

50376
1988
183

N° d'ordre : 1433



50376
1988
183

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE 3ème CYCLE

Biologie et Physiologie Végétales

par

GUEDIRA IDRISSE-AYDI Mouna

ORGANOGENESE ET EMBRYOGENESE SOMATIQUE DIRECTE A PARTIR DE PIÈCES FLORALES DE *CICHORIUM* (ASTERACEAE) CULTIVEES *IN VITRO*

Soutenue le 6 Octobre 1988 devant la Commission d'Examen

M.	R.	BOURIQUET	USTL Flandres Artois	Président
M.	J.	DUBOIS	USTL Flandres Artois	Rapporteur
M.	J.	VASSEUR	USTL Flandres Artois	Examineur

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE II : HISTORIQUE.....	3
1 - L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE.....	4
1.1. - Origine des embryons somatiques.....	5
1.2. - Etude des facteurs qui contrôlent l'embryogenèse somatique <i>in vitro</i>	7
1.2.1. - Rôle des composés azotés.....	7
1.2.1.1. - Rôle de l'azote minérale chez le <i>Daucus carota</i>	7
1.2.1.2. - Rôle de l'azote organique chez le <i>Daucus carota</i>	10
1.2.1.3. - Apport de l'azote chez d'autres espèces.....	11
1.2.2. - Rôle des régulateurs de croissance.....	11
1.2.2.1. - Chez <i>Daucus carota</i>	13
1.2.2.2. - Chez d'autres espèces.....	14
1.2.3. - Rôle des conditions de culture de la plante mère.....	18
1.2.4. - Rôle de la nature et du stade de développe- ment de l'explantat.....	18
2 - LA SPOROGENESE ET LA GAMETOGENESE MALE CHEZ <i>CICHORIUM</i> <i>INTYBUS</i> L.....	20
2.1. - La microsporogénèse.....	20
2.2. - La microgamétogénèse.....	21
CHAPITRE III - MATERIEL ET METHODES.....	23
1 - MATERIEL VEGETAL.....	24
1.1. - Etude botanique.....	24
1.2. - Matériel biologique utilisé.....	25

	<u>Page</u>
2 - CULTURE <i>IN VITRO</i> D'ANTHERES ET DE STYLES.....	26
2.1. - Désinfection des inflorescences.....	26
2.2. - Prélèvement des anthères et des styles.....	27
2.3. - Ensemencement des anthères et des styles.....	27
2.4. - Conditions de culture.....	29
3 - COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE.....	30
3.1. - Composition des milieux inducteurs de cals.....	30
3.2. - Composition des milieux inducteurs de bourgeons.....	32
3.3. - Composition du milieu de développement des bourgeons.	33
3.4. - Composition des milieux inducteurs de proembryons....	34
3.5. - Composition des milieux de différenciation des embryons somatiques.....	36
3.5.1. - Premiers milieux de transfert.....	36
3.5.2. - Deuxième milieu de transfert.....	37
4 - EXPRESSION DES RESULTATS.....	37
4.1 - Evaluation de la croissance.....	37
4.2. - Evaluation du bourgeonnement.....	38
4.3. - Evaluation de l'embryogenèse.....	38
5 - CULTURE <i>IN VITRO</i> DE FRAGMENTS DE FEUILLES ET DE TIGES.....	39
5.1. - Désinfection du matériel et prélèvement des explants.	39
5.2. - Ensemencement et conditions de culture.....	39
5.3. - Composition des milieux de culture.....	40
6 - TECHNIQUES CYTOLOGIQUES.....	42
6.1. - Dénombrement des chromosomes.....	42
6.2. - Observation des différents stades de la microsporo- génèse et de la microgamétogénèse.....	44
6.3.- Détermination de l'origine des embryons somatiques....	44

	<u>Page</u>
CHAPITRE IV : RESULTATS.....	46
1 - PROLIFERATION ET ORGANOGENESE DES ANTHERES CULTIVEES <i>IN VITRO</i>	47
1.1. - Recherche d'un critère morphologique.....	47
1.2. - Prolifération et callogenèse des anthères.....	50
1.2.1. - Anthères prélevées sur les hybrides '474' et 'Zoom'.....	52
1.2.2. - Anthères prélevées sur l'hybride '448'.....	54
1.3. - Organogénèse des cals d'anthères.....	54
1.3.1. - Induction de bourgeons sur les cals d'anthères de l'hybride '474'.....	56
1.3.2. - Induction de bourgeons sur les cals d'anthères de l'hybride '448'.....	59
1.3.2.1. - Obtention d'un variant somaclonal thermosensible à étamines avor- tées.....	61
1.3.2.2. - Multiplication du variant soma- clonal thermosensible à étamines avortées.....	64
1.3.3. - Induction de bourgeons sur les cals d'anthères de l'hybride 'Zoom'.....	66
2 - EMBRYOGENESE SOMATIQUE DES ANTHERES ET DES STYLES CULTIVES <i>IN VITRO</i>	67
2.1. - Etude des facteurs intervenant dans l'induction des embryons somatiques.....	67
2.1.1. - Importance du génotype dans l'obtention des embryons somatiques.....	68
2.1.2. - Rôle du stade de développement et de la na- ture de l'explant ensemencé.....	70
2.1.3. - Influence de la date de prélèvement des an- thères et des styles.....	72
2.1.4. - Conditions d'induction.....	73
2.1.4.1. - Rôle de la température.....	73
2.1.4.2. - Influence de la durée de la phase d'induction.....	75

	<u>Page</u>
2.1.5. - Influence de la composition du milieu de culture.....	76
2.1.5.1. - Les régulateurs de croissance...	78
2.1.5.2. - Apport de l'azote.....	80
2.1.5.3. - Le saccharose.....	85
2.1.6. - Influence d'un prétraitement des inflorescences par le froid.....	87
2.2. - Origine des embryons somatiques.....	87
2.2.1. - Proembryons induits à partir des anthères..	87
2.2.2. - Proembryons induits à partir des styles....	89
2.3. - Développement des embryons.....	90
2.3.1. - Structure des embryons au moment du transfert.....	90
2.3.2. - Influence de la composition du milieu de développement sur l'évolution des embryoides.....	106
2.3.3. - Influence de la composition du milieu d'induction sur le développement des embryoides.....	107
2.3.4. - Passage en serre et conformité des plantes obtenues.....	108
CHAPITRE V : DISCUSSION ET CONCLUSION.....	109
1 - CALLOGENESE ET ORGANOGENESE.....	110
2 - EMBRYOGENESE SOMATIQUE DIRECTE.....	111
CHAPITRE VI : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	120

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Physiologie végétale de l'Université de Lille I. Je remercie Monsieur le Professeur R. BOURIQUET de son accueil, de sa bienveillance à mon égard et d'être le Président du Jury.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Monsieur J. DUBOIS, qui m'a initié à la recherche scientifique et qui a souvent eu la patience de m'écouter et de me conseiller. Je suis sensible à l'honneur qu'il me fait en examinant cette thèse en qualité de Rapporteur.

Que Madame T. DUBOIS, veuille croire en ma sincère reconnaissance pour les conseils précieux et l'aide continuelle qu'elle m'a prodigués tout au long de ces années.

Je remercie vivement Monsieur J. VASSEUR qui a bien voulu faire partie de mon Jury et a accepté de juger ce mémoire.

J'adresse de très vifs remerciements à Monsieur M. BANNEROT de nous avoir fourni des hybrides de *Cichorium* issus de programme de sélection conduit à l'INRA de Versailles qui ont servis à la réalisation de ce travail.

Je remercie aussi les Ets DESPREZ qui nous ont fourni des Chicorées à café.

Que toutes les personnes du laboratoire qui, de près ou de loin, m'ont aidée au cours de cette étude, soient vivement remerciées pour leur amitié et leur sympathie.

Je ne saurais oublier mes parents, mon mari, mes frères et soeurs qui m'ont permis de réaliser cette thèse et m'ont soutenue tout au long de ces années. Qu'ils soient assurés de mon affection par la présentation de ce mémoire.

ABREVIATIONS

ABA	: Acide abscissique
AG3	: Acide gibbérellique
AIA	: acide indole-3-acétique
AIB	: acide indole-3-butyrique
ANA	: acide naphthalène acétique
BAP	: 6-benzylaminopurine
Gln	: glutamine
MEB	: microscopie électronique à balayage
P.E.	: proembryon somatique
2-iP	: 6-diméthylallylaminopurine
2,4-D	: acide 2,4-dichlorophenoxyacétique

INTRODUCTION

Les tissus de *Cichorium* sont connus pour leurs remarquables propriétés organogènes. Depuis longtemps on a signalé la néoformation de racines et de bourgeons à partir d'explants provenant de racines (GAUTHERET, 1941 ; MARGARA et RANCILLAC, 1966 ; LEFEBVRE, 1976), de hampes florales (BOURIQUET et VASSEUR, 1973) ou de feuilles (BESEMER *et al.*, 1969 ; VASSEUR, 1979). Plus récemment des plantes ont été régénérées à partir de protoplastes foliaires (BINDING *et al.*, 1981 ; CREPY *et al.*, 1982 ; SAKSI *et al.*, 1986), de colonies tissulaires et de suspensions cellulaires (DUBOIS *et al.*, 1988). Par contre peu de travaux se rapportent à l'embryogenèse somatique chez le genre *Cichorium*. VASIL *et al.* (1964) puis VASIL et HILDEBRANDT (1966) l'ont observé pour la première fois chez *Cichorium endivia* L. sans aboutir toutefois à régénérer des plantes. Chez *Cichorium intybus* L. HEIRWEGH *et al.* (1985) ont obtenu des embryoides suivi de leur développement en plantes. Cependant dans les deux cas il s'agissait d'embryogenèse somatique indirecte faisant appel à une callogénèse plus ou moins importante.

Notre travail après avoir permis la néoformation de plantes par simple organogénèse à partir de cals d'anthers de plusieurs hybrides de *Cichorium*, décrit l'embryogenèse somatique directe sur des anthers et des styles prélevés dans de jeunes inflorescences d'une Chicorée hybride.

HISTORIQUE

1 - L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE

La démonstration la plus spectaculaire de la persistance de toutes les informations génétiques dans les cellules des plantes supérieures, à savoir la totipotence (hypothèse formulée en 1902 par HABERLANDT), est la régénération de plantes entières à partir d'embryons induits à partir de culture de cellules somatiques. Ces embryons évoluent en passant par une succession de stades proches de ceux de l'embryogenèse zygotique. D'abord globulaire, l'embryon devient cordiforme avec l'initiation des cotylédons puis l'hypocotyle s'allongeant il acquiert une forme torpille.

Ce phénomène d'embryogenèse somatique a été observé pour la première fois chez *Daucus carota* dans des cultures de cals cultivés sur un milieu semi solide. (REINERT, 1959) et dans des suspensions cellulaires (STEWART *et al.*, 1958). Ces chercheurs avaient rapporté que la régénération de la plante entière commence par le développement de tissus vasculaires à l'intérieur des amas cellulaires de la suspension, suivi par la formation de méristème racinaire. L'initiation des cotylédons a lieu au pôle opposé à l'apex racinaire après transfert sur un milieu gélosé semi solide.

Les observations faites sur *Daucus carota* ont été étendues à plus de 100 espèces appartenant à 35 familles (TISSERAT *et al.*, 1979 ; WILLIAMS et-MAHESWARAN, 1986) parmi lesquelles les Apiacées, les Renonculacées (DORION *et al.*, 1984), les Rutacées (ESAN, 1973) et les Solanacées semblent montrer le plus d'aptitude.

1.1. - Origine des embryons somatiques

Les embryons somatiques peuvent apparaître selon deux modalités : soit directement à partir de cellules d'une structure organisée tel qu'un segment de tige ou un embryon zygotique, soit indirectement après formation d'un cal. Dans ces deux cas, l'origine de ces néoformations bipolaires qui n'établissent pas de connections vasculaires avec le tissu maternel a été étudiée.

Il a été souligné que dans les cultures de tissus de Carotte, les embryoides se forment à partir d'une cellule de la surface des cals qui se divise selon un processus à peu près comparable à celui observé dans le cas de l'embryogenèse zygotique (REINERT, 1959). Ce concept a été renforcé par la présence au sein d'une même culture de structures embryonnaires à différents stades de leur développement (HALPERIN et WETHERELL, 1964 ; STEWART, 1970).

Les observations de KONAR *et al.* en 1972 vont dans ce même sens. En effet ces chercheurs avaient rapporté que dans des cultures de cal de *Ranunculus scellaratus* la majorité des embryoides formés prennent naissance à partir de cellules uniques localisées à la surface des cals.

Les travaux de STEWARD *et al.* (1966), sur des suspensions cellulaires de Carotte renfermant des cellules isolées et des agrégats cellulaires ont montré que les cellules isolées de la suspension se développent directement par segmentation et sans formation de cal en embryoides qui, en passant par les différents stades du développement embryonnaire, aboutissent à la régénération de plantes entières. De plus il a été supposé que l'isolement des cellules dans la suspension est une condition nécessaire pour l'embryogenèse.

Plus tard en 1970, BACKS-HUSEMANN et REINERT, démontrent la validité des conclusions de STEWARD *et al.*, et obtiennent un embryon à partir d'une cellule unique. Mais cette cellule avant de donner un embryon, s'est divisée pour donner un cal et c'est à partir de ce cal qu'un ou plusieurs embryons ont été initiés.

Depuis, l'origine unicellulaire des embryons somatiques a été mise en évidence chez de nombreuses plantes comme *Atropa belladonna* (KONAR *et al.*, 1972 a), *Citrus sinensis* (VARDI *et al.*, 1975), *Antirrhinum majus* (PRAT et POIRIER-HAMON, 1975), *Saccharum officinarum* (HO et VASIL, 1983) et récemment chez de nombreuses espèces du genre *Trifolium* (PEDERSON, 1986), etc...

Les cellules aux potentialités embryogènes et qui sont à l'origine des embryons somatiques, présentent des caractères cytologiques particuliers, qui les rendent facilement reconnaissables, quelles que soient la nature de l'explant à l'origine du cal qui les forme et l'espèce étudiée. Ces cellules aux parois épaisses sont de petites cellules méristématiques, ayant un cytoplasme dense et riche en ARN, un noyau sphérique central volumineux avec un seul nucléole important et très colorable ; peu vacuolisées, elles renferment de l'amidon (JONES, 1974 ; Mc WILLIAM *et al.*, 1974 ; HO et VASIL, 1983). Ces cellules embryogènes se divisent selon un plan de recloisonnement polarisé et les cellules-filles issues de ces premiers recloisonnements conservent les caractéristiques cytologiques de la cellule embryogène mère et restent à l'intérieur de sa paroi (MICHAUX-FERRIERE *et al.*, 1987).

1.2. - Etude des facteurs qui contrôlent l'embryogenèse somatique *in vitro*

Les facteurs qui favorisent l'expression des potentialités embryogènes des cellules, commencent à être connus. Les substances de croissance et la source azotée des milieux de culture en sont deux éléments essentiels. De plus, le stade de développement et la nature de l'explantat jouent un rôle important.

1.2.1. - Rôle des composés azotés

De nombreuses études ont souligné que l'embryogenèse somatique dépendait de la nutrition azotée. Les premiers travaux ont porté sur la Carotte sauvage, plante qui a été le plus étudiée.

1.2.1.1. - Rôle de l'azote minéral chez le *Daucus carota*

Ce sont HALPERIN *et al.*, en 1965 et REINERT *et al.*, en 1967, qui ont soulevé le problème de la nature de la source azotée nécessaire à l'initiation de l'embryogenèse et à son déroulement. Mais leurs résultats sont contradictoires.

La nécessité de l'ammonium pour l'initiation de l'embryogenèse somatique a été rapportée en 1965 par HALPERIN *et al.* Ces chercheurs avaient constaté que les cals de phloème de racines de Carotte sauvage qui ont proliféré en présence de 60 mM de nitrate de potassium comme seule source azotée, ne sont pas embryogènes, même après leur transfert sur un milieu qui normalement permet l'embryogenèse. L'addition de 5 mM d'ammonium au milieu de culture initial permet l'embryogenèse.

Ces chercheurs avaient également travaillé sur des cals de pétioles de Carotte et constaté que ces tissus répondent de la même façon que les cals issus de racines. Cependant la dépendance de l'embryogenèse vis-à-vis de l'ammonium disparaît, si on ajoute $0,5 \text{ mg. l}^{-1}$ de kinétine au milieu de culture.

REINERT *et al.* (1967,) après des études détaillées sur la nutrition azotée des tissus de Carotte, présentent des résultats qui en réfutant ceux d'HALPERIN *et al.* (1965) montrent que l'embryogenèse *in vitro* de la Carotte peut se produire non seulement en présence d'ammonium, mais aussi avec du nitrate comme seule source d'azote, estimant que c'est la quantité globale d'azote introduite dans le milieu qui est déterminante pour l'embryogenèse et non la forme sous laquelle cet élément nutritif est fourni.

En effet, ces chercheurs en utilisant le milieu de WHITE (1943) qui ne renferme que 3,2 mM d'azote sous forme de nitrate de potassium et de nitrate de calcium, n'observaient pas de phénomènes d'embryogenèse. Cependant quand la quantité d'azote de ce milieu est augmentée par l'addition de 13,8, 20,6 ou 41,2 mM de nitrate de potassium, ou encore 20,6 mM de nitrate d'ammonium, les cultures deviennent embryogènes, et le pourcentage de cultures produisant des embryons varie entre 10 % et 49 % (Tableau 1).

Milieu	MW	MW + NH_4NO_3	MW + KNO_3	MW + KNO_3	MW + KNO_3
Concentration d'azote en mM	3.2	44.4	44.4	23.8	17.0
Pourcentage de cul- tures produisant des embryons après 16 semaines de culture	0	49 %	40 %	10 %	10 %

Tableau 1 : Influence de la nature et de la concentration de l'azote du milieu de culture sur l'embryogenèse somatique des tissus de Carotte. D'après REINERT *et al.* (1967).

MW : milieu de WHITE

L'importance de la quantité globale d'azote pour l'embryogenèse a été également observée avec le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962). En effet la réduction de la quantité d'azote dans ce milieu de 60 mM à 1.5 mM entraîne la disparition de la capacité embryogène des cellules de Carotte. Cependant l'action positive des deux formes d'azote, nitrate et ammonium, peut être due aux ions accompagnateurs K^+ et NH_4^+ . REINERT *et al.* (1967) montrent que l'action positive du K^+ est évidente pour les faibles concentrations de KNO_3 , mais que le K^+ n'a plus d'action quand on augmente les quantités en nitrate de potassium. Selon ces auteurs l'effet stimulateur de ces cations pourrait être dû à la perméabilité des cellules de Carotte aux deux cations ou aux activités des enzymes impliquées dans la conversion de l'azote *in vivo* ou les deux en même temps.

WETHERELL et DOUGALL en 1976, puis KAMADA et HARADA en 1979 étudient à leur tour les besoins en azote pour ce type de morphogenèse et concluent que la présence de composés azotés réduits dans le milieu de culture est importante pour l'embryogenèse somatique des tissus de Carotte. Ainsi, bien que le nitrate de potassium utilisé (en quantité importante) comme seule source azotée induit la formation d'embryons somatiques, la présence simultanée de composés azotés réduits permet une embryogenèse nettement meilleure. Parmi les composés azotés réduits testés, le nitrate d'ammonium et le chlorure d'ammonium se sont révélés très efficaces contrairement au sulfate d'ammonium.

Avec des explantats d'hypocotyle, l'effet stimulant du chlorure d'ammonium n'est observé qu'en présence du nitrate de potassium (KAMADA et HARADA, 1979). L'addition de seulement 0,1 mM de chlorure d'ammonium à un milieu renfermant du

KNO_3 comme source d'azote, est suffisante pour induire l'embryogenèse (WETHERELL et DOUGALL, 1976).

KATO et TAKEUCHI en 1966, puis KAMADA et HARADA en 1979 rapportent que la présence d'azote réduit dans le milieu n'est pas un besoin strict pour l'induction de l'embryogenèse somatique, mais celui-ci est nécessaire pour le développement des embryons.

1.2.1.2. - Rôle de l'azote organique chez le *Daucus carota*

L'action de différents acides aminés sur l'embryogenèse somatique des suspensions cellulaires de Carotte a été également examinée. REINERT *et al.*, (1967) rapportent que l'addition de 41.2 mM d'azote organique (acide glutamique ou un mélange d'acides aminés) au milieu de WHITE - milieu pauvre en azote et donc ne permettant pas l'embryogenèse -, permet la formation d'embryons somatiques. Ceci confirme les conclusions de REINERT *et al.*, (1967) à savoir : il n'y a pas de différence qualitative entre la capacité de l'azote réduit et celle de l'azote oxydé quand à l'induction de l'embryogenèse somatique chez la Carotte, mais c'est plutôt la quantité globale de l'azote qui est déterminante.

KAMADA et HARADA, (1979) indiquent que lorsque le milieu de culture contient du nitrate de potassium (20 mM) comme principale source azotée, l'addition de 5 à 10 mM d' alanine stimule puissamment l'embryogenèse somatique. En effet cet acide aminé accélère les divisions cellulaires durant les premiers stades de l'embryogenèse et augmente le nombre d'embryons par amas cellulaires. La

glutamine, l'asparagine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'arginine et la proline sont aussi très efficaces. La lysine, la valine, l'histidine, la leucine et la méthionine n'ont aucun effet.

Cependant, en absence du nitrate, l'effet stimulant de l' α alanine et de la glutamine n'est observé qu'à des concentrations élevées (entre 10 et 30 mM), celui de l'arginine, l'asparagine, l'acide aspartique et la proline disparaît.

1.2.1.3. - Apport de l'azote chez d'autres espèces

La dépendance de l'embryogenèse somatique vis-à-vis de la source azotée n'a pas été aussi bien étudiée chez les autres plantes. Les chercheurs emploient dans la majorité des cas un milieu riche en azote comme celui de MURASHIGE et SKOOG. Si le milieu choisi est pauvre en azote, il doit être modifié.

Le tableau 2 cite quelques exemples de milieux utilisés, et les modifications apportées concernant la source azotée, pour différentes espèces chez lesquelles l'embryogenèse somatique a été observée.

1.2.2. - Rôle des régulateurs de croissance

Parmi les régulateurs de croissance utilisés, il a été montré que les auxines jouent un rôle très important dans l'induction des cals embryogènes. La concentration et la nature de la molécule auxinique varient selon les espèces et les variétés considérées.

Espece	Milieux de bases utilises	Modifications apportees	References
<i>Saccharum officinarum</i>	MURASHIGE et SKOOG	Neant	HO <u>et al.</u> (1983)
<i>Pennisetum americanum</i>	"	"	BOTTI <u>et al.</u> (1984) VASIL <u>et al.</u> (1982)
<i>Cocos nucifera</i>	"	"	GUPTA <u>et al.</u> (1984)
<i>Festuca rubra</i>	"	"	TORELLO <u>et al.</u> (1984)
<i>Hordeum vulgare</i>	"	"	THOMAS <u>et al.</u> (1985)
<i>Cichorium intybus</i>	"	"	HEIRWEGH <u>et al.</u> (1985)
<i>Secale cereale</i>	"	"	LINACERO <u>et al.</u> (1986)
<i>Solanum carolinense</i>	"	"	REYNOLDS, 1986
<i>Ranunculus sceleratus</i>	WHITE	addition de 400 mg.l ⁻¹ de Ca (No ₃) ₂ et 100 mg.l ⁻¹ de glutamine.	DORION <u>et al.</u> (1984)
<i>Juglans regia</i>	DRIVER et KUNUYUKI	addition de 250 mg.l ⁻¹ de glutamine	TULECHE <u>et al.</u> (1985) B
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	B ₅ de GAMBORG <u>et al.</u> (1968)	remplacement de (NH ₄) ₂ SO ₄ par NH ₄ NO ₃ a 400 mg.l ⁻¹ diminution de KNO ₃ de 20 % addition de 292 mg.l ⁻¹ de glutamine.	McHUGHEN <u>et al.</u> (1984)
<i>Vitis vinifera</i>	MURASHIGE et SKOOG	Addition de : a) 10 mg.l ⁻¹ de phenylalanine + 1 mg.l ⁻¹ d'adenine ou b) 100 mg.l ⁻¹ de glutamine + 1 mg.l ⁻¹ d'adenine ou c) 100 mg.l ⁻¹ de glutamine + 1 mg.l ⁻¹ d'adenine + 10 mg.l ⁻¹ de phenylalanine	MAURO <u>et al.</u> (1986)

Tableau 2 : Quelques exemples de milieux utilises et des modifications apportees concernant la source azotee pour differentes especes chez lesquelles l'embryogenese somatique a ete observee.

1.2.2.1. - Chez *Daucus carota*

HALPERIN (1966) puis HALPERIN *et al.* (1967) rapportent que dans les suspensions cellulaires de Carotte, le devenir des amas cellulaires dépend essentiellement de la présence ou de l'absence du 2,4-D dans le milieu de culture. En présence du 2,4-D (0.1 à 10 mg. l⁻¹), les amas cellulaires prolifèrent activement et subissent ensuite des fragmentations. Les nombreux petits amas libérés dans le milieu effectuent à leur tour plusieurs cycles de croissance et se fragmentent. Si ce matériel est transféré dans un milieu sans 2,4-D ou renfermant une quantité inférieure à 0.01 mg. l⁻¹, il s'ensuit un développement d'embryons somatiques.

KATO et TAKEUCHI (1966) en travaillant sur des segments d'hypocotyle de Carotte montrent que le 2,4-D joue un rôle clé dans l'induction de l'embryogenèse. En effet, ces chercheurs avaient constaté en éprouvant plusieurs concentrations de cette substance de croissance (0.001 ; 0.01 ; 0.1 ; 1 ; 10 mg. l⁻¹), que les segments d'hypocotyles cultivés en présence de faibles concentrations de 2,4-D (0.001 ; 0.01 mg.l⁻¹) ne produisaient pas de proembryons globulaires. Ils ont suggéré alors qu'une certaine quantité de ce régulateur de croissance doit être obligatoirement additionnée au milieu de culture initial pour que les segments d'hypocotyle produisent des proembryons globulaires. 1 mg. l⁻¹ s'est montré la concentration la plus efficace, viennent après 10 mg. l⁻¹ puis 0.1 mg. l⁻¹. Le transfert de ces structures globulaires sur un milieu à faible concentration en 2,4-D (0.01 mg. l⁻¹) est obligatoire pour leur développement ultérieur.

Les recherches de FUJIMURA *et al.* (1975) vont dans le même sens. En effet en utilisant des segments d'hypocotyle de Carotte, ces chercheurs n'obtenaient le développement des structures globulaires initiées en présence du 2,4-D au niveau des

amas cellulaires de leur suspension qu'après transfert de ces amas dans un milieu sans 2,4-D ou renfermant une très faible concentration. Le transfert des cultures sur un milieu renfermant cette substance de croissance ($> 0.2 \text{ mg. l}^{-1}$) ou de l'AIA ($> 0.01 \text{ mg. l}^{-1}$) entraîne l'inhibition du développement des proembryons.

Ces chercheurs ont également étudié l'action de plusieurs cytokinines sur l'induction des proembryons, ils mentionnent que, contrairement à la BAP et à la kinétine, la zéatine utilisée à une concentration de 0.02 mg. l^{-1} stimule la formation des embryons. Ceci pourrait être dû au fait que la zéatine est une hormone naturelle, alors que les deux autres sont des substances de synthèse. Les combinaisons zéatine 2,4-D ou encore zéatine AIA se sont montrées inhibitrices.

L'effet de l'ABA et de l'AG₃ a également été testé. Ces deux hormones inhibent le développement des embryons, mais uniquement après le stade cordiforme.

1.2.2.2. - Chez d'autres espèces

Chez les espèces appartenant à la classe des Monocotyledones, l'importance des régulateurs de croissance et notamment celle de l'auxine a été signalée.

Chez le *Saccharum officinarum*, le 2,4-D (0.50 à 3.00 mg. l^{-1}) est le régulateur de croissance le plus efficace pour l'induction de cals embryogènes, sa réduction (0.25 à 0.50 mg. l^{-1}) dans le milieu de transfert permet le développement des embryons (HO *et al.*, 1983).

Les cytokinines exercent un effet inhibiteur. Cependant après la formation des proembryons, ces hormones favorisent l'initiation de multiples méristèmes apicaux et favorisent la germination (HO *et al.*, 1983).

Pour *Echinochloa muricata* et *Echinochloa crus-galli* var. *Oryzicola*, l'induction des cals embryogènes est réalisée sur un milieu renfermant 5 à 10 mg. l⁻¹ de 2,4-D et 2 mg. l⁻¹ de BAP ; le développement des embryons est obtenu en supprimant la BAP et en réduisant le 2,4-D à 1 à 5 mg. l⁻¹ (GREG COBB *et al.*, 1958).

Chez *Hordeum vulgare*, il faut 2.5 mg. l⁻¹ de 2,4-D pour induire l'embryogenèse, la régénération est meilleure sur un milieu sans hormones ou contenant uniquement de l'ABA (THOMAS *et al.*, 1985).

Pour les Dicotylédones, le tableau 3 résume la nature et la concentration des régulateurs de croissance utilisés pour l'induction de l'embryogenèse somatique chez quelques espèces.

A côté de ces hormones exogènes, il faut signaler l'importance du contenu endogène des cultures en régulateurs de croissance dans l'embryogenèse somatique.

EPSTEIN *et al.* (1977) ont montré dans le cas de cultures anergiées de *Citrus sinensis* 'Shamouti' que les cals embryogènes sont capables de complexer l'AIA sous forme d'AIA aspartate ; le contenu en auxine endogène est alors maintenu à un niveau compatible avec l'embryogenèse ; les cals non embryogènes ne possèdent pas cette capacité physiologique. Dans ces cultures, l'AIA se trouverait à un niveau supra-

Espèces	Nature et concentration des régulateurs de croissance	Référence
<i>Cichorium intybus</i>	2,4-D : 0.02 mg. l ⁻¹ BAP : 0.26 mg. l ⁻¹ ou 2,4-D : 0.20 mg. l ⁻¹ BAP : 0.26 mg. l ⁻¹	HEIRWEGH <i>et al.</i> , 1985
<i>Juglans regia</i>	BAP : 1.00 mg. l ⁻¹ + AIB : 0.01 mg. l ⁻¹ + kinétine : 2.00 mg. l ⁻¹	TULECKE <i>et al.</i> , 1985
<i>Medicago sativa</i>	2,4-D : 22.00 mg. l ⁻¹ + kinétine : 1.00 mg. l ⁻¹	NOVAK <i>et al.</i> , 1982
<i>Trifolium vesiculosum</i> et <i>Trifolium repens</i>	2,4-D : 1.25 mg. l ⁻¹ + ANA : 0.50 mg. l ⁻¹ + kinétine : 0.50 mg. l ⁻¹	PEDERSON, 1986

Tableau 3 : Nature et concentration des régulateurs de croissance utilisés pour l'induction de l'embryogenèse somatique chez quelques espèces appartenant à la classe des Dicotylédones.

optimal et donc probablement inhibiteur. D'autre part, les souches embryogènes possèdent plus de peroxydases que les lignées non embryogènes, ce qui semblerait indiquer l'existence d'un système de dégradation de l'auxine plus efficace (KOCHBA *et al.* (1977). Enfin, TISSERAT et MURASHIGE (1977) ont trouvé que l'auxine est une des composantes du complexe répresseur de l'embryogenèse nucellaire mis en évidence dans les variétés monoembryonnées de *Citrus* (ne produisant pas naturellement d'embryons nucellaires).

Dans le cas de *Beta vulgaris* KEVERS *et al.* (1981) ont aussi montré que les cals anergisés organogènes contiennent plus de peroxydases que les souches non organogènes.

DORION *et al.* (1983) ont travaillé sur des protoplastes foliaires de *Ranunculus sceleratus* Ils ont obtenu de nombreuses souches d'origine unicellulaire qui présentaient des aptitudes variables quant à l'embryogenèse. Ils ont supposé que le comportement particulier de chaque souche vis-à-vis de l'organogenèse pourrait être mise en relation avec le contenu endogène soit en auxines, soit plus généralement en régulateurs de croissance. Chacune des souches obtenues à partir d'un protoplaste, possède sa propre capacité de synthèse, de transport, de dégradation, de protection ou de complexation des hormones, ceci déterminerait son aptitude à la régénération. Ainsi, les souches régénérantes avec plantules auraient le niveau d'auxine le plus proche de l'optimum, alors que les souches seulement induites, conservant des embryons stabilisés au stade globulaire, auraient un contenu endogène supra-optimal.

1.2.3. - Rôle des conditions de culture de la plante mère

L'influence des conditions de l'environnement des plantes mères (température, photopériode, intensité lumineuse) sur l'obtention des embryons somatiques, a été rarement étudiée. DORION *et al.*, (1983), en décrivant l'embryogenèse somatique à partir de protoplastes foliaires de *Ranunculus sceleratus*, retiennent l'effet favorable de l'ombrage, associé à un éclairage d'appoint, pour la libération de protoplastes viables.

1.2.4. - Rôle de la nature et du stade de développement de l'explantat.

L'aptitude à produire des embryons somatiques a été manifestée par différents organes et tissus cultivés *in vitro*. Cependant la nature des organes et tissus utilisés comme source d'explantat dépend étroitement de l'espèce considérée (TISSERAT *et al.*, 1979).

Le stade de développement de l'explantat utilisé joue un rôle très important. Les cellules de fragments d'organes jeunes possèdent souvent la plus grande aptitude à former des embryons somatiques. Ce sont par exemple des embryons zygotiques immatures chez *Pisum sativum* (KYESELY *et al.*, 1897), *Trifolium repens* (MAHESWARAN et WILLIAMS, 1985, 1986, 1987), *Pennisetum americanum* (BOTTEI et VASIL, 1984, VASIL et VASIL, 1982), et *Lolium multiflorum* (DALE, 1980; DALE *et al.*, 1981), des fragments de feuilles immatures chez *Saccharum officinarum* (HO et VASIL, 1983), *Secale cereale* (LINACERO et VAZQUEZ, 1986), *Coffea canephora* (PIERSON *et al.*, 1983), et *Dactylis glomerata* (GRAY *et al.*, 1984).

L'embryogenèse somatique a également été obtenue à partir de segments de tiges chez *Solanum carolinense* (REYNOLDS, 1986) ; d'anthers chez *Vitis vinifera* (MAURO *et al.* 1986) et *Dactylis glomerata* (SONGSTAD et CONGER, 1986) ; de fragments de racines chez *Atropa belladonna* (KONAR *et al.* 1972 b).

Chez *Daucus carota*, l'explantat et le stade de développement de l'organe ou du tissu dont il provient ne sont pas déterminants pour l'embryogenèse somatique. En effet n'importe quelle partie de la plante prélevée à n'importe quel stade de développement est apte à donner des embryons somatiques ; les hypocotyles pour FUJIMURA *et al.* (1980) et CATTOIR-REYNAERTS *et al.* (1983), mais aussi les pétioles (FUJIMURA *et al.* 1975 ; DREW, 1979), les racines (ROSE *et al.* 1974 ; SUZICH *et al.* 1984) les embryons (RUBOS, 1985). Chez la Carotte sauvage, les explantats les plus utilisés sont les pétioles et les racines.

Chez le genre *Cichorium*, l'embryogenèse somatique a été obtenue à partir d'embryons zygotiques (VASIL et HILDEBRANDT, 1966), de fragments de racines (HEIRWEGH *et al.* 1985) et à l'issue de ce travail, à partir d'anthers et de styles. Le stade de développement de ces explants se traduit par le stade d'évolution des gametophytes mâles contenus dans les anthers.

Une étude détaillée de la chronologie de la microsporogénèse et de la microgamétogénèse chez le *Cichorium* paraît alors nécessaire.

2 - LA SPOROGENESE ET LA GAMETOGENESE MALE CHEZ *CICHORIUM INTYBUS* L.

Selon LOUANT et LONGLY (1981), un capitule de *Cichorium intybus* contient en moyenne 19 fleurs (16 à 22). Les ovaires infères sont uniloculaires. Les 5 étamines, soudées entre elles au niveau des anthères, forment un manchon enserrant un style bifide. Celui-ci s'ouvre après sa complète émergence du manchon d'anthères pour laisser apparaître les stigmates jusqu'alors accolés et donc vierges de pollen.

Le genre *Cichorium* est le seul parmi les Lactuceae (Cichorieae) chez lequel toutes les fleurs d'un même capitule se développent simultanément au cours des quelques 18 jours qui s'écoulent entre la méiose des microsporocytes et l'anthèse. Ces auteurs ont effectué une étude détaillée de la chronologie de la microsporogénèse et de la microgamétogénèse chez cette plante.

2.1. - La microsporogénèse

L'observation de la sporogénèse mâle débute lorsque les anthères contiennent une file de microsporocytes. Ces derniers sont généralement en interphase, rarement en prophase méiotique.

Le déroulement de la méiose dans les cellules mères de microspores se fait d'une façon assez rapide et, une fois la prophase I accomplie, il est fréquent de voir plusieurs phases de la méiose coexister dans un même capitule ; en effet sont rencontrés des stades allant de la métaphase I à la télophase I ou parfois même à la

métaphase II, et de la prophase II au stade de tétrades jeunes. Cependant, tous les microsporocytes d'une même fleur sont au même stade de développement.

2.2. - La microgamétogénèse

Lorsque la microsporogénèse est achevée et que les tétrades sont mûres, les microspores s'individualisent en se libérant de leur paroi callosique. Ici encore, parmi les fleurs d'un même capitule, certaines peuvent contenir des tétrades mûres tandis que, dans les autres, les microspores se libèrent déjà de leur paroi callosique.

Le gamétophyte mâle ainsi libéré s'entoure des premiers dépôts de l'exine puis se vacuolise. La vacuole unique prend des proportions très importantes et repousse cytoplasme et noyau à la périphérie. L'exine s'épaissit et la structure échinolophatée propre au pollen de l'espèce apparaît. Les cellules du tapis commencent à se désagréger.

La première mitose pollinique s'effectue ; celle-ci n'est pas simultanée dans toutes les microspores d'une même loge ; elle s'échelonne depuis le moment où s'est formée la vacuole jusqu'à ce que celle-ci disparaisse.

Cette mitose produit deux noyaux qui évoluent de façon distincte : le plus grand a une fonction végétative, le plus petit une fonction générative.

Parfois les premiers dépôts d'intine se laissent distinguer et au niveau des pores, trois protubérances cytoplasmiques font saillie vers l'extérieur ; plus tard, lors de la germination du grain de pollen sur le stigmate, l'une d'elles se développera et

constituera le tube pollinique. L'exine a atteint son épaisseur maximale et la désagrégation du tapis se poursuit.

Lorsque la vague des premières mitoses polliniques prend fin, la vacuole régresse et les protubérances cytoplasmiques débordent très nettement, l'intine se distingue alors parfaitement bien. Les cellules du tapis sont complètement disloquées et des lambeaux multinucléés se retrouvent parmi les grains de pollen en formation.

A un stade ultérieur de la microgamétogénèse, les grains de pollen se remplissent de substances de réserves. Une deuxième mitose pollinique pour le noyau génératif se produit par la suite. Elle aboutit à la formation de deux noyaux spermatiques qui se déplacent en directions opposées et s'allongent. Le noyau végétatif devient invisible.

Le développement des grains de pollen touche à sa fin. Les deux noyaux spermatiques se sont considérablement allongés ; ils deviennent filiformes et s'écartent de plus en plus l'un de l'autre. Le tapis est maintenant complètement digéré.

MATERIEL ET METHODES

1 - MATERIEL VEGETAL

1.1. - Etude botanique

Les Chicorées sont des plantes de la famille des Astéracées. Les botanistes les groupent en deux espèces :

- *Cichorium intybus* L.
- *Cichorium endivia* L.

Diverses variétés ont été sélectionnées à partir de ces deux espèces, les plus connues sont :

L'Endive frisée (*C. endivia* L., var. *Crispa*) et l'Endive (*C. endivia* L., var. *latifolia*) sélectionnées à partir de *Cichorium endivia* L.

La Chicorée de Bruxelles (*C. intybus* L., var. *Witloof*) et la Chicorée à café (*C. intybus* L., var. *Magdebourg*) sélectionnées à partir de *Cichorium intybus* L.

Par autofécondations successives, les sélectionneurs ont pu créer des lignées homozygotes à partir de la chicorée Witloof, puis par croisement entre lignées intercompatibles, ils ont obtenu de nombreux hybrides F₁ : 'Zoom' depuis une dizaine d'années, 'Flash', Bea et Toner plus récemment.

1.2. - Matériel biologique utilisé

La première difficulté pour aborder un tel travail est de disposer d'inflorescences pendant une grande partie de l'année. Les plantes de *Cichorium intybus* L. sont des bisannuelles, leur cycle de végétation comprend, la première année, une phase végétative correspondant à la production de racines tubérisées et de feuilles disposées en rosette et la seconde année, une phase reproductive aboutissant à la formation de semences.

Dans la pratique agricole, le cycle de végétation est interrompu à la fin de la première année par l'arrachage puis le "forçage" des racines afin d'obtenir des Endives ou chicons.

Des hybrides F₁, des plantes faisant partie de variétés déjà commercialisées et de lignées en cours de sélection ont été utilisées pour la réalisation de ce travail ; leurs inflorescences proviennent :

- de hampes florales développées à partir de racines préalablement vernalisées à 4° C et plantées en serre dans des conditions d'éclairement et de température permettant l'induction florale pour les deux hybrides F₁ 'Zoom' et 'Flash'.

- de plantes issues de bourgeons formés *in vitro* par organogenèse sur des cals d'anthers pour deux hybrides fournis en mai 1985 par M. BANNEROT (INRA, Versailles) en un seul exemplaire chacun. Ces deux hybrides sont connus sous les numéros '474' et '448' et proviennent des croisements suivants.

Hybrides	Croisements
'474'	<i>C. intybus</i> L., var. Magdebourg (Chicorée à café, mâle stérile) X <i>C. endivia</i> L., var. Latifolia (Chicorée scarole, cv. 'Catalane')
'448'	<i>C. intybus</i> L., var. Foliosum (cv. Pain de sucre) X <i>C. intybus</i> L. (Chioggia)

A côté de ces hybrides qui représentent le matériel végétal essentiel de notre travail, nous avons utilisé mais juste à titre d'essai des inflorescences issues :

- de chacun des parents de l'hybride F₁ 'Zoom'
- de *C. intybus* L., var. Magdebourg cv. n° 1 106.

2 - CULTURE *IN VITRO* D'ANTHERES ET DE STYLES

2.1. Désinfection des inflorescences

Juste après leur récolte sur la plante, ou après une conservation pouvant aller jusqu'à une semaine à 4° C, les inflorescences sont désinfectées par un passage de 1 à 2 minutes dans une solution de "Mercryl laurylé" LABAZ diluée de moitié, qui joue le rôle de bactéricide et d'agent mouillant, puis par

immersion pendant 20 min. dans une solution filtrée d'hypochlorite de calcium (210° chlorométrique), à 6 % suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérile.

2.2. Prélèvement des anthères et des styles

Chez le *Cichorium*, un capitule contient en moyenne 19 fleurs (16 à 22). les cinq étamines, soudées entre elles au niveau des anthères, forment un manchon enserrant un style bifide.

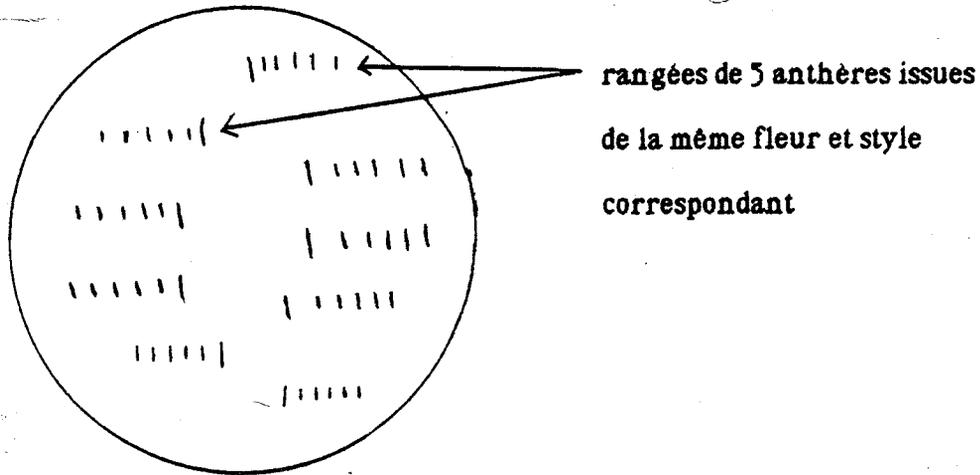
Afin d'éviter le dessèchement rapide des anthères et des styles lors de leur prélèvement, les capitules puis les fleurs qui en sont issues sont disséqués en conditions aseptiques sur un milieu fortement gélosé 14 g. l⁻¹ préalablement autoclavé et coulé dans des grandes boîtes de Petri (90 mm x 10 mm). Ce milieu de dissection ne renferme que du saccharose à une concentration de 20 g. l⁻¹.

Vu la très petite taille des anthères et des styles, leur prélèvement est effectué sous une loupe binoculaire (grossissant x 10) préalablement nettoyée à l'éthanol et maintenue sous une hotte à flux laminaire avant son utilisation

2.3. - Ensemencement des anthères et des styles

Les anthères et les styles ainsi prélevés sont immédiatement placés sur milieu nutritif solide en boîte de Petri (90 mm x 10 mm). Ces dernières sont ensuite scellés avec du Parafilm.

L'ensemencement est réalisé par rangées de 5 anthères issues de la même fleur, ceci permet de visualiser la réactivité des fleurs d'un même capitule. Chaque boîte de Petri renferme 30 à 40 anthères et les styles correspondants.



rangées de 5 anthères issues
de la même fleur et style
correspondant

Boîte de Petri montrant le mode d'ensemencement des anthères et des styles sur milieu solide.

Le stade de développement des anthères se traduit par le stade de développement des gamétophytes mâles qu'elles renferment. Ainsi pour repérer leur stade d'évolution, les gamétophytes mâles des anthères d'une fleur par capitule sont observés au microscope photonique avant la mise en culture des anthères des autres fleurs du même capitule. Cette observation microscopique est facilitée par une coloration au carmin acétique ferrique des anthères mises entre lame et lamelle.

2.4. - Conditions de culture

Les conditions de culture varient selon qu'on souhaite obtenir callogénèse ou embryogénèse somatique.

Pour l'induction de l'embryogénèse somatique, une foisensemencées, les boîtes de Petri sont placées dans une étuve à 35° C et à l'obscurité. Après 10 jours dans ces conditions inductrices, les anthères et les styles sont repiqués sur un deuxième milieu nutritif en boîtes de Petri et placés dans une pièce de culture thermostatée ($24 \pm 1^\circ \text{C}$ le jour et $20 \pm 1^\circ \text{C}$ la nuit) éclairée par des tubes fluorescents assurant une photopériode de : 18:6 h et une intensité d'éclairement de 3 W.m^{-2} environ.

D'autres conditions d'induction de proembryons ont été utilisées, soit en faisant varier le temps de contact des anthères et des styles avec le milieu inducteur, soit en faisant varier la température. Toutes ces variations seront données au chapitre Résultats.

Pour obtenir la callogénèse, les boîtes de Pétri sont placées dès leur ensemencement à l'obscurité ou à une photopériode de 18:6 h avec une température diurne de $24 \pm 1^\circ \text{C}$ et nocturne de $20 \pm 1^\circ \text{C}$. Cette phase obscure dure deux semaines, puis les cultures sont exposées à la lumière fournie par des tubes fluorescents "Lumière du jour de luxe", avec une intensité d'éclairement d'environ 3 W.m^{-2} .

Les embryons somatiques issus des anthères et des styles ainsi que les bourgeons prélevés sur les anthères callogènes sont repiqués sur un milieu de Heller (1953) sans hormone préalablement coulé dans des tubes en verre (22 x 160 mm). L'ensemble est ensuite placé dans une pièce de culture thermostatée ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ le jour et $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ la nuit) éclairée par des tubes fluorescents assurant une photopériode de : $12:\overline{12}$ h.

La dernière étape est le passage des plantules en miniserre sur un mélange terreau-perlite (60/40) puis leur transfert en serre sur terreau fertilisé.

3 - COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

3.1. - Composition des milieux inducteurs de cals

Le milieu de base que nous avons utilisé comprend les macroéléments de la solution de Murashige et Skoog (1962), du KCl et les microéléments de la solution de Heller. Sa composition détaillée est indiquée dans le tableau 4. Nous avons eu recours à 7 milieux différents l'un de l'autre par la nature et la concentration des régulateurs de croissance. Ceux que nous avons utilisés sont les suivants : ANA, BAP, 2iP ; les concentrations employées et les différentes combinaisons réalisées sont indiquées dans le tableau 5.

Dans certains essais, nous avons fait intervenir le lait de coco (80 ml. l^{-1}) ; celui-ci est ajouté aux milieux de culture après leur autoclavage. Il est alors filtré sur membrane d'ester de cellulose (Millipore) retenant les particules d'un diamètre supérieur à $0,45\mu\text{m}$.

Constituants	Concentrations en mg.l ⁻¹		
	Milieux inducteurs de cals	Milieux inducteurs de bourgeons	
		A, B, C	D
Macroéléments minéraux			
MgSO ₄ . 7H ₂ O	185	185	185
KH ₂ PO ₄	85	85	85
CaCl ₂ . 2H ₂ O	220	220	220
NH ₄ NO ₃	0	0	825
KNO ₃	0	316.6	950
KCl	750	750	0
Microéléments minéraux			
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1	1	1
H ₃ BO ₃	1	1	1
MnSO ₄ . H ₂ O	0.0758	0.758	0.758
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.03	0.03	0.03
Al Cl ₃	0.03	0.03	0.03
NiCl ₂ . 6H ₂ O	0.03	0.03	0.03
KI	0.01	0.01	0.01
Fe-EDTA	9.75	9.75	9.75
Vitamines			
acide nicotinique	1	0.25	1
panthothenate de calcium	1	0	1
pyridoxine	1	0.25	1
thiamine	1	0.05	1
biotine	0.01	0	0.01
inositol	100	100	100
Composés organiques			
glutamine	750	220	0
glycocolle	0	1	0
Saccharose	10 000	5 000	10 000
Gélose	5 000	5 000	5 000
	(Bacto Agar Difco)	(Agar biokar type E)	
Hormones	(voir tableau 5)	(voir tableau 6)	(voir tableau 6)

Tableau 4 : Composition des milieux de culture utilisés pour la prolifération des tissus des anthères et le bourgeonnement des cals obtenus

Milieux (numéros)	Régulateurs de croissance mg.l ⁻¹		
	ANA	BAP	2iP
1	0,02	0,1	-
2	0,02	0,25	-
3	0,1	0,1	-
4	0,1	0,5	-
5	0,02	-	0,5
6	0,1	-	0,5
7	0,5	0,5	-

Tableau 5 : Combinaisons et concentrations des régulateurs de croissance dans les sept milieux testés pour la callogenèse des tissus somatiques des anthères.

3.2. - Composition des milieux inducteurs de bourgeons

Après deux semaines sur les milieux "callogènes" les cals formés sont transférés en tubes sur des milieux destinés à induire le bourgeonnement. La composition de ces milieux notés A, B, C et D est indiquée dans le tableau 4.

Les combinaisons et concentrations hormonales sont données dans le tableau 6.

Milieux	Régulateurs de croissance en mg. l ⁻¹		
	ANA	BAP	2iP
-			
A	0,05	0,5	-
B	0,02	0,05	-
C	0,02	-	0,05
D	0,02	0,05	-

Tableau 6 : Combinaisons et concentrations des régulateurs de croissance dans les milieux testés pour le bourgeonnement des cals d'anthères

3.3. - Composition du milieu de développement des bourgeons

Lorsqu'ils atteignent une taille de 2 à 3 mm, les bourgeons sont séparés des cals et repiqués en tube à essais sur milieu de Heller (1953) dépourvu de substances de croissance. La composition de ce milieu est la suivante :

- Macroéléments minéraux :
 - CaCl₂. 2H₂O : 75 mg.l⁻¹
 - KCl : 750 mg.l⁻¹
 - MgSO₄.7H₂O : 250 mg.l⁻¹
 - NaH₂PO₄.H₂O : 125 mg.l⁻¹
 - NaNO₃ : 600 mg.l⁻¹

- **Microéléments minéraux**

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1 mg.l^{-1}
- H_3BO_3 : 1 mg.l^{-1}
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0,0758 mg.l^{-1}
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,03 mg.l^{-1}
- AlCl_3 : 0,03 mg.l^{-1}
- $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,03 mg.l^{-1}
- KI : 0,01 mg.l^{-1}
- Fe-EDTA : 19,5 mg.l^{-1}
- Saccharose : 10 g.l^{-1}
- Agar bactériologique : 5 g.l^{-1}

3.4 - Composition des milieux inducteurs de proembryons

Pour induire la formation de proembryons à partir des anthères et des styles, nous avons adopté un milieu inducteur que nous avons appelé milieu 17. Ce milieu comporte :

- Certains macroéléments de Murashige et Skoog :
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 185 mg.l^{-1}
 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 220 mg.l^{-1}
 - KH_2PO_4 : 85 mg.l^{-1}
 - NH_4NO_3 : 825 mg.l^{-1}
- Du KCl : 750 mg.l^{-1}

- Les microéléments de la solution de Heller :
 - $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 1 mg.l^{-1}
 - H_3BO_3 : 1 mg.l^{-1}
 - $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$: $0,0758 \text{ mg.l}^{-1}$
 - $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$: $0,03 \text{ mg.l}^{-1}$
 - AlCl_3 : $0,03 \text{ mg.l}^{-1}$
 - $\text{NiCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$: $0,03 \text{ mg.l}^{-1}$
 - KI : $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$
- Du Fe-EDTA : $19,5 \text{ mg.l}^{-1}$
- Des vitamines :
 - vitamine B₁ : 1 mg.l^{-1}
 - vitamine B₆ : 1 mg.l^{-1}
 - acide nicotinique : 1 mg.l^{-1}
 - panthothénate de calcium : 1 mg.l^{-1}
 - biotine : $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$
 - inositol : 100 mg.l^{-1}
- Du saccharose : 20 g.l^{-1}
- Des substances de croissance : ANA : $0,02 \text{ mg.l}^{-1}$, 2iP : $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$
- Le Bacto Agar Difco : 6 g.l^{-1}

Les substances de croissance sont ajoutées avant stérilisation des milieux de culture. Nous avons également expérimenté d'autres milieux qui diffèrent soit par la nature et la concentration des composés azotés (milieux 13, 14, 15, 16, 17 a, 17 b, 17 c, 17 d, 17 e, 17 f, 17 g, 17 h, 18, 19, 20, 21), soit par la concentration en saccharose (milieux 17 i, 17 j, 17 k, 17 l, 17 m), soit par la nature et la concentration des régulateurs de croissance (milieux 18, 18 a,

18 b, 18 c, 18 d, 18 e, 18 f, 18 g, 18 h, 18 i, 18 j, 18 k, 18 l, 18 m, 18 n, 18 o.).
Les compositions exactes de tous ces milieux seront données dans le chapitre
RESULTATS.

3.5 - Composition des milieux de différenciation des embryons somatiques

3.5.1 - Premiers milieux de transfert

Après un temps de contact avec le milieu inducteur, les anthères et les styles ont été transférés en boîtes de Petri sur différents milieux dont nous avons éprouvé l'influence sur la différenciation des embryons. Nous avons utilisé deux milieux de base auxquels nous avons additionné ou non des substances de croissance.

Le premier milieu renferme les éléments minéraux de la solution de Heller (1953), sa composition exacte est indiquée dans le paragraphe 3.3.

Le second milieu renferme les macroéléments de la solution minérale de Murashige et Skoog : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 185 mg.l^{-1} , KH_2PO_4 : 85 mg.l^{-1} , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 220 mg.l^{-1} , NH_4NO_3 : 825 mg.l^{-1} , KNO_3 : 950 mg.l^{-1} ; les microéléments de la solution minérale de Heller ; des vitamines : panthothenate de calcium, acide nicotinique, vitamine B_6 , vitamine B_1 : tous à 1 mg.l^{-1} , biotine : 0.01 mg.l^{-1} ; la glutamine : 20 mg.l^{-1} ; le saccharose : 10 g.l^{-1} et l'Agar bactériologique : 5 g.l^{-1} .

Dans un premier cas, ces milieux de base ne sont pas additionnés de régulateurs de croissance, dans un second cas ils sont additionnés soit uniquement d'une cytokinine : BAP : 0.5 mg.l^{-1} , soit d'une combinaison auxine/cytokinine : ANA : 0.05 mg.l^{-1} + BAP : 0.05 mg.l^{-1} , ANA : 0.01 mg.l^{-1} + BAP : 0.05 mg.l^{-1} , ANA : 0.05 mg.l^{-1} + BAP : 0.50 mg.l^{-1} .

3.5.2. - Deuxième milieu de transfert

Dès qu'ils sont pourvus d'une racine et de deux cotylédons bien formés, les embryons sont séparés des anthères et des styles et repiqués individuellement en tubes (22 x 160 mm) sur milieu de Heller (1953) dépourvu de substances de croissance. La composition de ce milieu est indiqué dans le paragraphe 3.3.

Le pH de tous les milieux nutritifs est ajusté à 5,6 à l'aide d'une solution de soude (NaOH, 0,1N), ou d'acide chlorhydrique (HCl, 0,1N). Ces milieux sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 115°C pendant 20 min.

4 - EXPRESSION DES RESULTATS

4.1. - Evaluation de la croissance

La croissance des tissus somatiques des anthères est évaluée par l'augmentation de la masse de matière fraîche et de matière sèche en cours de culture.

Les cals sont extraits des tubes à essais, essuyés afin d'éliminer tout le milieu pouvant adhérer à leur surface, puis pesés (poids de matière fraîche, P.F.) Ils sont ensuite maintenus à l'étuve à 60° C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (poids de matière sèche, P.S.).

4.2. - Evaluation du bourgeonnement

Nous avons considéré comme bourgeon toute ébauche caulinaire ayant formé au moins deux feuilles.

Le bourgeonnement est évaluée en dénombrant les bourgeons formés sur les cals d'anthers entre la première et la huitième semaine de culture sur le milieu inducteur de bourgeons ; les résultats sont exprimés par rapport à l'ensemble des cals organogènes (12 cals par condition) en :

- nombre de bourgeons formés sur 12 cals
- pourcentage de bourgeons évoluant en plantules.

4.3. - Evaluation de l'embryogenèse

Le pouvoir embryogène d'un lot d'anthers et de styles mis en culture est évalué en exprimant d'une part le pourcentage d'anthers et de styles embryogènes et d'autre part le nombre moyen de proembryons formés par explant embryogène.

5 - CULTURE *IN VITRO* DE FRAGMENTS DE FEUILLES ET DE TIGES

En vue de cloner un variant somaclonal thermosensible, à étamines avortées, obtenu à partir d'un bourgeon prélevé sur cal d'anthere, nous avons eu recours au bourgeonnement *in vitro* de fragments de feuilles et de tiges de cette plante.

5.1. - Désinfection du matériel et prélèvement des explantats

Des feuilles et des tiges jeunes sont prélevées sur ce variant somaclonal maintenu en serre. Elles sont ensuite stérilisées par immersion pendant 20 min. dans une solution d'hypochlorite de calcium à 8 % puis lavées dans trois bains successifs d'eau distillée stérile.

Sur les feuilles, des explantats d'environ 1 cm de côté sont prélevés au niveau de la nervure principale à l'aide d'un scalpel. Les explantats de tige sont obtenus en coupant cette dernière en deux dans le sens de sa longueur puis en prélevant des fragments d'entre-noeuds.

5.2. - Ensemencement et conditions de culture

Les explantats ainsi prélevés sont ensemencés horizontalement sur des milieux nutritifs gélosés préalablement coulés dans des boîtes de Petri (90 mm x 10 mm).

Les cultures sont ensuite placées dans une pièce de culture thermostatée ($24 \pm 1^\circ \text{C}$ le jour et $20 \pm 1^\circ \text{C}$ la nuit) éclairée par des tubes fluorescents assurant une photopériode de 18: $\overline{6}$ h et une intensité d'éclairement environ 3 W.m^{-2} .

5.3. - Composition de milieux de culture

La solution minérale utilisée renferme :

Les macroéléments de la solution de Murashige et Skoog aux concentrations suivantes :

- KH_2PO_4 : 170 mg.l^{-1}
- $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 370 mg.l^{-1}
- $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$: 440 mg.l^{-1}
- NH_4NO_3 : 825 mg.l^{-1}
- KNO_3 : $1\ 900 \text{ mg.l}^{-1}$
- Fe-EDTA : $19,5 \text{ mg.l}^{-1}$

- Les microéléments de la solution de Heller : concentrations figurant sur le tableau 4

- Des vitamines :

- acide nicotinique : $0,25 \text{ mg.l}^{-1}$
- pyridoxine : $0,25 \text{ mg.l}^{-1}$
- thiamine : $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$
- inositol : 100 mg.l^{-1}
- Du glycocolle : 10 mg.l^{-1}
- Du saccharose : 10 g.l^{-1}

- Les régulateurs de croissance utilisés sont l'ANA et la BAP ; leurs concentrations figurent sur le tableau 7.

Milieux	Régulateurs de croissance en mg.l ⁻¹	
	ANA	BAP
-		
a	0,02	0,05
b	0,5	0,5
c	1	1

Tableau 7 : Concentrations des régulateurs de croissance dans les milieux de culture de fragments de feuilles et de tiges.

Les milieux sont solidifiés par l'addition de 5 g.l⁻¹ d'Agar avant stérilisation à 115° C pendant 20 min.

Remarque : Une culture d'anthères a été également réalisée pour ce variant somaclonal thermosensible. Dans ce cas les anthères ont été prélevées en dehors d'une période de froid. Le milieu utilisé pour cette culture est le milieu 7 additionné de 80 ml.l⁻¹ de lait de coco. La composition de ce milieu figure sur le tableau 4, les

concentrations des régulateurs de croissance sont indiquées dans le tableau 5.

6 - TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

6.1. - Dénombrement des chromosomes

+ prélèvement et préfixation des racines

Les très jeunes racines prélevées sur les embryons somatiques et à la base des bourgeons sont préfixées pendant 3 h à 20° C dans une solution de 8 - hydroxyquinoléine à 290 mg. l⁻¹. L'effet est de supprimer le fuseau de la cellule en division permettant l'étalement des chromosomes lors de l'écrasement.

+ Fixation

La fixation des jeunes racines est réalisée dans un mélange éthanol-acide acétique (3V - 1V). Cette opération permet le stockage à une température de 4° C.

+ Coloration par la méthode de Feulgen

Les jeunes racines sont lavées à l'eau distillée, puis essorées sur un buvard et placées dans un petit tamis à mailles très fines pour subir une hydrolyse à 60° C dans du HCl (N) préalablement maintenu à l'étuve. Après 12

minutes d'hydrolyse, les racines sont lavées, essorées et placées dans le réactif de Schiff.

+ Préparation et observation au microscope

Après 2 à 3 h dans le réactif de Schiff, un très petit fragment de la pointe racinaire est prélevé (les divisions sont à l'extrémité, et il est important pour la vitesse de travail et la qualité de l'écrasement d'avoir peu de cellules) ; il est ensuite placé entre lame et lamelle dans une goutte de réactif de Schiff, écrasé et aussitôt examiné au microscope photonique.

La méthode de coloration de Feulgen donne avec le *Cichorium intybus* L. une très faible coloration nucléaire même après 3 h de contact avec le réactif de Schiff. La coloration ne se développe qu'après une brève exposition des extrémités racinaires écrasées dans le réactif de Schiff à "la fuchsine phéniquée".

Composition de la fuchsine phéniquée

Selon CARR et WALKER (1961) la solution de fuchsine phéniquée est obtenue comme suit :

- préparer une solution mère A : dissoudre 3 g de fuschine basique dans 100 ml d'éthanol à 70 %

- préparer une solution mère B : additionner 10 ml de la solution A à 90 ml de phénol 5% (utiliser de l'eau distillée)

- l'addition de 45 ml de la solution mère B à 6 ml d'acide acétique glacial et 6 ml de formaldéhyde à 37 % donne la solution de fuchsine phéniquée.

6.2. - Observation des différents stades de la microsporogénèse et de la microgamétogénèse

Pour observer l'évolution des gamétophytes mâles, nous avons fixé puis coloré selon la méthode de Feulgen des anthères prélevées dans des inflorescences de tailles différentes. Ces anthères sont ensuite coupées en deux dans le sens de leur largeur puis écrasées entre lame et lamelle dans une goutte de réactif Schiff et observées au microscope photonique.

6.3. - Détermination de l'origine des embryons somatiques

Pour déterminer l'origine des embryons formés à partir des anthères et des styles, au bout de deux jours de culture, et ensuite chaque jour, nous prélevons des anthères et des styles dont une partie est fixée par le mélange éthanol - acide acétique (3V - 1V) puis colorée par la technique de Feulgen ; une autre partie est fixée par le glutaraldéhyde à 6 %, déshydratée par l'éthanol, passée dans un appareil à point critique, métallisée à l'or-palladium et observée en MEB. Enfin une troisième partie est éclairée par une solution de KOH (N) pendant 10 min à 100° C, permettant l'étalement des

styles et des anthères et l'observation des embryoides *in situ* Après le traitement par KOH, le meilleur contraste est obtenu par une double coloration : acide périodique Schiff selon JENSEN (1962) puis bleu de méthylène en solution aqueuse saturée.

RESULTATS

La culture *in vitro* d'anthers et de styles de plusieurs cultivars de *Cichorium intybus* a permis l'obtention de jeunes plantes selon deux modes de néoformation. Le premier est une organogenèse simple par élaboration de bourgeons sur les cals d'anthers initialement formés. Le second est une embryogenèse somatique par obtention directe d'embryons.

1. - PROLIFERATION ET ORGANOGENESE DES ANTHERES CULTIVEES *IN VITRO*

1.1. - Recherche d'un critère morphologique

Le stade de développement des anthers se traduit par la stade d'évolution des gamétophytes mâles qu'elles renferment. Nous avons alors essayé d'établir un critère morphologique permettant d'identifier les différents stades de la microsporogénèse et de la microgamétogénèse.

Des capitules sont prélevés à différents stades de leur développement sur trois hybrides F1 de Chicorée : 'Zoom', '474' et '448' cultivés en serre.

Ce matériel végétal est immédiatement fixé dans un mélange éthanol-acide acétique (3V - 1V) puis stocké à une température de 4° C. Il servira ensuite à mesurer la taille de chaque capitule, des fleurs qui en sont issues ainsi que celle des anthers au moyen d'une loupe "Compte fil" 8 x Aplanitique. Les anthers sont ensuite colorées au carmin acétique et les cellules qu'elles renferment sont observées au microscope photonique pour déterminer leurs stades de développement. Une coloration des anthers selon la méthode de Feulgen puis à la fuchsine phéniquée est nécessaire lors de la détermination des différentes étapes de la méiose.

Le tableau 8 illustre la corrélation qui peut exister entre la morphologie des capitules, des fleurs, puis celle des anthères et le stade de développement des gamétophytes mâles.

Ainsi, nous constatons que chez les hybrides 'Zoom' et '474', les capitules ayant une taille inférieure à 2,5 mm, renferment des anthères dont les gamétophytes mâles n'ont pas encore entamé la microgamétogénèse, le passage au stade tétrades de microspores jeunes correspond à des capitules de 2,5 mm de long. Chez l'hybride '448', il faut que les capitules atteignent 3,1 mm pour que l'on puisse assister à l'achèvement de la méiose et observer le passage au premier stade de la microgamétogénèse.

Le second stade de la microgamétogénèse ou stade microspores libérées de leur paroi callosique se rencontre dans les capitules mesurant entre 3,2 et 3,4 mm pour l'hybride 'Zoom', 3,1 et 4 mm pour l'hybride '474', 4,1 et 4,9 mm pour l'hybride '448'. Lorsque les capitules atteignent 3,5 mm pour l'hybride 'Zoom', 4 mm pour l'hybride '474' et 4,9 mm pour l'hybride '448', les microspores se transforment en grains de pollen.

Au cours de nos expériences nous ne nous sommes pas fiés à ce critère de taille des capitules pour mettre en culture des anthères renfermant des gamétophytes mâles à tel ou tel stade de développement, car nous avons constaté que cette taille est très variable selon les conditions de culture de la plante sur laquelle est effectué le prélèvement des inflorescences. Nous avons aussi constaté que le développement des gamétophytes n'est pas toujours synchrone dans les anthères d'une même fleur, ni même dans une même

Taille du capitule	Taille des fleurs en mm			Taille des anthères en mm			Stade de développement des gamétophytes mâles		
	'Zoom'	'474'	'448'	Hybrides 'Zoom' '474' '448'			'Zoom'	'474'	'448'
2.2	1.6	1.9	1.3	1	1.4	0.7	cm	me	cm
2.3	1.8	2.1	1.4	1.1	1.5	0.8	me	me	cm
2.4	1.9	2.2	1.5	1.2	1.6	0.8	me	me	cm
2.5	2.1	2.3	1.6	1.6	1.6	0.9	tm	tm	me
2.6	2.2	2.4	1.7	1.8	1.7	1	tm	tm	me
2.7	2.3	2.4	1.7	1.8	1.7	1	tm	tm	me
2.8	2.4	2.5	1.8	1.8	1.8	1.1	tm	tm	me
2.9	2.4	2.5	1.8	1.9	1.8	1.1	tm	tm	me
3	2.5	2.7	2	1.9	1.9	1.3	tm	tm	me
3.1	2.6	2.8	2.1	1.9	2.1	1.3	tm	tm parfois	tm
3.2	2.6	2.9	2.1	2	2.2	1.3	tm parfois	m	tm
3.3	2.6	2.9	2.2	2	2.3	1.4	m parfois	m	tm
3.4	2.7	3	2.2	2.1	2.3	1.5	m	m	tm
3.5	2.8	3.1	2.3	2.2	2.4	1.6	gp	m	tm
3.6	3.1	3.2	2.4	2.4	2.5	1.7	gp	m	tm
3.7	3.3	3.4	2.5	2.5	2.6	1.8	gp	m	tm
3.8	3.5	3.5	2.6	2.7	2.8	1.8	gp	m	tm
3.9	3.7	3.7	2.7	2.9	2.9	1.9	gp	m	tm
4	4	3.8	2.8	3	3	1.9	gp	m parfois	tm
4.1	-	-	3	-	-	2.2	gp	gp	m parfois
4.2	-	-	3.3	-	-	2.4	gp	gp	m
4.3	-	-	3.4	-	-	2.4	gp	gp	m
4.4	-	-	3.5	-	-	2.4	gp	gp	m
4.5	-	-	3.6	-	-	2.4	gp	gp	m
4.6	-	-	3.6	-	-	2.5	gp	gp	m
4.7	-	-	3.7	-	-	2.5	gp	gp	m
4.8	-	-	3.8	-	-	2.5	gp	gp	m
4.9	-	-	3.9	-	-	2.6	gp	gp	gp parfois
5	4.5	4.7	4	3.5	4	2.7	gp	gp	gp
6	5	5.4	4.5	4	4.9	3.5	gp	gp	gp

Tableau 5 : Evaluation de quelques critères morphologiques au cours de la méiose et de la gamétogénèse mâle chez trois hybrides de *Cichorium* cultivés en serre.

nous désignons par : cm : Cellules mères

me : méiose

tm : tétrades de microspores

m : microspores

gp : grains de pollen

anthère. Aussi pour nos expériences, nous avons observé au microspore photonique les gamétophytes mâles des anthères d'une fleur avant de mettre en culture les anthères des autres fleurs du même capitule.

1.2. - Prolifération et callogenèse des anthères

Les anthères cultivées sur les milieux 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 (cf Tableaux 4 et 5, pages 31 et 32) manifestent des phénomènes de prolifération. Généralement la prolifération commence à la base de l'anthère et gagne ensuite sa totalité pour aboutir à la formation d'un cal de couleur blanchâtre et d'aspect noduleux.

Cette callogenèse des tissus somatiques des anthères s'observe quelque soit le stade de développement des gamétophytes mâles contenus dans les anthères et chez tous les génotypes sur lesquels nous avons travaillé. Cependant des différences sont à souligner selon le génotype considéré et le milieu de culture utilisé.

La date du prélèvement des fleurs n'influence guère la callogenèse ; des cals ont été obtenus à tout moment de l'année à partir de plantes cultivées aux champs, en serre ou en pièce conditionnée .

De même le prétraitement des capitules par le froid avant la mise en culture des anthères ne modifie pas la callogenèse (Tableau 9).

Génotypes	ANA/BAP mg.l ⁻¹	Nombre d'anthères mises en culture		Anthères callogènes (%)		Intensité de prolifération	
		Prétraitement à 4° C	Absence du prétraitement	Prétraitement à 4° C	Absence du prétraitement	Prétraitement à 4° C	Absence du prétraitement
Hybride n° '474' <i>C. Intybus</i> L., var Magdebourg x <i>C. endivia</i> L. var. Latifolia	0,1/0,5	45	40	95,2	97,3	++++	++++
Hybride n° '448' <i>C. intybus</i> L., var. Foliosum x <i>C. Intybus</i> L. (Chioggia)	0,1/0,5	75	78	58,4	53,5	++	++
<i>C. intybus</i> L., var. Witloof cv 'Zoom'	0,1/0,5	83	85	92,1	96,3	++++	++++

eau 9 : Influence d'un prétraitement des capitules par le froid (4° C pendant 7 jours) sur la callogénèse des tissus somatiques

des anthères de trois hybrides de Chicorée.

Les dénombrements sont effectués après deux semaines de culture à la lumière à une température de 24° ± 1° C le jour et 20 ± 1° C la nuit.

+ —→++++ prolifération de plus en plus importante

L'obscurité ou la lumière durant les deux premières semaines de culture n'influe pas non plus sur la callogénèse des tissus somatiques des anthères (Tableau 10).

1.2.1. - Anthères prélevées sur les hybrides '474' et 'Zoom'

Après deux semaines de culture sur les différents milieux éprouvés pour leurs capacités callogènes, les anthères des hybrides 'Zoom' et '474' manifestent la callogénèse maximale sur les milieux 3 : (ANA : 0,1 mg. l⁻¹, BAP : 0,1 mg. l⁻¹) et 4 : (ANA : 0,1 mg. l⁻¹, BAP : 0,5 mg. l⁻¹), celle-ci est moins importante avec le milieu 7 : (ANA : 0,5 mg. l⁻¹, BAP : 0,5 mg. l⁻¹), plus réduite encore avec les milieux 1 : (ANA : 0,02 mg. l⁻¹, BAP : 0,1 mg. l⁻¹), 2 : (ANA : 0,02 mg. l⁻¹, BAP : 0,5 mg. l⁻¹) et 6 (ANA : 0,1 mg. l⁻¹, 2 iP : 0,5 mg. l⁻¹). Enfin avec le milieu 5 : (ANA : 0,02 mg. l⁻¹, 2 iP : 0,5 mg. l⁻¹) la prolifération est nulle ou presque.

Les régulateurs de croissance jouent un rôle très important dans la prolifération des tissus somatiques des anthères ; il faut que les concentrations d'ANA soient supérieures à 0,02 mg l⁻¹ et inférieures à 0,5 mg. l⁻¹.

La nature de la cytokinine influence également la callogénèse ; la BAP est plus efficace que le 2 iP qui en outre favorise les cals "vitreux" et friables.

Remarque : La callogénèse des tissus des styles n'a pas été autant étudiée que celle des anthères, mais des styles prélevés sur l'hybride '474' et placés sur le milieu 3 prolifèrent activement et aboutissent à la formation de cal.

Génotypes	ANA/BAP mg.l ⁻¹	Nombre d'anthers mises en culture		Anthers callogènes (%)		Intensité de prolifération	
		Lumière	Obscurité	Lumière	Obscurité	Lumière	Obscurité
Hybride n° '474'							
<i>C. intybus</i> L., var. Magdebourg	0,02/0,10	77	58	65,0	63,0	++	++
<i>C. endivia</i> L. var. Latifolia	0,10/0,50	120	92	94,8	96,2	++++	++++
Hybride n° '448'							
<i>C. intybus</i> L., var Foliosum	0,02/0,10	60	58	4,0	7,0	+	+
<i>C. intybus</i> L. (Chioggia)	0,10/0,50	101	97	67,2	59,3	++	++
<i>C. intybus</i> L., var. Witloof cv 'Zoom'	0,02/0,10 0,10/0,50	112 95	99 100	59,1 92,9	56,3 95,3	++ ++++	++ ++++

Tableau 10 : Effet de l'obscurité et de la lumière sur la callogénèse des tissus somatiques des anthers de trois génotypes de *Cichorium*

Les dénombrements sont effectués après deux semaines de culture à la lumière ou à l'obscurité, à une température de 24° ± 1 le jour et 20 ± 1° C la nuit

+ → +++++ prolifération de plus en plus importante

1.2.2. - Anthères prélevées sur l'hybride '448'

Les anthères de cet hybride sont très peu réactives sur les milieux utilisés : la callogenèse se limite à la prolifération de la région basale des anthères. Seul le milieu 7, et avec une moindre intensité le milieu 4, ont permis une légère prolifération de l'ensemble des tissus des anthères .

Dans le but d'améliorer cette prolifération nous avons additionné 80 ml l⁻¹ de lait de coco au milieu 7 . Nous avons constaté qu'à cette concentration, le lait de coco stimule puissamment la prolifération cellulaire, il y a une callogenèse importante des tissus des anthères. Cette exaltation a permis d'augmenter la quantité de la matière fraîche et sèche d'environ 35 % (Tableau 11). Parallèlement, nous avons noté la formation de racines sur les cals. Ces racines sont épaisses mais leur élongation est faible.

1.3. - Organogenèse des cals d'anthères

Après deux semaines de culture sur les milieux callogènes, les cals formés à partir des anthères sont repiqués en tube sur deux types de milieux :

- milieux ayant comme source azotée de la glutamine et de l'azote nitrique (milieux A, B et C).

- milieu ne renfermant que de l'azote minéral sous forme nitrique et amoniacale (milieu D).

	Poids de matière fraîche de 12 cals en mg.	Poids de matière sèche de 12 cals en mg.
Milieu 7 sans lait de coco	112	13
Milieu 7 additionné de 80 m l.l ⁻¹ de lait de coco	180	19

Tableau 11 : Effet du lait de coco sur la prolifération des tissus somatiques des anthères de l'hybride 448.

Les Poids de matières fraîches et sèches ont été déterminés après 3 semaines de culture.

Seuls ont été transférés les cals d'anthères initiés sur le milieu 3 pour les hybrides '474' et 'Zoom' et ceux initiés sur le milieu 7 pour l'hybride '448', en effet ce sont les milieux qui ont permis les meilleures proliférations.

Les milieux nutritifs destinés à favoriser l'organogenèse des cals renferment de l'ANA comme auxine, de la BAP ou de la 2 iP comme cytokinine. les différentes combinaisons et concentrations de ces régulateurs de croissance sont indiquées dans le chapitre Matériel et Méthodes.

1.3.1. - Induction de bourgeons sur les cals d'anthères de l'hybride '474'.

Le transfert des cals sur le milieu inducteur D se traduit par une prolifération abondante et l'apparition de bourgeons dès la première semaine de culture. Sur les milieux C et B, l'apparition des bourgeons n'a lieu qu'après deux semaines de culture et la prolifération des cals est très faible (Tableau12). Lorsqu'ils sont repiqués sur le milieu A, les cals prolifèrent activement mais ne manifestent aucun bourgeonnement ; ils présentent seulement de petits nodules de couleur verte.

Les cals sont maintenus pendant 8 semaines sur les différents milieux inducteurs et les bourgeons qu'ils forment sont prélevés au fur et à mesure de leur apparition et lorsqu'ils atteignent une taille de 2 à 3 mm, ils sont repiqués en tube sur milieu de Heller sans régulateurs de croissance.

Milieux inducteurs de bourgeons	Intensité de prolifération (a)			Nombre de bourgeons prélevés sur 12 cals d'anthères'			Pourcentage de bourgeons évoluant en plantules (%)		
	'474'	Zoom	'448'	'474'	Zoom	'448'	'474'	Zoom	'448'
	A	+++	+++	+	0	0	103	-	-
B	+	+	0	107	121	0	69,2	63,2	-
C	+	+	0	98	111	0	73,9	68,9	-
D	++++	++++	++	442	540	66	23,8	18,4	8,3

Tableau 12 : Capacités de prolifération et de bourgeonnement des cals d'anthères de 3 géotypes de *Cichorium* sur différents milieux inducteurs de bourgeons (A, B, C et D).

La durée de la phase inductrice des bourgeons est de 8 semaines

(a) : estimation visuelle de la prolifération des cals d'anthères cultivés sur les milieux inducteurs de bourgeons.

Le tableau 12 montre que le milieu D se montre le plus favorable à l'induction de bourgeons : 442 bourgeons ont pu être prélevés sur 12 calcs d'anthères dans une période de 8 semaines. Sur les milieux C et B, nous n'avons pu prélever qu'une centaine de bourgeons sur 12 calcs.

Cependant si le milieu D permet un meilleur bourgeonnement des calcs, par la suite l'évolution des bourgeons en plantules n'est possible que dans 23,8 % des cas (Tableau 12) ; ceci est dû au fait que sur le milieu D, les calcs sont friables et hyperhydriques et les bourgeons qu'ils produisent ont un aspect charnu et translucide.

Une abondante néoformation de bourgeons a été obtenue lorsque les calcs sont cultivés pendant 8 semaines sur le milieu A, puis transférés sur milieu de Heller sans régulateurs de croissance ; nous avons pu prélever jusqu'à 2 000 bourgeons sur 12 calcs d'anthères dans une période de 3 semaines dont 80 % ont évolué en plantules. Il apparaît donc que le milieu A qui renferme une forte dose d'auxine a pour effet d'entraver le bourgeonnement des calcs ; le passage sur un milieu sans régulateurs de croissance permet une réduction de la quantité d'auxine au niveau des calcs et par conséquent l'expression caulogène.

Lorsque les bourgeons atteignent une taille de 2 à 3 cm, ils sont transférés en miniserre sur un mélange de terreau et de perlite (60/40) maintenu humide par des arrosages avec la solution minérale de Heller. Tous les bourgeons repiqués en miniserre continuent leur développement pour être transférés ultérieurement en serre.

Nous avons mené à l'état de plantes adultes plusieurs lots de bourgeons issus de cals d'anthers. Les plantes obtenues sont parfaitement homogènes et ressemblent toutes à l'hybride de départ. Après vernalisation elles ont fleuri, en jour long, aux champs, en serre ou en pièce conditionnée. Le dénombrement des chromosomes a révélé un nombre diploïde $2n = 18$ chromosomes.

La méiose de cet hybride fertile est normale. Il n'y a pas de grains de pollen vides et ils sont réactifs au chlorure tétrazolium. Environ 2 % de grains sont plus gros, et correspondent probablement aux figures de microspores non séparées de quelques tétrades observées à la fin de la méiose.

1.3.2. - Induction de bourgeons sur les cals d'anthers de l'hybride '448'

La culture des cals d'anthers sur les différents milieux inducteurs de bourgeons montre que l'on est en présence d'un génotype très peu réactif. En effet un faible bourgeonnement des cals a été obtenu sur les milieux D et A et aucun bourgeon sur les milieux C et B (Tableau 12). Cependant une remarquable stimulation de la néoformation de bourgeons sur les cals d'anthers a été obtenue lorsque ceux-ci sont initiés sur un milieu contenant du lait de coco et transférés ensuite sur un milieu d'induction de bourgeons.

Les résultats consignés dans le tableau 13 montrent que la subculture de cals cultivés sur le milieu 7 additionné de lait de coco (80 ml l-1) permet l'apparition de bourgeons sur les milieux C et B et une stimulation du bourgeonnement sur les milieux A et D.

Nombre de bourgeons prélevés sur 12 cals d'anthères			
	provenant du milieu 7 sans lait de coco	provenant du milieu 7 additionné de 80 ml.l ⁻¹ de lait de coco	
Milieux inducteurs de bourgeons	A	103	480
	B	0	198
	C	0	109
	D	66	123

Tableau 13 : Influence du lait de coco sur le bourgeonnement des anthères ou l'hybride '448'.

La durée de la phase inductrice est de 8 semaines.

1.3.2.1. Obtention d'un variant somaclonal thermosensible à étamines avortées

Plusieurs lots de bourgeons issus de cals d'anthers de l'hybride '448' ont été menés jusqu'à l'état de plantes adultes dont le phénotype est identique à l'hybride de départ.

Un lot de plantes issues de bourgeons prélevés sur des cals d'anthers cultivés en présence de lait de coco et de concentrations élevées en régulateurs de croissance a montré une plante qui, bien que cultivée dans les mêmes conditions a fleuri tardivement. L'aspect différent de ses inflorescences nous a conduit à les prélever, les disséquer pour observer les fleurs. Celles-ci, plus petites que les fleurs normales sont dépourvues d'étamines ou présentent des anthers atrophiées et vides (Planche I, Figures 1, 2, 3 et 5). Le gynécée est peu modifié bien que les styles des fleurs à étamines avortées soient nettement plus courts que ceux des fleurs normales (Planche I, Figure 6). Les anthers vides ne sont pas soudées (Planche I, Figure 4) et leur sommet présente des expansions cellulaires qui simulent des papilles stigmatiques (Planche I, Figure 8). Le même type de pseudopapilles se retrouve au sommet de pétales soudés (Planche I, Figures 7 et 9). Nous observons parfois des ovules nus sur le bord d'anthers carpelloïdes. Ces observations amènent à penser à un variant mâle stérile.

Le dénombrement des chromosomes au niveau des pointes racinaires issues de cette plante appelée '448a' révèle que le nombre est diploïde ($2n = 18$). Le caryotype ne diffère pas à première vue de celui des autres plantes 448.

Planche I : Observation des fleurs d'un variant somaclonal mâle stérile thermosensible ('448a') obtenu par organogénèse sur cals d'anthers d'une Chicorée hybride 448'.

Figure 1 : Capitule issu d'une plante hybride 448 "normale". Observer les étamines soudées entre elles au niveau des anthers qui forment un manchon enserrant un style bifide.

Figures 2 et 3 : Capitules prélevés sur le variant somaclonal 448a, montrant : Fig. 2 : des fleurs à étamines réduites et anthers vides, Fig. 3 : des fleurs sans étamines.

Figures 4 et 5 : Fleurs isolées dont la corolle a été enlevée ; Fig. 4 : fleur à anthers vides et non soudées, Fig. 5 : Fleurs dépourvues d'étamines ou présentant des étamines rudimentaires carpelloïdes.

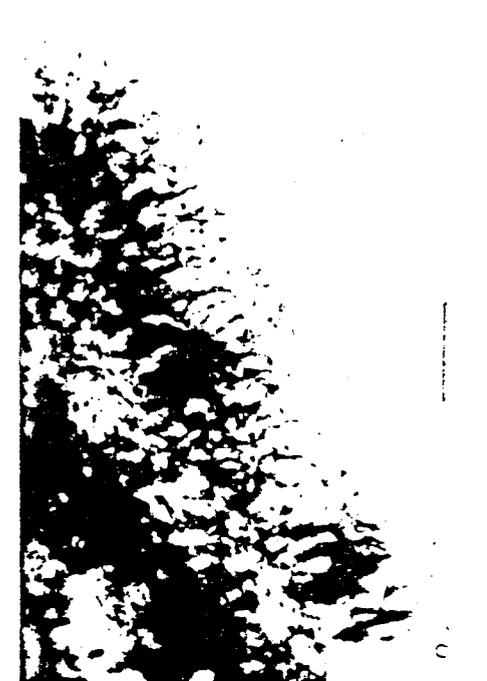
Figure 6 : Comparaison de la longueur des styles entre une fleur "normale" à droite et une fleur sans étamines à gauche.

Figure 7 : Fleur à étamines réduites et anthers vides montrant des pétales soudés sur lesquels se sont développés des pseudopapilles stigmatiques.

Figure 8 : Sommet d'une anthere vide montrant des expansions cellulaires qui simulent des papilles stigmatiques.

Figure 9 : Sommet d'un pétale de fleur à anthers vides montrant des pseudopapilles stigmatiques.

La barre correspond à 1 mm pour les figures 1 à 7 et à 100 μm pour les figures 8 et 9.



Pour éviter les gelées, cette plante a été placée en serre le 24 septembre 1986, avec une température approximative de 20° C le jour et 15° C la nuit, et un éclairage d'appoint en jour court de 10 h. 5 jours plus tard, les inflorescences formées présentaient des étamines pleines de pollen réactif au chlorure de tétrazolium. Un accident de régulation a provoqué ensuite la chute de la température nocturne jusqu'à 4° C et diurne jusqu'à 12° C aux environs du 13 octobre. Les jeunes inflorescences ont de nouveau montré des anthères vides. Il semblerait que le caractère anthères vides ne se manifeste que pour des températures basses. La station météorologique de Lesquin nous a fourni les relevés de température pour la seconde quinzaine de septembre où les premières fleurs anormales avaient été observées. La moyenne des températures minimales était de 7,8° C avec des extrêmes de 4 et 14,3° C. La moyenne des températures maximales de 16,8° C avec des extrêmes de 11,9° C et 20,2° C.

Le comportement particulier de cette plante vis-à-vis de la température nous a incité à la multiplier pour vérifier la stabilité de ce caractère.

1.3.2.2. - Multiplication du variant somaclonal thermosensible à étamines avortées

Plusieurs modes de propagation ont été envisagés :

- Multiplication par bouturage

Trois boutures ont été prélevées sur la plante '448a', plantées en pot et gardées en serre. La seule plante ayant poursuivi son développement jusqu'à la floraison a été transférée après six mois sous un tunnel (sans régulation).

Cette plante a produit des fleurs parfaitement normales ; mais à la suite d'une vague de froid survenue fin avril début mai, les nouvelles inflorescences formées présentaient des fleurs anormales dont les étamines étaient avortées.

- Multiplication par voie sexuée

Des fleurs '448a' ont été autofécondées en serre, et d'autres fécondées par du pollen de plantes '448' normales. Ces croisements ont tous deux abouti à l'échec car dans aucun cas nous n'avions obtenu d'akènes fertiles.

- Multiplication par culture *in vitro*

Différents explants ont été utilisés pour la micropropagation de cette plante thermosensible :

- des anthères prélevées en dehors d'une période de froid, cultivées *in vitro* sur un milieu callogène puis inducteur de bourgeons se comportent de la même façon que des anthères issues d'une plante '448' normale. La différence réside dans le nombre d'anthères qui réagissent pour donner des cals organogènes. Ce nombre est beaucoup moins important pour la plante thermosensible.

- Des fragments de feuilles ensemencés sur les milieux nutritifs A, B et C (cf chapitre Matériel et Méthodes) forment après deux semaines de culture des bourgeons sur les petits cals développés au niveau de la nervure principale et des bords de ces fragments. Parfois des bourgeons naissent directement sur le limbe sans formation de cal. La croissance des cals est fonction de la concentration en régulateurs de croissance du milieu de culture, l'équilibre hormonal ANA/BAP = 0,5 mg. l⁻¹/0,5 mg.l⁻¹ est le plus favorable au bourgeonnement. Après bourgeonnement, les explantats sont transférés sur

le milieu nutritif de Heller sans hormones où les bourgeons poursuivent leur développement. Ils sont ensuite isolés et repiqués sur le même milieu. Après enracinement, ils sont transférés en miniserre puis en serre.

Nous avons également cultivé des fragments de tiges, ils se comportent comme les fragments de feuilles toutefois le bourgeonnement le plus intense a été obtenu en présence de $0,02 \text{ mg. l}^{-1}$ d'ANA et $0,05 \text{ mg. l}^{-1}$ de BAP.

Un certain nombre de bourgeons issus des fragments de feuilles et de tiges ont fleuri en tube à 25° C et en jour long, les fleurs étaient fertiles. Les expériences ultérieures sur des plantes adultes ont eu pour objet de tester la régression des étamines liée à la température. Ce caractère ne semble pas être conservé.

1.3.3. Induction de bourgeons sur les cals d'anthères de l'hybride

'Zoom'

Les cals d'anthères de cet hybride se comportent d'une manière assez comparable à ceux de l'hybride '474' : faible prolifération et bourgeonnement sur les milieux B et C, cals friables et bourgeons charnus en grand nombre sur le milieu D, absence de bourgeonnement sur le milieu A (Tableau 12), obtention d'un très grand ^{nb} de bourgeons sur des cals cultivés pendant 8 semaines sur le milieu A et transférés ensuite sur le milieu de Heller sans hormone.

2. EMBRYOGENESE SOMATIQUE DES ANTHÈRES ET DES STYLES CULTIVES *IN VITRO*

En modifiant les conditions de culture et la composition du milieu, nous avons, avec certains géotypes de Chicorée, obtenu des embryons somatiques directement sans passer par le "stade cal". Ces embryons somatiques sont décelables, à l'état globulaire, dès le 10ème jour de culture.

Les styles ensemencés en même temps que les anthères ont montré des potentialités embryogènes beaucoup plus importantes.

Nous utiliserons en synonymie les termes "embryons somatiques" et "embryoïdes" au sens de VASIL et HILDEBRANDT (1966) pour les différencier des embryons issus de la reproduction sexuée et nous appellerons proembryons somatiques (PE) les embryoïdes globulaires ou ovoïdes.

2.1. - Etude des facteurs intervenant dans l'induction des embryons somatiques.

L'embryogenèse somatique des anthères et des styles cultivés *in vitro* dépend de plusieurs facteurs.

2.1.1. Importance du génotype dans l'obtention des embryons somatiques

L'expérimentation menée parallèlement sur plusieurs génotypes de *Cichorium* a mis en évidence l'importance des facteurs génétiques sur les potentialités embryogènes. En effet dans les mêmes conditions de culture, les anthères et les styles de l'hybride '474' se sont montrés les plus aptes à différencier des proembryons (Tableau 14). Après 10 jours de culture 50 à 90 % des anthères et 100 % des styles sont embryogènes, avec respectivement 2 à 4 et 10 à 30 proembryons par explant embryogène. 10 à 20 % des proembryons après un développement embryonnaire normal ont donné des plantules et des plantes qui montent normalement à fleurs.

Les anthères et les styles prélevés sur l'hybride F1 'Flash' et sur une Chicorée à café (cv n° 1 106) ont révélé des potentialités embryogènes très faibles, pour le cv. n° 1 106 l'embryogenèse somatique n'a pu être obtenue que pour 1 à 10 % d'anthères et de styles. Pour l'hybride 'Flash', seulement 4 % d'anthères et 10 % des styles sont embryogènes après 18 jours d'induction ; le nombre de proembryons induit par explant embryogène est très faible, il n'a jamais dépassé 1. Jusqu'à présent, aucune plante n'a pu être obtenue à partir de ces proembryons. Les anthères et les styles prélevés sur l'hybride 'Zoom' ainsi que ceux prélevés sur ses deux parents et l'hybride 448 n'ont jamais manifesté d'embryogenèse somatique (Tableau 14).

Ainsi pour l'étude des facteurs contrôlant l'embryogenèse somatique chez le *Cichorium*, nous avons adopté l'hybride '474', en effet c'est le seul hybride qui a fourni jusqu'à présent suffisamment de proembryons.

Génotypes	Potentialités embryogènes des anthères et des styles (a)
<i>C. intybus</i> L., var. Willoof, lignée 116. 1. 34. 24 (akène noir, parent de 'Zoom')	0
<i>C. intybus</i> L., var. Willoof, lignée 949. 16. 24. 26. (akène blanc, parent de 'Zoom')	0
<i>C. intybus</i> L., var. Willoof, cv 'Zoom'	0
<i>C. intybus</i> L. var. Willoof, cv 'Flash'	+
<i>C. intybus</i> L., var. Foliosum x	0
<i>C. intybus</i> L. (Chioggia) x	+++
<i>C. intybus</i> L., var. Magdebourg x	+
<i>C. endivia</i> L., var. Latifolia	
<i>C. intybus</i> L., var. Magdebourg, cv. n° 1106 (l'un des parents de l'hybride '474')	+

Tableau 14: Potentialités embryogènes des anthères et des styles de différents génotypes de *Cichorium*

(a) : Pourcentage d'explants embryogènes : 0 : nul ; + : 1 à 10 % ; ++ : 10 à 50 % ; +++ : 50 à 100 %

2.1.2. Rôle du stade de développement et de la nature de l'explant ensemencé

Pour chercher le stade de développement le plus favorable à l'embryogenèse somatique, nous avons ensemencé des anthères renfermant des gamétophytes mâles à différents stades de leur développement : allant du stade cellules mères jusqu'au stade grains de pollen mûrs. Les styles correspondant à chaque stade sont mis en culture en même temps que les anthères.

Le tableau 15 montre que le stade d'évolution des anthères et des styles, joue un rôle très important dans l'induction de l'embryogenèse somatique. En effet en utilisant le milieu 17 comme milieu inducteur, nous constatons que presque 60 % des anthères et 100 % des styles sont embryogènes lorsqu'ils sont ensemencés aux stades tétrades de microspores et microspores jeunes venant d'être libérées de leur enveloppe callosique. A un stade de développement antérieur -cellules mères- ou postérieur- grains de pollen, l'embryogenèse somatique n'est observée que pour environ 5 % d'anthères et 50 % de styles.

Le stade de développement intervient également sur le nombre moyen de proembryons induits par explant, en effet ce nombre est nettement plus élevé lorsque les styles et les anthères sont aux stades tétrades et microspores jeunes : 9,25 et 10,21 pour les styles aux stades tétrades et microspores, seulement 5,33 et 5,21 pour les styles aux stades cellules mères et grains de

Stade de développement	Nombre d'explantats mis en culture		Pourcentage d'explants embryogènes		Nombre moyen de PE par explant embryogène	
	Anthères	Styles	Anthères	Styles	Anthères	Styles
Cellules mères	105	21	4.76	52.38	1.20	5.33
Tétrades	215	43	55.81	93.02	2.41	9.25
Microspores	160	32	56.87	100.00	2.53	10.21
Grains de pollen	95	19	4.21	47.36	1.15	5.21

Tableau 15 : Influence du stade de développement et de la nature de l'explant sur la formation des proembryons (PE) chez l'hybride '474'.
Le dénombrement est effectué après 10 jours de contact avec le milieu inducteur, à 35° C à l'obscurité.

pollen ; 2,41 et 2,53 pour les anthères aux stades tétrades et microspores, seulement 1,20 et 1,15 pour les anthères aux stades cellules mères et grains de pollen (Tableau 15).

En plus du stade de développement, l'aptitude à produire des proembryons dépend également de la nature de l'explantensemencé. Ainsi dans les mêmes conditions de culture et pour un même stade de développement des fleurs, les styles ont des potentialités embryogènes plus importantes que les anthères : au stade microspores par exemple 100 % de styles sont embryogènes avec 10,21 proembryons induits par style réactif ; pour des anthères prises au même stade de développement, 56,87 % seulement sont embryogènes avec en moyenne 2,53 proembryons induits par anthère embryogène (Tableau 15).

2.1.3. Influence de la date de prélèvement des anthères et des styles

L'aptitude à produire des proembryons s'est manifestée sur des anthères et des styles durant toute l'année : depuis le mois d'octobre jusqu'en mai pour des plantes en serre ou en pièce conditionnée (16 h de lumière par jour, 20° C \pm 1° C le jour, 15° C \pm 1° C la nuit), depuis le mois de mai jusqu'en octobre à partir de plantes en champs.

Si le pourcentage de styles embryogènes et le nombre de proembryons par style réactif ne varient pas en fonction de la date du prélèvement, les potentialités embryogènes des anthères sont affectées : pour des prélèvements

effectués en Novembre-Décembre, le pourcentage d'anthères embryogènes a été de 74,2 % en 1986 et 73,0 % en 1987, dans les mêmes conditions de culture, ce pourcentage n'est que de 50,0 % lorsque les anthères sont prélevées en Juin-Juillet (Tableau 16).

Le nombre de proembryons induits par anthère embryogène varie également : 3 à 4 proembryons ont été induits par anthère réactive en Novembre-Décembre, seulement 2,1 en juin-juillet (Tableau 16).

2.1.4. Conditions d'induction

L'obscurité, la température et le temps de contact des explants avec le milieu inducteur jouent un rôle très important dans l'embryogenèse somatique des anthères et des styles.

2.1.4.1. Rôle de la température

La température au cours de la phase d'induction semble un facteur déterminant dans l'initiation des proembryons au niveau des anthères et des styles. Les cultures ont été placées dans des pièces conditionnées ou des étuves dont la température s'échelonne de 5 en 5° C, de 15 à 40° C.

Pour des températures inférieures à 25° C (15° C et 20° C) et supérieures à 35° C (40° C), aucun embryon somatique n'a été obtenu ni à partir des

		Pourcentage d'explants embryogènes		Nombre moyen de PE par explant embryogène	
		Anthères	Styles	Anthères	Styles
Date de prélèvement des explants	Novembre-Décembre 1986	74.2	a	3.30	a
	Juin-Juillet 1987	50.0	100.0	2.10	11.08
	Novembre-Décembre 1987	73.0	100.0	4.00	12.03

a : essais non effectués

Tableau 16: Influence de la date de prélèvement des anthères et des styles sur l'embryogenèse somatique de l'hybride '474'.

Les dénombrements sont effectués après 10 jours de contact avec le milieu inducteur, à 35° C

anthères, ni à partir des styles. A 25° C, une très faible embryogenèse est parfois observée. A 30° C, l'induction des embryons somatiques est importante. A 35° C, l'embryogenèse somatique est à son maximum, c'est en effet la température la plus favorable à une induction abondante et reproductible de proembryons. Placés sur un milieu inducteur, 100 % des styles et plus de 50 % des anthères sont embryogènes, il se forme en moyenne entre 2 et 3 proembryons par anthère embryogène et entre 10 et 30 proembryons par style embryogène.

En plus de l'embryogenèse somatique, d'autres phénomènes ont été observés sous l'influence de la température :

- une pigmentation anthocyanique des cellules superficielles des anthères et des styles à 15° C.
- un développement de papilles stigmatiques dans la zone superficielle supérieure des styles à 20 et 25° C.
- Une élongation des cellules des styles, de plus en plus accentuée en allant de 20 à 40° C.

2.1.4.2. Influence de la durée de la phase d'induction

La durée du traitement inducteur, c'est-à-dire le temps de contact des styles et des anthères avec le milieu inducteur intervient d'une part sur le pourcentage d'explants embryogènes, d'autre part sur le nombre de proembryons initiés (Tableau 17). Ce facteur contrôle également le devenir des embryoides. Ainsi, en faisant varier de 5 à 15 jours la durée de la période

d'induction (le milieu utilisé est le milieu 17) on s'aperçoit que 5 ou 7 jours ne suffisent pas pour obtenir un maximum d'explants embryogènes ; à partir du 10^e jour, tous les styles mis en culture sont embryogènes et le pourcentage d'anthères réactives est de 73 %, il atteint 90,6 % après 15 jours de culture . Le nombre moyen de proembryons formés par explant embryogène augmente avec la période d'induction, du 5^e au 15^e jour : il passe de 1,8 à 4 pour les anthères et de 7 à plus de 20 pour les styles (Tableau 17). En réalité, le nombre total de proembryons induits est très supérieur car les valeurs précédentes ne tiennent compte que des proembryons visibles au microscope (grossissant x 20). En microscopie électronique à balayage (MEB) on met en évidence des proembryons plus petits mesurant une centaine de μm (Planche VII, Figures 3, 4 et 5 ; Planche VIII, Figure 11)..

Pour la suite de notre expérimentation, nous avons retenu un temps de contact de 10 jours car pour une durée d'induction assez longue (15 jours), il s'installe une relative dormance des embryoides formés.

2.1.5. Influence de la composition du milieu de culture

Plusieurs composants du milieu de culture interviennent dans l'initiation de l'embryogenèse somatique des anthères et des styles. Pour cela nous avons expérimenté de nombreux milieux qui diffèrent soit par la nature et la concentration des régulateurs de croissance, soit par la nature et la concentration des composés azotés, soit par la concentration en saccharose.

		Explants	Temps de contact sur le milieu inducteur (Jours)				
			5	7	10	12	15
Nombre d'explants mis en culture	Anthères	83	93	100	80	180	
	Styles	17	38	37	39	22	
Pourcentage d'explants embryogènes	Anthères	39,7	59,3	73,0	96,2	90,6	
	Styles	41,2	78,9	100,0	100,0	100,0	
Nombre moyen de PE par explant embryogène	Anthères	1,8	2,3	4,0	3,8	4,0	
	Styles	7,1	12,7	18,5	> 20	> 20	

Tableau 17: Influence de la durée du traitement inducteur sur la formation de proembryons (PE).

Le dénombrement est effectué au moment du transfert des explants embryogènes sur le milieu de développement.

2.1.5.1. Les régulateurs de croissance

Pour la recherche d'une combinaison auxine-cytokinine pouvant favoriser l'expression des potentialités embryogènes des cellules des anthères, nous avons eu recours à 16 combinaisons différentes (Tableau 18). Le milieu que nous avons utilisé pour cette expérimentation est le milieu 18 différant du milieu 17 (cf chapitre Matériel et Méthodes) par la nature de la source azotée. En effet ce milieu renferme 750 mg de glutamine comme seule source d'azote.

Les conditions optimales d'induction n'étaient pas encore déterminées, les anthères ont été placées à 25° C et à l'obscurité lors des 10 premiers jours de culture.

Le tableau 18 montre que la nature et la concentration des facteurs de croissance dans le milieu d'induction déterminent l'orientation ultérieure vers la callogenèse ou vers l'embryogenèse directe. Ainsi, en maintenant à 0,02 mg l⁻¹ la concentration d'ANA dans le milieu de culture, nous constatons que contrairement à la BAP, à la kinétine et à la zéatine, la ZiP utilisée à une concentration de 0,5 mg.l⁻¹ permet l'obtention reproductible d'embryoïdes. A une concentration supérieure (1 mg. l⁻¹) cette cytokinine est beaucoup moins efficace car elle ne stimule que très faiblement l'embryogenèse somatique. De même, sa réduction à 0,1 mg.l⁻¹ entraîne la disparition de ce type de morphogenèse.

Milieux	Régulateurs de croissance en mg.l-1					Réponses des anthères
	ANA	BAP	2iP	Zéatine	Kinétine	
18 a	0,02	0,10				C
18 b	0,02	0,25				C
18 c	0,02	0,50				C
18 d	0,02	1,00				C
18 e	0,02		0,10			C _b
18	0,02		0,50			E _s directe reproductible
18 f	0,02		1,00			C _b parfois E _s directe
18 g	0,02			0,10		C
18 h	0,02			0,50		C
18 i	0,02			1,00		C
18 j	0,02				0,50	C
18 k	0,10	0,10				C
18 l	0,10	0,25				C
18 m	0,10	0,50				C
18 n	0,10		0,50			C
18 o	0,50	0,50				C

Tableau 18 : Rôle des régulateurs de croissance dans l'induction de l'embryogenèse somatique au niveau des anthères de l'hybride '474'.

Les observations sont effectuées après 10 jours de contact avec le milieu inducteur à 25° C à l'obscurité.

C : callogenèse plus ou moins importante de toute l'anthère

C_b : Callogenèse basale

E_s : embryogenèse somatique

L'augmentation de la concentration d'ANA dans le milieu de culture favorise la prolifération des tissus des anthères et oriente leur développement vers la callogenèse plutôt que vers l'embryogenèse directe.

Nous avons ainsi adopté pour la suite de notre expérimentation, la combinaison : ANA : 0,02 mg.l⁻¹, 2iP : 0,5 mg.l⁻¹.

2.1.5.2. Apport de l'azote

Il est bien connu que la nature et la concentration des composés azotés présents dans le milieu d'induction jouent un rôle important dans le déclenchement de l'embryogenèse somatique.

Une première série d'essais réalisée uniquement avec des anthères nous a indiqué que pour des quantités globales d'azote allant de 48 à 432,75 mg.l⁻¹ et fournies sous différentes formes (KNO₃ seul, NH₄ NO₃ seul, glutamine seule, KNO₃ + glutamine, NH₄ NO₃ + glutamine) le pourcentage d'anthères embryogènes le plus élevé était obtenu pour une valeur de 336,75 mg.l⁻¹ apportée sous forme de NH₄ NO₃ associé à la glutamine (Tableau 19).

Afin de préciser les effets de la nature de la source d'azote sur les potentialités embryogènes des anthères et des styles, nous avons réalisé une seconde série d'essais où nous avons maintenu constante à 336,75 mg.l⁻¹ la

Milieux	Composés azotés (mg.l ⁻¹)			Quantité globale d'azote (mg.l ⁻¹)	Nombre d'anthers mises en culture	Pourcentages d'anthers embryogènes (%)	Nombre moyen de PE par anthere embryogène
	KNO ₃	NHNO ₃	Gln				
21	0	0	250	48,00	200	13,4	1,4
18	0	0	750	144,00	210	16,2	2,1
20	0	825	0	288,75	75	29,3	3,7
16	475	0	0	65,80	120	0,8	1,0
15	950	0	0	131,60	200	2,0	1,0
17	0	825	250	336,75	62	74,2	3,3
19	0	825	750	432,75	65	49,2	2,7
14	475	0	250	113,80	112	4,4	1,2
13	475	0	750	209,80	118	8,4	1,2

Tableau 19 : Effet de la concentration des composés azotés sur l'embryogenèse somatique des anthers de l'hybride '474'.

Les dénombrements sont effectués après 10 jours de contact avec le milieu inducteur, à 35° C à l'obscurité.

quantité d'azote que nous avons fournie sous différentes formes : KNO_3 seul (milieu 17 f) ou associé à la glutamine (milieu 17 h), NH_4NO_3 seul (milieu 17 d) ou associé à la glutamine (milieu 17, 17 b, 17 c), NH_4Cl seul (milieu 17 e) ou associé à la glutamine (milieu 17 g) ou de la glutamine seule (milieu 17 a).

Les résultats obtenus à la suite de cette expérimentation montrent qu'en faisant varier la nature de la source azotée, la proportion d'anthères embryogènes varie beaucoup plus (3,01 à 67,12 %) que celle des styles réactifs (86 à 100 %) ; inversement le nombre moyen de PE par anthère embryogène varie peu (2,01 à 3,17) alors que pour les styles il varie de plus du double (6,55 à 15,73).

Ainsi le tableau 20 montre que lorsque le milieu de culture contient du nitrate d'ammonium comme seule source azotée, l'addition de glutamine stimule l'embryogenèse somatique des anthères : respectivement 44,98 et 45,84 % d'anthères embryogènes pour l'addition de 125 et 250 mg.l^{-1} de glutamine au lieu de 32,06 % lorsque le nitrate d'ammonium est utilisé seul. Cependant cette action stimulante de la glutamine n'apparaît que si cet acide aminé est apporté à faibles doses (125 ou 250 mg.l^{-1}) pour des doses élevées (750 mg.l^{-1}) la glutamine a plutôt un effet défavorable puisque le pourcentage d'anthères produisant au moins 1 PE se réduit à 17,29 % .

L'action de différentes formes d'azote minéral sur l'embryogenèse somatique a également été examinée et les résultats rapportés dans le tableau 21 indiquent que le nitrate de potassium utilisé comme seule source azotée se montre plus efficace que le nitrate d'ammonium ou le chlorure d'ammonium quant à l'embryogenèse des anthères : 53,79 % d'anthères embryogènes au lieu de 42,10 et 37,03 %.

Milieux	Composés azotés (mg.l ⁻¹)		Explants				Nombre moyen de PE par explant embryogène	
			mis en culture		embryogènes (%)			
	Gln	NH ₄ NO ₃	Anthères	Styles	Anthères	Styles	Anthères	Styles
17 a	1753.9	0	497	100	3.01	86.00	2.01	6.55
17 b	750.0	550.65	532	111	17.29	97.29	2.10	9.03
17	250.0	825.00	517	100	45.84	100.00	2.05	11.08
17 c	125.0	893.57	469	96	44.98	98.95	2.29	10.48
17 d	0	962.14	474	97	32.06	100.00	2.20	9.26

Tableau 20 : Rôle de la glutamine dans l'embryogenèse somatique des anthères et des styles de l'hybride '474'.

Les dénombrements sont effectués après 10 jours de contact avec le milieu inducteur, à 35° C et à l'obscurité.

Milieux	Composés azotés (mg.l ⁻¹)				Explants mis en culture embryogènes (%)				Nombre moyen de PE par explant embryogène	
	KNO ₃	NH ₄ NO ₃	NH ₄ Cl	Gln	Anthères	Styles	Anthères	Styles	Anthères	Styles
17		825		250	284	62	53,52	100	2,09	13,50
17 d		962,14			323	65	42,10	100	2,01	13,02
17 e			1284 (a)		297	43	37,03	100	2,85	11,27
17 f	2424				290	63	53,79	88,88	2,06	8,08
17 g			1101 (b)	250	321	72	47,97	100	2,86	10,71
17 h	2018			250	289	66	67,12	100	3,17	15,73

Tableau 21 : Influence de la nature des composés azotés sur la formation des proembryons (PE), chez l'hybride '474'.
Les dénombrements sont effectués après 10 jours de contact avec le milieu inducteur, à 35° C à l'obscurité.

(a) 1214 mg.l⁻¹ d'acide succinique sont ajoutés à NH₄Cl

(b) 1040 mg.l⁻¹ d'acide succinique sont ajoutés à NH₄Cl

L'addition dans ce cas d'une faible dose de glutamine (250 mg.l^{-1}) fournit le pourcentage d'anthères embryogènes le plus élevé : 67,12 %.

Si les anthères semblent s'accomoder de l'azote nitrique, les formes réduites sont plus favorables à l'embryogénèse des styles, que celle-ci soit exprimée par le pourcentage d'explants embryogènes ou par le nombre de PE formés par chacun d'eux (Tableau 21), l'addition de la glutamine à un milieu renfermant de l'azote réduit reste sans effet sur l'embryogénèse des styles dans la mesure où il y a déjà 100 % d'explants embryogènes avec l'azote réduit seul. Cependant quand le milieu contient de l'azote nitrique, l'apport de glutamine fait passer à 100 % la proportion des styles réactifs et augmente le nombre de PE formés par chacun d'eux : 15,73 au lieu de 8,08 (Tableau 21).

Des différents composés c'est incontestablement la glutamine qui seule est la moins efficace, elle ne permet l'embryogénèse des anthères que dans 3,01 % des cas et avec les styles qui sont cependant plus réactifs, on obtient le nombre le plus faible de PE : 6,55 (Tableau 20).

2.1.5.3. Le saccharose

L'augmentation de la teneur en saccharose dans le milieu d'induction a un effet favorable sur l'embryogénèse (Tableau 22), ainsi après 10 jours de culture le pourcentage d'anthères embryogènes passe de 30,4 % pour une concentration de 5 g.l^{-1} à 90,7 % pour une concentration de 80 g.l^{-1} .

Milieux	Teneur en saccharose (g.l ⁻¹)	Explants mis en culture				Nombre moyen de PE par explant embryogène	
		Anthères	Styles	embryogènes (%) Anthères	Styles	Anthères	Styles
17 i	5	135	27	30,4	100,0	1,87	9,25
17 j	10	125	25	40,8	100,0	1,98	10,20
17	20	155	31	49,7	100,0	2,05	12,03
17 k	30	125	25	52,0	100,0	2,31	12,08
17 l	40	165	33	60,6	100,0	2,42	12,15
17 m	80	150	30	90,7	100,0	2,95	13,33

Tableau 22: Influence de la concentration en saccharose sur la formation de prembryons (PE), chez l'hybride '474'.

Les dénombrements sont effectués après 10 jours de contact avec le milieu inducteur, à 35° C à l'obscurité.

Simultanément le nombre moyen de PE par anthère embryogène augmente de 1,87 à 2,95. Cet effet est moins spectaculaire sur les styles, dans la mesure où il y a déjà 100 % d'explants embryogènes avec 5 g.l⁻¹ de saccharose ; il n'en reste pas moins que le nombre moyen de PE augmente de 9,25 à 13,33 quand la concentration en saccharose est portée à 80 g.l⁻¹.

2.1.6. Influence d'un prétraitement des inflorescences par le froid

Pour tenter de stimuler l'embryogenèse, nous avons soumis des inflorescences prélevées sur un lot homogène de plantes cultivées au champs à des prétraitements au froid (4° C, à l'obscurité) pendant 15 h, 4 jours et 8 jours. Le tableau 23 montre que le froid reste sans aucun effet ni sur le pourcentage d'explants embryogènes (anthères ou styles), ni sur le nombre de proembryons formés.

2.2. Origine des embryons somatiques

2.2.1. Proembryons induits à partir des anthères

Après coloration par la technique de Feulgen améliorée par la "fuchsine phéniquée" les anthères fixées après un contact de 4 jours avec le milieu d'induction ont montré de rares figures de division des microspores qui ne poursuivent pas au delà du stade 2 ou 4 cellules. Ainsi l'origine

Durée de prétraitement à 4° C	Explants				Nombre moyen de PE par explant embryogène	
	mis en culture		embryogènes (%)		Anthères	Styles
	Anthères	Styles	Anthère	Styles		
0	205	41	51,20	95,12	2,13	12,87
15 h	110	22	50,90	95,50	2,23	13,12
4 jours	175	35	49,71	97,10	2,19	12,97
8 jours	180	34	53,3	94,10	1,98	13,02

Tableau 23 : Influence de la durée du prétraitement des inflorescences par le froid (4° C) sur la formation de proembryons (PE), chez l'hybride '474'.

Les dénombrements sont effectués après 10 jours de contact avec le milieu inducteur à 35° C et à l'obscurité.

androgénétique des embryoides formés est une hypothèse qu'il faut écarter. Par contre on observe un très grand nombre de cellules en division à la surface de l'anthere, à la base près de l'insertion du filet, et dans la cavité des microsporangies au niveau du tapis. Ces cellules se détachent et s'organisent en masses globulaires (Planche II, Figures 3, 4 et 5) parfois polarisées (Planche II, Figure 7) qui sont à l'origine de la formation des embryons somatiques (Planche III, Figure 1 et 2).

2.2.2. Proembryons induits à partir des styles

Les observations cytologiques effectuées sur des frottis de tissus de styles éclaircis par une solution de KOH (N) puis colorés par l'acide périodique Schiff et bleu de méthylène, et sur des coupes réalisées à différents niveaux des styles ont révélé une néoformation de trachéides (Planche IV, Figure 3) concomitante à la néoformation de proembryons (Planche IV, Figure 2 ; Planche V, Figure 3). Ces trachéides trouvent leur origine au niveau des cellules de la zone périvasculaire et se distinguent des proembryons par leur aspect allongé (Planche IV, figure 3 ; Planche V, Figure 3). La température lors de la phase d'induction semble le facteur déterminant dans l'initiation de ces éléments lignifiés. En effet seuls les styles placés à 25, 30 et 35° C ont manifesté ce phénomène de néotrachéogenèse.

Ces mêmes observations cytologiques ont révélé deux localisations privilégiées pour la formation des proembryons somatiques : à la surface au niveau de l'épiderme (Planche V, Figure 4 ; Planche VI, Figures 1 et

2) ou très rarement juste en dessous de celui-ci (Planche V, Figure 1), et à l'intérieur des tissus (Planche V, Figure 2 ; Planche VI, figures 1 et 3 ; Planche VIII, Figure 7) à proximité du faisceau vasculaire primitif (Planche IV, figure 2) au contact des files de cellules denses qui se différencient ultérieurement en éléments de trachées du métaxylème (Planche V, figure 3). Cette origine profonde est la plus fréquente (Planche VI, Figure 2).

Dans notre étude l'origine unicellulaire des embryons somatiques a pu être clairement établie ; en effet les premières mitoses qui conduisent à la formation de proembryons ont été facilement observées au niveau de l'épiderme (Planche IV, Figure 6).

2.3. Développement des embryons

2.3.1. Structure des embryons au moment du transfert

Après 10 jours de culture sur le milieu d'induction, des anthères et des styles sont prélevés pour l'étude histologique, le reste du matériel est transféré sur différents milieux conçus pour le développement des embryoides induits.

Les observations microscopiques révèlent que le développement des cellules embryogènes n'est pas synchrone, des stades de différenciation plus ou moins avancés des embryoides se rencontrent au sein d'un même explant

Planche II : Callogenèse, caulogenèse et embryogenèse somatique directe à partir d'anthères de l'hybride *Cichorium intybus* x *Cichorium endivia*.

Figure 1 : Cals d'anthères après 12 jours de culture à 24 + 1° C le jour et 20 + 1° C la nuit.

Figure 2 : Bourgeons néoformés sur un cal d'anthère après deux mois de culture à 24 + 1° C le jour et 20 + 1° C la nuit.

Figure 3 et 4 : Proembryons issus d'anthères () après 4 jours de culture à 35° C et à l'obscurité. Coloration Feulgen puis Fuchsine phéniquée.

Figure 5 : Anthère après 10 jours de culture sur milieu inducteur à 35° C et à l'obscurité, montrant une embryogenèse somatique directe. Noter les localisations diverses des embryoides.

Figure 6 : Style après 10 jours de culture sur milieu inducteur à 35° C et à l'obscurité, montrant des embryoides en surface.

Figure 7 : Anthère de 10 jours de culture dans les conditions ci-dessus citées, illustrant le développement asynchrone des embryoides. Observer des proembryons globulaires en même temps que des embryons avec racine différenciée.

Figure 8 : Etalement de l'apex racinaire prélevé sur un embryon observé sur la figure 7. Les cellules en métaphase montrent $2n = 18$ ch. Coloration Feulgen puis fuchsine phéniquée.

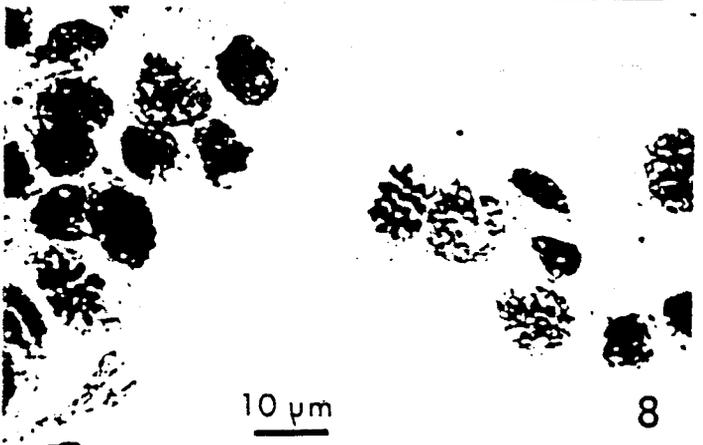
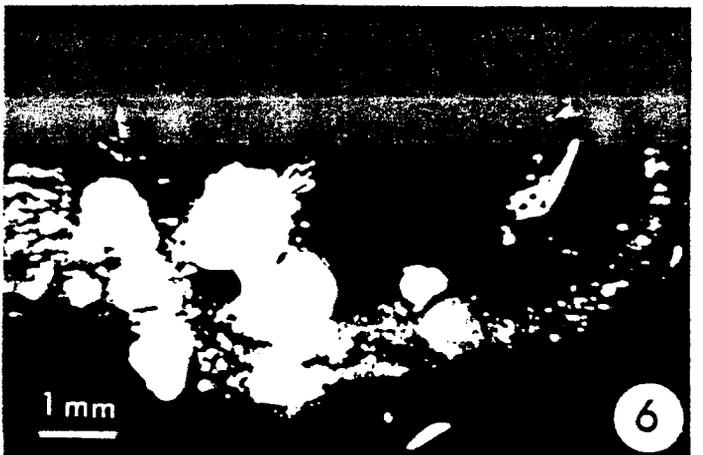
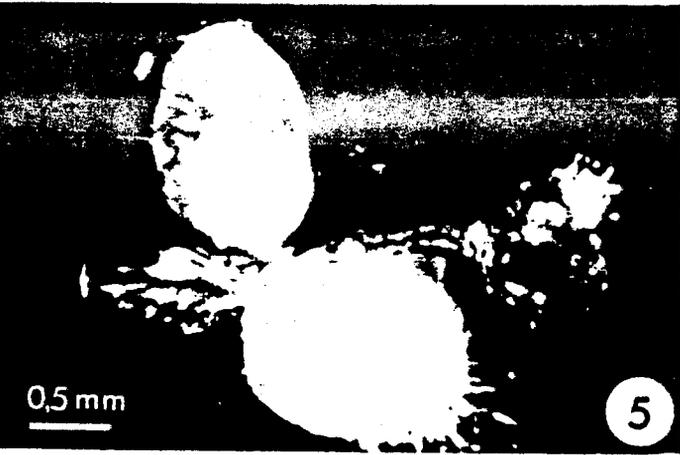
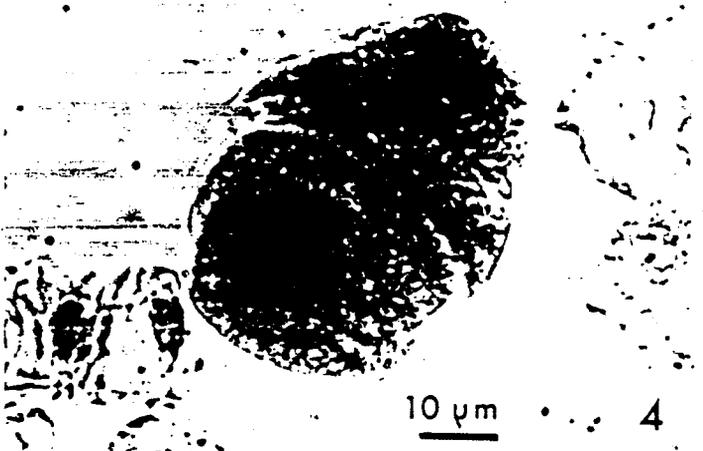
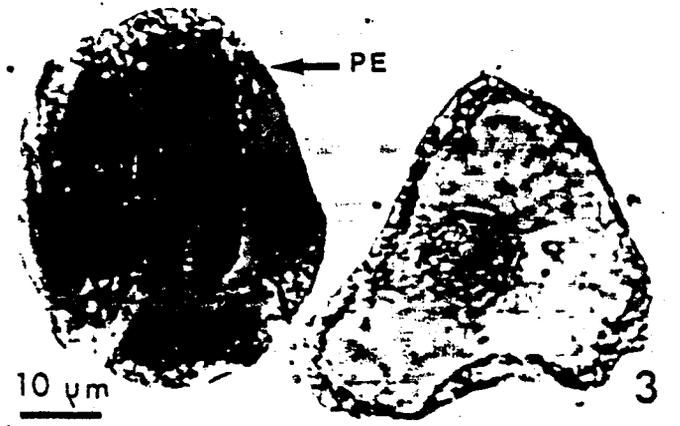
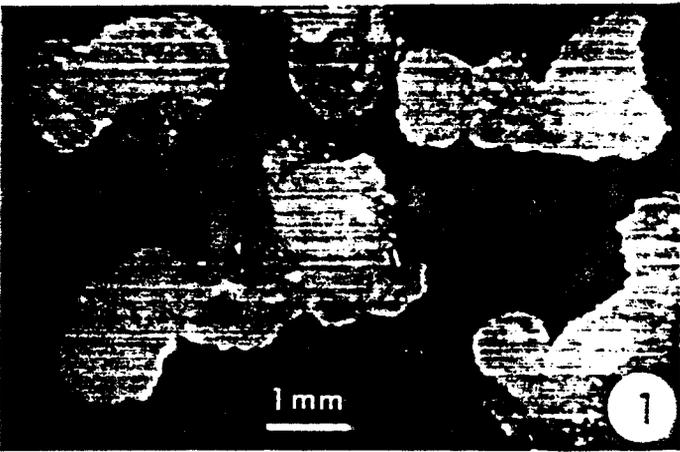


Planche III : Développement des embryoides issus d'anthères de l'hybride *Cichorium intybus* x *Cichorium endivia*

Figures 1 et 2 : Anthères embryogènes, 6 jours (Fig. 1) et 19 jours (Fig. 2) après transfert sur milieu de Heller sans hormones et culture dans une pièce thermostatée (24 + 1° C le jour et 20 + 1° C la nuit). Observer le développement asynchrone des embryoides.

Figure 3 : Anthère embryogène, 2 jours après transfert sur milieu de Heller, et culture dans les conditions ci-dessus citées, montrant à son extrémité basale un embryon présentant deux zones méristématiques opposées entre lesquelles se distinguent des éléments conducteurs constituant les ébauches du faisceau procambial. Eclaircissage par KOH puis coloration APS et bleu de méthylène.

Figure 4 : Embryon somatique issu d'anthère, 16 jours après transfert sur milieu de Heller caractérisé par sa racine pivotante et ses deux feuilles cotylédonaires.

Figure 5 : Plantules issues d'embryoides d'anthères cultivés 1 mois 1/2 sur milieu de Heller en tube.

Figure 6 : Deux lots de plantes issues d'embryoides ; en miniserre : 3 mois après la mise en culture des anthères, en pot : 5 mois après la mise en culture.

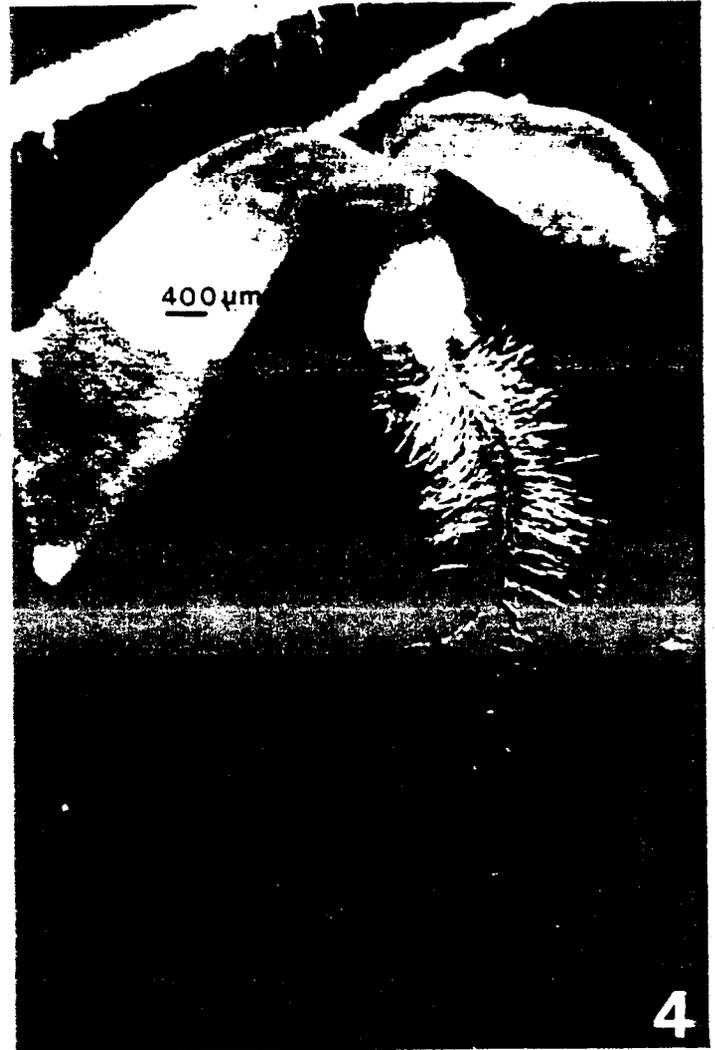


Planche IV : Embryogenèse somatique directe et néotrachéogenèse des styles de l'hybride *Cichorium intybus* x *Cichorium endivia*.

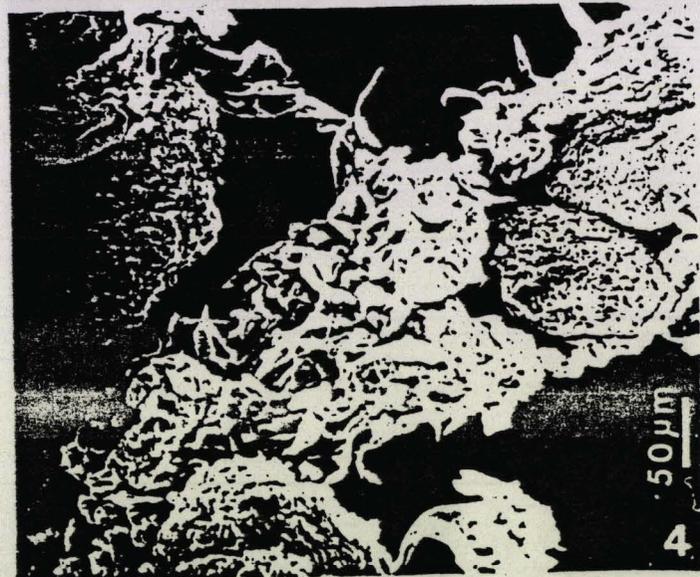
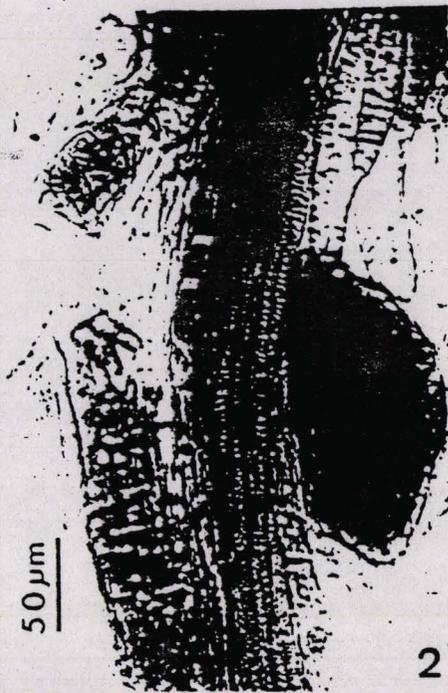
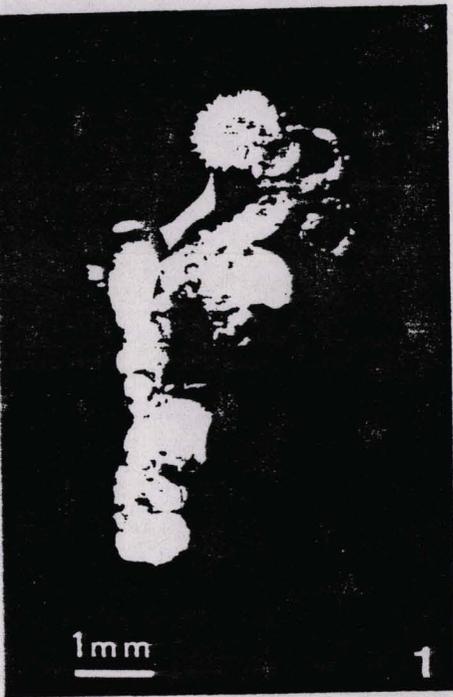
Figure 1 : Style après 10 jours de culture à 35° C et à l'obscurité montrant une embryogenèse somatique directe.

Figure 2 et 3 : Observations microscopiques des tissus de styles après 7 jours de culture à 35° C et à l'obscurité : éclaircissage par KOH puis coloration APS et bleu de méthylène ; Fig. 2 : Embryoïde formé de petites cellules denses méristématiques, localisé à proximité d'un faisceau vasculaire, Fig. 3 : néoformation de trachéides au niveau de la zone périvasculaire.

Figures 4 et 5 : Tissus de styles observés en MEB après 6 jours (Fig. 5) et 10 jours (Fig. 4) de culture à 35° C et à l'obscurité. Observer le développement asynchrone des proembryons.

Figure 6 : Segmentation d'une cellule épidermique, à l'origine des premières cellules d'un proembryon à la surface d'un style mis en culture depuis 7 jours à 35° C et à l'obscurité. Noter le contenu dense de cette cellule embryogène. Eclaircissage par KOH puis coloration APS et bleu de méthylène.

Figures 7 et 8 : Embryoïdes montrant des aspects de progénèse ; ils sont issus de styles après 26 jours de culture (10 jours à 35° C à l'obscurité sur milieu inducteur puis transfert sur milieu de Heller sans hormones à 24° C le jour et 20° C la nuit ; Fig. 7 : Cotylédon massif présentant des pseudopapilles stigmatiques, Fig. 8 : Expansions cotylédonaires rappelant la structure du style.



BU
LILLE

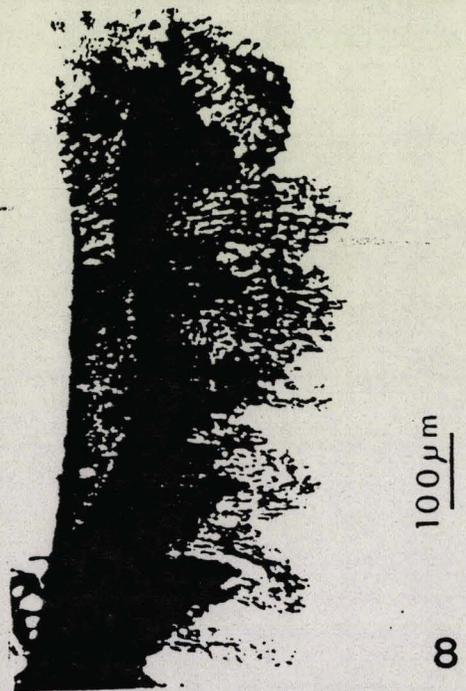


Planche V : Observations cytologiques de tissus de styles embryogènes de l'hybride *Cichorium intybus* x *Cichorium endivia*.

Figure 1 : Coupe longitudinale au niveau des stigmates d'un style cultivé pendant 3 jours à 35° C et à l'obscurité, montrant un proembryon d'origine sous épidermique. Coloration safranine et fast green.

Figure 2 : Coupe longitudinale au niveau de la zone des poils pointus d'un style cultivé pendant 6 jours à 35° C et à l'obscurité. Noter l'origine profonde du proembryon. Coloration safranine et fast green.

Figure 3 : Coupe longitudinale au niveau de la région basale d'un style cultivé pendant 10 jours à 35° C et à l'obscurité. Observer la néoformation simultanée de proembryons et de trachéides à proximité du faisceau vasculaire primitif. Coloration safranine et fast green.

Figure 4 : Coupe longitudinale au niveau de la zone des poils pointus d'un style cultivé pendant 10 jours à 35° C et à l'obscurité, montrant un proembryon d'origine épidermique. Coloration safranine et fast green.

La barre correspond à 50 μm pour les figures 1 et 3 et à 25 μm pour les figures 2 et 4.



(style ou anthère) (planche VI, Figure 1 ; Planche VII, Figures 1, 2 3 et 4 ; Planche VIII, Figure 7) ; plus nombreux sont les embryoides au stade globulaire ou ovoïde, ceux-ci sont constitués de très petites cellules, denses de type méristématique (planche VII, Figures 5 et 6), dont le nombre détermine le diamètre qui peut varier d'une centaine de μm (planche VII, Figure 4 ; Planche VIII, Figures 11 et 12) à plus de 1 mm (planche II, Figures 5 et 6). En même temps d'autres embryoides sont au stade cordiforme avec l'initiation des cotylédons ou déjà au stade torpille (planche III, Figure 1). Moins fréquents sont les embryoides ayant acquis une bipolarité marquée par la localisation des cellules méristématiques aux pôles racinaire et caulinaire (Planche III, Figure 3) , reliés entre eux par un épais faisceau procambial. Certains embryoides présentent déjà une racine sur laquelle se sont développés des poils absorbants (Planche II, Figure 7 ; Planche III, figure 2). Des comptages de chromosomes, au stade métaphase, dans les méristèmes racinaires de ces embryoides montrent $2n = 18$ (Planche II, Figure 8), nombre identique à celui de chacun des parents de l'hybride d'origine.

Dépourvus de lien vasculaire avec les tissus sous-jacents, beaucoup d'embryoides sont peu adhérents aux tissus du style (planche VIII, Figures 8 et 9) ou de l'anthère sur lesquels ils se développent. Certains d'entre eux se détachent spontanément et peuvent poursuivre leur développement à côté des explants sur le milieu gélosé (Planche III, Figure 2)..

Planche VI : Observations cytologiques de tissus de styles embryogènes de l'hybride *Cichorium intybus* x *Cichorium endivia* après 10 jours de culture à 35° C et à l'obscurité.

Figure 1 : Coupe longitudinale d'un style embryogène. Noter les localisations diverses et le développement asynchrone des proembryons. Coloration safranine et fast green.

Figure 2 : Coupe longitudinale dans la partie basale d'un style embryogène montrant l'origine épidermique (Ep), et profonde (Pr) des proembryons. Coloration safranine et fast green.

Figure 3 : Coupe tangentielle dans la partie basale d'un style embryogène. Observer la présence simultanée de proembryons globulaires et cordiformes. Coloration safranine et fast green.

La barre correspond 100 µm.

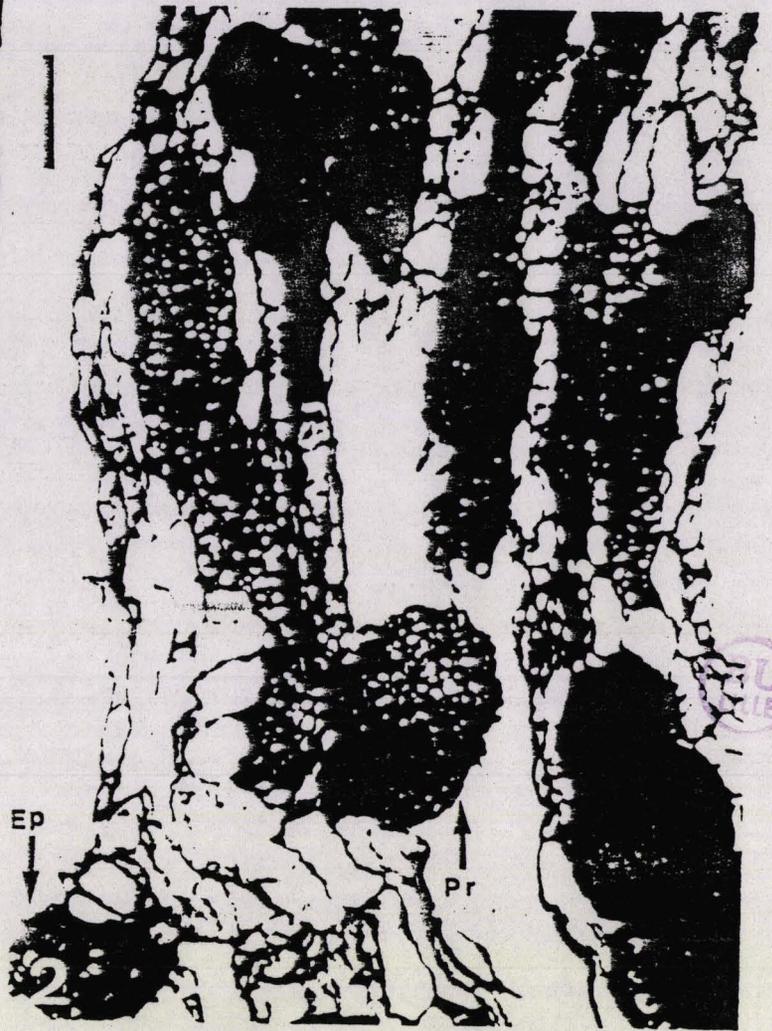


Planche VII : Observation en MEB de tissus de styles embryogènes de l'hybride *Cichorium intybus* x *Cichorium endivia*.

Figures 1, 2, 3 et 4 : Styles observés après 6 jours de culture à 35° C et à l'obscurité. Observer les proembryons peu adhérents aux tissus de styles et montrant un développement asynchrone. (Fig. 2 et 3 : x 450 ; Fig. 1 : x 180 ; Fig. 4 : x 270).

Figures 5 et 6 : Styles observés après 8 jours de culture à 35° C et à l'obscurité. Observer les proembryons constitués de très petites cellules (Fig. 5 : x 180 ; Fig. 6 : x 450).

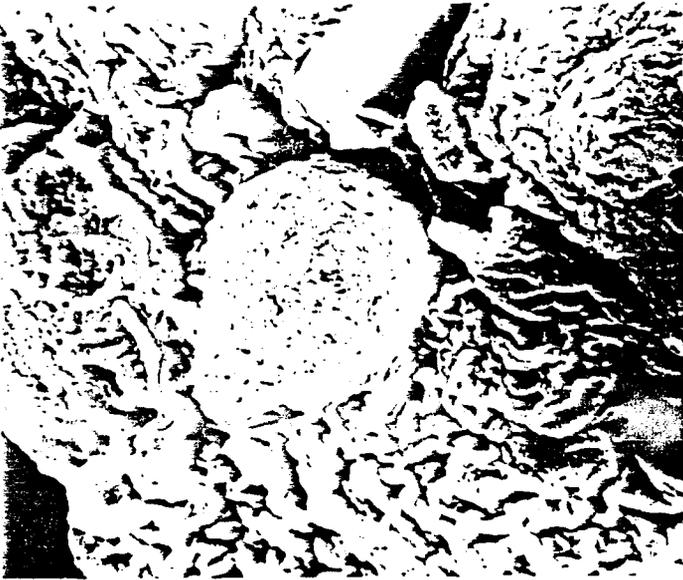
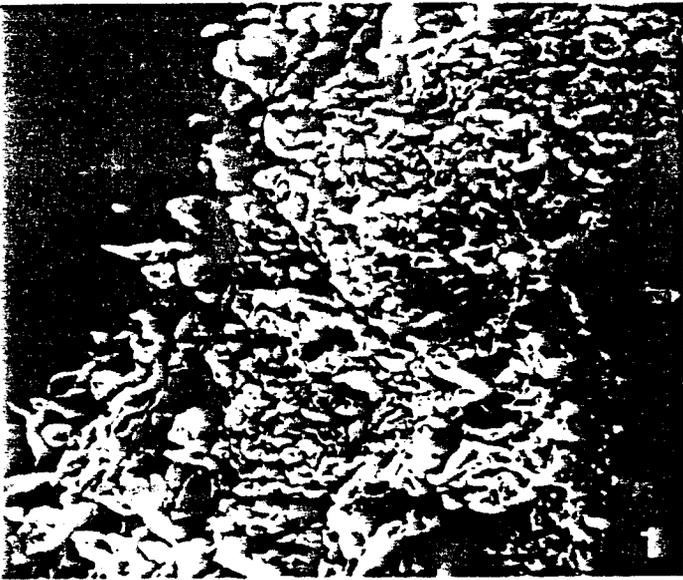
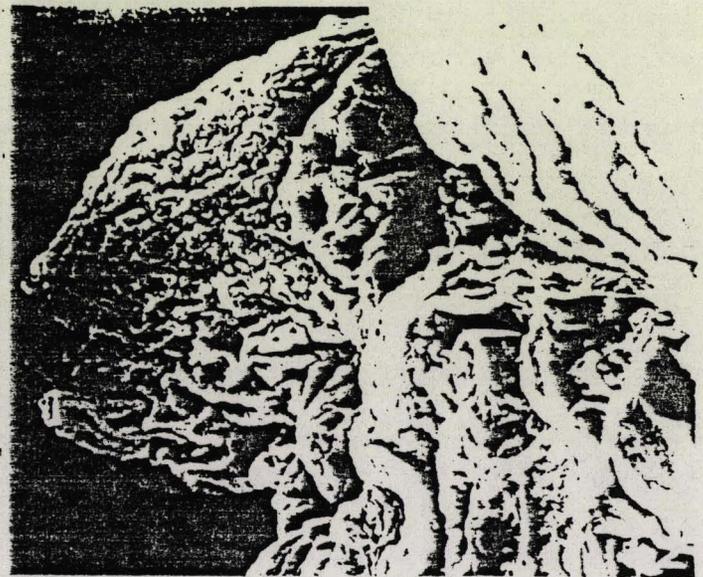
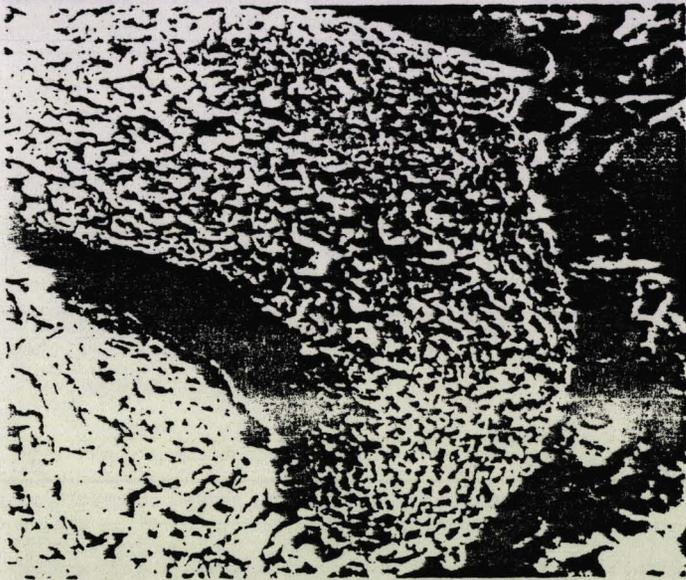
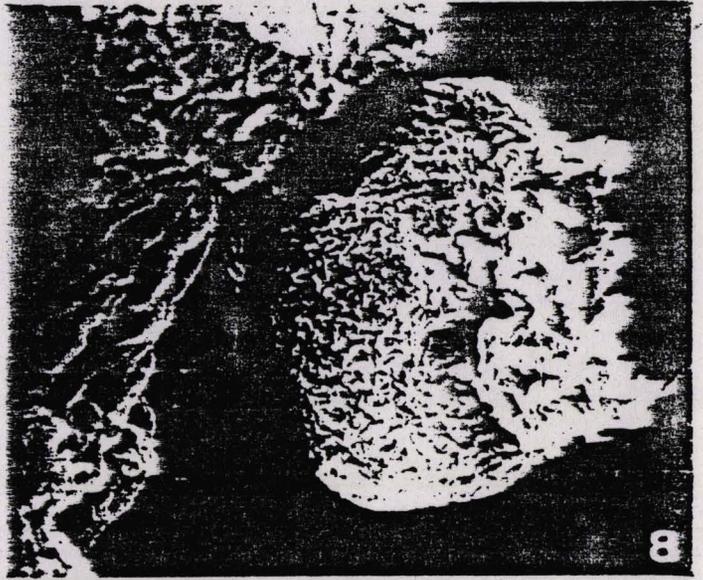
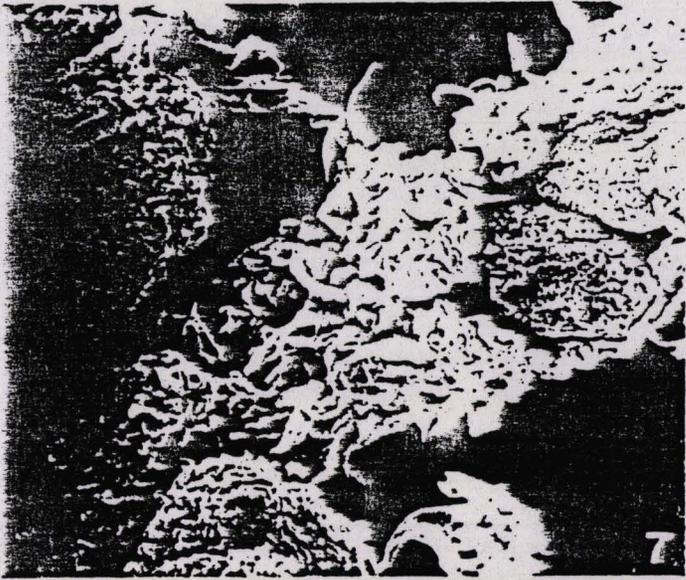


Planche VIII : Observations en MEB de tissus de styles et d'anthers embryogènes de l'hybride *Cichorium intybus* x *cichorium endivia*.

Figures 7, 8 et 9 : Tissus de styles observés après 10 jours de culture à 35° C et à l'obscurité ; Fig. 7 : proembryons formés au niveau de la zone des poils pointus dans les tissus profonds du style (x 180), Fig. 8 : proembryons détaché des tissus de style (x 450) ; Fig. 9 : proembryon peu adhérent aux tissus du style (x 270).

Figures 10, 11 et 12 : Tissus d'anthers observés après 10 jours de culture à 35° C et à l'obscurité ; Fig. 10 : grains de pollen à structure échinolophatée (x 900), Fig. 11 : proembryon formé dans les tissus profonds de l'anthere (x 450) ; Fig. 12 : proembryon formé à la surface de l'anthere (x 450).



BU
LILLE

2.3.2. Influence de la composition du milieu de développement sur l'évolution des embryoides

Pour permettre la maturation des proembryons et la croissance des embryons bipolaires formés lors de la phase initiale de culture, nous avons transféré les anthères et les styles embryogènes sur différents milieux dont nous avons éprouvé l'influence sur la différenciation des embryoides.

Les résultats obtenus montrent que la morphologie et le développement des embryoides sont fortement influencés par la composition du milieu sur lequel on les transfère. La présence d'auxine inhibe le développement des embryoides initiés, et entraîne un épaississement du collet qui se transforme progressivement en cal sur lequel se différencient des racines et quelques ébauches de bourgeons. Ceci est d'autant plus accentué que le rapport auxine/cytokinine est élevé. La BAP utilisée seule provoque l'apparition de plusieurs points végétatifs au pôle caulinaire. Par contre, sur les milieux sans régulateurs de croissance, le développement des embryoides est normal avec des résultats meilleurs sur le milieu de HELLER (1953) plutôt que le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962). Les racines s'allongent d'abord puis les cotylédons verdissent et montrent tous les intermédiaires entre une masse indivise et deux feuilles nettement séparées (Planche III, Figure 4). 7 à 15 jours après ce premier transfert, les embryons somatiques sont repiqués individuellement en tube sur milieu de HELLER (1953) sans hormones où ils se développent en montrant d'une manière caractéristique une racine pivotante (Planche III, Figure 5) qui les différencie rapidement des bourgeons issus de cals (Planche II, Figure 2). Cependant si le milieu de HELLER offre un meilleur

développement des embryoides, le nombre de plantules obtenues reste faible par rapport au nombre de proembryons formés. Les embryoides qui ne se développent pas pourraient présenter une dormance que ni le froid (4°C à l'obscurité) ni l'application de l'AG₃ ($0,1\text{ mg.l}^{-1}$) n'ont pu lever. Nous avons parfois observé des aspects de progénèse. L'accélération du développement des structures florales se manifestent par des cotylédons massifs présentent des papilles allongées qui ressemblent aux papilles stigmatiques ou des expansions multiples munies de poils pointus qui ont la même morphologie que dans la partie moyenne du style (planche IV, Figure 7 et 8)..

2.3.3. Influence de la composition du milieu d'induction sur le développement des embryoides

La composition du milieu de culture lors de la phase d'induction influence le développement des embryoides initiés. Si les anthères et les styles produisent un nombre important de PE en présence de concentrations élevées de saccharose (Tableau 22), par la suite leur évolution est bloquée ; à 40 g.l^{-1} , les PE évoluent difficilement, à 80 g.l^{-1} ceux ci ne se différencient jamais en plantules, ils possèdent des cotylédons anormaux et finissent par produire du cal friable qui les couvre. Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque le milieu d'induction renferme 20 g.l^{-1} de saccharose.

L'initiation d'un nombre important de PE est également favorisée par la présence de KNO_3 dans le milieu d'induction, cependant le développement en plantules est rarement obtenu dans la plupart des cas, on assiste à la formation de cal au niveau du collet avec l'apparition de plusieurs points

végétatifs au pôle caulinaire empêchant ainsi l'évolution normale des PE. La présence de KNO_3 dans le milieu d'induction favorise également la production d'embryons adventifs sur les embryons initialement induits, cependant leur développement n'est pas meilleur que celui des embryons de la première génération. En fait, c'est lorsque le milieu d'induction renferme à la fois des ions NO_3^- , NH_4^+ et de la glutamine que l'évolution des P.E en plantules est la plus satisfaisante : 48,3 % des proembryons issus d'anthers ont donné des plantules.

2.3.4. Passage en serre et conformité des plantes obtenues

2 mois 1/2 après la mise en culture des anthers, les jeunes plantes néoformées sont transférées en miniserre sur un mélange de terreau, et de perlite (60-40) préalablement stérilisé à l'autoclave. Une hygrométrie saturante durant les premiers jours suivie d'une diminution progressive permet une reprise de croissance de tous les vitroplants. Une fois acclimatées, les jeunes plantes sont transférées en pots sur terreau fertilisé et cultivées en serre (Planche III, Figure 6) puis au champs. Jusqu'à présent 4 lots d'une trentaine de plantes chacun ont été menés jusqu'à l'âge de plantes adultes. 115 plantes sur 117 présentaient un phénotype identique à l'hybride d'origine et sont normalement montées à fleurs. Les anthers et les styles mis en culture étaient embryogènes. Les 2 variants obtenus sont caractérisés par des modifications de la morphologie foliaire ; le premier variant était une plante chétive à feuilles très étroites et dentées, nous l'avons perdu avant de pouvoir l'étudier. L'autre, qui montrait des feuilles à larges nervures anthocyanées a progressivement perdu ce caractère au cours de son développement.

DISCUSSION ET CONCLUSION

A l'issue de notre travail, des cals organogènes et des embryons somatiques ont été obtenus à partir d'anthers et de styles isolés cultivés sur des milieux gélosés. La température lors des dix premiers jours de culture ainsi que la composition du milieu et notamment la nature et la concentration des régulateurs de croissance semblent les facteurs prépondérants, contrôlant l'orientation du développement des explants vers la callogénèse ou l'embryogenèse somatique directe.

1) CALLOGENESE ET ORGANOGENESE

A $24 \pm 1^\circ \text{C}$ le jour et $20 \pm 1^\circ \text{C}$ la nuit, et en présence de doses importantes en ANA ($> 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$) et en BAP ($> 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$), la callogénèse est favorisée ; les cals apparaissent rapidement, quelque soit le stade de développement des anthers ensemencées et pour les différents génotypes sur lesquels nous avons travaillé. Toutefois des variations de l'intensité de prolifération sont à signaler. Ainsi, si l'hybride '474' et la Chicorée Witloof 'Zoom' sont facilement callogènes, l'hybride '448' par contre produit des cals beaucoup plus réduits. L'addition de lait de coco dans le milieu de culture permet pour cet hybride peu réactif une stimulation de la prolifération cellulaire. Ce serait la présence d'auxines et de cytokinines au sein de ce liquide naturel (SHANTZ, 1959 ; KOVOOR, 1962, 1964) qui expliquerait en grande partie son action stimulante.

Après transfert des cals sur des milieux inducteurs, de très nombreux bourgeons sont obtenus, il est facile de les faire enraciner *in vitro* puis de les

élever en miniserre. Cette méthode de multiplication clonale nous paraît très intéressante pour multiplier un génotype. En effet le nombre de plantes que l'on peut produire à partir d'une seule inflorescence est très important et la technique permet d'obtenir du matériel aseptique lorsque l'environnement est en mauvais état sanitaire.

Un variant mâle stérile a été décelé parmi les plantes néoformées à partir des anthères de l'hybride '448'. Ce variant à anthères vides et atrophiées ne manifeste ce caractère que pour des températures basses. Cette action de la température sur la stérilité a déjà été observée par SAWHNEY (1983) sur un mutant de Tomate 'Stamenless'. Cependant inversement au *Cichorium*, ce mutant est stérile pour des températures élevées.

Le clonage de cette plante mâle stérile par culture in vitro de fragments de feuilles et de tiges a révélé que la variation n'était pas reproductible, ce qui laisse parler d'une variation physiologique.

2) EMBRYOGENESE SOMATIQUE DIRECTE

La réduction de l'ANA dans le milieu de culture à $0,02 \text{ mg.l}^{-1}$ et l'utilisation de la 2iP ($0,5 \text{ mg.l}^{-1}$) comme cytokinine permet à 35° C et à l'obscurité l'embryogenèse somatique directe.

L'état de compétence des anthères et des styles pour ce type de morphogenèse est étroitement lié au génotype utilisé. Si l'hybride '474' offre une embryogenèse reproductible et abondante, si les Chicorées à café produisent également des proembryons, le cultivar 'Zoom', ses deux parents ainsi que l'hybride '448' ne sont pas embryogènes. Ces variations observées entre génotypes peuvent conduire à deux hypothèses :

- ou bien on peut faire une distinction entre les génotypes aptes et inaptes ; les premiers, du fait de caractéristiques génétiques particulières, à la suite de modifications brutales de leur environnement pourraient induire le développement d'embryons somatiques tandis que les autres n'en seraient pas capables, quelles que soient les conditions de milieu et quelles que soient les conditions de culture

- ou bien tous les génotypes sont aptes à la différenciation d'embryons, mais les conditions propices à leur développement ne sont pas connues. Le problème revient alors à préciser les conditions suffisantes permettant de provoquer le phénomène.

L'effet génotype est un phénomène très général. On peut le citer lors de la production de proembryons haploïdes à partir d'anthers de différentes lignées de *Brassica napus* (THURLING et CHAY, 1984), lors de l'initiation de cal à partir de culture d'anthers de plusieurs cultivars d'*Avena sativa* (RINES, 1983), ou encore lors de la formation d'embryons somatiques à partir d'anthers de plusieurs clones de *Vitis vinifera* (MAURO *et al.*, 1986).

L'ensemencement des anthers à différents stades de développement (allant du stade cellules mères jusqu'au stade grains de pollen mûrs), ainsi que les styles correspondant a montré que l'induction maximale de structures embryonnaires est obtenue lorsque les explants sont aux stades tétrades et microspores. L'établissement d'un critère morphologique permettant d'identifier les différents stades d'évolution ne s'est pas révélé fiable. En effet la méiose et la microgamétogenèse ne sont pas synchrones au sein d'un capitule ni même dans les anthers d'une même fleur. Cependant pour avoir le

maximum de chances de mettre en culture des styles et des anthères aux stades tétrades et microspores, il faut prélever des capitules de 2,5 à 4 mm de long pour l'hybride '474'. Ces dimensions sont toutefois à préciser, en fonction des conditions de culture des plantes.

Dans les mêmes conditions de culture et pour le même stade de développement, les potentialités embryogènes des styles sont beaucoup plus importantes que celles des anthères. Le nombre moyen de proembryons formés par les styles est environ 10 fois supérieur.

La formation préalable de cal est un phénomène très généralement rencontré dans les cas d'embryogenèse somatique (DOS SANTOS *et al.*, 1983 ; HO et VASIL, 1983 ; GREG GOBB *et al.*, 1985 ; HEIRWEGH *et al.*, 1985 ; GRIGA *et al.*, 1987). Chez l'hybride 474, les embryons somatiques se forment directement sur les tissus des anthères et des styles et ils sont décelables dès le 10ème jour de culture. Ce phénomène d'embryogenèse somatique directe est peu répandu, CONGER *et al.* (1983, 1987) l'ont observé chez *Dactylis glomerata* et *Zea mays* et FINER (1987) l'a décrit à partir de *Helianthus annuus*. L'absence de "la phase cal" permet de réduire la fréquence des changements chromosomiques et génétiques dans les plantes régénérées et limite ainsi les variations somaclonales (LARKIN et SCOWCROFT, 1981) qui se produisent lorsque les cellules subissent un cycle de dédifférenciation et redifférenciation (formation de cal et régénération).

Les principaux facteurs contrôlant l'induction des embryoides sont : une température élevée, une alimentation azotée équilibrée, une forte teneur en

saccharose du milieu et la présence de deux régulateurs de croissance, l'ANA et la Zip.

La température semble le facteur déterminant dans l'induction des embryons chez l'hybride '474'. A 15° C et 20° C aucun embryon n'est induit, à 25° C une très faible embryogenèse est parfois observée, cette embryogenèse devient plus importante à 30° C et atteint son maximum à 35° C. Il est probable que la température provoque un stress qui déclenche les premières mitoses des cellules dans les tissus somatiques des anthères et des styles, comme c'est le cas pour d'autres espèces lors de l'androgenèse. Chez *Helianthus annuus* (MEZZAROBBA et JONARD, 1986), *Capsicum annuum* (DUMAS DE VAULX *et al.*, 1981) et *Solanum melongena* (DUMAS DE VAULX et CHAMBONNET, 1982), il s'agit aussi d'une température élevée (35° C), alors que chez *Datura innoxia* (NITSCH et NORREL, 1972), *Nicotiana tabacum* (NITSCH, 1974), *Triticum aestivum* et *Hordeum vulgare* (BOUHARMON, 1977) c'est une basse température (3° C) qui est la plus efficace.

En plus de l'embryogenèse somatique, la température contrôle également une néotrachéogenèse au niveau des tissus des styles ; cette néoformation de trachéides a lieu entre 25 et 35° C avec une induction maximale à 35° C. Il apparaît donc qu'au niveau des styles, les cellules qui entrent en division sous l'action de la température, peuvent être à l'origine de deux types de néoformation : des proembryons et des éléments lignifiés. Pour le moment nous ne connaissons pas le déterminisme de ce changement d'orientation des divisions des cellules.

La nature des composés azotés dans le milieu d'induction peut également être déterminante pour l'obtention d'embryons somatiques. L'apport sous différentes formes d'une même quantité d'azote dans le milieu révèle que l'azote réduit fourni sous forme de nitrate d'ammonium ou de chlorure d'ammonium se montre plus favorable que l'azote nitrique quant à l'embryogenèse somatique des styles. Cette supériorité des composés azotés réduits par rapport aux nitrates a déjà été souligné par WETHERELL et DOUGALL en 1976 puis par KAMADA et HARADA en 1979 lors de l'embryogenèse somatique chez la Carotte. Pour les anthères ceci ne semble pas être vérifié puisque le nitrate de potassium permet une embryogenèse nettement meilleure. La glutamine seule, pourtant favorable à l'embryogenèse somatique des tissus de Carotte (KAMADA et HARADA, 1979) provoque une réponse relativement faible aussi bien pour les anthères que pour les styles. Cependant associée à faible dose au nitrate d'ammonium ou au chlorure d'ammonium, la glutamine présente un effet bénéfique sur l'embryogenèse des anthères. Cette association n'est nullement indispensable à l'embryogenèse des styles dans la mesure où il y a déjà 100 % de styles embryogènes avec l'azote réduit seul. Quand la glutamine est associée à faible dose au nitrate de potassium, elle stimule l'embryogenèse des styles et fournit le pourcentage d'anthère embryogène le plus élevé. L'effet stimulant de la glutamine se retrouve également chez *Daucus carota* (KAMADA et HARADA, 1979), chez *Vitis vinifera* (MAURO *et al.*, 1986), chez *Medicago sativa* (STUART et STRICKLAND, 1984) et chez plusieurs autres espèces.

Lors de la phase d'induction, le saccharose s'est révélé être un facteur limitant du nombre d'embryoïdes formés. Ce nombre est d'autant plus

important que la concentration en saccharose est élevée. Cet effet favorable des teneurs élevées en saccharose peut être du au rôle à la fois nutritionnel et osmotique de cette substance. D'une part l'augmentation du taux de production de proembryons sous l'effet de la pression osmotique peut être dû à la rupture des échanges intercellulaires par l'intermédiaire des plasmodesmes car, d'après STEWARD (1958), l'isolement d'une cellule stimulerait l'activité mitotique et permettrait d'exprimer un programme embryogène. D'autre part en raison de la rapidité de la croissance des proembryons et de l'obscurité, l'effet énergétique du saccharose serait particulièrement net.

L'action bénéfique des fortes concentrations en saccharose se retrouve également chez *Helianthus annuus* (FINER, 1987) et chez *Rumex acetosella* (CULAFIC *et al.*, 1987) ; avec cette dernière espèce, le saccharose joue essentiellement un rôle osmotique.

Le suivi histologique réalisé tout au long de la culture des explantats floraux a permis de préciser l'origine des embryoides formés. Pour les anthères, ces embryoides trouvent leur origine dans des cellules non sporogènes : cellules épidermiques et cellules de l'assise nourricière. Une telle origine somatique des embryons formés à partir des anthères se retrouve également chez *Dactylis glomerata* (SONGSTAD et CONGER, 1986) et *Vitis vinifera* (MAURO *et al.*, 1986). Pour les styles, on observe deux localisations privilégiées pour la formation des proembryons somatiques : au niveau de l'épiderme et à proximité des cordons vasculaires. L'origine épidermique est commune à de nombreux embryoides, tels ceux observés sur les pétales de *Begonia x elatior* (MARGARA et PHELOUZAT, 1984) ou ceux issus des

embryons zygotiques de *Trifolium repens* (MAHESWARAN et WILLIAMS, 1985). Plus fréquente, est l'origine profonde au niveau des cellules périvasculaires à proximité des éléments allongés qui sont à l'origine des futures trachées. On peut penser que cette localisation découle soit d'une meilleure conduction des éléments du milieu à travers le style, soit d'une modification de l'équilibre hormonal à cet endroit due à la néotrachéogenèse. De plus, la zone périvasculaire est bien connue pour sa réactivité et les cellules à ce niveau sont celles qui sont les moins différenciées (CORSI et AVANZI, 1970). C'est là que se différencie chez *Coffea arabica* le cal qui sera ultérieurement embryogène (MICHAUX-FERRIERE *et al.*, 1987). Cette zone est dans notre cas, directement embryogène.

Enfin, si l'origine unicellulaire des embryons somatiques n'a pu être clairement établie chez de nombreuses espèces tel *Sorghum bicolor* par exemple WERNICKE *et al.*, (1982), dans notre étude et plus particulièrement dans le cas des styles de l'hybride '474' les premières divisions qui conduisent à la formation de proembryons ont été facilement observées du moins pour ceux ayant une origine épidermique.

Après l'induction des embryons, le transfert des explants sur milieu de HELLER (1953) sans régulateurs de croissance s'est montré le plus favorable à leur développement. Cependant le nombre de proembryons évoluant en plantules est nettement inférieur au nombre de proembryons induits.

De manière générale le pourcentage de germination des embryons *in vitro* est relativement faible. Les meilleurs taux de germination 40 à 60 %

sont obtenue pour la Carotte (MASUDA *et al.*, 1981). Pour l'hybride '474' le taux de germination des embryons n'a pas été précisément étudié, toutefois on peut signaler que 48,3 % de proembryons issus d'anthères cultivées sur un milieu inducteur renfermant à la fois des ions NO_3^- et NH_4^+ , de la glutamine et 20 g.l^{-1} de saccharose ont évolué en plantules.

L'inaptitude des embryons à se développer en plantules résulte pour la plupart d'un mauvais déroulement de l'embryogenèse aboutissant à des embryons non fonctionnels : embryons à collet épaissi et montrant de multiples points végétatifs. Ceci peut être une conséquence de la composition du milieu d'induction notamment en saccharose et en azote et également une conséquence des conditions de culture à savoir la température et le temps de contact avec le milieu inducteur. De même l'absence de développement des embryons pourrait être due à un phénomène de dormance ; dans ce cas le prétraitement des embryons par le froid humide ou par l'application des gibbérellines exogènes favorise leur germination chez *Eschscholzia* (KAVATHEKAR *et al.*, 1977), *Vitis* cv Gloryvine (RAJASEKARAN et MULLINS, 1979) et *Juglans regia* (TULECK Et McGRANAHA, 1985). Dans notre cas, ces traitements se sont révélés inefficaces. L'essai d'autres traitements tels l'ablation des cotylédons ou encore l'application de la BAP utilisées dans le cas de la Vigne avec succès (MAURO *et al.*, 1986 ; LEBRUN, 1987), pourront peut être vaincre cette éventuelle dormance.

Les jeunes plantes néoformées sont transférables en pot 2 mois et 1/2 après la mise en culture des anthères et des styles. Il n'y a pas de problème d'acclimatation.

Les résultats obtenus avec le génotype '474' montrent que les Chicorées pourraient être propagées par cette méthode avec une rapidité d'obtention de plantes satisfaisante. Nous avons parfois observé une faible prolifération embryogène secondaire, comme c'est le cas chez *Dactylis glomerata* (SONGSTAD et CONGER, 1986) et il devrait être possible de la stimuler si l'on souhaite augmenter le taux de multiplication. Une autre voie serait la réalisation de suspensions cellulaires embryogènes qui permettraient d'utiliser à l'avenir le phénomène comme outil de propagation rapide à grande échelle.

Cependant pour pouvoir utiliser couramment cette technique d'embryogenèse somatique, il est important de vérifier la conformité des plantes produites. A ce sujet, si pour VASIL (1983), HANNA *et al.*, (1984) et MAHESWARAN et WILLIAMS (1987), l'uniformité génétique des plantes néoformées par cette voie de morphogenèse est assurée, pour DALE et JONES (1982), KARP et MADDOCK (1984) et plus récemment ORTON (1985), elle demeure source de variabilité au même titre que l'organogenèse. Dans ce cas elle pourrait être utilisée de manière fructueuse pour la sélection de plantes à caractères intéressants, tels la résistance à des maladies ou à la toxicité de certains éléments du sol. Dans cette optique, la détermination du nombre de chromosomes des somaplants variants ainsi que leur caractérisation biochimique seraient nécessaires.

BIBLIOGRAPHIE

- BACKS-HUSEMANN D. et REINERT J. - 1970. - Embryobildung durch isolierte Einzelzellen aus gewebeulturen von *Daucus carota* Protoplasma, 70, 49-60.
- BESEMER J., HARDEN U. et REINERT J., 1969. - Der Einflub von kinetin und gibberellinsäure auf die organbildung an *in vitro* kultiierten blättern von *Cichorium intybus* L.
Z. Pflanzenphysiol., 60 123-134.
- BINDING H. NEHLS R., KOCK R., FINGER J. et MORDHORST G., 1981. - Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceous species of the Dicotyledoneae class.
Z. Pflanzenphysiol., 101, 119-130.
- BOTTI C. et VASIL I.K., 1984. - Ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum*. II. In cultured immature inflorescences.
Can. J. Bot., 62, 1629-1635.
- BOUHARMONT J., 1977. - Cytology of microspores and calli after anther culture in *Hordeum vulgare*
Caryologia, 30, 351-360.
- 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 explantats.
Bull. soc. bot. Nord Fr., 120, 27-32.
- CARR D.H. et WALKER J.E., 1961. - Carbol fuchsin as a stain for human chromosomes.
Stain Technol, 36, 233-236.
- CATTOIR-REYNAERTS A., DEGRYSE E., VERBRUGGEN I. et JACOBS M., 1983. - Selection and characterization of Carrot embryoid cultures resistant to inhibition by lysine plus threonine.
Biochem. Physiol. Pflanzen, 178, 81-90.
- CONGER B.V., HANNING G.E., GRAY D.J. et Mc DANIEL J.K., 1983. - Direct embryogenesis from mesophyll cells of Orchardgrass.
Science, 221, 850-851.

- CONGER B.V., NOVAK F.J., AFZA R. et ERDELSKY K., 1987. - Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Zea mays*
Plant Cell Reports, 6, 345-347.
- CORSI G. et AVANZI S., 1970. - Cytochemical analyses on cellular differentiation in the root tip of *Allium cepa*
Caryologia , 23, 381-386.
- CREPY L., CHUPEAU M.C. et CHUPEAU Y., 1982. - The isolation and culture of leaf protoplasts of *Cichorium intybus* and their regeneration in to plants.
Z. Pflanzenphysiol., 107, 123-131.
- CULAFIC L., BUDIMIR S., VUJICIC R. et NESKOVIC M., 1987. - Induction of somatic embryogenesis and embryo development in *Rumex acetosella*L.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 11, 133-139.
- DALE P.J., 1980. - Embryoids from cultured immature embryos of *Lolium multiflorum*.
Z. Pflanzenphysiol., 100, 7-73.
- DALE P.J. et JONES M.G.K., 1982. - Studies on callus and plant regeneration from tissues and protoplasts of the forage grass *Lolium multiflorum*.
In : Proceedings of the 5 th international congress of plant tissue and cell culture, Tokyo, Japan, 11-16 July. p. 579-580. Tokyo, Mazuren.
- DALE P.J., THOMAS E., BRETTELL R.I.S. et WERNICKE W., 1981. - Embryogenesis from cultured immature inflorescences and nodes of *Lolium multiflorum*.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1, 47-55.
- DORION N., GODIN B. et BIGOT C., 1984. - Embryogenèse somatique à partir de cultures issues de protoplastes foliaires de *Ranunculus sceleratus*
Can. J. Bot., 62, 2345-2355.
- DOS SANTOS A.V.P., CUTTER E.G. et DAVEY M.R., 1983. - Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa*L. (Alfalfa).
Protoplasma, 117, 107-115.

- DREW R.L.K., 1979. - The development of Carrot (*Daucus carota* L.) embryoids (derived from cell suspension culture) in to plantlets on a sugar-free basal medium.
Hort. Res., 19, 79-84.
- DUBOIS J., DROUJININSKI A. et VASSEUR J., 1988. - Croissance et potentialités organogènes de suspensions cellulaires de *Cichorium intybus* L. var. Witloof;
Bull. soc. bot. fr., Actual. bot. (sous presse).
- DUMAS DE VAULX R. et CHAMBONNET D., 1982. - Culture *in vitro* d'anthers d'Aubergine (*Solanum melongena* L.) : stimulation de la production de plantes au moyen de traitements à 35° C associés à des faibles teneurs en substances de croissance
Agronomie, 2, 983-988.
- DUMAS DE VAULX R., CHAMBONNET D. et POCHARD E., 1981. - Culture *in vitro* d'anthers de piment (*Capsicum annuum* L.) : amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à 35° C.
Agronomie., 1, 859-864.
- EPSTEIN E., KOCHBA J. et NEUMANN H., 1977. - Metabolism of indoleacetic acid by embryogenic, and non embryogenic callus lines of Shamouti' orange (*Citrus sinensis* Osb.).
Z. Pflanzen. Physiol., 85, 263-268.
- ESAN E.B., 1973. - A detailed study of adventive embryogenesis in the Rutaceae.
Ph D Dissertation. Univ. California, Riverside.
- FINER J.J., 1987. - Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.)
Plant Cell Reports, 6, 372-374.
- FUJIMURA T. et KOMAMINE A., 1975. - Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a Carrot cell suspension culture.
Plant Science Letters, 5, 359-364.

- FUJIMURA T. et KOMAMINE A., 1980. - The serial observation of embryogenesis in a Carrot cell suspension culture.
New Phytol., 86, 213-218.
- GAMBORG O.L., MILLER R.A. et OJIMA K., 1968. - Nutrient requirements of suspension cultures of Soybean root cells.
Cell Res., 50, 151-158.
- GAUTHERET R.J., 1941. - Recherches expérimentales sur la polarité des tissus de la racine d'Endive.
C.R. Acad. Sci., Paris, 213, 37-39
- GRAY D.J, CONGER B.V. et HANNING G.E., 1984. - Somatic embryogenesis in suspension and suspension derived callus cultures of *Dactylis glomerata*
Protoplasma, 122, 196-202.
- GREG COBB B., VANDERZEE D., LOESCHER W.H. et KENNEDY R.A., 1985. - Evidence for plantlet regeneration via somatic embryogenesis in the grasses *Echinochloa muricata* and *E. crus-galli* var. *Oryzicola*.
Plant Science 40, 121-127.
- GRIGA M., KUBALAKOVA M. et TEJKLOVA E., 1987. - Somatic embryogenesis in *Vicia faba* L.
Plant Cell Tissue and Organ Culture, 9, 167-171.
- GUPTA P.K., KENDURKAR S.V., KULKARNI V.M., SHIRGURKAR M.V. et MASCARENHAS A.F., 1984. - Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro*
Plant Cell Reports, 3, 222-225.
- HALPERIN W., 1966. - Alternative morphogenetic events in cell suspensions.
Am. J. Bot., 53, 443-453.
- HALPERIN W. et JENSEN W.A., 1967. - Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in Carrot cell cultures.
J. Ultrastructure Research, 18, 428-443.
- HALPERIN W. et WETHERELL D.F., 1964. - Adventive embryony in tissue cultures of the wild Carrot, *Daucus carota*
Am. J. Bot., 51, 274-283.

- HALPERIN W. et WETHERELL D.F., 1965. - Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*
Nature, 205, 519-520.
- HANNA W.W., LU C. et VASIL I.K., 1984. - Uniformity of plants regenerated from somatic embryos of *Panicum maximum* (Guinea grass).
Theor. Appl. Genet., 67, 155-159.
- HEIRWEGH K.M.G., BANERJEE N., Van NERUM K. et De LANGHE E., 1985. - Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cichorium intybus* L. (Witloof, Compositae).
Plant Cell Reports, 4, 108-111
- HELLER R., 1953. - Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*
Ann. Sci. Nat. Biol. vég., 14, 1-123.
- HO W.J. et VASIL I.K., 1983. - Somatic embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos.
Protoplasma, 118, 169-180.
- JENSEN W.A., 1962. - Botanical histochemistry. Freeman and Co. San Francisco London.
- JONES L.H., 1974. - Factors influencing embryogenesis in Carrot cultures (*Daucus carota* L.)
Ann. Bot., 38, 1077-1081.
- KAMADA H. et HARADA H., 1979. - Studies on the organogenesis in Carrot cultures. II. Effects of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis.
• Z. Pflanzenphysiol., 91, 453-463.
- KARP A. et MADDOCK S.E., 1984. - Chromosome variations in wheat plants regenerated from cultivated immature embryos.
Theor. Appl. Genet., 67, 249-255.
- KATO H. et TAKEUCHI M., 1966. Embryogenesis from the epidermal cells of Carrot hypocotyl.
Sci. Pap. Coll. Gen. Ed. Univ. Tokyo, 16, 245-254.

- KAVATHEKAR A., GANAPATHY P.S. et JOHRI B.M., 1977. - Chilling induces development of embryoids in to plantlets in *Eschscholzia*
Z. Pflanzenphysiol., 81, 358-363.
- KEVERS C., COUMANS M., DE GREEF W., JACOBS M. et GASPAR T., 1981. - Organogenesis in habituated Sugarbeet callus : auxin content and protectors, peroxidase pattern and inhibitors.
Z. Pflanzenphysiol., 101, 79-87.
- KOCHBA J., LAVÉE S. et SPIEGEL-ROY P., 1977. - Differences in peroxydase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamouti' orange ovular callus lines.
Plant Cell physiol., 18, 63-467.
- KONAR R.N., THOMAS E. et STREET H.E., 1972 a. - Origine and structure of embryoids arising from epidermal cells of the stem of *Ranunculus sceleratus* L.
J. Cell. Sci., 11, 77-93.
- KONAR R.N., THOMAS E. et STREET H.E., 1972 b. - The diversity of morphogenesis in suspension cultures of *Atropa belladonna* L.
Ann. Bot., 36, 249-258.
- KOVOOR A., 1962. - Essai d'isolement d'un régulateur de croissance présent dans le lait de coco.
C.R. Acad. Sci. Paris, 255, 1991-1993.
- KOVOOR A., 1964. - Action du lait de coco sur la prolifération des tissus de Topinambour cultivés *in vitro* Dans : "Régulateurs naturels de la croissance végétale".
Colloques internationaux du CNRS n° 123, Gif sur Yvette, 83-96.
- KYSELY W., MYERS J.R., LAZZERI P.A., COLLINS G.B. et JACOBSEN H.J., 1987. - Plant regeneration via somatic embryogenesis in Pea (*Pisum sativum* L.).
Plant Cell Reports., 6, 305-308.
- LARKIN P.J. et SCOWCROFT W.R., 1981. - Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement.
Theor. Appl. Genet., 60, 197-214.

- LEBRUN L., 1987. - Etude de l'embryogenèse somatique *in vitro* chez la Vigne (*Vitis* sp.) et application à la sélection de plantes tolérantes de fortes concentrations en chlorure de sodium.
Thèse Univ. Paris-Sud, Orsay, 145 p.
- LEFEBVRE R., 1976. - Influence de l'anaérobiose sur le bourgeonnement de tissus de racine d'Endive (*Cichorium intybus* L.).
Rev. Cytol. Biol. vég., 40, 185-291.
- LINACERO R. et VAZQUEZ A.M., 1986. - Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of Rye (*Secale cereale* L.).
Plant Science, 44, 219-222.
- LOUANT B.P. et LONGLY B., 1981. - Correspondances chronologiques entre les sporogénèses et gamétogénèses mâles et femelles chez *Cichorium intybus* L. (Chicorée de Bruxelles).
Rev. Cytol. Biol. végét. Bot., 4, 187-201.
- MAHESWARAN G. et WILLIAMS E.G., 1985. - Origin and development of somatic embryos formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro*
Ann. Bot., 56, 619-630.
- MAHESWARAN G. et WILLIAMS E.G., 1986. Direct secondary somatic embryogenesis from immature sexual embryo of *Trifolium repens* cultured *in vitro*
Ann. Bot., 57, 109-117.
- MAHESWARAN G. et WILLIAMS E.G., 1987. - Uniformity of plants regenerated by direct somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Trifolium repens*
Ann. Bot., 59, 93-97.
- MARGARA J. et PHELOUZAT R., 1984. - Structure et ontogenèse des néoformations observées *in vitro* sur le pétale de *Begonia x elatior*.
Can. J. Bot., 62, 2798-2803.
- MARGARA J. et RANCILLAC M., 1966. - Observations préliminaires sur le rôle du milieu nutritif dans l'initiation florale des bourgeons néoformés *in vitro* chez *Cichorium intybus* L.
C. R. Acad. Sci., 263, 1455-1458.

- MASUDA K, KIKUTA Y. et OKAZAWA Y., 1981. - A revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot suspension culture.
J. Fac. Agr. Hokkaido Univ., 60 183-193.
- MAURO M. CL., NEF C. et FALLOT J., 1986. - Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon.
Plant Cell Reports, 5, 377-380.
- McHUGHEN A. et SWARTZ M., 1984. - Embryo formation in cell cultures of the legume *Cyamopsis tetragonoloba*. (*Guar*).
J. Plant Physiol., 117, 163-167.
- Mc WILLIAM A.A., SMITH S.M. et STREET H.E., 1974. - The origin and development of embryoids in suspension cultures of Carrot (*Daucus carota*).
Ann. Bot., 38, 243-250.
- MEZZAROBBA A. et JONARD R., 1986. - Effets du stade de prélèvement et des prétraitements sur le développement *in vitro* d'anthers prélevées sur le Tournesol cultivé (*Helianthus annuus* L.).
C.R. Acad. Sc. Paris, 303, 181-186.
- MICHAUX-FERRIERE N., DUBLIN P. et SCHWENDIMAN J., 1987. - Etude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explants foliaires de *Coffea arabica* L.
Café Cacao Thé, 31, 103-111.
- MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962. - A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., 15, 473-497.
- NITSCH C., 1974. - La culture de pollen isolé sur milieu synthétique.
C. R. Acad. Sc. Paris, 278, 1031-1034.
- NITSCH C. et NORREEL B., 1972. - Factors favoring the formation of androgenetic embryos in anther culture.
XII Congreso de Biología Basica (Cali, Colombie), In : Genes, Enzymes and Population, Plenum Press.

- NOVAK F.J. et KONECNA D., 1982. - Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures of Alfalfa (*Medicago sativa* L.).
Z. Pflanzenphysiol., 105, 279-284.
- ORTON T.J., 1985. - Genetic instability during embryogenic cloning of Celery.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture., 4, 159-169.
- PEDERSON G.A., 1986. - *In vitro* culture and somatic embryogenesis of four *Trifolium* species.
Plant Science, 45, 101-104.
- PRAT R. et POIRIER-HAMON S., 1975. - Caractéristiques ultrastructurales des parois cellulaires d'embryoïdes obtenus à partir de protoplastes d'*Antirrhinum majus* L.
Protoplasma, 86, 175-187.
- RAJASEKARAN K. et MULLINS M.G., 1979. - Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines.
J. Exp. Bot., 30, 399-407.
- REINERT J., 1959. - Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten.
Planta, 88, 318-333.
- REINERT J., TAZAWA M. et SEMENOFF S., 1967. - Nitrogen compounds as factors of embryogenesis *in vitro*
Nature, 216, 1215-1216.
- REYNOLDS T.L., 1986. - Somatic embryogenesis and organogenesis from callus cultures of *Solanum carolinense*.
Am. J. Bot., 73, 914-918.
- RINES H.W., 1983. - Oat anther culture : genotype effects on callus initiation and the production of a haploid plant.
Crop Science, 23, 268-272.
- ROSE D. et MARTIN S.M., 1974. - Parameters for growth measurement in suspension cultures of plant cells.
Can. J. Bot., 2, 903-912.

- RUBOS A.C., 1985. - Isolation and culture of single cells from Carrot embryos.
Plant Science, 38, 107-110.
- SAKSI N., DUBOIS J., MILLECAMPS J.L. et VASSEUR J., 1986. - Régénération de plantes de chicorée Witloof cv. 'Zoom' à partir de protoplastes : influence de la nutrition glucidique et azotée.
C. R. Acad. Sc. Paris, 302, 165-170.
- SAWHHNEY V.K., 1983. - The role of temperature and its relationship with gibberellic acid in the development of floral organs of tomato (*Lycopersicon esculentum*).
Can. J. Bot., 61, 1258-1265.
- SONGSTAD D.D. et CONGER B.V., 1986. - Direct embryogenesis from cultured anthers and pistils of *Dactylis glomerata*
Am. J. Bot., 73, 989-992.
- STEWART F.C., 1970 - From cultured cells to whole plants : the induction and control of their growth and morphogenesis.
Proc. Roy. Soc. Lond., 175, 1-30.
- STEWART F.C., KENT A.E. et MAPES M.O., 1966. - The culture of free plant cells and its significance for embryology and morphogenesis.
p. 113-154. In A. MONROY and A.A. MOSCONA (eds). Current topics of developmental biology. 1. Academic Press, New York.
- STEWART F., MAPES M. et SMITH J., 1958. - Growth and organised development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells.
Am. J. Bot., 45, 693-713.
- STUART D.A. et STRICKLAND S.G., 1984. - Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L.. I. The role of amino acid additions to the regeneration medium.
Plant Science letters, 34, 165-174.
- SUZICH J.A., RANJEVA R., HASEGAWA P.M. et HERRMANN K.M., 1984. - Regulation of the shikimate pathway of Carrot cells in suspension culture.
Plant Physiol., 75, 369-371.

- THOMAS M.R. et SCOTT K.J., 1985. - Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus initiated from immature embryos and immature inflorescences of *Hordeum vulgare*.
J. Plant Physiol., 121, 159-169.
- THURLING N. et CHAY P.M., 1984. - The influence of donor plant genotype and environment on production of multicellular microspores in cultured anthers of *Brassica napus* ssp. *oleifera*.
Ann. Bot., 54, 681-693.
- TISSERAT B., ESAN E.B., et MURASHIGE T., 1979. - Somatic embryogenesis in Angiosperms.
Hortic. Rev., 1, 1-78.
- TISSERAT B. et MURASHIGE T., 1977. - Repression of asexual embryogenesis *in vitro* by some plant growth regulators.
Vitro, 13, 799-805.
- TORELLO W.A., SYMINGTON A.G. et RUFNER R., 1984. - Callus initiation, plant regeneration and evidence of somatic embryogenesis in red Fescue.
Crop Sci., 24, 1037-1040.
- TULECKE W. et McGRANAHAN G., 1985. - Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L.
Plant Science., 40, 57-63.
- VARDI A., SPIEGEL-ROY P. et GALUN E., 1975. - Citrus cell culture : Isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos.
Plant Sci. Letters, 4, 231-236.
- VASIL I.K., 1983. - Regeneration of plants from single cells of cereals and grasses. In : Genetic engineering in Eukaryotes.
P.F. LURQUIN, A. KLEINHOF S Eds New York, Plenum Publishing Corporation. P 233-252.
- VASIL I.K. et HILDEBRANDT A.C., 1966. - Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures. I. *Cichorium endivia*
Am. J. Bot., 53, 860-869.

- VASIL I.K., HILDEBRANDT A.C. et RIKER A.J., 1964. - Endive plantlets from freely suspended cells and cell groups grown *in vitro*
Science, 146, 76-77.
- VASIL V. et VASIL I.K., 1982. - The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. I. In cultured immature embryos.
Bot. Gaz., 143, 454-465.
- VASSEUR J., 1979. - Etude du bourgeonnement de fragments de feuilles étiolées d'Endive. I. Formation de bourgeons en fonction de caractéristiques physiologiques.
Rev. Gén. Bot., 86, 35-106.
- VERNICKE W., POTRYKUS I. et THOMAS E., 1982. - Morphogenesis from cultivated leaf tissue of *Sorghum bicolor*. The morphogenetic pathways.
Protoplasma, 11, 53-62.
- WETHERELL D.F. et DOUGALL D.K., 1976. - Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild Carrot tissue.
Physiol. Plant, 37, 97-103.
- WHITE Ph. R., 1943. - A handbook of plant tissue culture.
The Jaques Cattell Press éd., Lancaster, 277 p.
- WILLIAMS E.G. et MAHESWARAN G., 1986. - Somatic embryogenesis : Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group.
Ann. Bot., 57, 443-462.

RESUME

La culture *in vitro* de pièces florales prélevées dans des inflorescences de plusieurs génotypes de Chicorée a permis l'obtention de plantes selon deux modes de néoformation :

- Une organogenèse, par élaboration de bourgeons sur des cals initiés à partir d'anthers de trois hybrides de *Cichorium* ('Zoom', '474' et '448'). La callogenèse est favorisée à 24° C sur des milieux de culture renfermant de l'acide naphthalène acétique et de la 6-benzylaminopurine à des concentrations $> 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$.

- Une embryogenèse somatique, par obtention directe d'embryons à partir des anthers et des styles de l'hybride '474'. Les explants aux stades tétrades et microspores sont les plus réactifs. La durée de la phase d'induction, la température, la nature du milieu nutritif et plus particulièrement la concentration du saccharose, des substances de croissance (acide naphthalène acétique et 6-diméthylallylaminopurine) et la nature de la source azotée, sont les principaux facteurs contrôlant l'embryogenèse chez cet hybride. Dans les meilleures conditions, 100 % des styles et 90 % des anthers sont embryogènes avec respectivement 10 à 30 et 2 à 4 proembryons par explant embryogène. 10 à 20 % des proembryons évoluent normalement, et les plantes obtenues sont phénotypiquement conformes.



Mots clés : Embryons somatiques, bourgeons, anthers, styles, *Cichorium*, culture *in vitro*