

COMMUNICATIONS

DE LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ D'ANKARA

Série C : Biologie

TOME : 3

ANNÉE : 1985

**PHYSIOLOGIE VEGETALE-NOUVELLES RECHERCHES POUR
OBTENIR DES EMBRYONS IN VITRO À PARTIR DES PISTILS DE
NICOTIANA TABACUM L. CV. SİİRT**

by

M. Davut BAŞARAN

✍

Faculté des Sciences de l'Université d'Ankara
Ankara, Turquie

**Communications de la Faculté des Sciences
de l'Université d'Ankara**

Comite de Redaction de la Serie C.
Y. Akman, S. Karol, B. Mursaloğlu
Secetaire de Publication
Ö. Çakar

La Revue "Communications de la Faculté des Sciences de l'Université d'Ankara" est un organe de publication englobant toutes les disciplines scientifiques représentées à la Faculté des Sciences de l'Université d'Ankara.

La Revue, jusqu'à 1975 a l'exception des tomes, I, II, III était composée de trois séries

Série A : Mathématiques, Physique et Astronomie,
Série B : Chimie,
Série C : Sciences Naturelles.

A partir de 1975 la Revue comprend sept séries:

Série A₁ : Mathématiques,
Série A₂ : Physique,
Série A₃ : Astronomie,
Série B : Chimie,
Série C₁ : Géologie,
Série C₂ : Botanique,
Série C₃ : Zoologie.

A partir de 1983 les séries de C₂ Botanique et C₃ Zoologie ont été réunies sous la seule série Biologie C et les numéros de Tome commenceront par le numéro 1.

En principe, la Revue est réservée aux mémoires originaux des membres de la Faculté des Sciences de l'Université d'Ankara. Elle accepte cependant, dans la mesure de la place disponible les communications des auteurs étrangers. Les langues Allemande, Anglaise et Française seront acceptées indifféremment. Tout article doit être accompagné d'un résumé.

Les articles soumis pour publications doivent être remis en trois exemplaires dactylographiés et ne pas dépasser 25 pages des Communications, les dessins et figures portés sur les feuilles séparées devant pouvoir être reproduits sans modifications.

Les auteurs reçoivent 25 extraits sans couverture.

l'Adresse : Dergi Yayın Sekreteri
Ankara Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Beşevler-Ankara
TURQUIE

PHYSIOLOGIE VEGETALE—NOUVELLES RECHERCHES POUR OBTENIR DES EMBRYONS IN VITRO À PARTIR DES PISTILS DE *NICOTIANA TABACUM* L. CV. SIIRT

M. Davut BAŞARAN

(Reçu le Novembre 26, 1984, accepté le Janvier 7, 1984)

RESUME

Le Tabac utilisé pour nos expériences est le *Nicotiana tabacum* L. cv. Siirt. Le but de cette recherche, c'est d'obtenir des embryons adventifs, in vitro, à partir des pistils de tabac de Siirt, dans des différentes modifications de milieux de MURASHIGE et SKOOG (MS., 1962).

Les techniques de cultures de tissus que nous avons employées dans nos expériences sont celles qui sont largement décrites dans l'ouvrage de GAUTHERET (1959).

En concluant, on a mis en culture des pistils de tabac de Siirt sur des milieux de MS, qui contiennent de 2 mg / L d'acide indolyacétique (AIA), de 2 mg / L de kinetin (K) et pour une deuxième milieu sans hormone, contenant 3-5 anthères par tube et près de chaque pistil. Finalement, en tous les deux milieux, on a obtenu tous les stades des embryons adventifs qui enracinent des carpelles d'ovarium et des teguments.

INTRODUCTION

Mis en culture réalisé à partir des cellules isolées des souches âgées de trois ans du tronc de *N. tabacum* L. var. "P 19" (BAŞARAN, 1974) dans des milieux qui concernent de 2 mg / l d'AIA et de 2 mg / l de K nous ont donné des bourgeons tout à fait normaux. Les mêmes concentrations d'hormones et d'autrement anthères ont été employé pour obtenir des embryons *in vitro* à partir de *N. tabacum* L. cv. Siirt.

Des embryons *in vitro* ont été réalisés pour la première fois avec des cultures de tubercules de Carotte par REINERT (1958) et STEWARD et ses coll. (1958).

En 1962, on a été obtenue des cultures d'embryons à partir des grains de *Cuscuta reflexa* par MAHESHWARI et BALDEV, et de *Dendrophthoe falcata* par JOHRI et BAJAJ, à la même année. GUHA et MAHESHWARI (1964) ont été réalisés des embryons androgéniques *in vitro* avec *Datura innoxia*.

Plus tard, JOHRI et SEHGAL (1965) ont été réalisés des cultures d'embryons à partir des ovules d'*Anethum graveolens*. A la même année, MAHESHWARI et GUPTA ont été réalisés des embryons *in vitro* avec des cals de troncs de *Foeniculum vulgare*. Aussi des embryons *in vitro* originaires d'épidermes du tronc de *Ranunculus sceleratus*, ont été constatés par KONAR et NATARAJA (1965).

YAMADA et ses coll. (1967) ont été réalisés des embryons *in vitro* à partir des cultures de cellules isolées des cals de *Solanum melongena*.

En 1970, THOMAS et STREET ont été obtenus des cultures d'embryons *in vitro* avec des cellules en suspension d'*Atropa belladonna*.

En haut, on a travaillé préciser l'origine des embryons *in vitro* sur les différentes plantes. Maintenant nous essaierons à expliquer les substances embryogénèses.

STEWART et ses coll. (1958) ont été obtenus des embryons *in vitro* dans des cultures de *Daucus*, en employant du lait du coco. Les mêmes embryons *in vitro* de *Daucus* ont été réalisées par KATO et TAKEUCHI (1963) en utilisant d'extraits de levures. Enfin, soit HALPERIN et WETHERELL (1964) soit HALPERIN (1964, 1966) ont été réalisés pour la première fois, des embryons, dans des milieux tout à fait synthétiques qui concernent des auxines, cytokinines et d'azote.

TZEN et LIN (1975) récemment, ont été réalisés des embryons *in vitro* avec des anthères de *Raphanus sativus*, en utilisant 2, 4-D.

Nos recherches concernent plutôt de réalisés des différentes étapes d'embryons *in vitro* en employant d'AIA (acide indolylacétique). K (kinétine) et d'anthères de la même plante dans le milieu de MURASCHIGE et SKOOG (1962).

METHODES D'ETUDES

Nous avons mis en culture des pistils de bourgeons d'inflorescence (fig. 1. c) de *Nicotiana tabacum* L. cv. Siirt (D'une variété de la Turquie) Avant de faire sortie les pistils, tous les bourgeons ont été stérilisés dans l'hypochlorite de calcium à 7 % pendant 30 minutes. Puis, nous les avons rincé trois fois dans l'eau distillée stérile en 10 minutes. Finalement, en coupant les bourgeons entre les papiers filtres stériles, nous avons pris les pistils et les avons mis en culture dans des différentes modifications du milieu de MURASCHIGE et SKOOG (MS) qui sont es suivant:

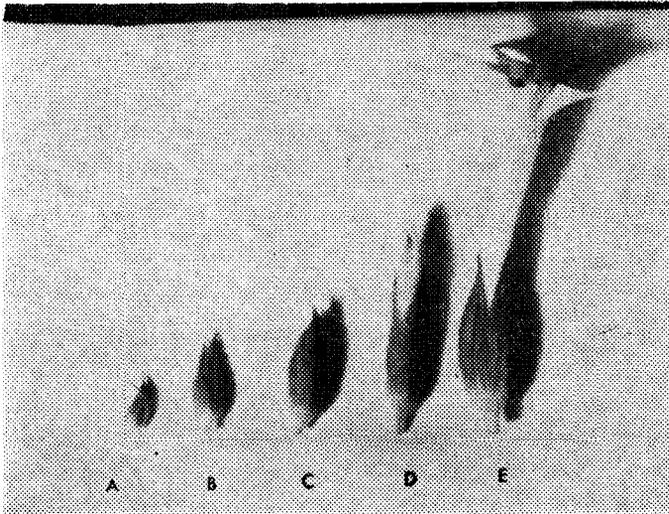


Fig. 1. Les stades d'un bourgeon d'inflorescence jusqu'à une fleur de *N. tabacum* L. cv. Siirt.

Milieu MS_0 : C'est un milieu de MURASCHIGE et SKOOG (MS) qui ne concerne pas d'hormones.

AIA	0 mg/l
K	0 mg/l

Milieu MS_1 : Les concentrations en IAA et en K sont équivalentes,

AIA	2 mg/l
K	2 mg/l

Milieu MS_2 : Ici, dans le milieu MS_0 contient différents nombres d'anthères de la même plante.

Lorsque nous avons effectué une dissection longitudinale des pistils de notre matériel de travail, nous avons constaté qu'ils contiennent de 4 pièces (fig. 2).

Au milieu de chaque pistil se trouve des colonnes placentaires sur lesquelles se trouvent des ovules (fig. 2). C'est à partir de ces ovules que nous essaierons d'obtenir des embryons *in vitro*.

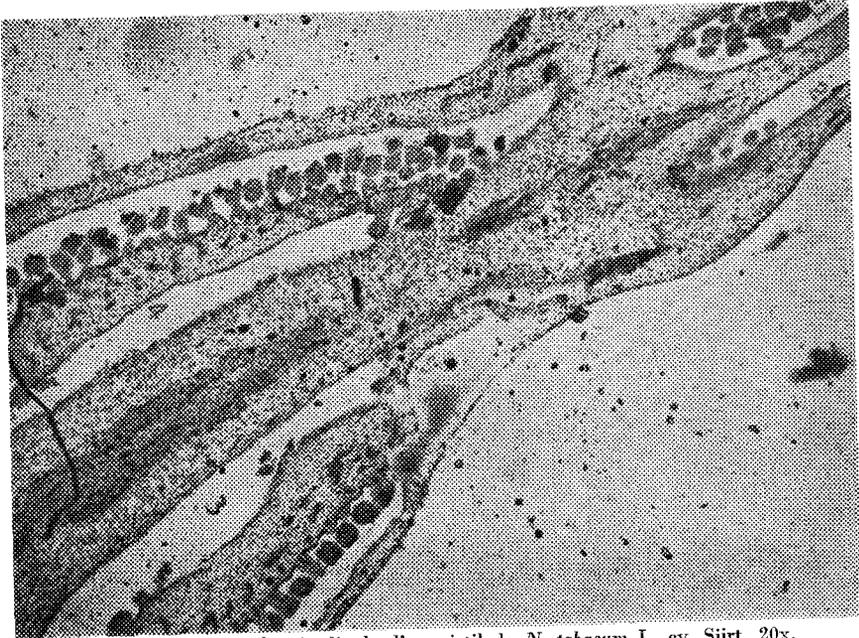


Fig. 2. Dissection longitudinale d'un pistil de *N. tabacum* L. cv. Siirt. 20x.

RESULTATS

Nous avons mis en culture des pistils dans des différents milieux que nous venons de définir. Nous avons observé les résultats suivants:

1. Metre les pistils en culture sur le milieu MS₀.

On a été mise en culture des pistils de *N. tabacum* L. cv. Siirt dans des 60 tubes concernant du milieu MS₀. Parmi ceux, 54 ont été brunis, noircis et ils finissent par dépérir. Dans le reste, on a été constaté un pue de gonflages et en 20 jours ils se sont arrêtés de proliférer.

Finalement dans le premier série des éssaies, on n'a pas pu observé ni des bourgeonnement et ni des embryons *in vitro*.

2. Metre les pistils en culture sur le Milieu MS₁.

48 pistils ont été mis en culture dans le milieu MS₁. 6 jours après mise en culture, on a observé dans 17 tubes des proliférations sur la region des ovaires des pistils. Le vingt-cinquième jour, la première étape embryogenèse qui est "globulaire" s'était montrée (fig. 3).



Fig. 3. Stade globulaire provenant du pistil de Tabac de Siirt dans le milieu MS_1 (40x).

Après quelques jours de ces stades, nous avons constaté le stade "cœur" (fig. 4), "tropic" (fig. 5) et finalement "cotylédonnaire" (fig. 6).



Fig. 4. Stade coeur provenant du pistil de *N. tabacum* L. cv. Siirt proliférant dans le milieu MS_1 (50x).

Les différentes étapes des embryons ont été parues à la fois sur le même pistil (fig. 2, 7-4, b, c). Cette figure 7 montre que les ovules des pistils ne prolifèrent pas en même temps. Parce que les hormones stimulantes n'arrivent pas en même temps dans chaque ovule. C'est pour ça, comme on le voit dans la figure 8, les ovules qui sont près de le mi-

lieu MS_1 ne prolifèrent pas (fig. 8a). Mais ceux qui sont loin de contact des milieu MS_1 prolifèrent bien (fig. 8b).



Fig. 5. Stade torpille provenant du pistil *N. tabacum* L. cv. Siirt dans le milieu MS_1 (40x).



Fig. 6. Stade cotylédonnaire réalisé à partir des pistils du Tabac de Siirt (3x).



Fig. 7. Montre différentes étapes des embryons in vitro réalisés à partir des pistils de *N. tabacum* L. cv. Siirt (2x). a) Stade globulaire b) Stade coeur c) Stade torpille



Fig. 8. Les ovules du Tabac de Siirt proches du milieu MS_1 ne prolifèrent pas (a), mais ceux qui sont loin (b) du milieu MS_1 prolifèrent bien (15x).

Les dissections histologique qui ont été effectués dans des pistils proliférant sur le milieu MS_1 , nous ont montre les origines des embryons *in vitro* (fig. 9a, b). Comme on le voit sur la fig. 9a, l'embryon (e) vient à l'extérieur des ovules (t), d'endroit des integuments (fig. 9b).

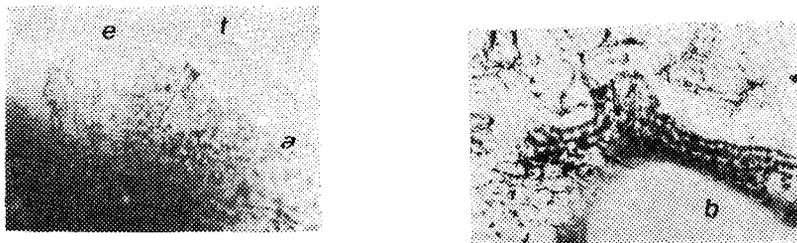


Fig. 9. Montre les origines des embryons *in vitro* obtenus à partir des ovules du pistil de *N. tabacum* L. cv. Siirt dans le milieu MS_1 (15x).

- a) Obtention des embryons (e) à partir des ovules (t),
b) Réalisé des embryons à partir des intégruments des ovules (b).

3. Metre les pistils en culture dans le Milieu MS_2 .

Les pistils stérilement sorties des bourgeons inflorescences ont été mises en culture dans des milieux MS_0 contenant à partir d'un anthère jusqu'huit. Les pistils qui ont été mise en culture avec 1 et 8 anthères par tube et par pistil, n'ont pas donné d'embryons. Ceux qui en contenaient 2 et 7, ont donné seulement le stade globulaire.

90 pistils qui ont été mise en culture égalenet avec 3, 4 et 5 anthères, ont montré les 4 stades embryonnaires du Milieu MS_1 . Ceux qui ont été mise en culture avec 6 anthères par tube et par pistil, n'ont donné que les stades globulaires et coeurs.

Résumant, les stades des embryons *in vitro* ont été obtenus uniquement dans le Milieu MS_1 dans lequel se trouve 2 mg/l d'AIA et 2/l de K ce qui sont équivalent vis à vis d'hormones au milieu MS_1 qui contenaient 3,4 et 5 anthères par tube.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Jusqu'aujourd'hui, les recherches réalisés, *in vitro*, sur les embryons adventifs, ont montré que l'origine et la matérielle chimique embryogène changeaient d'une plante à autre. Les embryons adventif ont été réalisés pour la première fois par REINERT (1958) des cellules

somatiques de *Daucus*, par STEWARD et ses coll. (1958) des cellules suspensions de *Daucus*, par GUHA et MAHESWARI (1964) des anthères de *Datura innoxia*, par JOHRI et SEHGAL (1965) des ovariums d'*Anethum graveolens*, par MAHESHWARI et GUPTA (1965) des cals du tronc de *Faeniculum vulgare*, par KONAR et NATARAJA (1965) d'épiderma du tronc de *Ranunculus sceleratus*, par YAMADA et ses coll. (1967) des tronc de *Solanum melongena*, par NIIZEKI et DONO (1968) des anthères d'*Oryza sativa*, par NORREEL et NITSCH (1968) des organes végétatifs de *Daucus*, par THOMAS et STREET (1970) des troncs d'*Atropa belladonna*, par PELLETTIER et ses coll. (1972) des anthères d'*Asparagus officinalis*, par RAQUIN et PILET (1972) des enthères de *Petunia*, par MOURAS (1972) à partir des cellules isolées et cultivées *in vitro* de *Daucus*.

CHAMPAGNAT et ses coll. (1969) ont montré que les embryons adventifs naturels enracinaient, chez les *Ficaria ranunculoides*, *Saxifraga granulata*, *Dentaria bulbifera*, *Bryophyllum tubiflorum*, *Asplenium bulbiferum*, *Allium oleraceum* et *Alliaria officinalis*, à partir des organes végétatifs; chez les *Lilium* et *Plantago lanceolata*, des synergides; et chez l'*Ulmus*, des antipodes.

Les explications données ci-dessus sur l'origine des embryons adventifs sont assez suffisantes, sauf celles de JOHRI et SEHGAL (1965). Parce que d'après JOHRI et SEHGAL (1965) l'origine d'embryon adventif, *in vitro*, d'*Anethum graveolens* est ovarium. Mais on sait bien que dans l'ovarium, il ya plusieurs régions. Il faut donc préciser le point exact de l'origine.

C'est pour cela, nous avons réalisé des recherches, à partir des ovariums du tabac de Siirt, cultivées *in vitro* dans des milieux de MURASHIGE et SROOG (1962), en faisant des coupes histologiques, sur ceux qui avaient déjà donné des différentes stades d'embryons adventifs. Nous avons constaté que l'origine de ceux sujets sont des carpelles d'ovarium et des téguments d'ovulum.

Quant aux matérielles chimiques embryogènes, STEWARD et ses coll. (1958) insistent sur le lait de coco. Mais soit HALPERIN et WETHERELL (1964), soit HALPERIN (1964) trouvent que le matériel embryogène sont ceux de 2,4-D, auxines, cytokinines, NH_4 et NO_3 . Même HAMPERIN (1966) et REINERT (1967) ont constaté que le lait de coco n'était pas un matériel embryogène. VAGERA et ses coll. (1979) insistent que le matériel embryogène est Fe EDTA. Parce qu'ils

ont réalisé des embryons adventifs avec Fe EDTA à partir des anthères de tabac de Samsun.

En profitant toutes ces expériences, nous avons employé un mélange de 2 mg / L d'AIA et de 2 mg / L de K dans des milieux de MURASHIGE et SKOOG (1962), avec le tabac de Siirt et finalement nous avons obtenu tous les stades des embryons adventifs.

Aussi, CHAMPAGNAT et ses coll. (1969) ont découvert que les organes urogénitaux contenaient jusqu'aux trente fois de plus d'auxines que les organes végétatifs. En partant de ces idées, nous avons mis en culture les pistils avec différents nombres d'anthères et constaté que les pistils donnaient tous les stades d'embryons adventifs avec seulement 3, 4 et 5 anthères. C'est donc prouvé que 3, 4 et 5 anthères contiennent à peu près, 2 mg / L d'AIA. Autrement dit ces anthères sont suffisants pour l'embryogenèse dans des milieux de MS sans auxine synthétique.

REFERENCES

- Başaran (D.):** Evolution des propriétés organogénétiques des cultures de tissus de Tabac au cours de leur développement. Thèse, Bordeaux, 62 pp. 1175, 1974.
- Champagnat (P.), Ozenda (P.) et Baillaud (L.):** Précis de Biologie végétale. Croissance, Morphogenèse et Reproduction 510 pp. Tome III, 1969.
- Guha (s.) and Maheshwari (S. C.):** In vitro production of embryos from *Datura*. Nature, London, 212 p. 497, 1964.
- Halperin (W.):** Morphogenetic studies partially synchronized cultures of carrot embryos. Science, 146, 408-410, 1964.
- Halperin (W.):** Alternative morphogenetic events in cell suspensions. Amer. Jour. Bot., 53, 443-453, 1966.
- Halperin (W.) and Wetherell (D. F.):** Adventiv embryony in tissue culture of the wild carrot, *Daucus carota* L., Amer. Jour. Bot., 51, 274-283, 1964.
- Johri (B. M.) and Bajaj (Y. P. S.):** Behavior of mature embryos of *Dendrophthoe falcata* (L. F.) Ettingsh. In vitro, Nature, 193, 194-195, 1962.
- Johri (B. M.) and Sehgal (C. B.):** In vitro production of meomorphs in *Anethum graveolens* L. Nature, 205, 1337, 1965.
- Kato (H.) and Takenchi (M.):** Morphogenesis in vitro starting from single cells of carrot root. Plant and Cell Physiol., 4, 233-245, 1965.
- Konar (R. N.) and Nataraja (K.):** Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. Plant lets from freely suspended cells and groups. Phytomorphology, 15, 206-211, 1965.
- Maheshwari (P.) and Baldev (B.):** In vitro induction of adventive buds from embryos of *Cuscuta reflexa* Roxb. In: Industrial Research New Delhi, PP. 129-138, 1962.

- Maheshwari (S. C.) and Gupta (G.R. P.):** Production of adventitious embryoids in vitro from stem callus of *Foeniculum vulgare*. *Planta (Berl.)* 67, 384-386, 1965.
- Mouras (A.):** Contribution a l'étude du déterminisme de l'embrogenese somatique chez la Carotte sauvage (*Daucus carota* L.) Cultivée in vitro. These, Bordeaux, 58 pp. 989, 1972.
- Murashige (T.) and Skoog (F.):** A revised medium for rapidgrowth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol.*, 15, 473-497, 1962.
- Niizeki (H.), Dono (K.):** Induotion of habloid rice plant from anther culture, *Proc. Jap. Acad.*, 44, 341-346, 1968.
- Norreel (B.) et Nitsch (P. J.):** La formation d'embryons végétatifs chez *Daucus carota* L. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 115, 501, 1968.
- Pelletier (G.), Raquin (C.) et Simon (G.):** La culture in vitro d'antheres d'Asperge (*Asparagus officinalis*), *C. R. Acad. S c. Paris*, 274, 848-851, 1972.
- Raquin (C.), Pilet (V.):** Production de plantes a partir d'antheres de *Petunias* cultives in vitro. *C.R. Acad. Sc.*, 274, 1019-1022, 1972.
- Reinert (J.):** Morphogenese un ihre kontrolle en gewebeulturen aus Karotten. *Nature. Wiss.*, 45, 344-345, 1958.
- Steward (F. C.), Mapes (M. O.) and Mears (K.):** Growth and organized development of cultured cells. II. Organisation in cultures grown freely suspended cells. *Amer. Jour. Bot.*, 45, 705, 1958.
- Thomas (E.) and Strett (H. E.):** Organogenesis in cell suspension cultures of *Atropa belladonna* L. and *Atropa belladonna* cv. *Lutea* Döhl. *Ann. Bot.*, 34, 657-669, 1979.
- Tzen (M. T.) and Lin (C. I.):** Influence of concentration of IAA, 2, 4-D and Kinetin on the in vitro anther cultures of Radish Broccoli Sunflower, *Jour. Asso. of China new series No. LXXXXI.* 23-31, 1975.
- Vagera (J.), Havranek (P.) and Opatrni (Z.):** Regulation of in vitro androgenesis of Tobacco. *Relation, Ship between concentration of ions and kinetin Biochemiphysiol. Pflanzen.* 174, 752-760. 1979.
- Yamada (R.), Nakagawa (H.) and Sinoto (Y.):** Studies on the differentiation in cultures cells. 1- Embryogenesis in three strains of *solanum* callus. *Bot Mag., Tokya*, 80, 68-74, 1967.

ÖZET

Denemelerimizde *Nicotiana tabacum* L. cv. Siirt tütünü kullanılmıştır. Bu araştırmada, MURASHIGE ve SKOOG (MS) (1962) ortamının değişik mofidikasyonlarında, Siirt tütünü pistillerinden itibaren, in vitro olarak, embriyo elde etme işlemi amaçlanmaktadır.

Denemelerimizde kullandığımız doku kültürü teknikleri GAUTHERET'nin (1959) eserinde geniş olarak anlatılmıştır.

Sonuç olarak, Siirt tütünü pistilleri, litrede 2 mg indolil asetik asit (AIA) ve 2 mg kinetin (K.) içeren ve hormonsuz fakat pistil yakınında ve her tüpte 3-5 anter içeren MS solusyonlarında kültüre alındılar. Neticede, her iki ortamda da, integumentlerden ve oraryum karpellerinden köken alan adventif embriyoların bütün evreleri elde edildi.