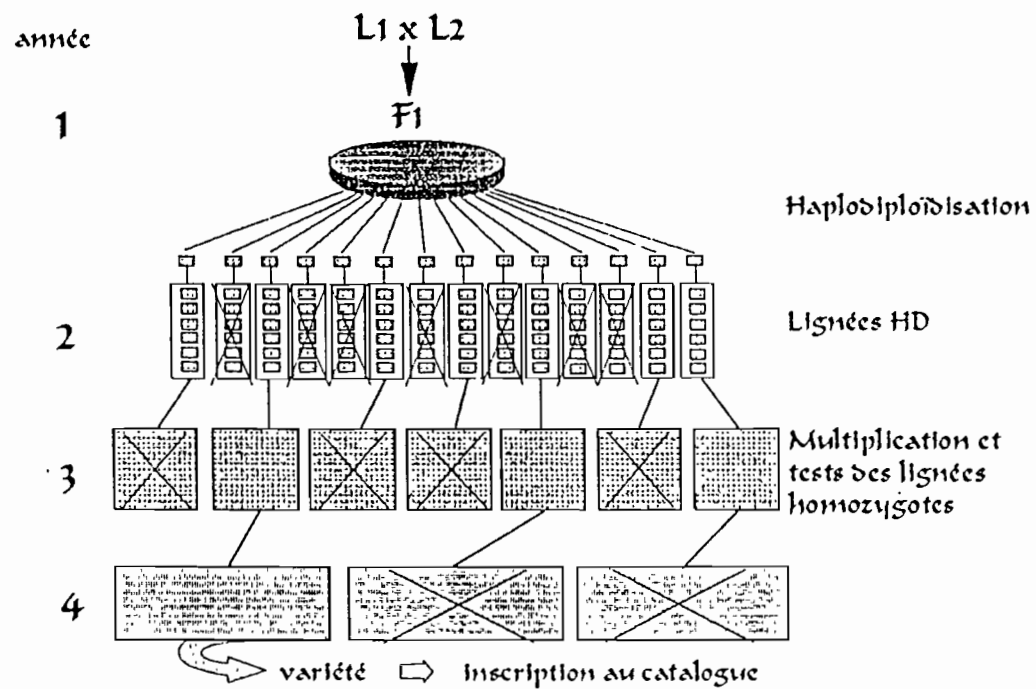


Figure 7 : La sélection en SINGLE SEED DESCENT (SSD) d'après Gallais, 1990.

SCHEMA D'UNE SELECTION AVEC HAPLODIPLOIDISATION DES LA F1. Gallais 1990



A. Bregot - M.-H. Chevalier 1991

Figure 8 : Schéma d'une sélection avec haploïdisation dès la F1 d'après Gallais, 1990.

II - BIOLOGIE DE L'HAPLODIPLOIDISATION:

Lors de la formation des gamètes mâles, les cellules mères des microspores subissent la méiose et donnent naissance à une tétrade de quatre cellules haploïdes jeunes

Chacune de ces cellules subit une mitose (première mitose pollinique) qui aboutit à la formation de deux cellules de taille très inégales : une cellule reproductrice de faible volume à noyau très condensé et à cytoplasme restreint, ne contenant que quelques mitochondries, et une large cellule végétative à noyau diffus et à cytoplasme abondant avec de nombreux plastes et vacuoles. Ces deux cellules très différenciées auront des devenir différents.

Au cours de la formation des gamètes femelles, dans le jeune ovule, une cellule située près du pôle micropilaire, la cellule mère du sac embryonnaire, subit la méiose. Trois des quatre cellules méiotiques dégénèrent. Seule la cellule inférieure se développe et, après trois mitoses successives, donne les 8 noyaux haploïdes du sac embryonnaire.

Lors de la pollinisation, la cellule reproductrice mâle migre dans le tube pollinique où son noyau subit une deuxième mitose pollinique qui donne deux gamètes mâles dont l'un va féconder l'oosphère et l'ensemble forme l'embryon diploïde, l'autre va féconder les deux noyaux polaires pour former l'albumen triploïde.

C'est la voie classique de reproduction sexuée des plantes à pollen binucléées. Cependant d'autres processus de régénération de plantes, comme les plantes haploïdes, existent. Ils sont soit naturels (Ex : la Polyembryonie), soit artificiels (Ex: androgenèse, gynogenèse, Hybridation interspécifique, Pollinisation avec du pollen irradié).

1 - La polyembryonie:

Chez certaines plantes comme le genre *Citrus* ou le manguier, il existe une polyembryonie naturelle. A côté des embryons sexués, issues de la fécondation, on trouve d'autres embryons adventifs ou nucellaires qui sont des copies végétatives de la plante mère, contrairement à l'embryon sexué.

Chez les autres espèces comme le Caféier ou le Piment, il arrive que deux embryons se développent simultanément au cours de la reproduction sexuée et donnent naissance à deux plantules. La fréquence de ce phénomène est cependant très faible (1/10000). L'une des plantules est souvent moins vigoureuse et haploïde. Son développement provient d'une induction d'une synergide qui, parallèlement à l'oosphère fécondé, se différencie en un embryon apogamique.

2 - L'hybridation interspécifique:

Dans certains croisements, l'incompatibilité ne se traduit pas au niveau de la reconnaissance pollen-stigmate, mais plus tard au stade de fusion noyau reproducteur-oosphère ou au cours des premières mitoses qui s'ensuivent.

Ainsi des plantes haploïdes peuvent être obtenues par simple pollinisation avec du pollen venant d'une autre espèce ou dans la même espèce entre génome de degré de ploïdie différent.

Cette technique est appliquée en sélection de l'Orge par croisement de l'orge cultivé *Hordeum vulgare* ($2n = 2x = 14$) avec l'orge sauvage *Hordeum bulbosum* ($2n = 2x = 14$) ou ($2n = 4x = 28$).

Après pollinisation, la fécondation a lieu mais les chromosomes de *Hordeum bulbosum* sont éliminés dès les premières mitoses laissant un embryon haploïde qui dégénère si on n'opère pas son sauvetage immédiat *in vitro* (Kasha et Kao, 1970).

L'hybridation interspécifique est aussi appliquée dans la sélection de la pomme de terre dont la forme cultivée est tétraploïde ($2n = 4x = 48$). Il est intéressant de l'amener à l'état dihaploïde afin de pouvoir le croiser avec de nombreuses espèces diploïdes spontanées. Ces dernières peuvent apporter une large gamme d'adaptations climatiques et de tolérances ou de résistances aux pathogènes. En outre l'amélioration au niveau diploïde est plus efficace qu'au niveau tétraploïde.

Le croisement *Solanum tuberosum* ($2n = 4x = 48$) cultivée, avec l'espèce sauvage *Solanum phureja* ($2n = 2x = 24$) permet d'obtenir une forte proportion de graines dihaploïdes (Hougas et al., 1964). Le pollen de l'espèce sauvage n'assurant pas la double fécondation, l'oosphère a un développement parthénogénétique alors que l'albumen est hybride, ayant reçu au moins, un noyau reproducteur mâle.

3 - Le traitement des gamétophytes avec du pollen irradié:

La pollinisation avec du pollen irradié, stérile, peut induire le développement de l'oosphère sans fécondation. Ce processus aboutit à la formation d'un embryon haploïde parthénogamétique.

La fréquence très basse de ce phénomène en a limité l'utilisation jusqu'aux travaux de Raquin, 1985; qui a associé l'irradiation à haute dose de rayons gamma, avec le sauvetage *in vitro* des embryons produits dans les graines sur le Pétunia. Cette récupération des embryons haploïdes *in vitro* est nécessaire. En effet, lors de la pseudopollinisation par le pollen irradié, l'oosphère se développe en embryon mais l'albumen ne se forme pas; privant ainsi le jeune embryon des réserves indispensables à son développement.

4 - Androgenèse *in vitro*:

C'est une technique qui consiste à intercepter le développement de la microspore juste après la méiose et à les mettre en culture *in vitro* pour régénérer des plantes. Pour cela, le stade de prélèvement des fleurs mâles demeure primordiale ainsi que le prétraitement appliqué aux anthères après la cueillette ou dès la mise en culture.

On s'est rendu compte que des facteurs tels que l'espèce, le génotype ainsi que l'état physiologique de la plante donneuse, jouent aussi un rôle important pour la réussite de l'expérience.

5 - La Gynogenèse *in vitro*:

La culture de gamétophytes femelles en vue d'obtenir des plantes haploïdes n'a donné de résultats satisfaisants que très récemment.

Les premiers résultats de gynogenèse ont été obtenus à partir de la culture *in vitro* d'ovules vierges d'orge (San Noem, 1973)

Depuis, la technique a été étendue à d'autres céréales tels que le riz (Asselin de Beauville, 1980); le blé, le maïs et à d'autres familles d'espèces végétales.

Du fait de la grande stabilité des cellules gamétophytiques femelles, les plantes gynogénétiques obtenues présentent peu de variations (pas ou peu d'albinos).

III-L'ANDROGENESE DU RIZ:

1 - La production de plantes haploïdes doublées de riz:

1.1 - Culture d'anthères et de microspores isolées:

La production de plantes haploïdes par la culture d'anthères ou de microspores isolées a des applications nombreuses et variées dans l'amélioration des espèces végétales.

Le doublement des chromosomes complémentaires du matériel haploïde est une méthode rapide d'obtention de lignées homozygotes qui raccourcit considérablement le temps nécessaire pour l'apparition de nouvelles variétés de plantes.

C'est en 1964 que les premiers embryons haploïdes furent obtenus sur le *Datura* (Guha et Maheswari, 1964).

En 1968, Niizeki et Oono, régénérèrent sur des anthères de riz des plantes dont le nombre chromosomique est égal à celui des gamètes des plantes mères dont elles sont issues.

Depuis lors de nombreuses découvertes ont été réalisées, par cette méthode, sur des espèces variées comme la tomate (Gressoff et Doy, 1972); le tabac (Bourk et al., 1972); le chou (Lelou et Belon, 1985) le piment (Wang et al.; Kuo et al.; George et Narayanaswami, 1973); le blé (Picard et De Buyser, 1974); .

Des améliorations notoires ont été réalisées chez le piment (Sibi et al., 1978; Dumas de Vaulx et al., 1981).

Chez le riz, plante qui a été beaucoup étudiée surtout dans les pays asiatiques, et Nord américains, des améliorations sont de plus en plus apportées à la technique de culture d'anthères, dans le but d'augmenter le rendement en plantes haploïdes doublées.

Des études plus fines ont été réalisées par la culture de microspores isolées chez le seigle (Wenzel et al., 1976); l'orge (Xu and Sunderland, 1981, 1982); le tabac (Kuo and Harada, 1986); le riz (Ku and Huang, 1973); entre autres espèces.

Depuis, des chercheurs ont accordé une grande attention à cette méthode.

L'une des limites de cette nouvelle technique peut être attribuée à une déficience de facteurs souvent inconnus qui influent sur l'induction de l'embryogenèse du pollen *in vitro* (Cho and Zapata, 1988;).

L'absence de certaines substances nutritives contenues dans les tissus de l'anthère pourrait constituer un autre facteur limitant (Zapata et al., 1990).

Un dimorphisme pollinique a été remarqué initialement par Sunderland et Wick (1971) sur des anthères de tabac mis en culture ; et *in situ* chez l'orge (Dale, 1975) et le tabac (Horner et Street, 1978), qui parle de "S-grain" ou Smaller grain.

Dans une revue sur l'haplométhode, Heberle-Bors (1985) expose la théorie du dimorphisme pollinique.

Selon cette théorie, seule une fraction très réduite de la population de microspores d'une anthère est susceptible, sous l'effet de la séparation de la plante mère, puis d'un choc thermique de dévier vers un développement de type "sporophytique".

Ces microspores particulières, appelées "P-grain", sont de petite taille et se colorent faiblement au carmin acétique. Elles possèdent souvent plusieurs noyaux, leur cytoplasme est souvent très peu chargé en amidon et l'exine y semble déficiente ou absente. Leur taux de formation serait déterminé, chez la plante mère, au moment de la prophase de la méiose, c'est-à-dire avant la mise en culture des anthères; peut être en raison d'irrégularités dans la division des cellules mères des grains de pollen (Heberle-Bors and Street, 1978).

2 - Androgenèse et stérilité mâle:

L'idée qu'un lien pourrait exister entre stérilité mâle d'origine chimique, et aptitude au développement androgénétique, a été étayée par les résultats de Bennett et Hughes (1972), Schmid et Keller (1986) et Picard *et al.* (1987) sur le blé; puis de Beaumond (1988) sur riz montrant qu'un traitement à effet gamétocide permet d'augmenter spectaculairement les rendements en androgenèse. Cependant, le mécanisme d'action n'a pas pour l'instant, été déterminé.

La stérilité mâle résulte d'anomalies dans le développement du pollen pouvant intervenir à n'importe quel stade entre la microsporogenèse et la germination du pollen.

Certaines formes de stérilité se traduisent par l'absence de formation des microspores (cas du gène nucléaire de stérilité d'IR36 chez le riz). Dans ce cas aucun développement androgénétique ne peut se produire (Ling *et al.* 1978).

D'autres formes de stérilité, notamment celles contrôlées par des facteurs génocyttoplasmiques, permettent une formation normale des microspores, et un développement androgénétique est alors possible (Ling *et al.*, 1978)

3 - Influence de différents facteurs sur l'androgenèse:

Des études ont montrées que le développement des microspores en plantes adultes, dépend de plusieurs facteurs dont chacun peut être limitant.

3.1 - Le génotype de la plante mère:

Une influence génotypique sur l'aptitude à produire des cals et à régénérer des plantes haploïdes, a été largement décrite par plusieurs auteurs, notamment chez le riz, par Guha et Mukherjee, 1973 ; Oono, 1975; Zapata *et al.*, 1983 ; Siva Reddy *et al.*, 1985 ; Guiderdoni *et al.* 1986; Lu and Xu , 1986; Zapata *et al.*, 1986.

Un classement de réactivité, vis à vis de la culture d'anthères, entre les différents types de l'espèce *Oryza sativa* L. a été établi.

Les variétés de type japonica répondent en général beaucoup mieux aux techniques actuelles par rapport aux croisements japonica x indica, ces derniers présentant un meilleur comportement que les variétés indica (Lu and Xu , 1986).

3.2 - Le stade de prélèvement des microspores:

Le bon stade de mise en culture peut varier selon les espèces.

Chez le Tabac, le prélèvement se situe au stade microspore binuclée médian (Kuo and Harada, 1986).

Chez le riz le meilleur moment de mise en culture est le stade uninuclée (Cornejo-Martin et Primo-Millo, 1981 ; Huang *et al.*, 1986; Guiderdoni *et al.*, 1986)

Cependant des travaux récents révèlent l'aptitude embryogène des microspores binuclées à l'image de leurs "homologues" uninuclées (Zapata *et al.*, 1987)

Trois voies possibles ont été décrites :

- une première voie, la plus fréquente, où seules les microspores uninuclées participent à l'initiation de cals.
- une deuxième voie où le noyau reproducteur du grain de pollen seul, prend part à la formation du cal.

- une troisième voie où le noyau végétatif se divise d'abord; ensuite le noyau reproducteur se divise. Enfin il participent ensemble au développement du cal (Zapata et al., 1987).

3.3 - Le prétraitement des anthères:

Dans le but d'améliorer le rendement en nombre de cals, et en plantes haploïdes doublées régénérées, les anthères sont soumis à un choc thermique quelques jours avant leur mise en culture, c'est le prétraitement.

Cela permet aux grains de pollen immatures de dévier de leur destination initiale et de prolonger la voie sporophytique.

Chez le riz un traitement au froid (8-10°C durant 7 à 10 jours) augmente le pourcentage des cals (Cornejo Martin, 1981; Guiderdoni *et al.*, 1986).

Chez le Piment des résultats intéressants ont été obtenus avec des températures plus élevées de l'ordre de +35°C et à l'obscurité pendant 8 jours de culture dans un milieu contenant de la Kinétine et du 2,4-D (Dumas de Vaulx, 1981).

L'application de gamétocides au niveau de la plante mère, chez le Blé, augmente le rendement androgénétique (Picard *et al.*, 1987; Schmid et Keller, 1986). Beaumont et Courtois, 1990, ont appliqué cette technique sur le riz avec une pulvérisation précoce, avant la méiose des cellules mères des grains de pollen, multipliant ainsi le rendement par trois.

Par ailleurs, l'irradiation des anthères par des rayons gamma, suivie d'une culture *in vitro*, a permis la sélection d'une variété de riz tendre, haploïde doublée spontanée, à haut rendement (Yin et Yu, 1986).

Chez le riz, pour des raisons d'efficacité et de mise en culture (500 à 1000 microspores dans chacune des six anthères d'un épillet de riz) (Courtois et al., 1990), et de lenteur dans la réponse, la culture d'ovules ou d'ovaires est rarement utilisée (Asselin de Beauville, 1980). Cependant, elle reste valable dans le cas d'une stérilité mâle.

3.4 - La Préculture des anthères:

En culture de microspores, pour obtenir une meilleure réponse embryogénique, il est nécessaire de faire la préculture des anthères d'abord. Cela facilite la récupération ultérieure des microspores (Cho and Zapata, 1988; Chen *et al.*, 1980; Zia *et al.*, 1987; Raghavan, 1988).

3.4 - Action des régulateurs de croissances:

L'addition d'auxine comme l'ANA et/ou le 2,4-D est nécessaire pour la formation de cals chez le riz (Cornejo-Martin et Primo-Millo, 1981).

L'auxine dans le milieu a une influence considérable sur la capacité des cals à régénérer des plantules. Les meilleures fréquences de régénération étant obtenues avec des auxines du milieu d'induction que l'on retrouve dans le milieu de régénération (Rout and Sarma, 1991).

Les cytokinines comme la Kinétine ou la BAP, jouent aussi un rôle sur le développement de la plantule.

Généralement, les plantes haploïdes sont obtenues en deux étapes. A chacune de ces étapes, correspond un milieu déterminé et des conditions physiques bien précises:

- induction d'une séquence de mitoses qui aboutit à la formation d'un ou de plusieurs cals par la culture des anthères à l'obscurité dans un milieu dit d'induction.

- différenciation des cellules du cal en embryons puis, en plantules, à la lumière dans un milieu de régénération.

Le rapport Auxine/Cytokinine du milieu d'induction est souvent inverse dans le milieu de régénération.

Une grande innovation méthodologique a cependant permis de régénérer des plantules en une seule mise en culture d'anthers (Marassi *et al.*, 1993).

Il obtint par la culture d'anthers à l'obscurité, dans un milieu N6 + 2mg/l ANA + 0,5mg/l KIN la néoformation de plantules albinos, dont le transfert à la lumière a permis de devenir chlorophylliennes sans un changement préalable de milieu de culture.

4 - La restauration du niveau de ploïdie initial:

Les plantes haploïdes, stériles, ne sont pas utilisables en sélection. Pour cela il faudra d'abord reconnaître avec une bonne certitude l'haploïdie des plantes obtenues. Ensuite, il faudra restaurer le niveau de ploïdie initiale pour que les plantes redeviennent fertiles.

En outre il est nécessaire d'identifier les plantes diploïdes spontanées avant d'entamer le processus de doublement des chromosomes de plantes restées haploïdes.

4.1 - Le doublement des chromosomes:

La principale méthode de doublement artificiel du nombre de chromosomes d'un individu, consiste à traiter un ou des bourgeons végétatifs de l'individu haploïde, avec une solution de colchicine.

En se développant le bourgeon donnera naissance, dans le meilleur des cas, à un rameau diploïde qui portera des fleurs fertiles.

En plus de cette méthode standard, d'autres techniques *in vitro* ont été mises au point, avec un traitement plus ou moins précoce d'anthers ou de cals dans le but d'augmenter considérablement le nombre de plantes haploïdes doublées spontanées :

* Wang *et al.*, 1989 initient une méthode efficace pour le doublement spontané des chromosomes avec un traitement à la colchicine au niveau de cals.

Une des limites de cette méthode réside dans la forte probabilité d'apparition de plantes chimériques.

* Une amélioration dans la fréquence d'apparition des haploïdes doublées a été réalisée chez le tabac (Nitsch, 1977) et le blé (Barnabes *et al.*, 1991) avec un traitement au niveau des anthers avant et après leur mise en culture dans le milieu d'induction.

Chez le riz les anthers ont été soumises à un traitement précoce à la colchicine, qui est incorporée au milieu de culture par Huang et Liang (1979), puis par Alemanno et Guiderdoni (1994) qui ajoutent à un milieu d'induction de cals, de la colchicine à une concentration de 250 à 500 mg/l durant 24 à 48 heures. Ensuite les anthers sont cultivées dans un milieu identique mais dépourvu de colchicine. Ils ont, par ce procédé, pu améliorer la fréquence d'apparition de plantes haploïdes doublées spontanées qui passe ainsi de 31 à 65%.

4.2 - Le contrôle du niveau de ploïdie:

Le comptage des chromosomes sur plaque métaphasique de méristèmes de racines en divisions actives, est la méthode la plus usitée dans les laboratoires de recherche, c'est aussi la plus fastidieuse et pas obligatoirement la plus fiable.

Certains caractères des stomates de feuilles ont une bonne corrélation avec le degré de ploïdie. Dans la pratique le sélectionneur détecte le degré de ploïdie des plantes d'une bonne

taille, d'après l'aspect général: plantes plus petites que les diploïdes, feuillage terne, tallage fort, dominance apicale réduite et stérilité des fleurs.

Ces observations demandent d'élever les plantes pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois.

Pour ces raisons une autre technique applicable à un stade très précoce, à été mise au point en utilisant la cytométrie en flux.

Avec cette technique on met en suspension dans un tampon, les noyaux cellulaires d'une feuille de chaque plantule obtenue par haplométhode.

Ces noyaux sont colorés avec un fluorochrome spécifique de l'ADN et passés au cytofluoromètre en flux qui détermine précisément pour chaque noyau, l'intensité de fluorescence, à raison de 5000 mesures par minute environ.

L'intensité de fluorescence étant proportionnelle à la quantité d'ADN du noyau, on peut "lire" le degré de ploïdie par comparaison à un témoin.

Dès que le degré de ploïdie diploïde est atteint (nous avons alors des lignées haploïdes doublées) et on procède aux autofécondations contrôlées qui permettent d'obtenir les semences de lignées fixées (homozygotes).

5 - Variation somaclonale:

Il a été établi pendant de nombreuses années que des variations diverses, d'origines variées, apparaissent au niveau de plantes et/ou de leurs descendants, issues de cultures de tissus.

En plus de l'albinisme et de la polyploïdie qui sont les plus fréquents au niveau de plantes androgénétiques, d'autres variations induites existent et peuvent être une source de mutations utiles pour l'amélioration.

San et Dattee (1984) estiment que l'albinisme, très fréquent surtout chez les Graminées androgénétiques, pourrait résulter de l'état de la cellule au moment de la mise en culture ainsi que du passage *in vitro*.

En androgénèse chez les Graminées, la culture s'adresse à des gamétophytes très jeunes (microspores uninuclées jeunes), il serait alors possible que les proplastides n'aient pas été suffisamment différenciés pour que s'enclenche la procédure normale de formation des chloroplastes San et Dattee, 1984).

Par contre, chez d'autres espèces comme le piment ou le tabac, la réponse androgénétique s'effectue à partir de microspores plus âgées (microspores au stade mitose pollinique ou deux noyaux jeunes) où les signaux de différenciation seraient déjà en place; ce qui expliquerait la rareté des albinos.

Par ailleurs, les modifications de la garniture chromosomique, garantes de la stabilité de la descendance constituent une source de variabilité, qui se produisent dès que l'on induit un certain niveau de décorrélation cellulaire, ou une longue durée de culture *in vitro* non morphogène.

La baisse de fertilité est l'une des nombreuses conséquences d'aberrations ou remaniements chromosomiques.

En outre, de nombreux travaux sur des lignées fixées parentales ont mis en évidence des différences au niveau de la descendance chez diverses espèces comme le tabac (Deaton et al. 1982; Burk et Matzinger, 1976; Arica et al. 1978), le blé (Picard et al. 1984), le colza (Hoffman et al. 1982), le riz (Truong-Andre, 1977; Kuadio, 1979; Dossou-Yovo et al., Schaeffer et al., Wakassa, 1982; Schaeffer et al. 1984), et l'orge (San et Ahmadi, 1982).

Ces différences peuvent se résumer ainsi:

- baisse plus ou moins grande de la vigueur (tabac).
- variation des caractères agronomiques (blé, riz, orge).

- différences phénotypiques (colza, riz).

L'existence d'une hétérozygotie résiduelle ou de mutations parmi les gamètes à l'origine de plantes haplodiploïdisées, pourraient expliquer ces variations assez inattendues (San et Dattee, 1985).

Tableau 2 : Caractéristiques de la variété IR 13240-108-2-2-3.

NOM DE LA VARIETE :IR13240-108-2-2-3	VULGARISATION : SAHEL 108
PEDIGREE : IR 30 (BPH) / BABAWEE // IR 36	
NOM DE LA LIGNE :	ESPECE / ORYZA SATIVA
ORIGINE : IRRI (PHILIPPINES)	GROUPE VARIETAL / INDICA
TYPE DE CULTURE : IRRIGUEE	ZONE CULTURE : VALLEE DU FLEUVE SENEGAL
CARACTERISTIQUES	
Cycle -semis floraison (jour)	:Hiv = 76 CSS=86
Cycle à maturité (jours)	:Hiv = 105 CSC=117
Hauteur (cm)	:90
Rendement potentiel	:10/ha
Tallage	:Bon
Port plant	:Ferme
Port feuille	:Erigé
Egrenage	:Faible
Couleur feuille	:Verte
Couleur ligule	:Blanche
Couleur collet	:Brune
Couleur auricule	:Brune
Longueur panicule	:21,5 cm
Type de panicule	:Compact
Port panicule	Erige
Nombre panicule/m2	:350
Longueur grain (paddy)	:8,9 mm
Largeur grain (Paddy)	:2,47 mm
Aristation	Non aristé
Poids 1000 grains	:24 gr
Format grain (L/l)	:Mince
Rendement décorticage	:
Rizcargos	:82,3
Riz blanc	:66,8
Riz entier	:90
Blancheur	:31,7
Longueur cargo	:7
Largeur cargo	:2,14
%Crayeux	:1
Amylose	:27
Tenue à la cuisson	Bonne pour la cuisine Sénégalaise
Température de gélâtini	:HI/I
Résistance aux insectes et auxmaladies	:Tolérante pour la zone concernée
Observation	Score =Standard Evaluation Systems for rice

Source : ADRAO, 1995.

C - MATERIELS ET METHODES:

1 - Présentation du matériel végétal:

Notre étude a été réalisée sur deux variétés de l'espèce *Oryza sativa* L.

-Moroberekan qui est une variété africaine à cycle long et à haut rendement. Elle est résistante à la sécheresse et à diverses maladies du riz comme la Pyriculariose. Cette variété appartient au groupe japonica.

-IR 13240-108-2-2-3 qui est une variété asiatique sélectionnée à l'IRRI. Elle a été étudiée et vulgarisée récemment au Sénégal, par le tandem ISRA/ADRAO à cause de son adaptation à l'environnement sahélien. Elle a un cycle court et un bon rendement. C'est une variété qui appartient au groupe indica (Tableau 2).

2 - Conduites des expériences:

2.1 - Les cultures:

Pour la germination, les graines de riz sont trempées dans l'eau pendant 24 heures. Cela facilite leur gonflement et la pénétration uniforme de l'eau.

Puis les graines sont semées en pépinière au niveau de la serre dans des bacs contenant du sable stérile.

Pour germer la graine a besoin d'air. Elle ne doit donc pas être trop submergée dans l'eau pour éviter une croissance difficile de l'embryon.

Les plantules bien développées, âgées de 3 à 4 semaines, sont repiquées au champ dans des parcelles de 1m² chacune contenant un mélange de sable et d'argile.

L'irrigation se fait journalièrement avec de l'eau du robinet.

Les plantes subissent un apport en engrais azoté durant deux étapes différentes de leur développement:

- 10g/m² d'Urée, une semaine après le repiquage des plantules au champ.

- 20g/m² d'Urée durant la phase paniculaire.

Ce traitement a permis un bon développement des plantes de riz qui ont donné les anthères utilisées lors de nos différentes manipulations.

2.2 - Le stade de prélèvement des anthères:

Pour la réussite de l'androgonèse, les anthères mises en culture doivent contenir des microspores au stade uninucléé (Cornejo-Martin et Primo-Millo, 1981; Huang et al.,; Guiderdoni et al., 1986). L'observation au microscope permet de déterminer ce stade.

Pour éviter de gaspiller inutilement du matériel végétal, les auteurs ont travaillé à mettre en place une bonne correspondance entre l'état cytologique uninucléé des microspores et l'aspect morphologique de la plante.

Le prélèvement des anthères a lieu lors de la montée de la panicule dans la gaine de la dernière feuille (= feuille paniculaire ou drapeau), précisément à 2/3 de la longueur de cette gaine (Yoboué, 1984). Cette distance est un critère fiable indiquant que la panicule possède un grand nombre de microspores au stade uninucléé qui est le stade le plus favorable pour le déclenchement de l'androgonèse. Les microspores sont uninucléées avec ou sans vacuoles.

Plus tôt, lorsque la panicule est au-dessous de ce niveau, on n'observe que des cellules mères au stade préméiotiques.

Cependant il est indispensable de faire un contrôle cytologique avant toute mise en culture.

Pour cela, les microspores sont colorées au carmin acétique et placées entre lame et lamelle.

2.3 - Prétraitement et stérilisation:

2.3.1 - Prétraitement:

Les panicules dans la gaine de la dernière feuille sont prélevées et subissent un prélavage rapide (1 min.) à l'alcool 70° accompagné de deux à trois rinçages à l'eau stérile.

Ensuite elles sont débarrassées de leur gaine, sous hotte stérile, puis placées dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre contenant du papier filtre imbibé d'eau stérile. Le tout est placé à l'obscurité pour un prétraitement au froid à 8°C pendant 8 à 10 jours.

3.2 - Stérilisation:

La panicule de riz est assez bien protégée par les gaines des différentes feuilles qui se recouvrent les unes sur les autres (phénomène caractéristique de Graminées). En outre, les épillets (fleurs) sont constituées d'enveloppes protectrices (glumelles). Tout ceci, constitue pour les anthères, une assez bonne protection contre les contaminations extérieures et facilite la stérilisation.

Le désinfectant utilisé est l'hypochlorite de calcium $\text{Ca}(\text{ClO})_2$. C'est un excellent désinfectant pour le riz mais, c'est aussi un produit chimique peu stable en solution aqueuse. On le prépare donc juste au moment de l'emploi. On pèse 50g de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ que l'on mélange dans 1 litre d'eau distillée (solution concentrée à 5%). Le tout est agité pendant 10 min. avant de laisser décanter la solution par simple sédimentation de la poudre d'hypochlorite. Ensuite on recueille le surnageant qui sera aussitôt utilisé pour stériliser l'explant.

Sous la hotte à flux laminaire, les panicules sont trempées dans des bocalux contenant la solution d'hypochlorite à 5% pendant 5 à 10 minutes. Puis elles sont lavées trois fois de suite à l'eau distillée stérile. Après ce traitement, elles sont prêtes pour la mise en culture dans un milieu d'induction.

2.4 - Préparation des milieux de culture:

Un bon milieu doit renfermer un ensemble d'éléments trophiques et oligodynamiques dont l'explant mis en culture a besoin, et à des doses favorables, à même d'orienter son développement dans le sens voulu.

Le choix de chaque élément du milieu, en fonction de l'objectif recherché, est très important pour la réussite de l'expérience.

Le protocole que nous avons suivi peut être scindé en plusieurs étapes:

- une phase d'induction de la callogenèse
- une phase de néoformation des cals en plantules
- une phase d'enracinement et d'élongation des plantules obtenues
- une phase de sevrage

A chaque phase correspond un ou des milieux de cultures bien précis (tableaux 3 et 4) ainsi que des conditions physiques et dynamiques favorables.

Tableau 3: MILIEUX D'INDUCTION DE CALS DE RIZ

Explant: anthères immatures
 Oryza sativa, Poacées-Graminées
 Auteurs: Chu et al., (1975)N6
 Murashige et Skoog (1962)
 Miller (1961a;1963)

Macréléments (mg/l)	Chu et al.,(75) N6	MS (62)	Miller (1961a;1963)
KNO3	2 830	1 900	1 000
NH4NO3	-	1 650	1 000
CaCl2,2H2O	166	440	-
MgSO4,7H2O	185	370	71,7
KH2PO4	400	170	300
(NH4)2SO4	463	-	-
Ca(NO3)2,4H2O	-	-	500
KCl	-	-	65
Micréléments (mg/l)	Chu et al.,(75)N6	MS (62)	Miller(1965; 1967)
KI	0,8	0,8	0,8
MnSO4,4H2O	4,4	22,3	14
ZnSO4,7H2O	1,5	8,6	3,8
H3BO3	1,6	6,2	1,6
Na2MoO4,2H2O	-	0,25	-
CuSO4,5H2O	-	0,03	0,36
CoCl2,6H2O	-	0,03	-
(NH4)6Mo7O24,4H2O	-	-	0,1
Cu(NO3)2,3H2O	-	-	0,35
Fer Chélaté	MS(1962) (mg/l)		
Na2EDTA	37,3		
FeSO4,7H2O	27,8		
*Vitamines	Nitsch et Nitsch (mg/l)		
Inositol	100		
Thiamine-HCl	0,05		
Acide-nicotinique	5		
Pyridoxine-HCl	0,5		
Biotine	0,05		
Acide folique	0,5		
*vitamineB12	1		
Acides aminés	mg/l		
Glycine	2		
Hormones	mg/l		
ANA	2		
KIN	0,5		
Source de carbone			
Saccharose	50g/l	50g/l	50g/l
pH	5,8	5,8	5,8
Agar	8g/l	8g/l	8g/l

*Les vitamines sont ajoutées au milieu après autoclavage par filtration stérilisante à 0.2 µm

Pour la préparation des milieux, il serait trop fastidieux de faire des pesées successives des différents éléments à mettre en solution. C'est pourquoi des solutions mères de chaque groupe d'éléments du milieu (macroéléments, microéléments, vitamines, hormones) sont préparées à une concentration finale connue.

Lors de la préparation des milieux de culture, il ne reste plus qu'à faire des prélèvements à partir des solutions mères afin d'obtenir une solution finale avec les concentrations voulues de chaque élément du milieu.

2.4.1 - Composition des milieux de culture:

2.4.2 - Les substances minérales:

Les macroéléments comme les microéléments sont nécessaires à la vie de la plante. Ce sont des constituants fondamentaux des tissus végétaux (macroéléments) et jouent un rôle capital dans les mécanismes enzymatiques comme activateurs ou constituant de coenzymes (microéléments).

Pour la phase d'induction, trois milieux de base différents ont d'abord été testés. Ceci afin d'en sélectionner les meilleurs qui permettent d'avoir un plus grand nombre d'anthères callogènes.

Il s'agit des milieux Miller (1961a; 1963), Murashige et Skoog (1962), et Chu et al., (1975) N6.

La composition de ces différents milieux est représentée dans le tableau 3.

Le fer est utilisé sous forme chélatée : Na₂EDTA 37,3mg/l + FeSO₄ 27,8 mg/l.

2.4.3 - Les substances organiques:

En culture in vitro, la nutrition des explants pose des problèmes particuliers. Avec l'androgenèse particulièrement, la culture d'anthères immatures, aphylls, complètement hétérotrophes, nécessite un apport en carbones organiques.

Nous avons utilisé le saccharose comme source de carbone avec deux concentrations différentes: 50g/l (milieu d'induction) et 30g/l (milieux de néoformation et d'enracinement).

2.4.4 - Les vitamines:

Les vitamines permettent un bon développement des tissus cultivés. Elles sont parfois associées à des acides aminés comme la glutamine et/ou la glycine.

Deux vitamines ont été utilisées dans nos expériences : les vitamines B12 et Nitsch et Nitsch (1965). Leur composition est donnée dans les tableaux 3 et 4.

2.4.5 - Les hormones:

Les régulateurs de croissances naturels des végétaux ou synthétiques, jouent un rôle essentiel sur la croissance et la néoformation des tissus végétaux. Nous avons utilisé deux types différents d'hormones : deux auxines fortes à très fortes, l'ANA et le 2,4-D, et deux cytokinines, la Kinétine et la Benzylaminopurine.

Les auxines sont très usitées en culture de tissus à cause de leur grande capacité à favoriser une prolifération de mitoses surtout lorsqu'elles sont associées à une cytokinine à faible dose.

Par contre, les cytokinines à forte dose, favorisent une néoformation de bourgeons sur les cals.

Quatre milieux modifiés Chu et al., (1975) N6, différents par leurs balances hormonales respectives, ont été réalisés :

Milieu I1: N6 + 2 mg/l ANA + 0.5 mg/l KIN

Milieu I2: N6 + 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l KIN

Milieu I3: N6 + 3 mg/l ANA + 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN

Milieu I4: N6 + 1 mg/l ANA + 3 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN

Pour la néoformation des cals obtenus, deux milieux modifiés Murashige et Skoog (1962), différents par la nature de la cytokinine ont été testés:

Milieu R1: MS (62) + 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA

Milieu R2: MS (62) + 1 mg/l KIN + 0.5 mg/l ANA

2.4.6 - Autres:

* Agent gélifiant : seul l' agar a été utilisé comme agent et concentré à 7g/l dans les milieux d'induction et à 8g/l au niveau des milieux de néoformation et d'enracinement.

* le pH : dans tous les milieux le pH est ajusté de façon uniforme à 5.8.

La stérilisation se fait à l'autoclave à 110°C pendant 20 minutes. Ensuite, sous hotte stérile, les vitamines sont ajoutées au milieu, après leur filtration stérilisante à 0.2 µm.

2.5-Induction de la callogenèse:

Les anthères immatures de riz sont mis en culture dans des boîtes de Pétri en Pyrex, stériles, de 60 mm de diamètre, contenant un milieu Chu et al., (1975) N6, qui est très usité en androgenèse surtout du riz (tableau 4).

Ce milieu a été modifié au niveau du Fer et des Vitamines, remplacés respectivement par ceux de Murashige et Skoog (1962) et de Nitsch et Nitsch (1965). La vitamine B12 a aussi été ajoutée au milieu.

En vu de faciliter la prolifération des mitoses, pour la formation d'un ou de plusieurs cals, outre l'acide aminé; la Glycine, ajouté au milieu, nous avons testé une série de mélange hormonales auxine-cytokinine. Principalement deux auxines synthétiques fortes à très fortes, ANA et 2,4-D respectivement, ont été testées, ainsi qu'une cytokinine; la Kinétine sur quatre milieux différents.

2.6 - Néoformation d'embryons:

Les cals obtenus sont repiqués dans un milieu modifié, Murashige et Skoog (1962).

Deux milieux de régénération R1 et R2 ont été préparés auxquels on ajoute deux types de cytokinines: la Kinétine (KIN.) et la Benzylaminopurine (BAP), afin de voir leur efficacité relative.

Pour orienter les cellules callogènes vers la voie embryogène, le taux en cytokinine est largement augmenté, inversement à celui de l'auxine.

Seul l'ANA est utilisé comme auxine dans ces milieux et à une faible concentration (Tableau 4).

Tableau 4: MILIEU D'ANDROGENESE RIZ

Explant : inflorescences immatures

Oryza sativa, Poacées-Graminées

Prétraitement : à 8°, Obscurité, 100% HR, 8j

Auteurs : Induction : Chu et al., 75(N6)

Régénération et enracinement : MS (1962)

	Induction				Régénération		Enracinement
Macroéléments	Chu et al.,19 75 (N6) mg/l				MS 62 (mg/l)		MS 1962 (mg/l)
KNO3	2 830				1 900		1 900
NH4NO3	-				1 650		1 650
CaCl2,2H2O	166				440		440
MgSO4,7H2O	185				370		370
KH2PO4	400				170		170
(NH4)2SO4	463				-		-
Microéléments	Chu et al., 1975 (N6) mg/l				MS 62 (mg/l)		MS 1962 (mg/l)
KI	0,8				0,8		0,8
MnSO4,4H2O	4,4				22,3		22,3
ZnSO4,7H2O	1,5				8,6		8,6
H3BO3	1,6				6,2		6,2
Na2MoO4,2H2O	-				0,25		0,25
CuSO4	-				0,03		0,03
CoCl2,6H2O	-				0,03		0,03
Fer Chélaté	MS 1962 (mg/l)						
Na2EDTA	37,3						
FeSO4,7H2O	27,8						
Vitamines	*Nitsch et Nitsch 1965 (mg/l)						
Inositol	100						
Thiamine-HCl	0,5						
Acide-nicotinique	5						
Pyridoxine-HCl	0,5						
Biotine	0,05						
Acide folique	0,5						
*B12	1						
Acide-aminés	mg/l				mg/l		mg/l
Glycine	2				2		2
Hormones	mg/l				mg/l		mg/l
	I ₁	I ₂	I ₃	I ₄	R ₁	R ₂	
ANA	2	-	3	1	0,5	0,5	-
2,4-D	-	2	1	3	-	-	-
BAP	-	-	-	-	1	-	-
Kin.	0,5	0,5	1	1	-	1	-
Source de carbone							
Saccharose	50g/l				30g/l		30g/l
pH	5,8				5,8		5,8
Agar	7g/l				8g/l		8g/l

* Les solutions mères de vitamines sont ajoutées au milieu après autoclavage par filtration stérilisante à 0,2 µm

2.7 - Elongation et enracinement des plantules:

Les plantules issues du milieu de néoformation sont repiquées en tube dans un milieu d'enracinement Murashige et Skoog (1962) (tableau 4). Ce milieu est sevré d'hormones (généralement inhibitrices de la rhizogenèse) pour favoriser l'élongation et l'enracinement des plantules.

3 - Les paramètres physiques des chambres de cultures:

Un bon environnement physique est nécessaire pour permettre la réussite des cultures.

Durant la phase d'induction des cals, les cultures sont placées à l'obscurité totale. La température reste constante à 27°C. L'hygrométrie est de 60% dans la chambre.

La néoformation des cals ainsi que l'enracinement des plantules obtenues sont réalisés à la lumière.

L'éclairage est assuré par des tubes fluorescents (L58 77), situés latéralement à 50cm par rapport aux cultures.

Un apport en rouge lointain est assuré par des ampoules à filaments tungstène de 220 volt, qui permettent de compléter le spectre de lumière des tubes fluorescents.

L'ensemble fournit un éclairage de 25 à 80 $\mu\text{E/s/m}^2$.

La chambre est soumise à une photopériode de 16 heures jour et 8 heures nuit et à une thermopériode de 28°C le jour et 27°C la nuit.

4 - Sevrage en serre:

Lorsque les plantules bien enracinées atteignent une certaine taille, (10 à 15cm), elles sont sorties des tubes et sevrées dans la serre.

Elles sont d'abord repiquées dans des miniserres constituées de bacs munis de couvercles. Trois types de substrats ont été testés :

- * des mottes "Melfert"

- * un mélange 3/4 sable et 1/4 tourbe préalablement imbibé d'eau.

- * un sol prélevé sous un acacia qui appartient à l'espèce *Acacia albida*.

Ces différents substrats ont été soumis à un double arrosage journalier une semaine avant leur utilisation.

Afin de permettre une bonne adaptation des plantules dans leur nouveau environnement, les couvercles des miniserres ne sont enlevés qu'après une à deux semaines plus tard.

5 - Doublement chromosomique par la colchicine:

A la floraison les plantes qui présentent des épillets vides, stériles, sont considérées comme des haploïdes. Les autres fertiles sont considérées comme des haploïdes doublées spontanées.

Le traitement se fait par trempage des éclats de talles dans une solution aqueuse de colchicine (0,1%) et de DMSO (2%) pendant 24 heures à la température ambiante. Les talles sont ensuite rincées puis repiquées sur le terrain. La fertilité des nouvelles panicules indique la réussite du traitement (Figure 9).

Les plantes restées stériles après ce traitement sont éliminées.

Tableau 5 : Comparaison des compositions ioniques des macroéléments en meq/l

	NO3-	PO4---	SO4--	Cl-	K+	Ca2+	Mg2+	NH4+	H+	Total N	NH4+/N	P.osmotique mM
N(6)	27,99	8,81	8,5	2,25	2,25	2,25	1,5	7	5,87	34,99	0,2	0,32
Miller (1961)	26,61	6,61	0,58	0,87	0,87	4,23	0,58	12,49	4,4	39,1	0,31	0,18
MS (62)	39,4	3,74	3	5,98	5,98	5,98	3	20,61	2,49	60,01	0,34	0,12

D - RESULTATS:

1- Induction de cals:

1.1 - Influence de 3 milieux minéraux:

Sur les trois milieux d'induction testés, le milieu Chu et al., (1975) N6 a donné le plus grand nombre d'anthères callogènes pour chaque variété. Le milieu MS(62), n'a donné aucun résultat, alors que sur milieu Miller (1961a;1963), seule la variété Moroberekan a réagi mais avec un nombre limité d'anthères.

Le tableau 5 permet d'établir une comparaison entre la composition ionique des milieux N6, MS, et Miller.

Il ressort de ce tableau que le milieu MS, par rapport aux autres milieux, est presque deux fois plus riche en azote. La pression ionique ainsi que la teneur en ions NH_4^+ y est identique à celui du Miller contrairement au milieu N6 qui a une teneur en NH_4^+ plus faible. Ce dernier milieu a une teneur en ions NO_3^- et un total en azote similaire à celui du milieu Miller qui cependant, comme pour le milieu MS, présente un déficit en ions SO_4^{--} .

L'excès d'azote du milieu MS, et le déficit en ions SO_4^{--} des milieux Miller et MS, pourraient expliquer les différences de résultats obtenus sur la production de cals.

Ces testes préliminaires montrent que, dans nos conditions, le milieu N6 est meilleur pour l'induction des cals, par rapport aux autres milieux (Figure 9). C'est pourquoi nous l'avons choisi comme milieu d'induction de base pour l'expérimentation des différentes combinaisons hormonales, lors de nos expériences ultérieures (tableau 3).

1.2 - Influence du renouvellement du milieu de base (N6):

Sur milieu N6, les cals apparaissent 3 semaines après leur mise en culture. Seulement, nous avons enregistré une très faible fréquence d'apparition des cals. Ce n'est qu'après le repiquage des cals dans un nouveau milieu frais que l'on a pu obtenir de meilleurs résultats (Figure 10).

Les cals apparaissent par fissuration latérale de la paroi de l'anthère au niveau des sacs polliniques, dûs à une prolifération des mitoses à partir d'une ou de plusieurs microspores (Planche 7 : c).

L'apparition des cals se fait de façon asynchrone. Ils sont de couleur blanche, compacts ou friables.

Un même anthère peut donner un ou plusieurs cals dont chacun peut se développer et se fragmenter (clonage précoce de cals).

Pour éviter des erreurs lors du décompte, nous utiliserons le terme d'anthères callogènes pour désigner les anthères ayant donné un ou plusieurs cals.

Les cals se présentent sous des aspects variés en fonction du milieu de culture.

Sur milieu d'induction à faible dose hormonale (I1 et I2), les anthères callogènes donnent peu de cals (généralement un seul cal apparaît par anthère callogène) mais qui, après une semaine de culture, peuvent être de grande taille (jusqu'à 1cm).

Sur milieu d'induction avec mélange de deux auxines (I3 et I4) par contre, le nombre de cals apparu par anthère callogène est plus nombreux avec une moyenne de 8 cal par anthère. Ces derniers sont de plus petite dimension (1 à 2mm), arrondis, ayant l'aspect de petites billes. Ces cals ont une croissance modérée, après une semaine de culture. Des évaluations des rendements androgénétiques de chaque variété testée ont été réalisées (tableau 6).

Tableau 6: Résultats des mises en culture d'anthères des variétés IR 13240-108-2-2-3 et Moroberekan

Variétés	Milieux de régénération R1											Milieux de régénération R2						
	A	B	C	D	E	F	*G	*H	I	J	K	L	M	*N	*O	P	Q	R
	Milieu d'induction	Nombre. d'anthères cultivés	Nombre. d'anthères callogènes	% d'anth. callogènes C/Bx100	Nombre. de cals repiqués sur R1	Nombre. de cals régénérants	Pltes vertes	Pltes albinos	% Pltes albinos H/Fx100	% néof F/Ex100	Rdmts en cals néof. F/Bx100	Nb. de cals repiqués sur R2	Nb. de cals régénérants	Pltes vertes	Pltes albinos	% Pltes albinos O/Mx100	% de néof. M/Lx100	Rdts en cals néof. M/Bx100
IR	I1	540	49	9	25	7	7	0	0	28	1,29	24	6	5	1	20	25	1,11
	I2	360	6	1,6	2	1	1	0	0	50	0,27	4	2	2	0	0	50	0,55
	I3	360	51	14,16	26	2	2	0	0	7,69	0,55	25	6	6	0	0	24	1,66
	I4	360	59	16,38	29	1	1	0	0	3,1	0,27	30	7	4	3	42,8	23,33	1,94
Moro	I1	720	56	7,5	46	14	8	6	42,8	30,43	1,94	10	4	2	2	50	40	0,55
	I2	360	12	3,3	6	2	2	0	0	33,3	0,55	6	2	1	1	50	33,3	0,55
	I3	360	6	1,6	2	2	1	1	50	100	0,55	4	3	2	1	33,3	75	0,8
	I4	540	15	2,5	8	4	2	2	50	50	0,74	7	3	2	1	33,3	42,8	0,8

* nombre de cals régénérant une ou plusieurs plantes androgénétiques.

I1 = N6 + 2 mg/l ANA + 0.5 mg/l KIN.

I2 = N6 + 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l KIN.

I3 = N6 + 3 mg/l ANA + 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN.

I4 = N6 + 3 mg/l 2,4-D + 1 mg/l ANA + 1 mg/l KIN.

R1 = MS + 0.5 mg/l ANA + 1 mg/l BAP

R2 = MS + 0.5 mg/l ANA + 1 mg/l KIN.

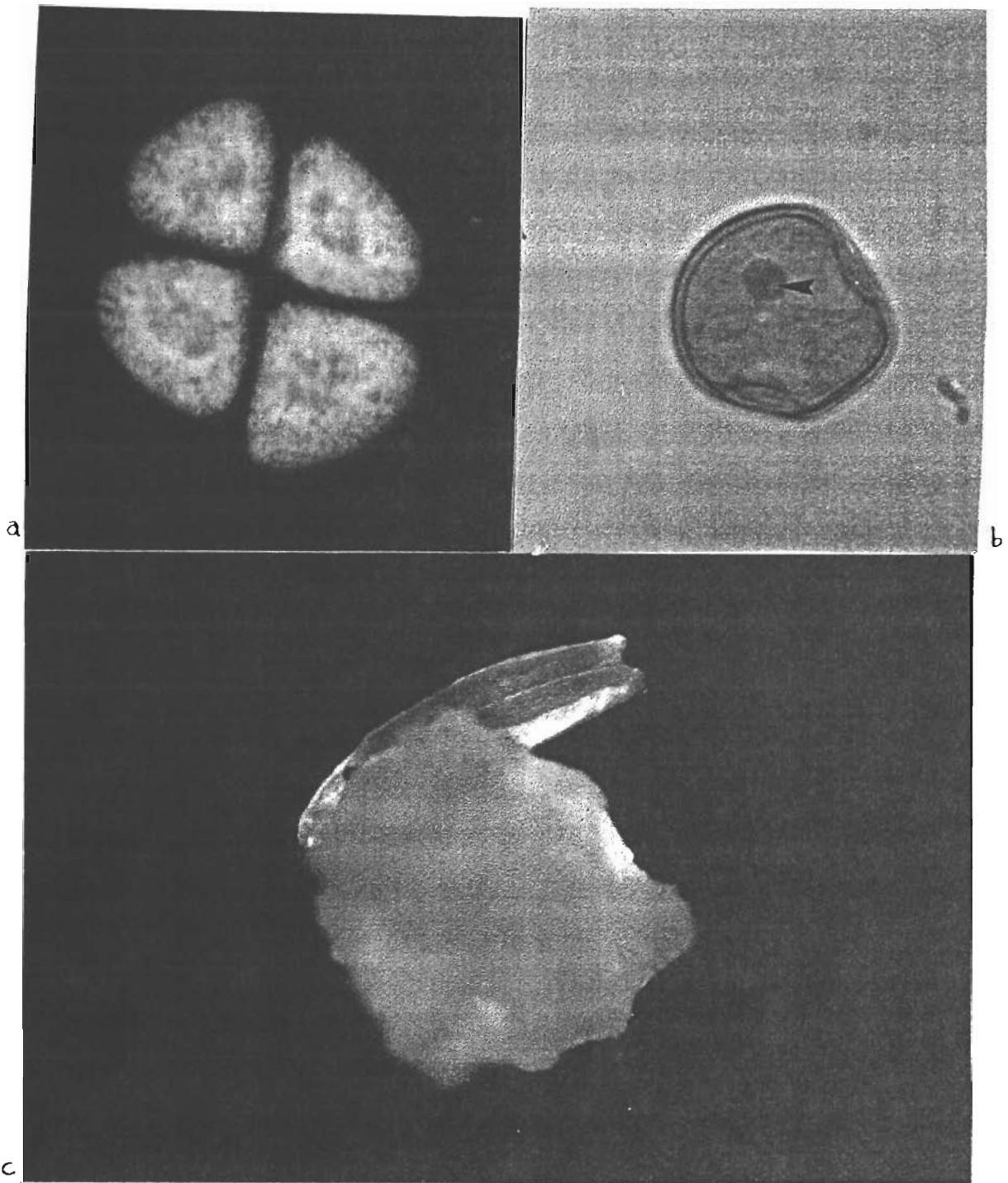


Planche 7: Induction de la formation de cals à partir d'anthères immatures.

photo a : Tétrade formée de 4 microspores issues de la méiose, colorées au DAPI (observer les gros noyaux). G x 980

Photo b : Microspore uninucléée colorée au carmin acétique. G x 980

photo c : Formation de cals, 3 semaines après mise en culture des anthères sur un milieu d'induction N6 modifié. G x 9.2

LA COLORATION AU DAPI:

Préparation:

Le DAPI est livré en flacons de 10 mg en poudre à dissoudre sans faire des pesées car le produit est dangereux.

- dissoudre 10 mg de DAPI dans 10 ml d'eau distillée (solution concentrée à 1 mg/l).

Le produit, photosensible, devra être bien protégé dans un flacon en verre recouvert de papier aluminium.

Coloration et observation:

- mélanger 1 ml d'eau distillée à 10 μ l de la solution de DAPI.
- déposer les anthères sur une lame propre et sèche.
- déposer dessus 10 à 20 μ l du mélange
- écraser les anthères pour libérer les microspores puis enlever les débris
- recouvrir le tout d'une lamelle
- observation au microscope à fluorescence.

PREPARATION DU CARMIN ACETIQUE:

- Chauffer jusqu'à ébullition 1 litre d'eau acétique à 45 % dans un erlenmayer de 2 litres.
- verser le carmin acétique dans la solution et laisser mijoter pendant 5 minutes.
- laisser décanter jusqu'au refroidissement avant de filtrer.
- l'addition de quelques gouttes de perchlorures de fer permet d'accentuer l'intensité de la coloration.

Coloration et observation:

- déposer les anthères sur une lame propre et sèche.
- déposer dessus une goutte du colorant
- écraser les anthères pour libérer les microspores
- enlever les débris de l'anthère
- recouvrir d'une lamelle puis observer.

Figure 9: Influence de 3 milieux minéraux sur l'induction de cals à partir d'anthères issues de 2 variétés de riz.

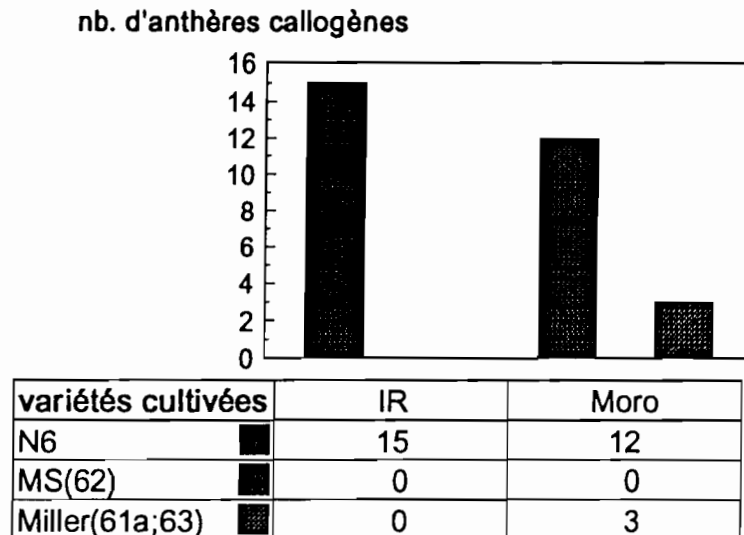
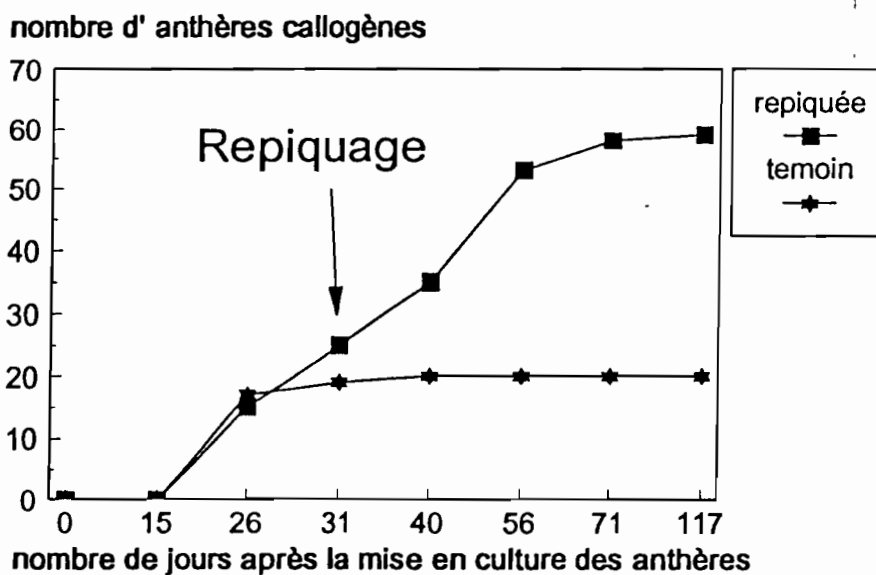


Figure 10: Influence du renouvellement du milieu de base (N6) sur la production de cals à partir d'anthères de la variété IR 13240-108-2-2-3.



1.3 - Influence de la nature hormonale du milieu:

Le nombre d'anthères callogènes varie suivant la variété étudiée et le dosage hormonal testé.

Les pourcentages d'anthères callogènes oscillent entre 1,6% et 16,38 anthères callogènes pour 100 anthères mises en culture.

Les meilleurs pourcentages pour la variété IR ont été obtenus dans les milieux I3 et I4 c'est à dire avec mélange de deux auxines; ANA 3mg/l + 2,4-D 1mg/l + KIN 1mg/l ou ANA 1mg/l + 2,4-D 3mg/l + KIN 1mg/l. Ils sont respectivement 14,16% et 16,38 % (Figure 11).

Par contre pour la variété Moro, le meilleur pourcentage est donné par le milieu I1 qui contient une seule auxine, l'ANA à 2mg/l + KIN 0,5mg/l, avec 7,5 anthères ayant donné un ou plusieurs cal pour 100 anthères mises en culture.

Ce taux est comparable à celui réalisé sur un milieu identique pour la variété IR, qui est de 9%.

2 - Néof ormation de plantules:

Après 30 jours de culture, les cals repiqués sur milieu de régénération donnent au bout de 3 semaines soit des plantules vertes soit des plantules albinos (Planche 8 : a et b).

L'apparition de plantules vertes et albinos au sein d'un même cal a été aussi observé mais très rarement.

Les plantules bien développées dans les boîtes de pétri, repiquées en tube dans un milieu M.S.(1962) sans hormones, commencent à émettre des racines dès la première semaine de mise en culture. Ces dernières sont nombreuses, fines et munies de nombreux poils absorbants (Planche 9 : a et b).

2.1 - Influence de la préculture sur différents milieux d'induction sur le taux de néoformation de bourgeons adventifs à partir de cal s:

Sur milieu de régénération R1 (MS + 0.5 ANA + 1 mg/l BAP), les meilleurs taux de néoformation ont été obtenus pour les deux variétés, sur les cal s issus du milieu I1 (N6 + 0.5 mg/l KIN + 2 mg/l ANA) avec 1,29 % pour la variété IR et 1,94% pour la variété Moro. Les cal s issus des autres milieux d'induction ont faiblement régénéré, avec des taux variant de 0,27% à 0,74% (Figure 12).

Sur milieu de régénération R2 (MS + 0.5 ANA + 1 mg/l KIN.), par contre, les meilleurs taux sont obtenus sur des cal s de la variété IR issus des milieux d'inductions I3 (N6 + 3 mg/l ANA + 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN) et I4 (N6 + 1 mg/l ANA + 3 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN) avec respectivement 1,66 % et 1,94% (Figure 13).

Sur des cal s de la variété Moro issus des mêmes milieux, ce taux est de 0.8%.

Pour les deux variétés, les cal s issus du milieu d'induction I2 (N6 + 2mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l KIN) présentent le plus faible taux de néoformation.

Par ailleurs, nous avons remarqué pour chaque variété, que les néoformations issues de milieux d'induction I1 et I2 présentent déjà des racines nombreuses contrairement aux autres néoformations, à partir de cal s issus des autres milieux, qui restent très peu ou pas du tout enracinées. Il faudra les transférer dans un milieu d'enracinement, dépourvu d'hormones pour obtenir leur enracinement.

Cependant, le nombre de plantes apparues, sur les cal s issus des milieux I3 et I4, sont plus nombreuses. C'est des touffes de bourgeons qui apparaissent contrairement aux

Figure 11: Influence de la nature hormonale du milieu d'induction sur la production de cals.

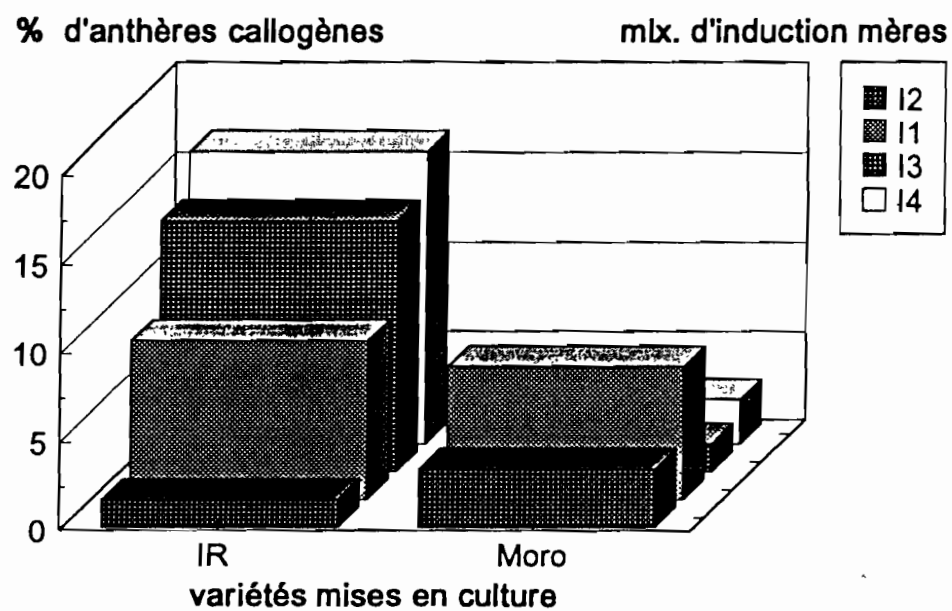


Tableau 6D

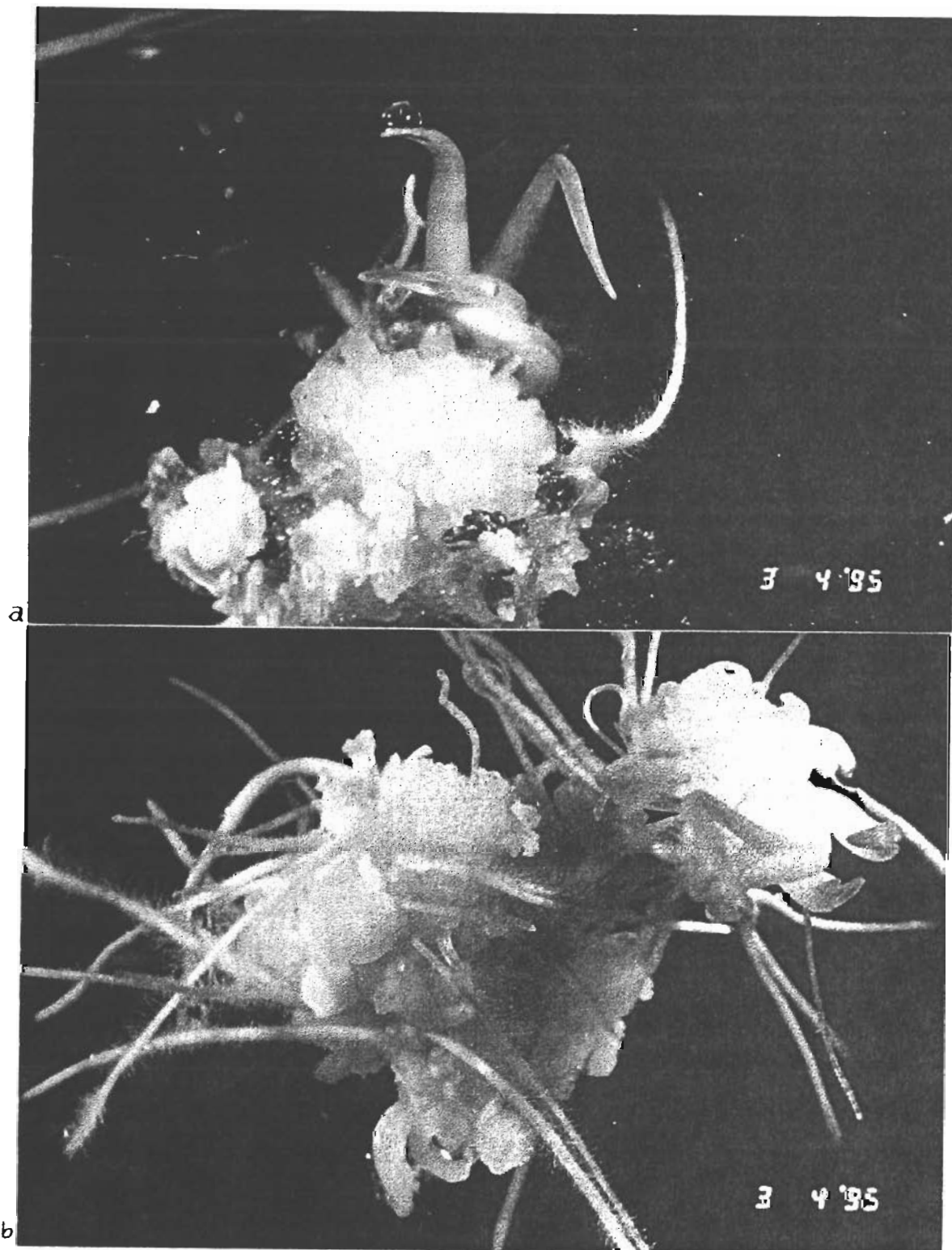


Planche 8: Néof ormation de plantules androgénétiques.

Photo a: Régénération de plantules androgénétiques chlorophylliennes à partir de cals induits sur un milieu N6 modifié, 3 semaines après leur subculture sur un milieu MS modifié auquel on a ajouté 1mg/l KIN et 0,5 mg/l ANA. G x 9,2

photo b : Régénération de plantules albinos. G x 9,2



Planche 9: Elongation, enracinement et sevrage des vitroplants régénérées.

Photo a: plantules en phase d'élongation et d'enracinement , 2 semaines après leur transfert sur un milieu MS dépourvu d'hormones. G x 0.9

Photo b: Plantules en croissance, 15j après le sevrage dans du sable prélevé sous un Acacia (*A. albida*). G x 0.4

Figure 12: Influence de la préculture d'anthères sur différents milieux d'induction callogènes (I1, I2, I3, I4) sur le taux de néoformation de bourgeons adventifs à partir de cals subcultivés sur le milieu R1 (MS+1mg/l BAP+0.5mg/l ANA).

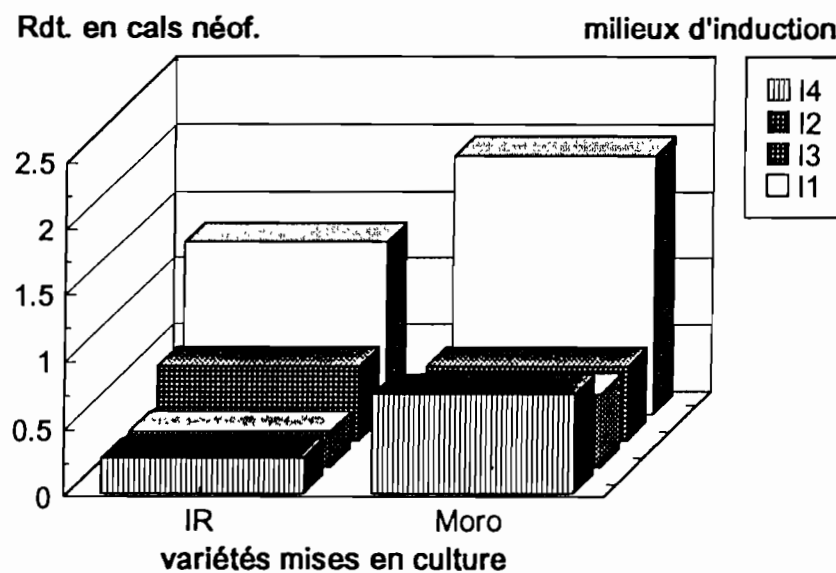


Tableau 6 K

Figure 13: Influence de la préculture d'anthères sur différents milieux d'induction callogènes (I1, I2, I3, I4) sur le taux de néoformation de bourgeons adventifs à partir de cals subcultivés sur le milieu R2 (MS+1mg/l KIN+0.5mg/l ANA).

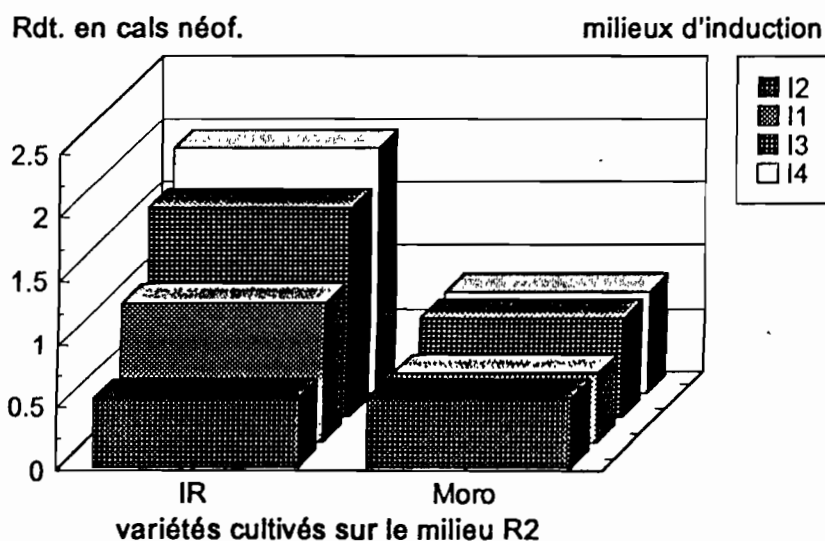


Tableau 6 R

néoformations obtenues sur les autres milieux où on note une à quatre plantules par cal ayant régénéré.

Des coupes, après inclusion, réalisée sur des cals de la variété Moro issus du milieu d'induction I1 et I4, néoformés sur le milieu de régénération R2, ont montré des amas cellulaires assez structurés présentant une partie supérieure avec des ébauches de feuilles en croissance de part et d'autre d'un dôme méristématique et une partie inférieure amorphe, inorganisée. C'est des bourgeons adventifs.

Cependant, d'autres ont des formes diverses, parfois allongées, voisines d'une torpille, d'où l'idée d'une autre voie de néoformation qui passe par un stade embryon.

Cependant la non netteté de ces structures semble ici, atténuer l'hypothèse d'une néoformation par voie embryogène.

Le phénomène de l'albinisme qui est fréquent en androgenèse, est absent avec la variété IR sauf sur les cals du milieu I4 repiqués sur milieu R2 où on note un pourcentage de 42,8%. Par contre pour la variété Moro, ce phénomène est beaucoup plus fréquent et atteint 75% chez les cals issus du milieu I2 mis en culture dans un milieu de régénération contenant de la kinétine.

Cependant compte tenu des effectifs de cals mis en culture qui sont à ce niveau faibles, ces forts taux de plantes albinos semblent être assez relatifs.

En tout, nous avons régénéré 232 plantes androgénétiques sur un effectif de 3600 anthères mises en culture, soit un rendement de 6.44 plantes obtenues pour 100 anthères cultivées.

Parmi les plantes régénérées, 213 sont chlorophylliennes et 19 albinos, soit un pourcentage de 91.81% et 8.18% respectivement.

Ces plantes appartiennent aux deux variétés étudiées avec 132 plantes pour la IR et 100 pour la Moro.

3 - Sevrage:

3.1 - Influence du type de substrat:

Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau 7.

Les substrats constitués d'un mélange sable/tourbe et celui représenté par le sable d'acacia ont donné le meilleur taux de survie qui est de 100%. Les plantules ont une bonne croissance. Les plus vigoureuses sont localisées au niveau du sable d'acacia.

Avec les mottes "Melfert" par contre, beaucoup de pertes en matériel végétal ont été enregistrées. Seule 15% des plantules ont pu survivre.

La longue durée de stockage de ces mottes a occasionné l'apparition de larves de termites. Ces dernières s'attaquent aux racines des jeunes plantules sevrées d'où le nombre élevé de plants morts. Le traitement avec un insecticide le Temik G, a permis la survie des plantules restantes.

4 - Le doublement chromosomique par la colchicine:

A la floraison, les plantes dont les chromosomes ne se sont pas doublés spontanément *in vitro*, présentent des épillets vides stériles. Ce sont des plantes de petite taille, avec un tallage bien développé, et des épillets petits et nombreux (Planche 10 : a).

Ces caractères sont communs à l'ensemble des plantes haploïdes.

Certaines plantes par contre présentent des épillets pleins fertiles. Le doublement de leurs chromosomes s'est réalisé *in vitro* (Planche 10 : b).

Tableau 7: effets du substrats sur la réussite du sevrage.

Substrats	nombre plantes sevrées	taux de survie
Mottes "Melfert"	40	15%
Sable-tourbe	50	100 %
Sol d'acacia	85	100 %

Tableau 8: traitement à la colchicine.

Variétés	*Effectif	Plantes HDS	HDSFP	HD par la colchicine
IR	56	16/56 = 28.57 %	0	28/40 = 70%
Moro	54	26/54 = 48.18 %	14/26 = 53.84 %	9/27 = 33.33 %

*Nombre de plantes sévrées en fin de cycle.

HDS = plantes haploïdes doublées spontanées

HD = plantes haploïdes doublées

HDSFP = plantes haploïdes doublées à fertilité partielle



Planche 10: Plantes androgénétiques en fin de cycle (épillets mûrs).

Photo a: plantes androgénétiques Haploïdes (H) (variété IR). La flèche indique l'emplacement des panicules qui sont droites avec des épillets de petite taille. G x 0.4

Photo b: plantes androgénétiques haploïdes doublées (HD) de la variété IR. Les panicules sont recourbées sous le poids des graines qui ont une bonne taille. G x 0.4

Les variétés IR et Moro ont donné respectivement 28.57% et 48.14% de plantes diploïdes spontanées (tableau 8).

Parmi les plantes autodoublées de la variété Moro, certaines présentent une fertilité partielle avec des épillets pleines et d'autres vides.

Chez la variété IR, cette fertilité partielle est inexistante.

Les plantes restées haploïdes, traitées à la colchicine, donnent de nouvelles tiges qui, à la floraison, peuvent être fertiles (à conserver) ou stériles (à éliminer).

Une certaine variation a été constatée au niveau la variété Moroberekan avec des individus plus courts et présentant des épillets à arête longue et d'autres ressemblant à la plante mère avec des épillets sans arêtes (planche 11: a et b).

Chez la IR, une variation au niveau de la taille des individus a aussi été constatée. On note la présence d'individus de taille identiques à la plante mère et d'autre plus courts.

Le traitement à la colchicine des plantes restées stériles à la floraison a donné les résultats qui figurent dans le tableau 8.

La variété IR a donné le meilleur taux de réussite avec 70% des plantes traitées qui sont devenues diploïdes.

Avec la variété Moro le taux de réussite est plus faible. Il est de 33,3%.

Cependant, il faut noter que depuis la régénération *in vitro*, beaucoup de pertes en plantes, pour des raisons diverses, ont été enregistrées (voir tableau ci - dessous).

Stade expérimental	Pertes	Causes
<i>in vitro</i>	57/232	- nécrose - pollutions - défaillances techniques
Sevrage	34/175	- termites
Serre	31/141	- blessures - défaillance du système d'arrosage automatique (ex : obstruction des filtres par des dépôts de débris)
Total	122/232	



Planche 11: Les épillets des plantes androgénétiques haploïdes doublées régénérés
 photo a: épillets mûrs (HD) de la variété Moro après le doublement des chromosomes par la colchicine. $G \times 0.4$
 photo b: épillets de plantes androgénétiques (HD) de la variété Moro présentant une aristation des graines (absente chez la plante donneuse) après doublement des chromosomes par la colchicine. $G \times 0.4$
 photo c: panicules de plantes haploïdes de la variété Moro $G \times 0.4$

E - DISCUSSION:

1 - Les milieux minéraux:

Parmi les milieux minéraux testés, le milieu Chu et *al.* (1975) N6 présente une aptitude nettement supérieure pour l'induction de cals sur les autres milieux MS (62) et Miller (1961a, 1963).

Zapata et *al.*, 1990, montrent, en cultivant des microspores isolées de riz, que l'utilisation d'ions nitrates comme unique source d'azote dans un milieu N6, inhibe l'induction de cals, contrairement à l'utilisation de deux sources d'azote; démontrant ainsi que l'azote sous forme d'ammonium du milieu ne peut pas être remplacé par une augmentation du taux en azote sous forme nitrate. L'azote total du milieu devra être constitué d'ions ammonium et d'ions nitrates.

Cependant, cette différence de réponse, selon les milieux, est fréquente en culture d'anthers de riz. C'est pourquoi, il est nécessaire de tester une gamme assez large de milieux minéraux afin de voir les meilleurs, pour chaque variété étudiée.

2 - Le renouvellement du milieu de base:

Le renouvellement du milieu de base permet d'augmenter le nombre d'anthers ayant produit un ou plusieurs cals.

D'après Aruga et Nakajima, 1985, les substances nutritives contenues dans les milieux de culture pénètrent difficilement à l'intérieur des anthers à cause de leurs parois ondulées, sans un contact franc et continu avec le milieu de culture. Avec la dégradation progressive des tissus de l'anthere mise en culture, les éléments trophiques peuvent alors atteindre graduellement les grains de pollen sevrés de nourriture.

Ces mêmes auteurs montrent, chez le tabac, une diminution précoce de la teneur en sucre au niveau d'anthers cultivées sur un milieu riche en saccharose. Au sein des microspores faiblement nourries, un nombre limité commence à suivre la voie sporophytique.

Le renouvellement du milieu de base, par sa plus grande disponibilité en saccharose, permet à un plus grand nombre de microspores d'entrer en divisions actives. En plus, lorsque l'apport en nourriture intervient après une période de famine, elle peut être, selon certains auteurs, un facteur important pour l'embryogenèse des grains de pollen.

Une meilleure connaissance des phénomènes d'échange à travers les tissus de l'anthere et des microspores pourrait permettre d'améliorer considérablement les rendements en cals produits.

Cependant, l'absence d'un synchronisme parfait des stades de développement des microspores dans l'anthere à prélever constitue un handicap.

En effet, lorsque à l'aide de repères morphologiques et de contrôles microscopiques, on prélève des anthers, dans lesquelles une grande majorité des microspores va entrer en mitose, une certaine proportion d'entre elles est encore au stade tétrade et une autre est déjà binuclée (Demarly et Sibi, 1985). Il en est de même avec les anthers d'un épillet et au sein des différents épillets le long de la panicule.

Généralement, c'est la partie médiane de la jeune panicule qui contient le plus grand nombre d'anthers à microspores uninuclées jeunes à tardives (Marassi et *al.*, 1993).

Une amélioration des méthodes de prétraitement, ainsi que la culture de grains de pollen isolées, pourraient permettre de disposer d'une population plus homogène de microspores augmentant ainsi les chances d'avoir un plus grand nombre de pollen embryogènes.

3 - La nature hormonale:

La nature hormonale du milieu influe sur la capacité des anthères à produire un ou plusieurs cals.

On note des différences significatives de la réponse en fonction de la nature et/ou de la combinaison en hormones ainsi que de la variété de riz cultivée.

Ces observations traduisent l'existence d'un effet génotypique et du milieu de culture.

L'existence d'un effet génotypique, sur des cultures d'anthères, a été relaté par plusieurs auteurs dont Cho et Zapata, et Zapata et *al.*, en 1990. Il ont en plus, pour la première fois, démontré par la culture de microspores isolées de deux variétés du groupe indica, que l'on peut bien régénérer des plantes à partir de ces variétés dites récalcitrantes.

Leurs travaux ont pu mettre en évidence, sur deux variétés du groupe indica IR 36 et IR 43, et une variété du groupe japonica Taipei 309, un dimorphisme pollinique avec des microspores embryogènes ou P-grains, et d'autres non embryogènes.

Les grains de pollen embryogènes, de plus grand diamètre, sont répartis en des proportions diverses suivant les variétés, avec une prédominance au niveau du groupe japonica, mais aussi au sein de la variété IR 43 qui est mieux fournie en P-grains que la variété IR 36. Cela se traduit par un rendement meilleur au niveau de la production de cals de la variété Taipei 309, japonica, et dans une moindre mesure, de la variété IR 43.

En fait, Heberle-Bors (1985) a eu le premier à relater, chez le tabac, ce phénomène de dimorphisme pollinique avec des P-grains embryogènes à côté d'autres grains de pollen non embryogènes, au sein des anthères. Mais à la différence des P-grains de Heberle-Bors où les microspores embryogènes sont plus petites par rapport aux non embryogènes, ceux de Cho et Zapata et Zapata et *al.*, sont de plus grande taille que les non embryogènes.

On pourrait supposer, à la suite de ces observations, que la forme comme la quantité en P-grains, pourrait varier d'un génotype à un autre, ou d'une espèce à une autre.

Diverses opinions existent sur l'origine de ces grains de pollen particuliers qui semblent nécessaires pour la formation de cals.

Certains auteurs comme Heberle-Bors et Reinert, 1979, 1981, Heberle-Bors, 1982; pensent que leur proportion est prédéterminée avant même la culture d'anthères ou de pollen, qu'elles sont stériles, et que leur fréquence dépend des conditions de culture de la plante mère (Heberle-Bors et Reinert, 1982).

D'autres auteurs, par contre, supposent que la formation des P-grains a lieu lorsque les anthères sont séparés de la plante mère, et dans des conditions particulières comme une période initiale de famine suivie d'un apport en nourriture des grains de pollen (Kyo et Harada, 1985).

L'influence du milieu de culture a aussi été observée par de nombreux auteurs dont Aruga et Reddy (1988) qui ont montré, sur des variétés de riz du groupe indica, une différence de réponse variétale suivant le milieu de culture.

Aruna et Reddy obtiennent en 1988, sur des variétés du groupe indica, un pourcentage d'anthères callogènes de 0,5 à 12,5%. Ces résultats sont comparables aux nôtres. Cependant, nos résultats demeurent inférieurs aux taux réalisés, sur d'autres variétés qui appartiennent au groupe japonica, par d'autres auteurs dont Guiderdoni et *al.*, (1986), Shiva et Reddy (1985) qui obtiennent 3 à 33% d'anthères callogènes.

Oono (1975) et Guiderdoni et *al.*, (1986) ont pu induire sur des génotypes du groupe japonica, un nombre moyen de 5 à 8 cals par anthère callogène. Ces résultats sont similaires aux nôtres sur milieu d'induction I3 et I4.

4 - Néoformation de plantules androgenétiques:

Sur des cals mis en culture sur milieux de néoformation avec BAP ou KIN, les taux de régénération sont variables et dépendent du génotype et de l'origine des milieux d'induction de cals.

La nature hormonale ainsi que leurs combinaison aussi bien dans le milieu d'induction que dans le milieu de néoformation, semble avoir une incidence significative sur la néoformation des cals obtenus.

Les meilleurs taux de néoformation ont été obtenus dans des milieux où l'auxine ou une des auxines du milieu d'induction se retrouve dans le milieu de néoformation.

Ces résultats confirment les travaux de Rout et Sarma (1991), sur un riz hybride *Oryza sativa* x *Oryza rufipogon*, qui obtiennent de meilleures fréquences de régénération avec des auxines du milieu d'induction que l'on retrouve ensemble dans le milieu de néoformation.

Cela dénote une influence considérable de l'auxine du milieu d'induction sur la capacité des cals à néoformer des plantules.

Les meilleurs taux de néoformation de 1,29% et 1,94% que nous avons obtenu, sur les deux variétés étudiées, sont inférieurs à ceux réalisés par Guiderdoni et al., 1986, et Aruna et Reddy, 1988, avec respectivement 2,75% et 47,5%

Sur la variété Moro, le pourcentage de néoformation de 1,94% que nous avons pu réaliser, est similaire à celui déjà obtenu par Yoboué (1981) sur le même génotype, qui est de 1,52%

Les observations histologiques faites sur des cals mis en culture sur un milieu de néoformation, montre une régénération par bourgeonnement adventif.

Cependant, les bourgeons formés sur un cal en culture *in vitro* pourraient être considérés comme un cas particulier de bourgeons adventifs (Margara, 1984). Il est préférable d'utiliser le terme de bourgeons de néoformation.

D'autre part, la néoformation par la voie embryogène n'est pas à exclure.

En effet, ce phénomène a déjà été démontré chez le riz par Huang et al., 1986, qui montre que la régénération de plantes issues de cals d'anthères, empruntait la voie de l'embryogenèse et rarement celle de l'organogenèse.

L'albinisme est apparu surtout dans le milieu R2 et semble beaucoup plus affecter la variété Moro avec un maximum de 75% que la IR dont le seul taux enregistré est de 42,8%

L'âge des cals, qui ont été repiqués un peu tard dans ce dernier milieu, pourrait expliquer cette fréquence en plantes albinos.

Cependant, la présence de plantes albinos de céréales parmi les plantes néoformées est un phénomène assez fréquent en culture d'anthères.

Son taux est variable selon les espèces avec des valeurs parfois très élevées : 97% chez le riz (Wang et al., 1978), 82% chez le blé (Aissa, 1977), 99% chez l'orge (Grunewaldt et Malepszy, 1975)

Une plus grande maîtrise des meilleures conditions de culture de la plante mère ainsi que des composantes des milieux de culture devraient nous permettre de mieux augmenter les rendements en nombre de cals produits et en plantes chlorophylliennes régénérées.

5 - Acclimatation:

5.1 - Nature du substrat:

Parmi les trois types de substrats utilisés lors du sevrage des plantules androgénétiques, deux se sont avérés être les meilleurs. Il s'agit du mélange sable/tourbe et du sol prélevé sous un *Acacia albida*, avec des plantes de plus grandes vigueur chez ce dernier type de substrat.

Le faible taux de survie enregistré avec les mottes "Melfert" ont pour origine une longue durée de stockage, surtout dans des conditions favorables à l'attaque de termites. Ces dernières ont provoqué de grandes pertes en matériel végétal, en s'attaquant aux racines de jeunes plantules fraîchement sevrées.

Une bonne conservation de ce type de matériel est nécessaire afin de les protéger contre d'éventuels parasites nuisibles aux plantes.

Par contre, le sable d'Acacia, dont l'arbre présente une bonne adaptation et prolifère dans nos régions sahéliennes, très accessible, contrairement aux autres types de substrats dont les coups sont souvent élevés, demeure un matériel de choix pour le sevrage des "vitro plants".

La plus grande vigueur que ce substrat confère aux plantules peut être due à sa grande richesse en azote car l'Acacia, lorsqu'elle est en symbiose avec certaines bactéries du sol, peut fixer l'azote atmosphérique.

6 - Doublement des chromosomes :

A la floraison, nous avons constaté que de nombreuses plantes se sont doublées spontanément avec une fréquence de 28.57 % pour la variété IR et 48.14% pour la variété Moro.

Les plantules restées stériles, soumises à un traitement par la colchicine, ont données 70% de doublement chromosomique pour la variété IR et 33.3% pour la variété Moro.

Le doublement spontané des chromosomes de plantes androgénétiques pourrait avoir diverses origines.

Raquin et al., 1982, montrent, chez le tabac, que le doublement spontané survient à un stade précoce des divisions des microspores en culture par endoreduplication.

Chez le riz, c'est plutôt un processus d'endomitose selon Oono (1975) et Chen et Chen (1980) ou bien, un doublement tardif de certains secteurs de cals ou de méristèmes en néoformation (Guiderdoni et al., 1986), qui seraient responsables du doublement spontané des chromosomes.

Selon Amssa, (1980), c'est le prétraitement au froid des épis avant le prélèvement des anthères qui favorise le doublement spontané du stock chromosomique des microspores.

La grande fréquence de plantes androgénétiques présentant une fertilité partielle constatée au niveau de la variété Moroberekan, pourrait avoir des origines diverses.

Selon San et Dattee, 1985, les aberrations et remaniement chromosomiques s'accompagnent le plus souvent d'une baisse de la fertilité et d'anomalies de méioses.

Cela pourrait expliquer la fertilité partielle de certaines plantes haploïdes doublées de la variété Moroberekan. En plus, les variations, au niveau de ces haploïdes doublées, sur la taille, le tallage, et la forme de l'épillet (épillet avec ou sans arête), peuvent être le résultat de la culture *in vitro* ou de l'environnement de la plante androgénétique.

Chez la IR, qui est une lignée fixée, la seule variation enregistrée, se situe au niveau de la taille des haploïdes doublées, avec des individus de taille identique à celle de la plante mère, et d'autres, plus courts.

Cette variation est très fréquente chez les plantes issues de cultures d'anthers et semble être due à la culture *in vitro*. C'est au niveau de la descendance des plantes haploïdes doublées qu'il pourrait réellement exister une variation comparativement à la plante mère.

Chez le blé, Picard, 1984, montre que les plantes haploïdes doublées issues de différentes lignées fixées (Cesar, Athys, Moisson), diffèrent entre eux et leur lignée de départ pour plusieurs caractères tels que: la précocité, la hauteur, la résistance aux maladies, et le rendement.

San et Dattee, 1985, expliquent ce phénomène de variation inattendue chez des haploïdes doublées issues de lignées fixées par l'existence, chez la plante mère, d'une hétérozygotie résiduelle subsistant au sein de lignées pures issues de reproduction sexuée, ou de mutations parmi les gamètes à l'origine de plantes haploïdes doublées.

Des études plus poussées sur l'hérédité de ces variations pourraient aider à une meilleure compréhension du phénomène.

Le traitement des plantes androgenétiques à la colchicine, après la floraison, rallonge la durée d'obtention de plantes haploïdes doublées de trois mois. Un traitement plus précoce, au moment de la mise en culture de l'anthere permet, par une augmentation des plantes diploïdes spontanées, de raccourcir cette période (Alemano et Guiderdoni, 1994).

F - CONCLUSION:

Les résultats auxquels nous avons abouti montrent que la culture d'anthères, en vue d'une sélection rapide de lignées homozygotes, est applicable aux variétés IR13240-108-2-2-3 (indica) et Moroberekan (japonica).

Les taux de 1,29 anthères ayant néoformés une ou plusieurs plantes pour 100 anthères mis en culture, obtenus chez la variété IR 13240-108-2-2-3 et celui de 1,94% réalisé chez la variété Moroberekan, militent en faveur d'une meilleure considération des variétés du groupe indica, rarement utilisées en culture d'anthères à cause de leur grande faiblesse de rendement.

L'utilisation des variétés de riz appartenant surtout au groupe indica, dans un schéma de sélection de lignées, par la culture d'anthères, reste limitée par leur faible capacité à produire un nombre suffisant de cals.

Nos résultats démontrent, sur milieux I3 et I4, avec la possibilité pour chaque anthère callogène de produire en moyenne 8 cals, que l'on peut améliorer le rendement en production de cals, généralement faible, des variétés du groupe indica.

Le repiquage systématique des anthères sur un milieu frais, par son effet stimulateur sur la production de cals, pourrait contribuer à améliorer de façon significative, les rendements androgénétiques de ces variétés à l'image de leurs "homologues" du groupe japonica.

Une attention particulière devrait être apportée sur les conditions de culture de la plante mère. L'état physiologique de cette dernière semble jouer un rôle important sur la capacité des microspores à développer des cals embryogènes (Heberle-Bors et Reinert, 1981; Demarly et Sibi, 1985; Martinez et al., 1985).

De jeunes plantes végétativement vigoureuses, en croissance actives, surtout à une période correspondant à l'époque naturelle de floraison de l'espèce, donnent des résultats meilleurs (Demarly et Sibi, 1985). Des expériences plus poussées devraient être menées dans ce sens afin de mieux maîtriser les facteurs physiques et physiologiques qui fournissent le plus grand nombre de microspores embryogènes.

En outre, l'auxine du milieu d'induction a une influence considérable sur la capacité des cals à néoformer des plantes (Rout et Sarma, 1991). Les meilleures fréquences de régénération sont obtenues avec des auxines du milieu d'induction que l'on retrouve ensemble dans le milieu de régénération.

Une amélioration de ces milieux pourrait favoriser de meilleures fréquences de néoformation.

Au Sénégal, l'amélioration du riz cultivé se fait par hybridation pour avoir des caractères complémentaires, et par sélection de plantes qui présentent une résistance naturelle aux maladies et/ou aux stress de l'environnement.

L'haplométhode pourrait constituer un appoint significatif et jouer un rôle important dans l'amélioration des plantes cultivées en général, et du riz en particulier.

L'exemple de la Chine dans ce domaine est édifiant. Dans ce pays, la culture d'anthères utilisée en association avec des croisements multiples pour accumuler des caractères souhaités, a contribué rapidement à la fixation d'une centaine de variétés et lignées.

Actuellement, 20 variétés sont cultivées sur 500.000 hectares (Bouharmont, communication personnelle).

G - PERSPECTIVES:

L'amélioration des plantes (la sélection et la création variétale) permet de disposer des variétés les mieux adaptées, dans les conditions particulières, souvent difficiles de nos pays.

L'haplométhode, pourrait être utilisé, à l'image des pays asiatiques comme la Chine, dans un schéma de sélection de diverses espèces annuelles utiles, plus particulièrement celles de grande culture comme le riz.

La culture d'anthers par sa rapidité dans la fixation de lignées homozygotes demeure un outil efficace pour le sélectionneur. Ce dernier, après avoir fixé des lignées, pourra créer des hybrides entre les meilleures lignées en vue de leur amélioration.

Une plus grande maîtrise de la culture de tissus en général, et celle de la culture d'anthers en particulier, pourrait être un atout majeur, dans la sous région.

Les cals constituent un matériel précieux pour la sélection *in vitro*, couramment pratiquée dans de nombreux centres de recherches en Europe, en Amérique et en Asie, en vue de résoudre un certain nombre de problèmes que peuvent rencontrer les riziculteurs et qui ne dépendent que des propriétés de la cellule.

L'application de pressions de sélections au niveau des cals, suivie d'une régénération de plantes à partir de cellules qui ont développé une résistance ou une tolérance, permettra de lutter efficacement contre différents maladies et stress de l'environnement tels que :

- la tolérance au froid
- la tolérance à la salinité
- la tolérance à la sécheresse
- la tolérance à l'aluminium
- la résistance à la Pyriculariose
- la résistance aux herbicides
- la surproduction d'acides aminés.

Par ailleurs, les plantes albinos souvent éliminées, représentent un matériel de choix pour divers études dont les études biochimiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES CITEES:

AIEA. 1981. Mutation breeding Newsletter

Aleman L., and Guiderdoni E., 1994. Increased doubled haploid plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) anthers cultured on colchicine supplemented media. CIRAD-CA, Biotrop-GREDA Laboratory, BP 5035, F-34032 Montpellier Cedex 01, France.

Aissa K., 1977. Obtention de plantes haploïdes chez *Triticum durum* par voie androgénétique *in vitro*. Thèse de 3ème cycle. Univ. Paris XI.

Amssa M., J., DE BUYSER et HENRY Y., 1980. Origine des plantes haploïdes obtenues par culture *in vitro* d'anthers de blé (*Triticum aestivum* L.). Influence du prétraitement au froid et de la culture *in vitro* sur le doublement. C.R. Acad. Sci. Paris 290, 1095-1097.

Arcia M.A., Wernsman E.A. et Burk L.G., 1978. Performance of anther derived dihaploids and their conventionally inbred parent as lines, in F_1 hybrids, and in F_2 generations. Crop. Sci. 18, 413-418.

Aruga K., et Nakajima T., 1985. Role of anther on pollen embryogenesis in anther culture of *Nicotiana tabacum* L. Jpn. J. Breed. 35; 390-397.

Aruna M., Reddy G. M., 1988. Genotypic differences in callus initiation and plant regeneration from anthers of indica rice. Current-Science. 1988, 57: 18, 1014-1017.

Asselin de Beauville M., 1980. Obtention d'haploïdes *in vitro* à partir d'ovaires non fécondés de riz (*Oryza sativa* L.). C.R. Acad. Sci. Paris, Série D, 290:489-492

Barnabes B., Pfahler P.L., Kovacs G., 1991. Theor. Appl. Genet. 81:675-678

Beaumont V., 1988. Androgénèse du riz : Influence d'un traitement gamétocide sur la plante mère. Rapport de DAA. Toulouse, ENSA, 54 p.

Beaumont V., Courtois B., 1990. Comportement en androgénèse de riz provenant de plantes traitées avec un agent chimique d'hybridation. Agronomie tropicale 1990, 45-2.

Bernett M.D., et Hughes W.G., 1972. Additional mitosis in Wheat pollen induced by Ethrel. Nature (Lond), 240:566-568.

Burk L.G., Gwynn G.R., and Chaplin J.F., 1972. Diploized haploid from aseptically cultured anthers of *Nicotiana tabacum* L. J. Hered. 63, p.355-360.

Bouharmont J. (com. pers.). Application de la biotechnologie à l'amélioration du riz. Laboratoire de cytogénétique, Université catholique de Louvain, Louvain-la-neuve (Belgique).

Burk L.G., Matzinger D.F., 1976. Variation among anther-derived doubled haploids from an inbred line of tobacco. J. Hered. 67, 381-384.

Chang T.T (1964) Report of a poll on rice species. Pages 24-26 in Rice genetics and cytogenetics. Elsevier, Amsterdam.

- Chen Y., Wang R., Tian W., Zuo Q., Zheng S., Lu D., Zhang G., 1980. Studies on pollen culture in vitro and induction of plantlets in *Oryza sativa* subsp. *Keng*. Acta. Genet. Sin. 7 : 46-53.
- Cho M.S., Zapata F.J., 1988. Callus formation and plant regeneration in isolated pollen culture of rice (*Oryza sativa* L. cv. Taipei 309). Plant. Sci. 58 : 239-244.
- Chu C.C., Wang C.C., Sun C.S., Hsu C., Yin K.C., Chu C.Y. et BI F.Y., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments
- CIRAD, 1995. Plantes d'hier, d'aujourd'hui et de demain. Dossier de la mission Connaissance et amélioration des plantes.
- Clayton W.D. (1968) Studies in gramineae: 17. West african wild rice. Kew Bull. 21:485-488.
- Cornejo-Martin M., Primo-Millo E., 1981. Anthers and pollen grain culture of rice (*Oryza sativa* L.). Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Spain. 1981, V. 30 (3) p. 541-546.
- Courtois B., Leborgne L., et Maledone E. Les cultures in vitro : un nouvel outil au service du progrès agricole en Guadeloupe III RIZ. IRAT/CIRAD. Station de roujol, F 97170. Petit Bourg p.49-52.
- Dale P.J., 1975. Pollen dimorphism and anther culture in barley. Planta, 127 : 213-220.
- Deaton W.R., Legg. P.D., and Collins G.B. 1982. A comparison of burley tobacco doubled-haploid lines with their source inbred cultivars. Theor. Appl. genet. 62, 69-74.
- Demarly Y., et Sibi M., 1985. Amélioration des plantes et Biotechnologies. Ed. John Liebbly and company Ltd. 13 Smith Yard, Summarly Street, London SW 18 4 HR, England.
- Dossou-Yovo S., Prioul. J.L., Demarley Y. 1982. Croissance et photosynthèse de phénovariants de Riz. Effet de l'ombrage. Agronomie 2, 493-502.
- Dumas de Vaultx R., Chambonnet D., et Pochard E. Culture *in vitro* d'anthères de piment (*Capsicum annum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à +35°C. Agronomie trop. 1981. 1 (10) p.859-864.
- Dumas de Vaultx, R. 1979. Obtention de plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo* L.) après pollinisation par *Cucumis ficifolis* A. Rich. C.R. Acad. Sci, Paris. 289: 875-878.
- Dumas de Vaultx R. et E. Pochard. 1974. Essai d'induction de la parthénogenèse haploïde par action du protoxyde d'azote sur les fleurs de piment (*Cucumis annum* L.). Ann. Amélior. Plantes, 24: 283-306.
- Dryanovska O.A., Illieva I.N. 1983. In vitro anther and ovule culture in muskmelon (*Cucumis melo* L.). C.R. Acad. Bulgzre Sci. 36 (8), p. 1107-1110.

Gallais, A. 1990. Théorie de la sélection en amélioration des plantes. Collection sciences agronomiques, Editeur Masson Paris, pp.1-588.

Genovesi A.D., Magill C.W., 1979. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. Crop Sci. 19 :662-664.

George L., Narayanaswami S., 1973. Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. Protoplasma, 78, p. 467-470.

Goodsell, S.R. 1961. Male sterility in corn by androgenesis. Crop. Sci. 1:227-228.

Gressof P.M., and Doy C.H. 1972. Development and différenciation of haploid *Licopersicum esculentum*. Planta (Berl.) 107. p. 161-170.

Grunewaldt J. et Malepszy S., 1975. Beobachtungen an antherenkallus von *Hordeum vulgare*, L. Z Pflanzenzüchtg. 75, 55-61.

Guha S. and Maheshwari S.C. 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204,495.

Guha-Mukherjee S.: Genotypic différences in the *in vitro* formation of the embryoid from rice pollen. Jour. Exp. Bot. 24 p. 139-144

Guiderdoni E., Courtois B., Dechenet R., and Feldman P.: Laproduction de lignées haploïdes doubles de riz (*Oryza sativa* L.) par culture d'anthères *in vitro*. Agronomie tropicale 41, 3-4 (1986).

Heberle-Bors E. 1985. In vitro haploid formation from pollen : a critical review. Theor. Appl. Genet., 71 (3) : 361-374.

Heberle-Bors E., Reinert, J. 1981. Environmental control and evidence for predetermination of pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* pollen. Protoplasma 109, 249-255.

Hoffman F., Thomas E. et Wenzel G., 1982. Anther culture as a breeding tool in rape. Theor. Appl. Genet. 61, 225-232. Horner M., Street H.E. 1978. Pollen dimorphism. Origine and significance in pollen plant formation by anther culture. Ann. Bot. 42 : 763-771.

Hu Z., Liang H.C. 1979. Acta. Phytophysiol. Sin. 5 : 131-139.

Huang C.R., Wu Y.H., Chen C.C. 1986. Effects of plant growth substances on callus formation and plant regeneration in anther culture of rice. Dep. Bot. Nat., Taiwan univ. Taipei, Taiwan. Rice genetics. 1986, 763-771.

Jacquot M. 1975. Rapport analytique. IRAT-CI.

Kasha, K.J. and K.N., Kao. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature (Lond.) 225: 874-876.

Ku M.K., Huang T.N. 1973. Callus formation and their cloning from isolated pollen of rice and wheat. Genet Commun. 1 : 28-31.

Kouadio Y. 1979. Analyse génétique de la variabilité observée dans la descendance d'une lignée pure de riz (*Oryza sativa* L. var. Cigalon) traitée par androgenèse *in vitro*. Thèse Docteur ingénieur. Univ. Paris XI.

Kuo J.S., Wang Y.Y., Chen N.F., KI S.J. 1973. Investigation on the anther culture *in vitro* of *Nicotiana tabacum* L. and *Capsicum annuum* L. Acta. Bot. Sin., 15 (1), 43-47.

Khush G.S., Toenniessen G.H. 1991. Rice Biotechnology. C.A.B. International in association with the international Rice Research Institute. 1991.

Lelu A. Belon E. 1985. Obtention d'haploïdes par culture d'anthers de *Brassica oleracea* L. CR. Acad. Sci. Paris, T, 300, Serie 3 n°2, p 71-76.

Ling T.H., Huang S.H., Liang C.E., Chun P.Y., 1978. The study of anther culture " in three line " breeding and utilization of heterosis in *Oryza sativa* subsp. *hsien*. In : Proceeding of Symposium of Plant Tissue Culture, p. 213-222, Peking, Science press.

Loo S.W., Xu Z.H. 1986. Anther culture for rice improvement in China. In : Biotchnology in agriculture and forestry, vol. 2, Crops I.Y.P.S. BAJAJ Edit., Berlin Springer Verlag, p.139-156.

Marassi M.A., Bovo O.A., Lavia G.L., and Mroginski L.A. 1993. Regeneration of rice doubled haploid using a one step culture procedure. J. Plant Physiol. Vol. 141. pp. 610-614.

Margara, J., 1984. Bases de la multiplication végétative; les meristèmes et l'organogenèse. Ed. INRA. 254 pages.

Marie, R., 1973. LA mutagnèse expérimentale. Réunion des sélectionneurs. IRAT-Novembre 1973.

Mercy S.T., Zapata F.J., 1987. Initiation of androgenèse in rice (*Oryza sativa* L. var. *Taipei 309*). Tissue culture Facility, International Rice Research Institute, Manilla, Philippines. 1987, 53 : 3, 253-258.

Miller C., O., 1961a. A Kinetin-like compound in maize. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A 47 170-174.

Miller C., O., 1963. Kinetin and kinetin-like compounds. pp. 194-202 in Liskens and Tracy eds. Modern Methods of plant analysis Vol.6. Springer-Verlag, Berlin.

Murashige T. et Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-essays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 473-497.

Nayar N.M. (1973) Origin and cytogenetics of rice. Adv. Genet. 17:153-292.

Niizeki H., Oono K. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. Proc. Japan Acad. 44 : 554-557.

Nitsch C. (1977) In Plant cell tissue and organ Culture, Reinert J. and Bajaj Y.P.S. Eds. Springer, Berlin, pp. 268-278.

Nitsch J.P. et Nitsch C. 1965. Néoformation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts: *Plumbago indica* L. Ann. Phys. Veg. 7 251-256.

Oka H.I. (1988) Origin of cultivated rice. Elsevier/Jpn. Sci. Soc. Press, Amsterdam/Tokyo. 254pp.

Oono K., 1975; Production of haploid plant of rice (*Oryza sativa*) by anther culture and their use for breeding. Bult. Nat. Inst. Agric. Sci., 26 : 139-222.

Picard E., 1984. Contribution à l'étude de l'hérédité et de l'utilisation en sélection de l'haploïdisation par androgenèse *in vitro* chez une céréale autogame: *Triticum aestivum* L. Thèse de doctorat d'Etat Univ. Paris XII.

Picard E., Hours C., Grégoire S., Phan T.H., Meunier J.P. 1987. Significant improvement of androgenetic haploid and doubled haploid induction from wheat plant treated with a chemical hybridization agent. Theor. Appl. Genet., 74 (3) : 289-297.

Picard E., De Buyser J., Henry Y., 1978. Techniques de production d'haploïdes de blé par culture d'anthères *in vitro*. Le sélectionneur français, 26 : 25-37.

Picard E., Hours C., Grégoire S., Phan T.H., Meunier J.P. 1987. Significant improvement of androgenetic haploid and doubled haploid induction from wheat plant treated with a chemical hybridization agent. Theor. Appl. Genet., 74 (3) : 289-297.

Raghavan, V. 1978. Anther and pollen development in rice (*Oryza sativa*). Amer. J. Bot. 75 : 183-196.

Raquin, C. 1985. Induction of haploid plants *in vitro* culture of *Petunia* ovaries pollinated with irradiated pollen. Z. Pflanzenzüchtg. 94: 166-169.

Roschevitz R.J. (1931) A contribution to the knowledge of rice [in Russian, English summary]. Bull. Appl. Bot. Genet. Plant breeding. 27:3-133.

Rout J.R., Sarma N.P. 1991. Anther callus induction and green plant regeneration at high frequencies from an interspecific rice hybrid *Oryza sativa* Linn. x *Oryza rufipogon* Griff. Department of Botany, University of California, Davis, USA. Euphytica. 1991, 54 : 155-159.

Rutger J.N., 1973. Emploi de mutants artificiels dans l'amélioration génétique du riz. FAO-Bulletin de la commission internationale du riz. Vol. XXXI, N°1, 30-32.

San L.H. 1976. Haploïdes d'*Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d'ovaires non fécondés. Ann. Amélior. Plantes. 26 : 751-754.

San L.H. et Ahmadi, 1982. Variability of doubled haploids from *in vitro* androgenesis and gynogenesis in *Hordeum vulgare* L. In: "Variability in plants regenerated from tissue culture". Earle E.D. and Y. Demarley (eds). Paeger Press, New York, 273-283.

San L.H. et Dattee Y. 1985. Variabilité des haploïdes doublés par androgenèse et gynogenèse "in vitro". Bull. Soc. bot. Fr., 132, Actual. bot., 1985 (3/4), 23-33.

Sauton, A. 1987. Recherche d'haploïdes chez le melon. (*Cucumis melo* L.): Etude et application de la sélection de la parthénogenèse induite par du pollen irradié. Thèse. Université des sciences et techniques de Langedoc.pp. 1-123.

Sauton A., Dumas De Vault R., Obtention de plantes haploïdes chez le par gynogénèse induite par du pollen irradié. Agronomie, 1987, 7 (2), 141-148.

Schaeffer G.W., Sharp Jr. F.T. et Gregan P.B., 1984. Variation for improved protein and yield from rice anther culture. Theor. Appl. Genet. 67,383-389.

Schaeffer G.W. 1982. Recovery of heritable variability in anther- derived doubled haploid rice. Crop. Sci. 22, 1160-1164.

Schaeffer G.W., Sharp Jr. F.T. et Gregan P.B., 1984. Variation for improved protein and yield from rice anther culture. Theor. Appl. Genet. 67,383-389.

Schmid J., Keller E.R., 1986. Effect of a gametocid on the induction of haploid in *Triticum aestivum*. In genetic manipulation in plant breeding. Berlin, Walter de Gruyter Ed., p. 347-349.

Singh, I.S. et A. Cornu. 1976. Recherche de plantes haploïdes de *Petunia* à noyau androgénétique et à cytoplasme gynogénétique déterminant la stérilité pollinique. Ann. Amélior. Plant. 26: 565-568.

Sibi M., Dumas De Vault R., Chambonnet D., 1979. Obtention de plantes haploïdes par androgénèse in vitro chez le piment (*Capsicum annuum* L.). Ann. Amélior. Plant., 29 (5), 583-606.

Siva Reddy V., Leelavathis S., Sen S.K., 1985. Influence of genotype and culture medium on microspore callus induction and green plant regeneration in anther of *Oryza sativa* L. Physiol. Plant., 63 : 309-314

Sunderland N., Wicks F.M., 1971. Embroid formation in pollen grain of *Nicotiana tabacum*. J. Exp. Bot., 22 : 213-226.

Tateoka T (1963) Taxonomic studies of *Oryza*, III. Key to the species and their enumeration. Bot. Mag. Tokyo 76:165-173.

Tateoka T (1964) Taxonomic studies of the genus *Oryza*. Pages 15-21 in Rice genetics and cytogenetics. Elsevier, Amsterdam.

Truong-Andre I., 1977. Variabilité des plantes issues d'androgenèse in vitro et tentative d'application directe en sélection de cette variabilité et de la mutagenèse par voie haploïde chez le riz. Thèse de 3ème Cycle. Univ. Paris XI.

Turcotte, E. L., and C.V. Faester. 1969. Semigametic production of haploid in pima cotton. Crop Sci. 9: 653-655.

- Vergara S Benito 1984. Manuel pratique de riziculture .International RiceResearch Institute.
- Wakaza R. 1982. Application of tissue culture to plant breeding. Method improvement and mutant production. Bull. Nat. Inst. Agric. Sci., D 33, 121-200.
- Wan Y., Petolino J.F., Wildhom J.M., 1989. Theor. Appl. Genet. 77: 889-892 .
- Wang C.C., Sun C.S., Chu C.C., et Wu S.C. 1978. Studies on the albino pollen plantlets of rice. In proceeding of symposium on plant tissue culture, Science Press, Peking 149-160.
- Wang Y.Y., Sun C.S., Wang C.C., Chien N.F., 1973. The induction of pollen plantlet of Triticum and Capsicum annuum from anther culture. Sci. Sin., 16, 147-151.
- Wenzel G., Hoffmann F., et Thomas E., 1976. Heterozygous microspores derived plants in rye. Theor. Appl. Genet., 48 : 205-208.
- Xu Z.H., Sunderland N., 1981. Glutamine, Inositol and conditioning factors in the production of barley pollen callus *in vitro*. Plant. Sci. Lett., 23 : 161-168.
- Yang S.J., Oh B.G., Chung G.S. 1989. Progress in cultural efficiency of rice anther culture for haploid breeding 1. Reliable recommendable plant regeneration techniques for rice anther culture. Yeongnam Crop Experiment Station, RDA, Milyang, Korea Republic.
- Research-Reports-of-the-Rural-Development-Administration-Biotechnology. 1989, 31:1, 15-21.
- Yin D.C., Yu Q.C., 1986. R462 a new rice strain obtained from irradiated anther *in vitro* culture. Jiangsu Acad Agric Sci., Nanjing,, Jiangsu, China. Mutation-Breeding-Newsletter. 1986, N°27, 5.
- Yoboue Nguessam . Création de variants de quelques variétés Ouest africaines de riz Oryza sativa L. (Poacée) par androgenèse. 1984, Thèse de docteur ingénieur. Univ. Nat. de Côte d' Ivoire.
- Zapata F.J., Klush G.S., Grill J.P., Neu M.H., Romero R.O., Torrizo L.B., Alejar M., 1983. Rice anther culture at IRRI, In : Cell and tissue culture techniques for cereal crop. improvement. Peking, Science Press, New York, Gordon and Breach Science Publishers Inc., p. 27-46.
- Zapata F.J., Aldemita R.R., Ella E.S., and Cho M.S., 1990. Isolated microspore culture of rice at the International Rice Research Institute. Secon International Rice Genetics Symposium 14-18 May 1990.
- Zapata F.J., Klush G.S., Grill J.P., Neu M.H., Romero R.O., Torrizo L.B., Alejar M., 1983. Rice anther culture at IRRI, In : Cell and tissue culture techniques for cereal crop. improvement. Peking, Science Press, New York, Gordon and Breach Science Publishers Inc., p. 27-46.

RESUME

TITRE : Mise en place d'une méthodologie d'androgenèse *in vitro* chez le riz *Oryza sativa* L.

Nom du candidat : Talla GUEYE

Nature du mémoire : Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie Végétale.

Composition du jury : M. Amadou Tidiane BA, Professeur titulaire
M. Alain BORGEL, chargé de recherche ORSTOM
Mme Yaye Kène DIA Maître-assistante
M. Nicolas DIALLO Maître-assistant
M. Moussa SIE Dr Ingénieur à l'ADRAO.

Soutenue le 22 Novembre à heures au Département de Biologie Végétale.

Nous avons mis en place une méthode de production de plantes haploïdes doublées par culture d'anthers *in vitro* ou androgenèse.

Deux variétés de riz *Oryza sativa* L. ont été utilisées durant les différentes expériences; la variété IR 13240-108-2-2-3 qui est une variété asiatique, de culture irriguée, appartenant au groupe indica, et la variété africaine de culture pluviale, Moroberekan qui est du groupe japonica.

Le stade optimal de mise en culture est celui des anthers contenant des microspores uninuclées.

Nous avons observé une influence du génotype, du milieu de culture ainsi que du renouvellement du milieu de base sur la capacité des anthers à produire un ou plusieurs cal (ou plantes).

Pour la variété IR 13240-108-2-2-3, le meilleur milieu d'induction de cal à partir d'anthers à microspores uninuclées, est un milieu modifié N6 + 1 mg/l ANA + 3 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN.

Pour la variété Moroberekan, le milieu modifié N6 + 2 mg/l ANA + 0,5 mg/l KIN a donné le meilleur pourcentage d'anthers callogènes.

La néoformation des plantules s'effectue sur un milieu Murashige et Skoog modifié.

La présence d'un ou de deux auxines dans le milieu d'induction influe de façon significative sur la capacité des cal à régénérer une ou plusieurs plantules.

Les taux les plus élevés sont obtenus avec des auxines du milieu d'induction que l'on retrouve ensemble dans le milieu de régénération.

Les meilleurs rendements en plantules néoformées à partir de cal varient de 1,11 à 1,94 plantules néoformées pour cent anthers mises en culture, suivant les milieux MS + 0,5 mg/l ANA + 1 mg/l BAP ou MS + 0,5 mg/l ANA + 1 mg/l KIN.

Au moment du sevrage, les plantules androgénétiques se sont bien développées dans du sable d'acacia non stérile et dans un mélange sable / tourbe. Les plantes androgénétiques présentent une plus grande vigueur dans le 1er type de substrat.

Au cours de cette étude, nous avons réussi à régénérer au total 232 plantes androgénétiques dont 132 appartiennent à la variété IR 13240-108-2-2-3 et 100 à la variété Moroberekan.

Mots clés : *Oryza sativa* L. , androgenèse, anthere, microspore, embryon, bourgeon, induction, néoformation, diploïde, haploïde, haploïde doublée.

RESUME

TITRE : Mise en place d'une méthodologie d'androgenèse *in vitro* chez le riz *Oryza sativa L.*

Nom du candidat : Talla GUEYE

Nature du mémoire : Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie Végétale.

Composition du jury : M. Amadou Tidiane BA, Professeur titulaire
M. Alain BORGEL, chargé de recherche ORSTOM
Mme Yaye Kène DIA Maître-assistante
M. Nicolas DIALLO Maître-assistant
M. Moussa SIE Dr Ingénieur à l'ADRAO.

Soutenue le 22 Novembre à heures au Département de Biologie Végétale.

Nous avons mis en place une méthode de production de plantes haploïdes doublées par culture d'anthers *in vitro* ou androgenèse.

Deux variétés de riz *Oryza sativa L.* ont été utilisées durant les différentes expériences; la variété IR 13240-108-2-2-3 qui est une variété asiatique, de culture irriguée, appartenant au groupe indica, et la variété africaine de culture pluviale, Moroberekan qui est du groupe japonica.

Le stade optimal de mise en culture est celui des anthers contenant des microspores uninuclées.

Nous avons observé une influence du génotype, du milieu de culture ainsi que du renouvellement du milieu de base sur la capacité des anthers à produire un ou plusieurs cal (ou plantes).

Pour la variété IR 13240-108-2-2-3, le meilleur milieu d'induction de cal à partir d'anthers à microspores uninuclées, est un milieu modifié N6 + 1 mg/l ANA + 3 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN.

Pour la variété Moroberekan, le milieu modifié N6 + 2 mg/l ANA + 0,5 mg/l KIN a donné le meilleur pourcentage d'anthers callogènes.

La néoformation des plantules s'effectue sur un milieu Murashige et Skoog modifié.

La présence d'un ou de deux auxines dans le milieu d'induction influé de façon significative sur la capacité des cal à régénérer une ou plusieurs plantules.

Les taux les plus élevés sont obtenus avec des auxines du milieu d'induction que l'on retrouve ensemble dans le milieu de régénération.

Les meilleurs rendements en plantules néoformées à partir de cal varient de 1,11 à 1,94 plantules néoformées pour cent anthers mises en culture, suivant les milieux MS + 0,5 mg/l ANA + 1 mg/l BAP ou MS + 0,5 mg/l ANA + 1 mg/l KIN.

Au moment du sevrage, les plantules androgénétiques se sont bien développées dans du sable d'acacia non stérile et dans un mélange sable / tourbe. Les plantes androgénétiques présentent une plus grande vigueur dans le 1er type de substrat.

Au cours de cette étude, nous avons réussi à régénérer au total 232 plantes androgénétiques dont 132 appartiennent à la variété IR 13240-108-2-2-3 et 100 à la variété Moroberekan.

Mots clés : *Oryza sativa L.*, androgenèse, anthere, microspore, embryon, bourgeon, induction, néoformation, diploïde, haploïde, haploïde doublée.