

**ETUDES DES PROPRIETES ORGANOGENETIQUES DES TISSUE DE NICOTIANA
TABACUM L.VAR. "P 19", EN CULTURE IN VITRO.**

Davut BAŞARAN- Sait YÜCEL, Ahmet ONAY

Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi DİYARBAKIR

RESUME

Les recherches que nous avons effectuées au cours des années précédentes, concernent des propriétés organogénétiques des tissus de tabac de *Nicotiana tabacum* L. var. "P19", en culture in vitro. Pour ces études, nous avons réalisé des mises en culture avec des fragments de tiges de Tabac de "P19", et des isoloments cellulaires à partir de ces souches âgées de trois mois, jusqu'au quinze mois, cultivées sur cinq milieux nutritifs de MURASHIGE et SKOOG [1].

Finalement, on a constaté que les cytokinines et les adénines associés avec l'acide indolylacétique exaltaient la neoformation de bourgeons, une augmentation de l'acide indolylacétique (AIA) provoquait la rhizogenèse.

ÖZET

Geçen yıllar boyunca gerçekleştirdiğimiz araştırmalar, *Nicotiana tabacum* L.var."P19" tütününün in vitro kültürdeki dokularının organogenetik özelliklerinin incelenmesini kapsarlar. Bu incelemeler için "P19" tütününün gövde parçalarıyla kültürler ve MURASHIGE ve SKOOG un (1) beş besleyici besi ortamları üzerinde yerleştirilmiş üç ila onbeş aylık yaşlı suşlarından itibaren hücre izolmanları gerçekleştirildi.

Netice olarak biz, indol asetik asitle karıştırılmış adenin ve sitokinlerin tomurcuk yenilenmesini çoşturduklarını, indolasetik asitteki bir artışın köklenmeyi teşvik ettiğini müşahade ettik.

INTRODUCTION

Il est maintenant bien établi que certaines souches tissulaires de Tabac, même âgées de plusieurs années sont encore aptes à donner des bourgeons et qu'à partir de ces bourgeons, il est possible de reproduire la plante entière.

Ces résultats ont pu être obtenus grâce aux travaux de SKOOG et ses col.(2) qui ont montré que les cytokinines exaltaient remarquablement la néoformation de bourgeons chez les souches tissulaires de *N. tabacum* L.

Cependant, les plantes obtenues sont plus ou moins parfaites. Dans le cas de cultures tissulaires récentes, c'est-à-dire ayant seulement quelques semaines, les plantes sont tout à fait normales [3]; taille, forme des feuilles, fleurs fertiles. Par contre, les souches anciennes, âgées de quelques mois [4], voire de quelques années, donnent des plantes présentant de nombreuses particularités. Les unes poussent normalement et ne présentent que quelques aberrations de taille et de forme. Les autres par contre, sont très éloignées de la morphologie habituelle, lorsqu'elles parviennent à fleurir, la plupart du temps elles ne donnent que ou pas de graines. Certaines ont un port en rosette.

Saisir l'apparition de ces anomalies, étudier leur évolution avec l'âge des souches tissulaires afin de mieux comprendre les transformations subies par les cultures de tissus au cours de leur développement, tel a été le but des recherches que nous avons effectuées.

Nous avons donc mis en culture des fragments de tige de Tabac sur des milieux nutritifs connus pour leurs tendances morphogènes et suivi le devenir des propriétés organogènes des souches tissulaires issues de ces mises en culture.

D'autre part LUTZ(5) ayant seulement montré que la réalisation

d'isolements cellulaires était susceptible de révéler des aptitudes organogènes non-exprimées par les souches tissulaires, nous avons jugé utile de compléter nos observations en isolant, à partir des cultures de tissus obtenues un certain nombre de clones dont nous avons également analysé les propriétés.

Ce travail nous a conduit, chaque fois que cela a été possible, à élever en plantes entières les productions caulogènes résultant des cals, des souches tissulaires et de certaines clones, à étudier les particularités de ces plantes et à déduire, par leur intermédiaire, les propriétés cellulaires des cultures de tissus qui leur avaient donné naissance.

MATERIAL ET TECHNIQUES

I-MATERIAL

Le Tabac utilisé pour nos expériences est le *N.tabacum L.var. "P19"*. Comme au cours de nos études nous avons été conduit à réaliser des cultures de cellules isolées, nous avons fait appel à la souche aseptisée de *N.tabacum L.var."White Burley"*, isolé par MOREL [6] pour disposer des nourrices.

II-TECHNIQUES

Culture de tissus

Les techniques de cultures de tissus que nous avons employées dans nos expériences sont celles qui sont largement décrites dans l'ouvrage de GAUTHERET [7].

Milieus de culture

Nous avons employé comme milieu simple, la solution minérale de KNOP diluée de moitié, et le milieu complexe de MUASHIGE ET SKOOG [1]. Dans ces milieux, les substances de croissance sont représentées, soit par l'association acide indolylacétique-kinétine(K), soit par l'association AIA-Ad (adénine). Grâce à ces associations, on a

défini 4 types de milieux qualifiés de M1, M2, M3, M4 et M5 qui seront expliqués plus tard.

Au cours de la description de ces milieux, nous utiliserons les abréviations suivantes:

Acide indolylacétique	: AIA
Kinétine	: K
Adénine	: Ad
2,4-Dichlorophénoxyacétique acide	: 2,4-D

Tous les milieux de culture sont répartis dans des tubes qui sont bouchés au moyen de coton hydrophile et stérilisés à 115 °C pendant 20 minutes. Les souches tissulaires sont entreposées dans une salle de culture à éclairément continu et dont la température est maintenue à 25 °C.

RESULTATS DES RECHERCHES

Propriétés des souches tissulaires en relation avec la nature du milieu nutritif

La mise en culture de fragments de tige de Tabac sur cinq milieux nutritifs a conduit à l'obtention des cinq souches tissulaires à partir desquelles nous avons effectué, à deux reprises, des isolements cellulaires et réalisé, ainsi des clones.

I-Souches tissulaires

A-Souches entretenues sur le milieu M1 (Souche M1)

Le milieu M1 est caractérisé par des doses de 0,03 mg/l d'AIA et de 1 mg/l de K. On obtient des bourgeons de la souche M1, dès le premier mois de mise en culture. La plupart des bourgeons présentent une morphologie tout à fait normale. Cette caulogénèse, d'abord intense, diminue progressivement sans, pour autant, disparaître

totalemment. Parallèlement à cette évolution, la souche M1 subit des transformations d'ordre structural. On aboutit au bout de 10 à 15 mois à une culture de tissus produisant de rares bourgeons peu aptes à se développer (figure 1, M1).

Clones issus de la souche

a-Clones provenant de la souche récente

Les isollements cellulaires ont été effectués alors que la souche M1 était âgée de 3 mois et fortement organogène. Des 11 clones obtenus, cinq seulement ont été conservés et entretenus pendant plus de 2 mois. L'apparition des bourgeons a été très précoce. Cette caulogénèse s'est maintenue avec le développement des clones.

b-Clones provenant de la souche âgée

La souche M1 était âgée de 14 mois et ne présentait plus qu'une caulogénèse faible et épisodique lorsque nous avons réalisé des isollements cellulaires. Les clones obtenus présentaient de grandes analogies avec ceux isolés antérieurement.

B-Souche entretenue sur le milieu M2 (souche M2)

Le milieu M2 renferme 2 mg/l d'AIA et 2 mg/l de K. Sur le milieu M2, le comportement des tronçons de tige de Tabac, ainsi que celui de la souche obtenue à partir de leur prolifération, présente de grandes analogies avec celui de la souche M1. Différemment, on assiste, avec le temps, à la formation épisodique de pousses feuillées qui produisent généralement des plantes très proches de la normale (figure 1, M2).

Clones provenant de la souche M2

a-Clones provenant de la souche récente

Les isollements cellulaires ont été effectués 3 mois après l'obtention

de la souche M2 qui était, alors, très organogène L'apparition des bourgeons a également été précoce, mais la caulogenese qui s'est maintenue avec le temps était plus faible.

b-Clones provenant de la souche âgée

La souche M2 avait plus d'un an et ne présentait plus qu'une organogenèse faible et épisodique, lorsque nous avons pratiqué les isollements cellulaires.

Sur ces clones aussi, la caulogenèse s'est manifestée très rapidement et cette caulogenèse a conservé toute son ampleur avec temps.

C-Souche entretenue sur le milieu M3 (souche M3)

Le milieu M3 contient une quantité beaucoup plus importante d'AIA (1mg/l) que de K (0,03 mg/l), est un milieu à tendance rhizogène. Sur un tel milieu, les fragments de tige de Tabac ont un comportement très différent de celui que nous avons décrit jusqu'à présent. Le développement du cal est lent. Ce dernier n'atteint pas une taille importante et son repiquage conduit à la formation d'une

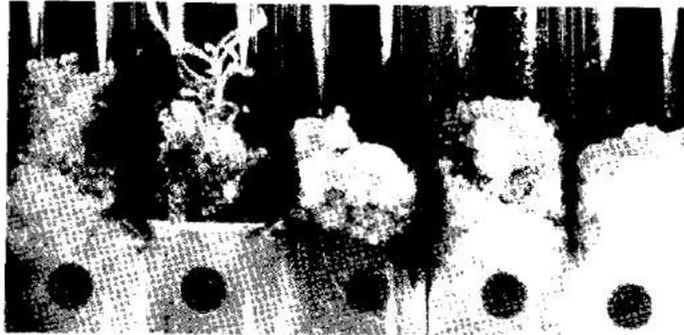


Figure-1 ; Aspect générale des cinq souches tissulaires après un an d'entretien.

souche tissulaire peu compact, d'aspect jaune sale et à croissance lente. De nombreuses racines apparaissent sur le cal, mais la rhizogenèse diminue ensuite, progressivement, au cours des repiquages succesifs, pour devenir définitivement nulle après 10 mois. Cette souche a été cultivée pendant plus de 2 ans. Elle n'a jamais manifesté la moindre tendance caulogène (figure 1,M3).

Clones issus de la souche M3

Seuls les isolements cellulaires effectués à partir de la souche récente on donné des clones viables. Ils ont été réalisés 2 mois après l'obtention de la souche M3, alors que cette dernière était encore jaunâtre et facile à entretenir. Des clones isolés, cinq ont été cultivés pendant plus de 30 mois. On retrouve les différences de structure et de vitesse de croissance déjà observées pour les clones antérieurs, mais elles sont ici beaucoup plus prononcées. II en est de même pour les manifestations organogènes. En effet, sur les cinq clones, un premier a produit épisodiquement des bourgeons, un second a donné parfois quelques racines, quant aux trois autres, ils sont restés purement tissulaires et, tout comme la souche mère M3, ils n'ont jamais donné le moindre organe.

D-Souche entretenu sur le milieu M4(Souche M4)

Le milieu M4 renferme 0,1 mg/l d'AIA et 10 mg/l d'Ad. La souche tissulaire de ce milieu est très ferme et très verte qui évolue, au bout d'un an, en un type friable et jaunâtre. Une intense rhizogenèse apparait 3 semaines après la mise an culture. Elle est suivie, 10 jours plus tard, d'une caulogénèse peu importante, représentée par des bourgeons obtenus présentent de nombreuses anomalies (figure 1,M4).

Clones issus de la souche M4

L'obtention des clones s'est averée difficile de la souche M4, car la plupart d'entre eux se sont rapidement nécrosés. On a réalisé 4

séries d'isolements et sur les 20 clones obtenus, six ont été conservés. Les manifestations organogènes étaient de faible importance.

E-Souche entretenue sur le milieu M5 (souche M5)

Le milieu M5 renferme 0,1 mg/l de 2,4-D et 2 mg/l d'Ad. N'est autre que le milieu de HALPERIN (8). Nous allons tout d'abord décrire le comportement des cultures de tissus de Tabac sur le milieu M5, puis sur le milieu M5 privé de 2,4-D.

1-Milieu complet

Placés sur le milieu M5, des tronçons de tige de Tabac donnent des cals de faible importance de structure très friable. Cette souche n'a jamais manifesté la moindre tendance organogène (Figure 1,M5).

2-Milieu sans 2,4-D

Les cals initialement induits sur M5 ont été transférés sur le milieu sans 2,4-D. II apparaît alors, au bout d'une semaine, de nombreuses racines qui se ramifient rapidement. La rhizogenèse est suivie d'une production de bourgeons apparemment normaux.

Clones issus de la souche M5

Treize clones ont été obtenus à partir d'isolements cellulaires [9] de la souche M5, alors qu'elle était âgée de 5 semaines. Elles étaient très friable vis à vis des antérieurs. La suppression du 2,4-D a toutefois mis en évidence des différences dans les aptitudes organogénétiques, puisque 3 des 5 clones alors âgés de 18 mois produisirent des bourgeons 3 mois après le retrait de l'auxine.

**PROPRIETES GENERALES DES PLANTES ISSUES DE DIFFERENTES SOUCHES
TISSULAIRES ET UNICELLULAIRES**

Les pousses feuillées provenant des colonies tissulaires organogènes issues de souches-mère ou de clones ont été placées sur un milieu nutritif ordinaire ne renfermant que des sels minéraux et toutes celles d'entre elles qui ont produit des racines ont été cultivées en serre, afin d'être élevées, dans la mesure du possible, en plantes entières. Nous allons donc décrire les propriétés des plantes ainsi obtenues à partir des différentes souches tissulaires M1, M2, M3, M4 ve m5, et des clones issus de ces dernières.

Nous constaterons que suivant la nature l'age de la souche, les plantes présenteront des diversités notables.

I-PLANTES ISSUES DE LA SOUCHE M1

A-Souche M1 proprement dite

Des bourgeons ont été prélevés à différents âges de la souche M1. Quatre bourgeons prélevés du cal initial de la souche M1 présentaient une morphologie normale. Après les avoir cultivées jusqu'à la floraison, on a constaté des particularités de la plante normale. Nous avons fait des prélèvement à chaque âge des repiquages et nous avons pu constater que les plantes s'éloignaient considérablement de Tabac normaux. Malgré tout, nous avons pu obtenir des bourgeons capables de se développer, au cours du 25^{ème} repiquage.

B-Clones issus de la souche M1

Nous examinerons les particularités des plantes obtenues, d'abord avec les clones provenant de la souche récente, puis avec ceux résultant de la souche âgée

1 - Plantes résultant de clones provenant de la souche récente

Deux séries de prélèvements de bourgeons ont été effectuées: La Première alors que ces clones avaient 2 mois, la seconde alors qu'ils en avaient huit.

a- Première série

Près de 40 plantes issues de bourgeons plus ou moins normaux, ont été cultivées, mais aucune d'entre elles n'a pu être élevée en plante adulte.

b- Deuxième série

Un nombre de plantes presque identique à celles de la première série a été cultivé à partir de bourgeons également anormaux.

2 - Plantes résultantes de clones provenant de la souche âgée. Les clones étudiés avaient été isolés alors que la souche M1 était âgée de 14 mois. Il a également été effectué deux séries de prélèvements de bourgeons, une première après 2 mois, une deuxième après 9 mois.

a - Première série

Elle est représentée par une quarantaine de plantes, que l'on peut aisément classer en 3 lots.

-un premier lot de 20 plantes très fortement anormales qui ont rapidement cessé de croître après leur mise en pot.

-un deuxième lot de 15 plantes très anormales qui se sont développées sans toutefois fournir de fleurs. La figure 2 représente une feuille de forme très aberrante observée sur l'un de ces Tabacs.

b - Deuxième série

Elle comprend une vingtaine de plantes. On retrouve les mêmes lots que dans la première série avec des proportions identiques.

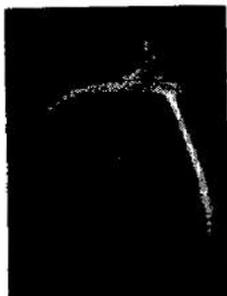


Figure-2 : Feuille très anormale provenant d'un Tabac du 2^{ème} lot.

-un troisième lot de 5 plantes plus ou moins normales, facile à cultiver et qui sont parvenues jusqu'au stade de floraison. Mais parmi elles, trois étaient totalement stériles, les deux autres ont fourni quelques graines sans germer.

II - PLANTES ISSUES DE LA SOUCHE M2

Tout comme pour la souche M1, des bourgeons ont été recueillis à différents âges de la souche M2 et élevés en plantes entières, dont nous allons examiner les principales caractéristiques de quelques prélèvements.

Nous avons prélevé des bourgeons à partir des cals initiaux jusqu'au 20^{ème} repiquage. Pendant ces études, on a pu constater que le nombre des bourgeons anormaux augmentaient avec le temps.

Mais parmi les bourgeons prélevés lors du 20^{ème} repiquage, nous sommes parvenus à obtenir une plante entière. Cette plante a des particularités d'un Tabac normal. L'obtention d'une telle plante est un fait à signaler. Il est, en effet, intéressant de constater qu'une souche tissulaire de Tabac, âgée de plus de 2 ans, est encore capable, malgré les nombreuses variations dont elle a fait preuve à de son développement, de reproduire une plante tout à fait normale.

B - Clones issus de la souche M2

Comme pour les clones de la souche M1, on a examiné des bourgeons des clones de la souche récente et âgée. On n'a pas pu réaliser des plantes entières avec ceux de récente, mais parmi les bourgeons résultant de clones provenant de la souche âgée, ont pu arriver jusqu'à la floraison et elles ne différaient pas de plantes normales.

III - PLANTES ISSUES DE LA SOUCHE M3

A - Souche M3 proprement dite

II n'a pas été possible d'obtenir des plantes avec la souche M3.

B - Clones issus de la souche M3

Compte tenu du fait que la souche M3 n'a jamais eu des bourgeons mais qu'un comportement rhizogène, on aurait pu s'attendre à ce que les colonies tissulaires d'origine unicellulaire qu'on isolerait à partir d'elle, montreraient les mêmes tendances.

IV - PLANTES ISSUES DE LA SOUCHE M4

A - Souche M4 proprement dite

Avec la souche M4, nous retrouvons une souche à tendance caulogène. Plantes résultant de bourgeons prélevés sur le cal initial et au-delà. Les quatre bourgeons que nous avons prélevés sur le cal initial ont évolué en plantes entières.

A partir de 3^{ème} repiquage, les bourgeons néoformés deviennent très anormaux et les anomalies iront en s'accroissant avec le temps, si bien que le développement de ces bourgeons s'avérera difficile et finira par devenir impossible.

Une plante tout à fait normale résultera du 3^{ème}, ainsi que du 4^{ème}

repiquage. Un bourgeon pourra être cultivé lors du 11^{eme} repiquage. Il donnera une plante très anormale et complètement stérile.

B - Clones issus de la souche M4

Au sein des faibles manifestations caulogènes observées parmi les clones issus de la souche M4, il n'a été possible d'obtenir qu'une seule plante entière, car les bourgeons néoformés présentaient de fortes anomalies.

V-PLANTES ISSUES DE LA SOUCHE M5

A - Souche M5 proprement dite

Les bourgeons ont été obtenus à partir de calcs transférés sur un milieu ne renfermant que de l'adénine. Les plantes issues de ces prélèvements présentaient entre elles une grande similitude initialement semblable aux témoins, elles prenaient avec l'âge un port particulier, caractérisé par des feuilles plus longues, verticales, et montraient une relative stérilité (figure 3).



Figure-3 , Aspect de quatre feuilles prélevées sur une plante issue de la souche M5.

La souche M5, âgée de 18 mois, est transférée sur un milieu sans auxine, s'est avérée incapable de produire des bourgeons.

B - Clones issus de la souche M5

Il a été impossible d'obtenir des manifestations caulogènes avec la souche M5 ancienne, il n'en a pas été même avec ses clones, puisque la suppression d'auxine a entraîné la caulogenèse pour trois clones. Les bourgeons d'un seul de ces clones récents ont pu être élevés en plantes entières et n'a-t-on obtenu que deux Tabacs. Il est intéressant de noter que, bien qu'issus de la même colonie tissulaire, ces deux Tabacs diffèrent nettement l'un de l'autre.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

D'une manière générale, les manifestations organogènes des souches tissulaires que nous avons isolées sont d'abord intenses qui elles s'amenuisent après quelques passages. Leur évolution est ensuite fonction de la nature des milieux de culture employés.

Toutes les observations ne peuvent s'expliquer que par une variation des propriétés cellulaires. D'ailleurs, ces variations se traduisent, notamment au niveau de la caulogenèse, par une production d'organes aux formes aberrantes. Ces aberrations augmentent généralement avec l'âge des souches tissulaires.

Le comportement organogène des clones que nous avons isolés à partir des différentes souches tissulaires a été très variable d'un milieu de culture à l'autre. Dans certains cas, il a été sensiblement voisin de celui des souches-mères, dans d'autres cas, il s'en est éloigné considérablement. Enfin, on relevera que pour plusieurs milieux nutritifs, notamment avec des isolements cellulaires effectués à partir de souches tissulaires âgées, l'obtention de clones s'est avérée difficile, voire impossible.

Les clones issus de la souche M3 méritent une attention toute particulière. En effet, alors que la souche M3 cultivée sur un milieu nutritif a tendance rhizogène n'a jamais produit que des racines un de ses clones est devenu caulogène sur ce même milieu.

On en peut trouver plus nette illustration de l'hétérogénéité des propriétés cellulaires présentées par les cultures de tissus.

Enfin, l'existence des clones issus des souches M4 et M5 nous permet de relever deux situations opposées. En effet, la souche M4 a été fortement caulogène et ses clones se sont avérés peu organogènes; par contre, la souche M5 a perdu ses aptitudes organogénétiques et plusieurs de ses clones ont produit des bourgeons.

Finalement, ce travail nous a permis de suivre avec fidélité le devenir organogénétique des cultures de tissus de Tabac. Nous avons pu montrer que les modifications qu'elles subissent sont, non seulement fonction du temps, mais aussi fonction de la nature du milieu nutritif sur lequel elles sont entretenues. Nous avons vu également que les plantes qui résultent des productions caulogènes fournies par les souches tissulaires, qu'elles soient ou non d'origine unicellulaire, reflètent, dans l'ensemble, les transformations qui affectent ces souches. Enfin, grâce au compartement particulier de certains Tabacs, nous avons acquis la conviction que certaines variations des propriétés cellulaires propres aux cultures de tissus doivent être largement réversibles.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- MURASHIGE T. ET SKOOG F., 1962-A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures *Physiol. Plan.*, 15, 473-479.
- 2- SKOOG F. et MILLER C.O., 1957-Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp.Soc.Exp. Biol.*, 11, 118-131.
- 3- VASIL V. et HILDEBRANDT A.C., 1958-Differentiation of Tobacco plants from single isolated cells in microcultures. *Science*, 150, 889-892.

- 4- LUTZ A., 1969-Etude des aptitudes morphogénétiques des cultures de tissus. Analyse par la methode des clones d'origine unicellulaire. Rev.Gen.Bot. 76, 309-359.
- 5- LUTZ A., 1966-Obtention de plantes de Tabac a partir de cultures unicellulaires provenant d'une souche anergiée. Ibid., 1856-1858.
- 6- MOREL G., 1948-Recherches sur la culture associee de parasites obligatoires et de tissus végétaux. Thèse, Paris. 112 pp. et Ann. Epiphyt., N.S.14, 123-234.
- 7- GAUTHERET R.J., 1959-La culture des tissus végétaux. 1 vol., Masson Edit. Paris, 863 pp.
- 8- HALPERIN W., 1970-Embryos from somatic plant cells. Syposia of the International Society for cell Biology. Vol.9:Control mechanism in the expression of cellular phenotypes, pp.169-191. Academic Press, New-York-London.
- 9- LUTZ A., 1963-Description d'une technique d'isolement cellulaire en vue de l'obtention de culture de tissus végétaux provenant d'une cellule unique.C.R.Acad. Sc., 256, 2676-2678.