

PHYSIOLOGIE CELLULAIRE VÉGÉTALE. — *Culture de tissus et de protoplastes de Sesbania rostrata*. Note de **Janina Hanower**, **Geneviève Cas** et **Philippe Bouvet**, présentée par Roger Gautheret.

La régénération des plantes de *Sesbania rostrata* à partir de cals issus de fragments de tiges est obtenue. Le procédé d'isolement et de culture de protoplastes de mésophylle foliaire est décrit. Il permet d'obtenir des protoplastes viables qui se divisent activement en formant des colonies cellulaires, puis des cals. Après transfert des cals sur différents milieux de régénération, on observe la formation de pro-embryons, de structures ressemblant à des bourgeons ainsi que, plus rarement, des pousses ou des racines.

PLANT CELL PHYSIOLOGY. — Tissue and protoplast culture of *Sesbania rostrata*.

Plants were regenerated from stem derived callus of *Sesbania rostrata*. Protoplast culture technique for further use in somatic fusion with other *Sesbania* was developed. Mesophyll protoplasts isolated from greenhouse grown plants of *S. rostrata* divided and formed callus but were recalcitrant to regeneration. Only pro-embryo- and bud-like formations and rare shoots or roots were observed.

INTRODUCTION. — *Sesbania rostrata* est une Légumineuse tropicale annuelle originaire d'Afrique de l'Ouest. Elle pousse spontanément dans la région du Sahel, dans les sols inondés pendant la saison des pluies. Son intérêt particulier réside en sa capacité exceptionnellement élevée de fixer l'azote atmosphérique grâce à la présence de deux types de nodules à *Rhizobium*, racinaires et aériens, ces derniers très abondants, disposés le long de la tige [1].

Les essais d'utilisation de *S. rostrata* en tant qu'engrais vert dans les rizières, au Sénégal, se sont montrés très probants.

Il aurait été intéressant de pouvoir transmettre ce caractère particulier de *S. rostrata* à d'autres espèces du genre utilisées comme fourrage ou comme engrais vert dans les régions tropicales, en faisant appel aux techniques d'hybridation somatique. L'objectif du présent travail a été d'élaborer un procédé d'isolement et de culture de protoplastes en vue d'une telle hybridation. A notre connaissance, aucune étude concernant les protoplastes du genre *Sesbania* n'a été, à ce jour, réalisée.

Au préalable, nous avons étudié le potentiel de régénération *in vitro* de *S. rostrata*, en culture de tissus.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — *Matériel végétal*. — Les graines de *Sesbania rostrata* sont trempées pendant 1 h dans l'acide sulfurique concentré, rincées à l'eau et placées à l'étuve à 30°C. Après germination, les plantes sont cultivées en serre chauffée (25°C) à Bondy, sous faible éclairage et arrosage abondant.

Prélèvement et culture des fragments de tiges et régénération des plantes. — Les entre-nœuds sont prélevés sur la partie médiane de la tige des plantes âgées de 3-4 mois. La désinfection à l'eau de Javel à 12° est suivie de rinçages à l'eau stérile. A différentes étapes de culture, le milieu de Murashige et Skoog [2] est utilisé avec variantes ne portant que sur les hormones. Les fragments de tiges de 1 à 2 cm de longueur sont mis en culture sur milieu gélosé contenant benzylaminopurine (BAP) (1 mg.l^{-1}) et acide β -indole butyrique (AIB) ($0,05 \text{ mg.l}^{-1}$). Les cals obtenus sont transférés sur milieux contenant BAP ($0,25$ à 2 mg.l^{-1}) et acide α -naphtalène acétique (ANA) ($0,5$ à 2 mg.l^{-1}). L'induction des racines sur les pousses feuillées formées est réalisée en milieu liquide, en présence de 5 mg.l^{-1} d'ANA. La rhizogénèse a lieu sur milieu sans hormones, dilué au demi et gélosé. Les plantes ainsi produites sont transférées en serre, sur terreau.

Isolement et culture de protoplastes de mésophylle foliaire et essais de régénération. — Les protoplastes sont isolés à partir de jeunes feuilles bien dépliées (2°-3° à partir du sommet) de plantes âgées de 2 à 4 mois, au stade végétatif ou à la floraison. On laisse flotter les feuilles, soit sur H_2O [3], soit sur une solution de sels de Frearson [4] additionnée de mannitol ($0,4$ à $0,6 \text{ M}$), $\text{pH} = 5,8$, à l'obscurité, à la température ambiante, pendant 6 à 8 h précédant l'attaque enzymatique. Après immersion des feuilles dans l'alcool à 70%, désinfection à l'hypochlorite de calcium à 5% et rinçages à l'eau stérile, les folioles sont découpées en lamelles de 1-2 mm de largeur sur une toile de nylon immergée dans la solution de sels de Frearson-mannitol, puis mises en incubation

avec des enzymes. La solution enzymatique est constituée de : Cellulase Onozuka R-10 (2%), Driselase (0,25%), Hemicellulase (1%), Macerozyme R-10 (0,5%) et Pectolyase Y-23 (0,15%), dissoutes dans la solution de sels de Frearson-mannitol. Elle est utilisée telle quelle pour l'attaque courte (3-4 h à 28°C) ou diluée au tiers avec la même solution pour l'attaque longue (14-16 h à la température ambiante). A la fin de la macération, les protoplastes sont libérés dans le milieu de culture sans hormones, recueillis par centrifugation (80 × g, 4 mn) et rincés deux fois dans les mêmes conditions. Les protoplastes peuvent également être purifiés sur gradient discontinu de Percoll (30, 40 et 50%; 200 × g, 6 mn), mais avec pertes. Les protoplastes sont mis en suspension dans le milieu de culture à la densité de 10^3 ml^{-1} à $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$. Deux milieux de culture sont utilisés : milieu de Belliard et Pelletier [5] simplifié, sans saccharose ni sérum albumine, et milieu de Kao [6]. Les deux sont additionnés de mannitol et (ou) de glucose à la pression molaire finale de 0,4 à 0,6 M, et de différentes combinaisons d'auxines et de cytokinines : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2.4-D) (0,2 à 5,5 mg.l^{-1}), ANA (1 à 2 mg.l^{-1}), BAP (0,4 à 1 mg.l^{-1}), Kinétine (1 à 2 mg.l^{-1}) et Zéatine (0,5 mg.l^{-1}). Les protoplastes sont cultivés soit en gouttes de 50-100 μl déposées au fond des boîtes de Petri, soit en film liquide mince, dans des boîtes multiloges ou dans des boîtes de Petri prétraitées « Greiner », à la température de 27°C, sous différents éclairagements (obscurité, lumière, et obscurité puis lumière). La culture de protoplastes est réalisée sans ou avec dilution progressive du milieu en apportant, à intervalles réguliers, du milieu frais à pression osmotique de plus en plus faible et renfermant un peu moins d'hormones [7]. Le taux de survie et l'efficacité d'étalement (nombre de cellules en division par rapport au nombre de protoplastes ayant survécu) sont mesurés 7, 14 et 21 jours après la mise en culture.

Les colonies cellulaires, les microcals (de 0,5 mm) ou les cals bien formés (de 2 à 3 mm), ayant grandi en milieu de culture liquide sont transférés sur divers milieux de culture solide ([2], [8], [9], [10], [11]) additionnés de différentes combinaisons d'auxines (2.4-D, ANA, acide β -indole acétique (AIA), Picloram) et de cytokinines (BAP, Kinétine, Zéatine, 2-isopentényladénine (2iP)) et, parfois, d'autres substances actives (acide 2,3,5-triiodobenzoïque (TIBA), acide abscissique (ABA), Phloridzine). Ceci en vue de tenter une régénération.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Culture de fragments de tiges. — L'apparition des cals est observée 2 semaines après l'ensemencement. La callogenèse est abondante et concerne la quasi-totalité des fragments mis en culture. 5 à 7 semaines après le repiquage des cals sur le milieu de régénération contenant 0,5 mg.l^{-1} d'ANA et autant de BAP, il y a formation de bourgeons, puis de pousses feuillées (*fig. 1 a-d*), sur 15% environ de cultures. L'induction racinaire est effectuée par action d'ANA à 5 mg.l^{-1} pendant 24 h. La rhizogenèse est rapide : elle est observée 2-3 jours après repiquage sur milieu dépourvu d'hormones. Les plantules, transférées en serre sur terreau, se développent normalement (*fig. 1 e*), fleurissent et forment gousses et graines.

Culture de protoplastes de mésophylle foliaire. — Le prétraitement des feuilles par flottement sur solution de sels de Frearson contenant du mannitol 0,55 M, suivi d'une

EXPLICATIONS DES PLANCHES

Planche I

Fig. 1. — Régénération des plantes à partir de cals issus de fragments de tige : (a-c) bourgeons et pousses feuillées; (d) pousse feuillée isolée avant racinement; (e) plante régénérée, sur terreau.

Fig. 1. — Plant regeneration from stem-derived callus: (a-c) buds and shoots; (d) isolated single shoot before rooting; (e) regenerated plant growing in soil.

Fig. 2. — Évolution des protoplastes de mésophylle en milieu de culture liquide: (a) protoplastes après isolement; (b) allongement des cellules; (c) première division; (d) 2^e et 3^e divisions; (e-i) microcolonies et colonies; (j-p) microcals et cals; (r) pseudo-bourgeons.

Fig. 2. — Mesophyll protoplast development in liquid culture medium: (a) freshly isolated protoplasts; (b) lengthening of cells; (c) first division; (d) 2nd and 3rd divisions; (e-i) micro colonies and colonies; (j-p) microcallus and callus; (r) bud-like formations.

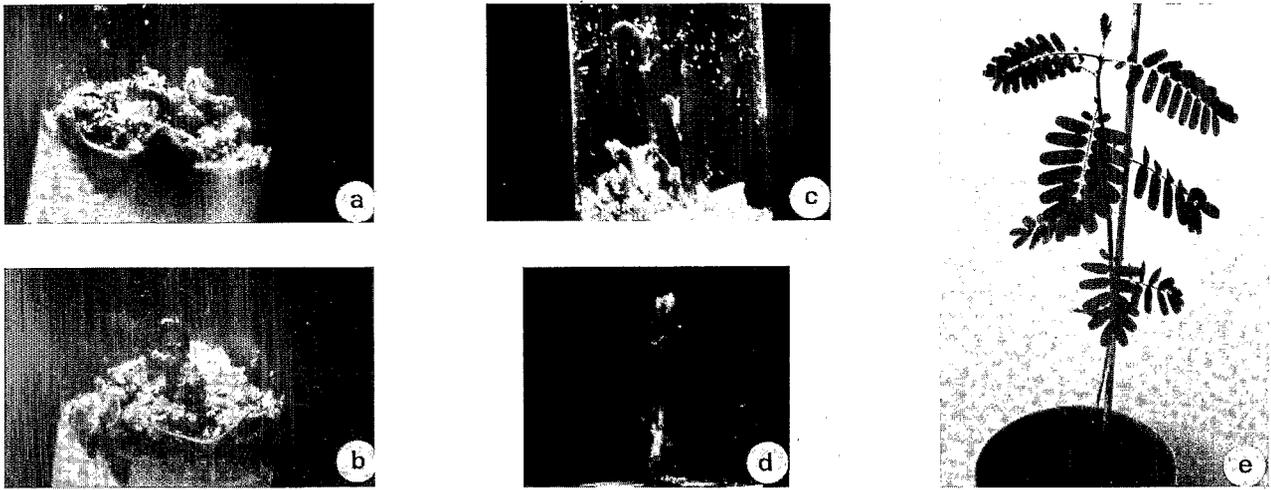


Fig. 1

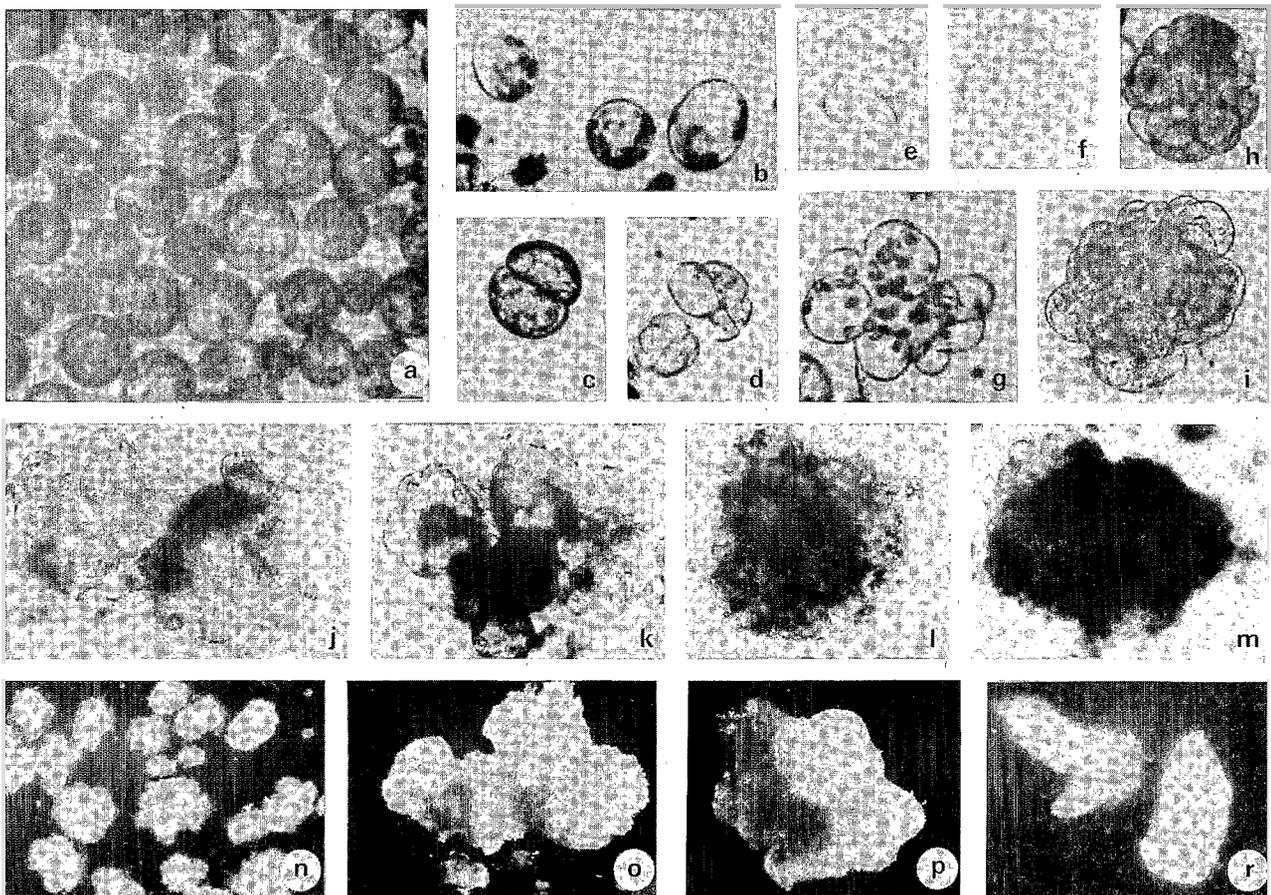


Fig. 2

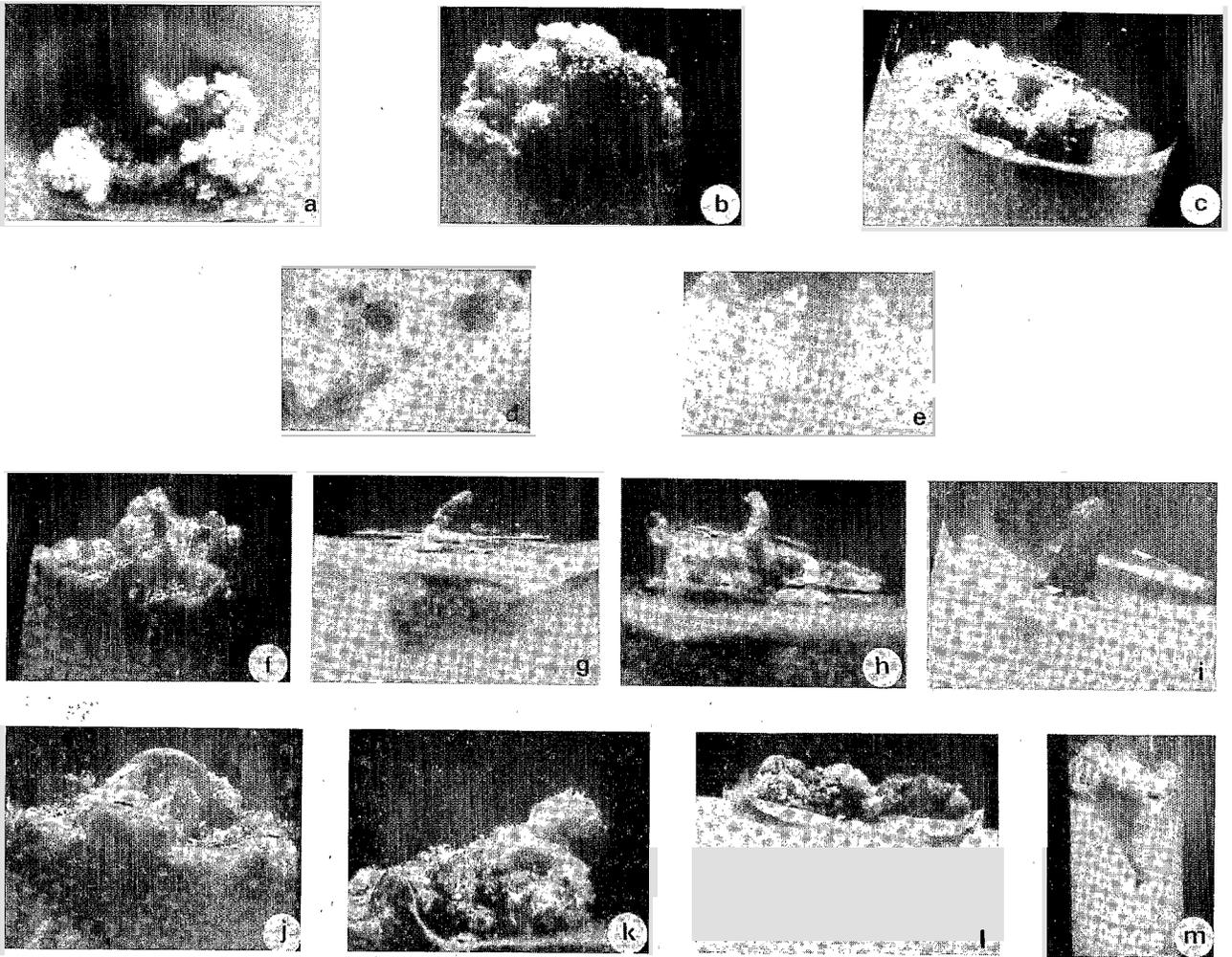


Fig. 3

Planche II

Fig. 3. — Premières expressions d'embryo- et morphogénèse sur cals issus de protoplastes après transfert sur milieux de régénération : (a-e) pro-embryons et pseudo-bourgeons; (f-k) pousses de différent aspect; (l, m) racines.

Fig. 3. — *Embryo- and morphogenic development of protoplast-derived callus on regeneration media: (a-e) embryo- and bud-like formations; (f-k) different forms of shoots; (l, m) roots.*

incubation de 15 h dans la solution enzymatique diluée au tiers, à la même pression osmotique, permet d'obtenir de bons rendements de protoplastes viables : en moyenne $3 \text{ à } 4 \cdot 10^6 \text{ g}^{-1}$ de poids frais de feuilles et jusqu'à $6 \text{ à } 8 \cdot 10^6$ dans certains essais. Cette variabilité des résultats d'un essai à l'autre est liée, en partie au moins, aux conditions non contrôlées de culture en serre des plantes-mères. La population de protoplastes ainsi isolés est assez hétérogène, leur diamètre variant de $15 \text{ à } 30 \mu\text{m}$ (fig. 2a). Les conditions optimales de culture sont les suivantes : densité des protoplastes de $5 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$, film liquide en boîtes de Petri prétraitées, milieu de culture de Kao [6] avec modifications portant sur les teneurs en glucose (0,2 M) et en mannitol (0,35 M) et sur la formule hormonale (1 mg.l^{-1} de 2.4-D et $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP), température 27°C , obscurité pendant 10 jours suivie d'une exposition progressive à la lumière (de 100 à 1 500 lx).

Le taux de survie 7 jours après la mise en culture atteint 90%. L'abaissement progressif de la pression osmotique du milieu par apports hebdomadaires d'un milieu frais s'avère nécessaire pour assurer les divisions cellulaires soutenues avec formation de colonies et de cals. Dans les conditions optimales décrites ci-dessus, on observe après 24 h un gonflement des protoplastes jusqu'à $40\text{-}50 \mu\text{m}$ de diamètre, vers le 2^e-3^e jour un allongement (fig. 2b), puis, le 4^e jour, les premières divisions cellulaires par clivage (fig. 2c). 2-3 jours plus tard, les secondes et les troisièmes divisions sont observées (fig. 2d). Les divisions successives se poursuivent et conduisent à la formation des microcolonies (fig. 2e-g), puis, vers le 10^e-14^e jour, à des colonies plus importantes constituées d'une trentaine de cellules-filles (fig. 2h) ou plus (fig. 2i).

Entre le 7^e et le 14^e jour de culture, l'efficacité d'étalement passe de 58 à 83%.

Vers le 21^e jour, les microcals apparaissent (fig. 2j, k). Leur croissance se poursuit en milieu liquide (fig. 2l-p). Une apparition de pro-embryons et de pseudo-bourgeons est parfois observée en milieu liquide (fig. 2r) mais leur développement reste bloqué. Environ 8 semaines après l'initiation des cultures, les cals sont transférés sur milieux solides. Un transfert plus précoce, au stade de colonies ou de microcals, s'avère infructueux. En moyenne 9% de protoplastes produisent des cals.

Aucun des nombreux milieux éprouvés n'a permis, à ce jour, une régénération de plantes. Néanmoins, des débuts d'embryogénèse et d'organogénèse se sont manifestés sous forme de pro-embryons, de structures ressemblant à des bourgeons (fig. 3a-e) et, plus rarement, de pousses (fig. 3f-k) ou des racines (fig. 3l-m).

CONCLUSION. — Les résultats rapportés plus haut mettent en évidence une différence de comportement *in vitro* entre les tissus de tiges et les protoplastes de mésophylle foliaire quant à la régénération de plantes. Alors que la régénération de plantes entières est relativement facile à obtenir après repiquages successifs sur trois milieux (ANA et BAP, ANA seul, et milieu exempt d'hormones), la régénération à partir des cals de protoplastes de mésophylle n'a pu être obtenue à ce jour. Aucune des séquences de milieux de régénération éprouvés, notamment celles utilisées avec succès chez d'autres Légumineuses

([3], [12], [13], [14], [15]), n'a conduit à la formation de plantes. En effet, seuls des débuts d'embryo- ou d'organogenèse ont été observés.

Ces constatations nous incitent à entreprendre une étude complémentaire sur la culture de protoplastes de tiges ainsi que sur celle d'explants foliaires. Cette recherche aurait les finalités suivantes : d'une part, parvenir à la régénération des plantes à partir des protoplastes, d'autre part, comparer les potentialités de régénération des tissus et des cellules d'un même organe.

Nous remercions Y. R. Dommergues du Laboratoire de Microbiologie des Sols ORSTOM/C.N.R.S. de Dakar de nous avoir fourni les graines de *Sesbania rostrata* en provenance du Sénégal.

Reçu le 28 avril 1986, acceptée après révision le 7 juillet 1986.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] B. DREYFUS et Y. DOMMERGUES, *Comptes rendus*, 291, série D, 1980, p. 767-770.
- [2] T. MURASHIGE et F. SKOOG, *Physiol. Plant.*, 15, 1962, p. 473-497.
- [3] L. B. JOHNSON, D. L. STUTEVILLE, R. K. HIGGINS et D. Z. SKINNER, *Plant. Sc. Lett.*, 20, 1981, p. 297-304.
- [4] E. M. FREARSON, J. B. POWER et E. C. COCKING, *Dev. Biol.*, 33, 1973, p. 130-137.
- [5] G. BELLARD et G. PELLETIER, *Physiol. vég.*, 16, 1978, p. 441-448.
- [6] K. N. KAO, *Molec. gen. Genet.*, 150, 1977, p. 225-230.
- [7] K. N. KAO et M. R. MICHAYLUK, *Z. Pflanzenphysiol.*, 96, 1980, p. 135-141.
- [8] H. UCHIMIYA et T. MURASHIGE, *Plant Physiol.*, 54, 1974, p. 936-944.
- [9] O. GAMBORG, R. MILLER et K. OJIMA, *Exp. Cell Res.*, 50, 1968, p. 151-158.
- [10] R. U. SCHENK et A. C. HILDEBRANDT, *Can J. Bot.*, 50, 1972, p. 199-204.
- [11] D. F. BLAYDES, *Physiol. Plant.*, 19, 1966, p. 748-753.
- [12] M. PEZZOTTI, S. ARCIONI et D. MARIOTTI, *Genet. Agr.*, 38, 1984, p. 195-208.
- [13] S. ARCIONI, M. R. DAVEY, A. V. P. DOS SANTOS et E. C. COCKING, *Z. Pflanzenphysiol.*, 106, 1982, p. 105-110.
- [14] D. W. R. WHITE, *Poster Proc. 6th Intl. Protoplast Symp.*, 1983, p. 59-60.
- [15] D. Y. LU, M. R. DAVEY et E. C. COCKING, *Plant Cell Reports*, 1, 1982, p. 278-280.

Laboratoire de Physiologie de l'ORSTOM, 70-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy.