

# LA CULTURE *IN VITRO* DES EMBRYONS IMMATURES DANS L'ACCELERATION DU CYCLE DE SELECTION DES LIGNÉES DE TOURNESOL ET SES EFFETS MORPHOVÉGÉTATIFS

H. S. AZPIROZ, P. VINCOURT, H. SERIEYS,  
A. GALLAIS

Station d'amélioration des plantes, INRA,  
Centre de Montpellier, 34130 Mauguio, France

## INTRODUCTION

Le tournesol en France est la troisième culture de champ, après le blé et le maïs. Les surfaces cultivées sont passées de 44 000 ha en 1976 à plus de 850 000 ha en 1986 (Martin, — Ferrari, 1986).

D'autre part les variétés cultivées en France ont une base génétique relativement étroite (Morice, 1985). C'est pourquoi l'INRA a développé depuis quelques années un programme de recherches pour élargir la variabilité génétique utilisable pour l'améliorateur du tournesol.

Les techniques de culture *in vitro* ont été employées pour obtenir des lignées dans un délai de temps sensiblement plus court. La culture *in vitro* des embryons immatures a été déjà utilisée chez diverses espèces par plusieurs chercheurs.

Les embryons immatures peuvent être cultivés soit pour la production d'embryons somatiques par voie callogène (Morocz, 1984; Thomas et Scott, 1985) soit directement pour la production de plantules, avec dans ce cas, deux objectifs principaux : le sauvetage des embryons interspécifiques et le raccourcissement de la durée du cycle végétatif.

En ce qui concerne le sauvetage des embryons nous citerons les travaux réalisés sur *Hordeum bulbosum* x *H. vulgare* de Luk' Yanyuk et Ignatova (1984) et sur *Arachis hypogaea* x *A. villosa* de Bajaj *et al.* (1982); chez le tournesol nous mentionnerons les travaux effectués par Chandler et Beard (1983) sur 32 croisements interspécifiques différents, et Bohorova *et al.* (1985) qui a utilisé cette méthode dans les croisements *H. annuus* x *H. hirsutus* et *H. scaberrimus* x *H. annuus*.

Les stades de prélèvement des embryons de tournesol les plus appropriés pour leur croissance *in vitro* ont été étudiés par Espinasse *et al.* (1985) sur matériel CMS (HA 99, Indiana 1 cms) et sur une population d'*H. annuus* sauvage. Une étude plus approfondie sur ce thème a été faite dans notre laboratoire chez

le tournesol cultivé (géotype No 159), deux espèces sauvages *H. anomalus*, *H. resinosus* et leur croisement avec la lignée de tournesol 84 SRI (Alissa *et al.*, 1986.)

Dans un même objectif d'accélération des cycles végétatifs chez les espèces cultivées nous citerons Boyadzhier (1984 a) qui a travaillé sur blé en effectuant la culture *in vitro* de 25 embryons immatures sur milieu de Murashige et Skoog avec une phase de vernalisation de 40 jours à 2 et 4°C pour obtenir des plantes.

Les méthodes de culture *in vitro* des embryons immatures chez le blé et le riz dans le but d'accélérer les cycles de sélection ont été discutées par Boyadzhier (1984 b). D'autre part l'utilisation de cette méthode pour la fabrication de lignées mâles-stériles cytoplasmiques de tournesol a été appliquée par Plotnikov (1983) qui a réalisé 6 retrecroisements en 370 jours, cela grâce à la culture d'embryons immatures sur milieu Nitch-Nitch modifié.

Dans le travail présenté nous étudierons les changements morphovégétatifs des lignées de tournesol produites par la culture *in vitro* d'embryons immatures durant quatre générations.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

Nous avons utilisé 7 lignées INRA mainteneuses de stérilité mâle ou restauratrices de la fertilité : respectivement 125, GP, 62, CX et 85 HR 4-1, 83 HR 4-1, PRS 7.

Un dispositif dialléle a été utilisé pour effectuer les croisements et la fabrication des hybrides a pu se faire grâce au prélèvement des étamines tous les jours pendant la floraison par apport d'allopollen.

Les embryons immatures (10 à 18 jours après la pollinisation) ont été isolés dans des conditions rigoureuses d'asepsie sur un milieu nutritif de Murashige et Skoog modifié par Alissa *et al.* (1986) qui consiste en la dilu-

tion de moitié des macroéléments. Ce milieu de base sans hormones a été complété de saccharose (20 g/l), d'inositol (0,1 g/l) et de vitamines du groupe B.

La culture d'embryons des différents cycles a été effectuée selon les trois protocoles suivants :

1. Les embryons âgés de 10 à 18 jours sont placés en conditions stériles dans des boîtes de Petri contenant le milieu nutritif décrit, puis incubés en salle climatisée à 25°C + 1°C sous un éclairage de 6 000 lux avec une photopériode de 16 h, après quoi les embryons germés sont transférés dans des flacons de 100 ml sur le même milieu jusqu'à la formation de plantules racinées (3 jours).

Les plantules normalement développées ont été repiquées sur terreau dans des jiffypots et élevées pendant 3 jours en salle climatisée avec éclairage pendant 16 h à 20°C et obscurité pendant 8 h à 15°C.

Après cette période de 9 jours les plantules ont été repiquées en plein champ sous un régime d'arrosage par aspersion quotidien (3 mm) jusqu'à l'apparition de la 4ème paire de feuilles.

2. Les embryons sont mis en culture dans des boîtes de Petri pendant une période de 5 jours puis transférés directement en serre dans des jiffypots où ils séjournent 5 jours.

Après cette période de 10 jours les plantules ont été repiquées sous serre ou au champ.

3. Le troisième procédé est identique au premier sauf pour la durée de séjour *in vitro* qui a variée de 5 à 15 jours.

La génération F<sub>1</sub> a été obtenue selon le premier protocole, les générations F<sub>2</sub> et F<sub>4</sub> ont suivi les conditions de culture du procédé No 2 avec une variante pour la F<sub>2</sub>, qui a comporté un séjour dans une chambre climatisée pendant 10 jours. La F<sub>3</sub> a été traitée selon la procédure No 3.

Au cours de chacun des cycles, les données morphovégétatives ont été recueillies sur chaque individu, à savoir :

- la hauteur ;
- le diamètre du capitule ;
- le nombre de jours nécessaires à la floraison ;
- la durée du cycle végétatif complet d'embryon à embryon.

La méthodologie suivie pour l'obtention des lignées pures a été la suivante :

A partir des 42 hybrides fabriqués, 5 plantes ont été retenues et mises au champ. Sur chacune des plantes autofécondées nous avons prélevé des embryons de manière à obtenir 5 individus par plante F<sub>2</sub> (soit 25 au total par combinaison hybride). Chacune de ces descendance a été conduite en S.S.D. jusqu'en F<sub>5</sub> en utilisant la culture d'embryons immatures.

## RESULTATS

L'utilisation de la culture *in vitro* des embryons immatures nous a permis d'obtenir des embryons F<sub>5</sub> dans un laps de temps moyen réduit à 320 jours à partir du croisement initial, soit 4 cycle végétatifs complets (tableau 1).

Au niveau d'un cycle végétatif, entre la mise en culture et l'obtention des embryons de la génération suivante, il s'est écoulé de 78 à 101 jours.

Nous avons observé que les plantules obtenues par culture *in vitro* d'embryons immatures présentent quelques modifications morphologiques. L'effet prépondérant paraît lié à un nanisme marqué de l'ensemble de l'appareil végétatif : réduction de la hauteur de la plante, du diamètre du capitule et de la taille des feuilles (fig. 1).

Tableau 1

Durée du cycle total entre la mise en culture des embryons F<sub>1</sub> et l'obtention des embryons F<sub>5</sub> dans le croisement diallèle

Lignée femelle	CYCLE TOTAL						
	Moyenne * Lignée mâle						
	125	62	83 HR 4-1	85 HR 4-1	CX	GP	PRS 7
125	—	316,81	316,81	322,33	323,06	375,05	313,37
62	325,12	—	331,78	320,00	315,82	—	321,20
83 HR4-1	321,90	317,53	—	329,33	330,71	333,17	330,00
85 HR4-1	317,33	319,00	—	—	316,25	318,00	318,42
CX	324,29	322,94	322,52	319,00	—	323,47	329,80
GP	320,00	324,62	333,18	325,87	330,20	—	321,92
PRS 7	318,08	319,86	326,70	315,54	322,82	320,20	—
Moyenne	320,90	319,90	324,22	320,48	322,72	334,57	321,56

\* Durée moyenne en jours entre embryon F<sub>1</sub> et F<sub>5</sub>

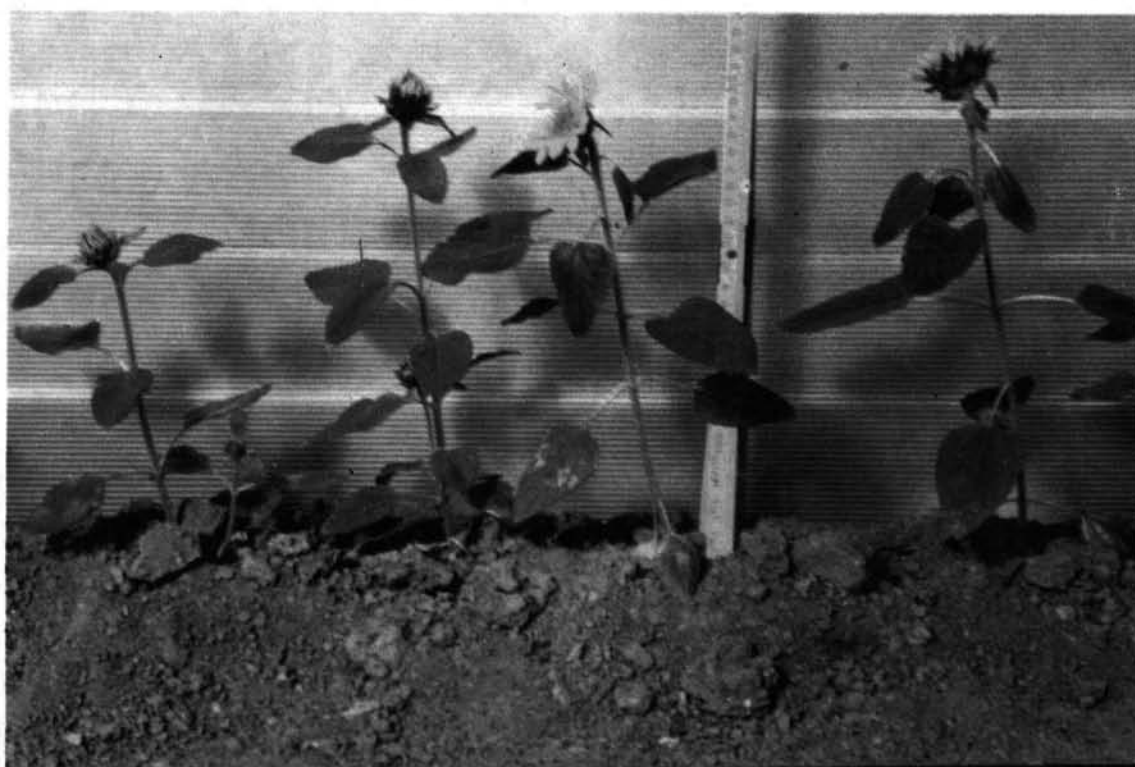


Fig. 1 — Les conditions de culture *in vitro* ont une incidence notable sur la taille des plantes



Fig. 2 — La diminution de la taille du capitule de tournesol issue de la culture *in vitro* varie de 16% à 80%, par rapport aux lignées parentales normalement cultivées