

Ann. Inst. Nat. Agron. El-Harrach, 1989,
Vol. 13 . N° 1, 209 - 220.

**ESSAI D'OBTENTION DE PLANTS DE TABAC (Nicotiana tabacum)
PAR CULTURE DE TISSUS " in vitro"**

**Par BERREKIA R. et AISSA K.
DEPARTEMENT DE PHYTOTECHE
I.N.A. EL HARRACH ALGER**

R E S U M E

Dans le but d'améliorer les types locaux de tabac, les auteurs ont envisagé l'induction de variabilité par culture "in vitro" de cotylédons et d'anthères.

Le travail entrepris a permis, dans le cas des cotylédons, de définir les conditions de culture permettant d'induire la callogénèse et l'organogénèse.

En ce qui concerne la culture d'anthères, il a été possible de mettre en évidence l'aptitude des types locaux de tabac à produire des plantes par voie androgénétique (de 24 à 58 plantes, pour 220 anthères mises en culture, selon les types considérés). Ceci suggère de nouvelles voies d'amélioration pour le Tabac, en Algérie.

I N T R O D U C T I O N

L'obtention de variants, par le biais de la culture in vitro, constitue de nos jours, un moyen très élégant d'induire de la variabilité chez les espèces végétales; on révèle ainsi l'information génétique qui n'est pas accessible par les techniques classiques d'induction de variabilité.

Le tabac représente, en Algérie, une production végétale qui souffre de nombreux maux: faible productivité, sensibilité à certaines maladies, ... Il existe plusieurs types locaux dont certains sont cultivés, malgré les faibles rendements.

C'est pourquoi nous avons envisagé de définir les conditions dans lesquelles la culture in vitro pourrait être appliquée en tant que technique pour la sélection et l'amélioration des types locaux de tabac.

Deux types d'expériences ont donc été proposées: la culture de cellules somatiques (cotylédons) d'une part, et l'androgénèse d'autre part, cette dernière voie permettant de réduire considérablement la durée des cycles de sélection nécessaires à l'obtention de lignées fixées, comme le précisent HENRY et De BUYSER (1980).

MATERIEL ET METHODE

* Expérience 1 = Culture de cotylédons

a. Induction de la callogénèse

La mise en culture porte sur les cotylédons de la variété locale "Djendel", prélevés à 5 âges différents : 2-3 jours, 5-6 jours, 8-9 jours, 14-15 jours, 36-37 jours (le jour d'apparition des cotylédons comptant comme le premier jour d'âge).

Les cotylédons sont mis en culture sur un même milieu de base (Tab. 1) mais comportant deux niveaux différents en ce qui concerne les substances de croissance et la quantité de saccharose: $N_1 = 0.05 \text{ mg/l d'AIA et } 15 \text{ g/l de saccharose}$, $N_2 = 5 \times 10^{-6} \text{ M/l de } 2,4\text{-D, } 10^{-7} \text{ M/l de Kinetine et } 30\text{g/l de saccharose}$.

Les niveaux N_1 et N_2 sont empruntés respectivement à NITSCH et al. (1969) et TRAN THAN VAN et al. (1974). Le pH est ajusté à 5,5.

Tableau 1: Composition du milieu de base pour la culture de cotyledons

COMPOSES	QUANTITES (mg/L)
KNO_3	1900
NH_4NO_3	1650
$CaCl_2 \cdot H_2O$	440
KH_2PO_4	370
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	25
H_3BO_3	10
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	10
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
Myo-Inositol	100
Glycine	2
Acide nicotinique	5
Pyridoxine	0.5
Thiamine	0.5
Acide folique	0.5
Biotine	0.05
Adenine	40
Fer*	5 ml/L

* Fer = solution obtenue par dissolution, dans 1 l d'eau distillée de 7.45g de Na_2EDTA et 5.57g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$.

Les milieux sont coulés en boîte de Pétri stériles, après autoclavage à 12° pendant 20 mn.

Le nombre de cotylédons mis en culture par classe d'âge et par type de milieu est constant (84 cotylédons/âge/milieu).

Après la mise en culture, les cotylédons sont placés à 26°C et 16 heures de lumière.

b. Multiplication des cals:

Les cals sont repiqués, au bout de 33 jours de culture, en boîte de Pétri, sur le milieu de base auquel nous incorporons le niveau N₂.

c. Induction de l'organogénèse:

Nous utilisons toujours le milieu de base auquel nous incorporons, 10⁵ M/L de Benzyladenine et 10⁻⁶ M/L d'AIA (TRAN THAN VAN et al., 1974).

Nous disposons d'un nombre variable de cals = 28 cals pour 2-3 jours et pour 5-6 jours, et 20 cals pour 8-9 jours.

* Expérience 2 = androgénèse

Les boutons floraux sont prélevés lorsque les sépales ont la même longueur que les pétales (WEATHERHEAD et GROUT, 1979), ce repère morphologique représentant le stade le plus favorable à l'androgénèse chez le tabac (KOHLENBACH et WERNICKE, 1978).

Les boutons floraux sont désinfectés puis mis en culture après 72 heures ou 96 heures de prétraitement au froid (4°C).

Nous utilisons 5 variétés locales (Alma, Courbet, Djendel, Souma et Spaka) et une variété étrangère (Coker 140). Les étamines sont mises en culture sur deux milieu différents,

l'un (BN) emprunté à BOURGIN et NITSCH (1967) et le second (ON) emprunté à OINUMA (1978), à raison de 220 étamines/variété/milieu/type de prétraitement.

Les boîtes de Pétri sont placées en chambre de culture, à $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ et 16 heures de lumière.

RESULTATS ET DISCUSSION

a. Expérience 1:

. Induction de la callogénèse

On note aucune formation de cals sur milieu de base + N_1 et ce quel que soit l'âge des cotylédons; après 30 jours de culture; ils brunissent, ce qui traduit leur senescence (SUBASHINI et al., 1978).

Sur milieu de base + N_2 , les cals apparaissent 8 à 10 jours après la mise en culture. Quel que soit l'âge, on ne compte toujours qu'un cal par cotylédon (Tab. 2). Au bout de 20 jours de culture, le nombre de cals obtenus montre une nette progression (Tab. 2).

Les résultats indiquent donc que plus les cotylédons sont âgés, moins ils sont aptes à produire des cals. La vitesse d'apparition des cals est également plus importante, lorsque les cotylédons sont jeunes. Ceci suggère donc que les tissus les plus jeunes ont un pouvoir de prolifération plus élevé et que ce dernier diminue avec l'âge des tissus. BOURIQUET et VASSEUR (1973) émettent les mêmes conclusions, dans leurs travaux sur Endive.

. Reprise des cals

Celle-ci est observée 20 jours après le repiquage et correspond à l'état de grossissement du cal initial.

Tableau 2 : Callogénèse et reprise des cals,
à partir des cotylédons

Apparition des cals	AGES (jours)	POURCENTAGE DE CALS		REPIQUAGE DES CALS		%
		Après 8-10 jours	Après 20 jours	Nombre de cals repiqués	Nombre de cals ayant repris	
Après 8 jours	2 - 3	85.7	95.2	82	34	41.4
	5 - 6	61.9	87.5	81	36	44.4
	8 - 9	45.2	84.5	81	73	90.1

Après 10 jours	14 -15	32.1	75.0	63	00	-
	36 -37	25.0	73.8	62	00	-

Nous remarquons que seuls les cals provenant de cotylédons ayant moins de 10 jours d'âge ont pu proliférer (Tab. 2).

Un gradient de propension à la reprise semble se manifester, les cals issus des cotylédons les plus jeunes réagissant moins bien que ceux des cotylédons âgés de 8-9 jours. Au delà de cet âge, les cals sont incapables d'évoluer, ce qui confirme l'idée selon laquelle l'aptitude à la callogénèse se perd chez les tissus trop âgés.

. Organogénèse des cals:

Après 30 jours de culture, les cals verdissent puis augmentent de taille. Les premiers bourgeons apparaissent au bout de 50 jours de culture; seuls les cals issus des cotylédons les plus jeunes (2-3 jours) produisent des néoformations.

b. Expérience 2

Chez le tabac, il est utile de souligner que les plantules émergent directement des anthèses, contrairement à ce qui se produit pour d'autres espèces comme le Riz (ASSELIN de BEAUVILLE, 1976), le blé (AISSA, 1977) ou l'Asperge (RAQUIN, 1973; DORE, 1978).

. Obtention des plantules

L'apparition des plantules ne s'effectue que sur le milieu ON, beaucoup moins riche et moins complexe que celui de BOURGIN et NITSCH (1967); seules les variétés locales répondent à l'androgénèse. La variété COKER 140 ne donne aucune plante, quel que soit le milieu de culture.

. Enracinement des plantules

Les plantules obtenues se sont directement enracinées sur milieu ON. BOURGIN et NITSCH (1967) mentionnent pourtant la nécessité de transplanter les jeunes individus sur un nouveau milieu plus pauvre, afin de provoquer la rhizogénèse. Dans notre

cas, c'est donc une étape qui n'apparaît plus indispensable.

. Effet du prétraitement au froid

Les réponses sont différentes, selon les variétés. L'obtention des plantules s'effectue pour un prétraitement de 72 heures avec Courbet et Djendel et de 96 heures avec Spaka et Alma. La variété Souma répond aux deux types de prétraitements.

L'effet génotype semble donc assez prononcé, en ce qui concerne la réponse au prétraitement par le froid. On relève une variation que l'on peut qualifier de continue, dans le sens où tous les cas de figure s'expriment. Il serait intéressant de définir les éléments qui rapprochent les variétés à comportement similaire, vis à vis d'un prétraitement donné, et d'en analyser les relations éventuelles avec des caractères susceptibles d'être sélectionnés.

. Vitesse d'apparition des plantules

L'effet génotype est moins évident en ce qui concerne la rapidité avec laquelle les plantules apparaissent. En effet, les premières plantes androgénétiques émergent 4 semaines après la mise en culture pour la plupart des variétés (Alma, Courbet, Djendel et Spaka); il faut attendre 5 à 6 semaines, dans le cas de Souma, pour que les plantes fassent leur apparition.

Ces durées sont, dans tous les cas, moins importantes que celles avancées par BOURGIN et NITSCH (1967) mais correspondent à celles citées par VAZART (1971) ou MONDEIL (1974); signalons toutefois que BERNARD (1971) mentionne une période de 3 semaines seulement.

. Nombre de plantules formées

Les aptitudes de certaines variétés s'expriment plus clairement, lorsque l'on considère ce paramètre (Tab. 3); ainsi les variétés Alma et Spaka se distinguent assez bien.

Tableau 3: Résultats des essais d'androgénèse

VARIETES	Durée du pré-traitement	Apparition des plantules	Nombre de plantes formées		Pourcentage d'E. A.
			Après 4 à 6 semaines(1)	Après 61 à 63 jours(2)	
DJENDEL	72h	4 semaines	12	25	6.8
	96h		-	-	-
ALMA	72h	4 semaines	-	-	-
	96h		11	118	10.9
COURBET	72h	4 semaines	6	38	4.5
	96h		-	-	-
SPAKA	72h	-	-	-	-
	96h	4 semaines	6	56	10.9
SOUMA	72h	6 semaines	1	13	2.3
	96h	5 semaines	1	18	4.1

E.A. = Etamines androgènes

(1) = Correspondant à l'apparition des premières plantules

(2) = 61 à 63 jours après l'apparition des premières plantules

Nous remarquons que les variétés qui paraissent les plus intéressantes sont celles qui ont répondu à 72h de prétraitement; les performances moyennes correspondent aux variétés réagissant au prétraitement de 96h. Enfin, les valeurs les plus faibles se rapportent à Souma, laquelle est apparemment indifférente à l'effet prétraitement.

Ceci tend à souligner l'importance du froid (4°C) dans l'induction de plantes androgénétiques; mais cela ne révélerait-il pas aussi des aptitudes génotypiques particulièrement exacerbées par le niveau de prétraitement au froid (température et durée appliquées)? .

Le nombre d'étamines androgénétiques est élevé, chez les deux variétés les plus performantes, caractéristique particulièrement recherchée lorsque l'on utilise l'androgénèse (Tab. 3). Ainsi donc, Alma et Spaka retiennent de nouveau l'attention, ce qui suggère de nombreuses perspectives de valorisation de ces types locaux.

C O N C L U S I O N

Plusieurs aspects ont été abordés, au cours de notre étude, et montrent que l'obtention de plantes néoformées, par le biais de la culture in vitro de tissus somatiques est une voie à exploiter pour valoriser les tabacs locaux; cependant les essais d'organogénèse et l'évaluation des individus obtenus sont des étapes à développer.

Les résultats sont encore plus encourageants, dans le cas des essais d'androgénèse, et certaines variétés locales paraissent particulièrement indiquées si l'on envisage de promouvoir cette technique pour l'amélioration des tabacs locaux.

Dans cette perspective, le choix du matériel de départ est d'une importance majeure, car selon BERREKIA (1980),

certaines variétés locales seraient plus proches que d'autres, aux plans génétique et physiologique.

B I B L I O G R A P H I E

- AISSA K., 1977. Obtention de plantes haploïdes de *Triticum durum* par voie androgénétique "in vitro". Thèse 3ème cycle, Univ. Paris Sud, Orsay, 1 - 132.
- ASSELIN DE BEAUVILLE M., 1976. Androgenèse "in vitro" chez *Oryza sativa* (variété Cigalon). Agron. Trop., 1, 50 - 55.
- BERNARD S., 1971. Développement d'embryons haploïdes à partir d'anthères cultivées "in vitro". Etude cytologique comparée chez le tabac et le petunia. Rev. Cytol. Biol. Vég., 34, 165 - 188.
- BERREKIA R., 1980. Essai d'obtention de plants de Tabac *Nicotiana tabacum* L. par culture de tissus "in vitro". Thèse Ing. I.N.A. El-Harrach, Alger, 1 - 71.
- BOURGIN J.P. et NITSCH J.P., 1967. Obtention de *Nicotiana* haploïdes à partir d'étamines cultivées "in vitro". Ann. Physiol. Vég., 9, 4, 377 - 382.
- BOURIQUET R. et VASSEUR J., 1973. Croissance et bourgeonnement des tissus de feuilles d'endive en fonction de l'âge et du lieu de prélèvement des plantats. Bull. Fr., 120, 27-32.
- DORE C., 1978. Techniques de production des haploïdes et cas de l'asperge. Sel. Française, 26, 19 - 23.
- HENRY Y. et DE BUYSER J., 1980. Androgenèse "in vitro" et utilisation chez le blé tendre. Cultivar, 124, 16 - 17.
- KOHLLENBACH V.W. et WERNICKE W., 1978. Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of activ carbon in anther culture. Z Pflanzenphysiol., 86, 463 - 472.
- MONDEIL F., 1974. Irradiation de microspores en culture d'anthères= essai d'une nouvelle technique d'obtention de mutations immédiatement decelables et fixables (application à *N. tabacum*). Ann. Am. Plantes, 24, 1, 1 - 11.
- NITSCH J.P.; NITSH C. et PEREAU-LEROY P., 1969. Obtention de mutants à partir de *Nicotiana* haploïdes issus de grains de pollen. C.R. Acad. Sc. Paris, 269, 1650-1652.

- OINUMA T., 1978. Tobacco anther breeding by anther culture. Symp. Meth. Crop Breed., Trop. Agric. Res., 11, 43-53.
- RAQUIN C., 1973. Etude de l'androgenèse "in vitro" chez *Petunia hybrida* et *Asparagus officinalis*. Soc. Bot. Fr. Memoires, Coll. Morphologie, 269 - 274.
- SUBASHINI U.; UNNIKRIISHNAN M. et SATYANARAYANA K.V., 1978. Direct style and stigma néoformation from stigma explants of *Nicotiana tabacum* L. Curr. Sci., 47, 14, 508 - 509.
- TRAN THAN VAN M.; DIEN N.T. et CHLYAH A., 1974. Régulation of organogenesis in small explants of superficial tissue of *Nicotiana tabacum* L.. Planta, 119, 149 - 159.
- VAZART B., 1971. Infrastructure des microspores de *Nicotiana tabacum* susceptibles de se développer en embryoides après excision et mise en culture des anthères. C.R. Acad. Sc. Paris, 272, 549-552.
- WEATHERHEAD M.A. et GROUT B.W.W., 1979. A scanning electron microscope study of embryoid development in the anthers of *Nicotiana tabacum* L. Ann. Bot., 631 - 632.