

SOMMAIRE

	Pages
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des annexes	
Abréviation	
Glossaire	

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

Première partie : GENERALITES SUR LES PLANTES.....	
HAPLOIDES ET L'ANDROGENESE.....	3

I- LES PLANTES HAPLOIDES.....	4
-------------------------------	---

I-1- Définition.....	4
I-2- Utilisation et importances des plantes haploïdes.....	4
I-3- Les voies d'obtention des plantes haploïdes.....	5
3-1- Les haploïdes spontanées.....	5
3-2- L'hybridation interspécifique.....	5
3-3- Le traitement des gamétophytes par irradiation.....	6
3-4- La gynogenèse artificielle.....	6
3-5- L'androgenèse artificielle.....	6

II- LA CULTURE D'ANTHERES IN-VITRO OU ANDROGENESE	6
---	---

1- Définition.....	6
2- Les facteurs influençant l'androgenèse.....	7
2-1- Le génotype de la plante-mère.....	7
2-2- L'état physiologique de la plante donneuse d'anthères.....	8
2-3- Le stade de développement de pollen.....	8
2-4- Le prétraitement inductif des explants.....	9
2-5- Les conditions de culture.....	10

2-6- <i>La composition de milieu de culture.....</i>	11
3- Les problèmes rencontrés sur l'androgénèse.....	13
Deuxième partie : MATERIELS ET METHODES.....	15
I- MATERIELS VEGETAUX.....	16
1- Caractéristiques et systématique des variétés utilisées.....	16
2- Culture de la plante-mère : plante donneuse d'anthères.....	17
II- CULTURE D'ANTHERES IN VITRO.....	17
1- Induction de cals.....	17
1-1- <i>Choix et récolte des panicules.....</i>	17
1-2- <i>Prétraitement inductif et stérilisation des panicules.....</i>	18
1-3- <i>Choix des milieux et stérilisation.....</i>	19
1- 4- <i>Mise en culture des anthères.....</i>	20
1-5- <i>Méthodes de calcul.....</i>	22
2- Régénération des plantes.....	22
2-1- <i>Stress.....</i>	23
2-2- <i>Régénération des plantules</i>	23
2-3- <i>Enracinement.....</i>	24
2-4- <i>Méthodes de calcul.....</i>	24
3- Acclimatation.....	24
3-1- <i>Acclimatation en milieu liquide.....</i>	25
3-2- <i>Acclimatation en serre.....</i>	25
3-3- <i>Méthode de calcul.....</i>	25

Troisième partie : RESULTATS ET INTERPRETATIONS..... 26

I- EVALUATION DE LA CONTAMINATION.....27

II- INDUCTION DE CALS..... 28

1- Effets des milieux de culture sur l'induction de cal..... 28

1-1- Comparaison générale des effets des sept milieux d'induction.....28

– *Variété F-159.....* 28

– *Variété F-154.....* 29

1-2- Comparaison des milieux solides et milieux liquides..... 31

1-3- Effet de la source de carbone..... 32

1-4- Effet de la caséine hydrolysate et du myoinositol 32

2- Effets du rang de la panicule sur l'induction de cal.....32

III- TRANSFERT DES CALS SUR LES MILIEUX DE REGENERATION.....34

IV- REGENERATION ET CROISSANCE DES PLANTULES..... 35

V- ACCLIMATATION.....41

DISCUSSION.....44

CONCLUSION GENERALE.....48

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Résumé

Abstract

Mots clés

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Nombre d'anthères de riz (Oryza sativa L.) cultivées par milieu et par variété</i>	<i>21</i>
---	-----------

<i>Tableau 2 : Nombre d'anthères de riz (Oryza sativa L.) cultivées par variété et par rang de panicule</i>	<i>22</i>
---	-----------

<i>Tableau 3: Nombre de plantes vertes obtenues dans les milieux de régénération</i> <i>M_{1r} , MSr , H_{2r} par les travaux antérieurs</i>	<i>23</i>
---	-----------

<i>Tableau 4: Nombre et pourcentage des tubes contaminés lors de la culture d'anthères de riz (Oryza sativa L.)</i>	<i>27</i>
---	-----------

<i>Tableau 5 : Effets des milieux de culture sur l'induction de cals d'anthères de riz (Oryza sativa L.), variété F-159</i>	<i>29</i>
---	-----------

<i>Tableau 6: Effet des milieux de culture sur l'induction de cals d'anthères de riz (Oryza sativa L.), variété F-154</i>	<i>30</i>
---	-----------

<i>Tableau 7: Effets du rang de la panicule sur l'induction de cals pour les deux variétés de riz (Oryza sativa L.)</i>	<i>33</i>
---	-----------

<i>Tableau 8 : Pourcentage des cals d'anthères de riz (Oryza sativa L.) transférés, variété F-159</i>	<i>34</i>
---	-----------

<i>Tableau 9 : Nombre de cals d'anthères de riz (Oryza sativa L.) transférés dans chaque milieu de régénération avec leur milieu d'induction respectif</i>	<i>36</i>
--	-----------

<i>Tableau 10 : Résultat sur la régénération et sur le nombre des plantules de riz (Oryza sativa L.) obtenues</i>	<i>39</i>
---	-----------

<i>Tableau 11 : Rapport entre les plantules vertes et les plantules albinos de riz (Oryza sativa L.)</i>	40
--	----

<i>Tableau 12 : Récapitulation des paramètres donnant des plantules de riz (Oryza sativa L.), variété F-159</i>	40
---	----

<i>Tableau 13 : Résultats sur les plantules de riz (Oryza sativa L.) acclimatées</i>	41
--	----

<i>Tableau 14 : Comparaison d'induction de cals et de régénération des plantes vertes de la variété F-159 et ceux de quelques variétés de riz (Oryza sativa L.)</i>	46
---	----

Listes des figures

<i>Figure 1 : Milieux de culture préparés sous hotte.....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 2 : Culture d'anthères du riz (Oryza sativa L.).....</i>	<i>21</i>
<i>Figure 3 : Types de contamination observés lors de la culture d'anthères du riz (Oryza sativa L.), variétés F-154 et F-159.....</i>	<i>27</i>
<i>Figure 4 : Cals induits de la variété de riz (Oryza sativa L.) F-159 dans les milieux N₆, MS et H₂.....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 5 : Histogramme montrant la variation de la fréquence d'induction de cals d'anthères du riz (Oryza sativa L.) en fonction du type de milieu d'induction, variétés F-154 et F-159.....</i>	<i>31</i>
<i>Figure 6 : Histogramme montrant la variation de la fréquence d'induction de cals d'anthères du riz (Oryza sativa L.) en fonction du rang de la panicule, variétés F-154 et F-159.....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 7 : Cals d'anthères du riz (Oryza sativa L.) en régénération, variété F-159... </i>	<i>35</i>
<i>Figure 8 : Cas possibles de la régénération à partir des cals d'anthères de riz (Oryza sativa L.).....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 9 : : Plantules de riz (Oryza sativa L.) repiquées dans le milieu d'enracinement (MS ϕ).....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 10 : Disposition à l'étagère des tubes contenant les plantules de riz (Oryza sativa L.) en milieu d'enracinement.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 11 : Plantules de riz (Oryza sativa L.) développées dans le milieu d'enracinement</i>	<i>38</i>

Figure 12 : Histogramme montrant la variation de la régénération des plantules de riz (*Oryza sativa* L.) en fonction du type de milieu de régénération, variété F-159.....39

**Figure 13 : Plantules vigoureuses de riz (*Oryza sativa* L.) prêtes pour l'acclimatation.
.....
..... 41**

Figure 14 : Plantules de riz (*Oryza sativa* L.) acclimatées dans la solution Yoshida (après une semaine de repiquage).....42

**Figure 15 : Plantules de riz (*Oryza sativa* L.) acclimatées en serre (En période de floraison)
..... 42**

Figure 16 : Graines double haploïdes de riz (*Oryza sativa* L.)variété F-159.....43

Liste des annexes

ANNEXE I :

I-1- CARACTERISTIQUES DE LA VARIETE F-159

I-2- CARACTERISTIQUES DE LA VARIETE F-154

ANNEXE II : COMPOSITION DU TAROKA

ANNEXE III : CARACTERISTIQUES DU SOL DE RIZIERE

ANNEXE IV : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

IV-1 Milieu d'induction

IV-2 Milieu de régénération

V-3 Milieu d'enracinement

V-4 Milieu d'acclimatation

Abréviations

- (*I*) : *indica*
- (*J*) : *japonica*
- 2.4-D : Acide 2.4-Dichlorophénoxyacétique
- ABA : Acide abscissique
- BAP : 6 Benzyl-aminopurine
- CIRAD : Centre de coopération International en Recherches Agronomiques pour le Développement
- FOFIFA : FOibem-pirenena momba ny Fikarohana ampiarina amin'ny Fampandrosoana ny eny Ambanivohitra.
- HD : Haploïdes Doublés
- IRRI : International Rice Research Institute
- M. E. F. B : Ministère de l'Economie, des Finances et du Budget
- N. P. K. : Azote-Phosphore-Potassium
- NAA ou ANA : Naphtalene Acetic Acid

Glossaire

Androgenèse : Culture d'anthère

Cal : Amas de cellule

Induction de cals : formation de cals

Génotype : Expression des caractères génétiques d'un individu

Haploïde : Individu à n chromosomes

Panicule : Inflorescence chez les Graminées

Régénération : Néof ormation des plantes

INTRODUCTION

Le riz constitue la plante alimentaire la plus importante du monde, nourrissant plus de la moitié de la population du globe. L'analyse de la distribution de la production révèle que les rendements les plus faibles se rencontrent dans les pays tropicaux les moins développés qui comptent pourtant parmi les plus gros consommateurs de cette denrée (2 tonnes/ha) (P. C. N. YOBOUE, 1986).

La croissance rapide de la population mondiale exige une augmentation de sources de production alimentaire. Par conséquent la production mondiale et annuelle du riz doit être augmentée de 56% dans les 30 années à venir pour satisfaire les besoins alimentaires de la population (IRRI Rice Almanac, 1997).

L'examen des cultures de riz dans le monde montre qu'elles sont soumises à des facteurs extrêmement variés liés au sol, au régime hydrique, à l'énergie solaire, à la température et à des nuisances de toutes sortes (P. C. N. YOBOUE, 1986).

A Madagascar, le riz constitue l'aliment de base des malgaches, alors que la production de riz annuelle n'arrive pas à subvenir la croissance annuelle de la population. En effet, les producteurs de riz à Madagascar rencontrent des problèmes de production et de commercialisation tels que les conditions climatiques défavorables (dépressions ou cyclones tropicaux et amplitude de variation des pluies), l'enclavement de certaines zones de production, l'état défaillant des réseaux d'irrigation, une mauvaise maîtrise de l'eau, un faible taux d'équipement, une faible application d'itinéraires techniques améliorés, des coûts élevés de main d'œuvre, et l'insécurité foncière. (M. E. F. B, 2004).

Face à ces problèmes, toutes les techniques possibles pour l'amélioration des plantes ont été utilisées pour satisfaire les besoins alimentaires. L'introduction de la biotechnologie comme les cultures de tissus variés dans les programmes de production peut surmonter les contraintes agronomiques et problèmes environnementaux rencontrés par les méthodes conventionnelles (F. J. ZAPATA et al, 1995). L'objectif de cette biotechnologie est de créer des variétés génétiquement tolérantes aux agressions du milieu, adaptées à des conditions climatiques variées et possédant un potentiel de rendement accru (E. GUIDERDONI, 1992).

Pendant le siècle dernier, la technique de culture d'anthères a été largement intégrée dans les programmes d'amélioration de cultures dans le but d'augmenter la fixation de lignées pures homozygotes à partir des matériels hybrides (E. GUIDERDONI, 1991).

Dans le laboratoire de Biotechnologie en amélioration de plantes (Université d'Antananarivo), de nombreuses études ont été déjà réalisées concernant l'androgenèse du riz. Elles ont été, en général, concentrées sur les facteurs influençant la réponse à la culture d'anthères.

Dans la présente étude, notre objectif est d'utiliser la technique de culture d'anthères du riz in vitro pour produire des plantes haploïdes. Celles-ci peuvent se dédoubler spontanément et donner des graines.

Mais pour la poursuite du travail, les graines obtenues peuvent être utilisées pour produire des lignées pures ou lignées haploïdes doublées servant à l'amélioration variétale du riz.

Ce travail comporte trois parties principales. La première partie parle des généralités sur les plantes haploïdes et l'androgenèse. Les matériels végétaux utilisés ainsi que la méthodologie sont décrits à la deuxième partie. A la troisième partie nous avons les résultats obtenus suivis de leur interprétation et d'une discussion. Et une conclusion générale termine notre travail.

Première partie

**GENERALITES SUR LES PLANTES
HAPLOIDES
ET L'ANDROGENESE**

I- LES PLANTES HAPLOIDES

1- Définition

Les cellules, tissus et plantes ayant un nombre gamétique de chromosomes (n) sont appelés des haploïdes. Les plantes haploïdes peuvent être produites in vitro par plusieurs techniques comme la culture d'anthères/pollen, culture d'ovaire ou par élimination de chromosomes (F. J. ZAPATA et al., 1995). Les plantes obtenues par ces différentes techniques proviennent, en principe, d'une cellule haploïde ; ce sont donc des plantes sans mère (androgenèse) ou des plantes sans père (gynogenèse). Cependant l'état haploïde est instable et pendant le déroulement des mitoses haploïdes, la télophase ne se fait pas normalement, ce qui aboutit à une endomitose et un retour à l'état ($2n$) ; par conséquent on peut obtenir des individus diploïdes ou parfois même polyploïdes. De toute manière, dans la majorité des cas, les plantes haploïdes sont stériles. (Y. DEMARLY et M. SIBI , 1989)

Ces plantes peuvent être rendues fertiles en pratiquant artificiellement un dédoublement de chromosomes si celui-ci ne se fait pas spontanément. Dans de nombreux cas on utilise la colchicine pour doubler les chromosomes et rendre fertiles les panicules, on obtient alors des plantes haploïdes doublées (E. GUIDERDONI et al, 1986).

Ces plantes double haploïdes présentent une homozygotie totale et après une autofécondation elles donnent des descendants tous parfaitement semblables à la plante –mère, ce qui donne une lignée pure et elles sont dites lignées double haploïdes ou haploïdes doublées (HD) (Y. DEMARLY et M. SIBI , 1989).

2 – Utilisations et importances des plantes haploïdes

Les plantes haploïdes ont de nombreuses applications sur l'amélioration variétale des plantes (P. T. LYNCH et al., 1991). En doublant les chromosomes de ces haploïdes, elles ont une grande importance pour la fixation immédiate d'une parfaite homozygotie obtenue en un temps très court alors que par la voie sexuée l'obtention d'une homozygotie de 98 à 99% nécessite au moins six autofécondations successives (R. AUGÉ et J. BOCCON-GIBOD, 1984 ; F. J. ZAPATA et al, 1991 ; SNAPE, 1982).

La production des plantes haploïdes présente un grand intérêt pour les sélectionneurs puisqu'elle augmente la variabilité génétique et l'efficacité de sélection permettant de combiner les caractères désirables de chaque parent à savoir le bon type de plantes, la

tolérance en sel ou au froid, le rendement élevé et la résistance aux maladies (F. J. ZAPATA et al, 1991). De plus elle facilite la recherche de mutants en permettant l'expression des gènes récessifs (R. AUGÉ et J. BOCCON-GIBOD, 1984 ; P. T. LYNCH et al., 1991 ; F. J. ZAPATA et al, 1991).

Les lignées haploïdes doublées (HD) ont servi directement comme matériels de base pour un travail de sélection en Camargue, en Guyane et dans le réseau riz de la CORAF en Afrique de l'Ouest. Grâce à un programme de collaboration entre l'IRRI et la Corée un grand nombre de lignées HD ont été produites et parmi eux, des lignées utilisables avec une tolérance au froid ont été identifiées (F. J. ZAPATA et al., 1986)

3 – Les voies d'obtention des plantes haploïdes

3- 1 – Les haploïdes spontanés

Les premiers haploïdes que l'on a pu observer provenaient d'haploïdisation spontanée. Dans de nombreuses espèces (Piment, cacaoyer, maïs cotonnier, caféier, trèfle) mais dans des cas très rares, une graine peut germer en donnant naissance à deux plantules jumelles et après le dénombrement de leurs chromosomes on a observé que l'une d'elle est haploïde, elle paraît plus faible que l'autre. De telles plantes sont viables mais elles ont une taille réduite et des feuilles étroites et fines, et surtout elles sont stériles. Parfois au cours de leur développement et suite à une mitose anormale ces plantes haploïdes spontanées peuvent redevenir diploïdes (Y. DEMARLY, 1992).

3- 2 –L'hybridation interspécifique

Lors d'une hybridation d'espèces différentes, la fécondation n'a pas eu lieu en général, le pollinisateur provoque seulement le développement de l'embryon mais ne participe pas à sa constitution génétique car ses chromosomes sont éliminés dès les premières mitoses. On obtient alors un individu à un seul stock chromosomique haploïde. C'est la méthode «bulbusum» décrite et développée par KASHA et KAO en 1970 (M. MALUSZYNSKI et al., 1991 ; Y. DEMARLY, 1992).

3- 3- Le traitement des gamétophytes par irradiation

L'irradiation par rayon X du gamétophyte mâle est l'une des techniques les plus utilisées pour perturber la voie normale de différenciation des spermatozoïdes. Le pouvoir inducteur de l'embryogenèse est maintenu mais le pouvoir fécondant est inhibé en neutralisant l'un des deux spermatozoïdes. Ce qui implique la fécondation des noyaux polaires et le développement de l'albumen. L'oosphère peut se diviser sans fécondation et donner un embryon haploïde parthénogamétique. Cet embryon peut être développé en le cultivant in vitro (Y. DEMARLY et M. SIBI, 1989).

3- 4- La gynogenèse artificielle

Il s'agit de cultiver des ovaires ayant été prélevés stérilement dans la fleur à un stade bien déterminé dans des milieux artificiels qui favorisent le développement des cellules haploïdes (Y. DEMARLY, 1992). La culture se fait in vitro et elle nécessite 4 à 6 mois jusqu'à la formation des plantules. De plus le taux d'ovaires embryogènes est faible. Pourtant la gynogenèse a l'avantage de ne donner que des plantes chlorophylliennes stables au niveau chromosomique et d'éviter dans la majorité des cas la formation intermédiaire des cals (A. DE BEAUVILLE, 1980).

3- 5- L'androgenèse artificielle

L'androgenèse ou la culture d'anthères in vitro est la technique la plus utilisée en production de plantes haploïdes. Les détails sont décrits dans le paragraphe suivant.

II- LA CULTURE D'ANTHERES IN VITRO ou ANDROGENESE

1- Définition

Le pollen immature ou les microspores contenus dans l'anthère donnent soit directement des embryons soit des tissus appelés cals qui, à leur tour vont régénérer des plantes haploïdes (T. P. CROUGHAN, 1995). Pour la plupart des espèces de céréales, la méthodologie est analogue : les boutons floraux sont disséqués stérilement et les anthères qui doivent produire le pollen sont prélevées à un stade bien précis du développement des microspores pour être

cultivées in vitro (Y. DEMARLY et M. SIBI, 1989). Dans cette manipulation l'objectif est d'obtenir une réorientation du fonctionnement pollinique, qui, au lieu d'effectuer une division inégale, va donner deux noyaux fils identiques. Cette modification va entraîner l'évolution du pollen vers un développement callogène ou embryogène. Cette déviation nécessite un choc physiologique qui peut être un choc thermique (températures basses ou élevées) ou l'utilisation de certains régulateurs ou encore la centrifugation des boutons (R. AUGÉ et J. BOCCON-GIBOD, 1984).

2- Les facteurs influençant l'androgenèse

Le taux de réussite en androgenèse est en général très faible si on le rapporte au nombre des microspores dans une anthère mise en culture. Ce qui amène beaucoup de chercheurs à l'étude des facteurs influençant la réponse en culture d'anthères. En général l'androgenèse se fait en deux étapes : induction de cals et régénération des plantes vertes. Chaque étape est contrôlée par différents facteurs : le génotype et l'état physiologique de la plante-mère, le stade de développement de pollen, le prétraitement inductif des explants, les conditions de culture et la composition du milieu de culture.

2- 1- Le génotype de la plante -mère

Le génotype de la plante donneuse d'anthères est le facteur le plus important en androgenèse chez le riz.

QUIMIO & F. J. ZAPATA (1990) ont démontré par leur expérience que le génotype a un effet significatif à la fois sur l'induction de cals et sur la régénération des plantes. SHEN et al. (1982) ont suggéré que la différence en réponse d'anthère entre les différents types de riz se fasse dans l'ordre suivant :

***Japonica* > hybrides *indica*/*Japonica* > hybrides *Japonica*/*indica* > riz hybrides > *indica*.**

Les variétés *japonica* répondent mieux donc à la culture d'anthères par rapport aux variétés *indica*. D'après GUHA-MUKHERJEE (1973) les différences génotypiques se trouvent non seulement au niveau des variétés de la même espèce mais aussi au niveau des races écogéographiques du riz.

La raison pour laquelle il y a des différences génotypiques en androgenèse n'est pas très claire mais il est évident que l'androgenèse est sous contrôle génétique et une des possibilités de

l'amélioration de la réponse en culture d'anthères est la manipulation génétique du génotype de la plante-mère (FOROUGH-WEHR et al., 1982).

2- 2- L'état physiologique de la plante donneuse d'anthères

L'état physiologique de la plante donneuse peut avoir une influence majeure sur la culture d'anthères. Les plantes jeunes, végétativement vigoureuses et en croissance active donnent des meilleurs résultats (Y. DEMARLY et M. SIBI, 1989). D'autres chercheurs ont pu aussi démontrer l'effet de l'âge de la plante sur la formation de cal en culture d'anthères.

C. C. CHEN and LIN (1976) ont observé que les anthères collectées au début de la période de floraison sont plus productives que celles récoltées à la fin de cette période. CHEN et TSAY en 1984 confirment que la fréquence de formation de cals est significativement plus faible avec les anthères des talles tertiaires qu'avec celles des talles primaires. Ceci peut s'expliquer par l'insuffisance des nutriments disponibles.

Les conditions environnementales dans lesquelles les plantes donneuses ont été cultivées ont aussi une influence sur la culture d'anthères. Les facteurs qui y interviennent sont : la photopériode, l'intensité lumineuse et la qualité de la lumière, ainsi que la température et la nutrition (A.D. GENOVESI, 1990). C. HU et al (1978b) ont observé que les anthères des plantes poussant sous une lumière solaire suffisante et à 18.5-20°C donnent la fréquence la plus élevée en formation de cals. Une température trop élevée (26-28°C) favorise la régénération des plantules albinos. Les plantes donneuses doivent donc pousser sous des conditions contrôlées, dans une serre par exemple.

Il est aussi important que les plantes donneuses soient à l'abri des maladies et ne doivent pas souffrir de stress environnemental. Cependant les traitements phytosanitaires comme l'application des fongicides et des pesticides ont en général un effet dépressif sur la potentialité des anthères (Y. DEMARLY et M. SIBI, 1989 ; A. JÄHNE et al. , 1991).

2- 3- Le stade de développement de pollen

La morphologie externe des boutons floraux est en relation avec la structure cytologique des grains de pollens qu'ils contiennent. Le choix des panicules peut être basé sur la distance entre la ligule de la feuille paniculaire et celle de la seconde feuille. Cette distance, ainsi que le stade uninucléé tardif et binucléé précoce ont été utilisés comme marqueurs d'induction de cal par certains chercheurs (R.AFZA et al. , 2000 ; A. JÄHNE, H. LÖRZ, 1995).

D'après Y. DEMARLY et M. SIBI (1989) c'est le stade où la jeune microspore uninucléée va entrer en mitose qui constitue l'optimum pour la réussite de la culture d'anthère. La collecte de la panicule doit se faire à 7-9 h du matin ou à 4-6 h de l'après-midi, c'est le moment où le stade de pollen est juste avant le stade de mitose nucléaire (protocole AC Doc, 1998).

De plus, la position des épillets à l'intérieur de la panicule peut influencer la fréquence en induction de cals mais non pas la fréquence de la régénération des plantes. Ceci peut être dû à la distribution inégale des assimilats (Acides aminés, carbohydrates) à l'intérieur de la panicule. En effet il y a une concentration plus élevée en assimilats dans la partie basale où les anthères montrent un taux de callogenèse plus élevé que dans la partie extrême de la panicule pendant son développement (MOHAPATRA et SAHU, 1991)

2-4- Le prétraitement inductif des explants

Des prétraitements physiques et chimique ont été montrés efficaces à l'augmentation de formation de cal. D'après T P CROUGHAN (1995), le prétraitement à froid des anthères augmente le pourcentage d'anthères callogènes. La variation de l'intensité et la durée de prétraitement peuvent entraîner des différences importantes sur la fréquence de formation de cals. WANG et al. (1974) ont observé que pour une même durée de prétraitement (2 jours), la température 10°C entraîne une fréquence plus élevée en formation de cals que la température 4°C. La durée optimale du prétraitement à froid dépend du génotype (N. LENKA and G. M. REDDY, 1994).

D'après les différentes études effectuées au laboratoire de biotechnologie en amélioration des plantes (Laboratoire de Physiologie végétale), les durées de prétraitement qui ont donné les meilleurs résultats en induction de cal varient avec la variété : 8 jours pour des variétés *indica* N. V. (RAKOTOARISOA, 2000) ; 5 à 7 jours pour trois variétés *japonica* (E. RAVELOARISOLO, 2002). Avec la variété IRAT 112, c'est la durée de 3 jours qui a donné la meilleure réponse (S. V. ANDRIANAIVO, 2002). Et avec une variété *japonica* irradiée la durée de prétraitement favorable est de 6 jours (R. H. RAMANANTSOA, 2003)

A part le prétraitement à froid, le traitement à l'irradiation rayon gamma avec un dosage 100 R (SUN et al.,1978), une centrifugation des panicules de riz à 2000 r.p.m pendant 10 mn et

une exposition aux champs magnétiques peuvent augmenter la quantité des cals produits (ZHU and WANG, 1982).

2-5- Les conditions de culture

Les facteurs principaux de l'environnement de la culture d'anthères in vitro sont la lumière et la température (MAHESHWARI et al., 1980).

Les conditions de lumière utilisées en culture d'anthères varient de l'obscurité totale à l'illumination continue. Pour l'induction de cal, les anthères cultivées doivent être placées à l'obscurité (NIIZEKI and OONO, 1968 ; HARN, 1969 ; WOO and TUNG, 1972 ; Y. CHEN et al. 1974). La lumière n'est donc pas nécessaire à la formation de cal. Par contre la régénération nécessite 16 heures de lumière de 2000 à 3000 lux par jour (Y. CHEN et al. 1982 ; ZHANG, 1982 ; F. J. ZAPATA et al, 1982 ; CROUGHAN et al 1983,1985 ; CHU et al 1984 ; ZHANG and CHU 1984)

Les processus morphogénétiques sont régulés par les pigments photorécepteurs : Phytochrome et autres. Il est alors intéressant de mélanger deux types de tubes fluorescents, l'un plus riche en radiations bleues et l'autre plus riche en radiations rouges (J. BOCCON GIBOD, 1984).

Concernant la température, la culture d'anthères exige en général une température comprise entre 25 et 30°C. Une température trop élevée favorise la régénération des plantes albinos (WANG et al, 1978). La formation des plantes vertes ou albinos est plutôt affectée par la température pendant la phase initiale du développement de la microspore mais non pas par celle de la phase de différenciation des cals. En réalité, la température réelle des tissus à l'intérieur des récipients peut être supérieure de 2 à 4°C par rapport à celle de la salle. C'est pourquoi pratiquement on doit régler la température de la salle à 2°C au-dessous de celle que l'on désire pour la culture des tissus (J. BOCCON GIBOD, 1984).

L'humidité relative à l'intérieur du récipient de culture n'est pas un facteur variable. Elle est en général voisine de 100% (J. BOCCON GIBOD, 1984). La densité des anthères inoculées dans le milieu de culture peut influencer la réponse en culture d'anthère mais ce facteur n'est pas bien étudié chez le riz (BAJAJ et al. 1977 ; SUNDERLAND et al. 1981).

2-6- La composition du milieu de culture

Les explants de riz exigent différents milieux de culture. En général les différences entre ces milieux sont les concentrations en macronutriments, en sucrose et en phytohormones. Beaucoup de chercheurs ont montré que les besoins nutritionnels des anthères cultivées varient avec le génotype de la plante donneuse. Par exemple la sous espèce *indica* est très sensible à la présence de l'ion ammonium (NH_4^+) et de sulfate de magnésium (MgSO_4) dans le milieu (V. S. REDDY et al., 1985).

Tous les milieux de culture sont constitués de différentes catégories de composés chimiques :

- les macroéléments (K^+ , NO_3^- , NH_4^+ , Ca^{++} , Mg^{++}) dont K^+ , NO_3^- et NH_4^+ sont les plus importants. Les tissus ont des besoins spécifiques vis-à-vis de ces éléments.

(J. BOCCON GIBOD, 1984).

- Les microéléments et les éléments traces : le fer sous forme de chélate (Fe-EDTA) est introduit à une concentration de 20 à 40 mg/l. Le CaCl_2 , MgSO_4 , KI, H_3BO_3 et ZnSO_4 sont introduits dans les milieux de culture à des concentrations de l'ordre de 0.02 à 0.10 mM/l. Ces constituants chimiques affectent seulement l'induction de cals mais non la régénération des plantes vertes.

Enfin, les cuivre, Cobalt, Molybdène, Iode et Sodium sont ajoutés aux milieux de culture par précaution à des concentrations de l'ordre de 0.00003 à 0.03 mM/l, ce sont des éléments traces (J. BOCCON GIBOD, 1984 ; S. K. RAINA and F. J. ZAPATA, 1997).

- La source de carbone : la source de carbone a un rôle important sur la culture d'anthères (Z. LENTINI et al, 1995). Celui le plus utilisé est le sucrose. Il joue à la fois un rôle dans la nutrition et dans la régulation osmotique et il affecte non seulement la formation de cal mais aussi la régénération des plantes vertes. La concentration optimale en sucrose pour la culture d'anthères est de 3 à 5 %, mais elle peut varier avec le stade de développement des microspores.

C. C. CHEN (1978) a observé que la fréquence en formation de cals augmente avec la concentration en sucre utilisé dans le milieu de culture (3 – 9 %) mais une concentration trop élevée (9-11 %) en sucrose entraîne la régénération des plantes albinos.

Certains chercheurs pensent que le sucrose augmente la production de l'éthylène à la surface des tissus cultivés in vitro, qui entraîne une faible croissance et la nécrose des cals chez le riz. D'autres ont trouvé qu'à la place du sucrose le maltose favorise mieux la culture d'anthères (G. S. KUSH et al, 1994). Une augmentation d'induction de cals a été observée lorsqu'on a

remplacé 146 mM de sucrose par 146 mM de maltose. De plus le taux de régénération de plantes vertes est plus élevé dans le milieu avec du maltose (14.2 %) par rapport à celui avec du sucrose (7.5 %) (Z. LENTINI et al, 1995)

- *Les acides aminés* : les acides aminés peuvent avoir ou non des effets sur la culture des tissus selon les espèces. Ils sont souvent apportés sous forme de mélange complexe appelé hydrolysate de caséine ou caséine hydrolysate (Mélange de arginine-acide aspartique et asparagine, acide glutamique et glutamine) (J. BOCCON GIBOD, 1984).

- *Les vitamines* : les vitamines les plus utilisées appartiennent au groupe B et c'est la vitamine B1 qui est essentielle et apportée à des concentrations plus fortes de l'ordre de 0.1 à 10 mg/l. Elles améliorent la croissance mais ne semblent pas être indispensables (J. BOCCON GIBOD, 1984).

Exemples de vitamines utilisées en culture d'anthères du riz : Thiamine HCl, Acide nicotinique, Pyridoxine HCl, Glycine. Le myoinositol est apporté à des concentrations de l'ordre de 10 à 100 mg/l (NITSCH, 1974).

- *Les régulateurs de croissance* : les régulateurs de croissance ou hormones végétales, appelées aussi phytohormones sont des substances agissant à très faible dose et qui ont une action soit stimulante soit inhibitrice, selon le type, sur le métabolisme cellulaire. Elles ont une influence très sensible sur la croissance des tissus pour de très faible variation de concentration (1/100 mg/l).

Il y a deux grands types de régulateurs de croissance : les régulateurs de croissance *endogènes* ou synthétisés par le végétal (auxine, gibberellines, cytokinines, acide abscissique et éthylène) et les régulateurs de synthèse, synthétisés par l'homme dont les formules chimiques sont voisines ou différentes des substances naturelles mais qui présentent une activité physiologique similaire (R. AUGÉ, 1984).

Les composés les plus utilisés dans les milieux de culture d'anthère de riz sont les auxines (Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique ou 2,4-D ; Acide naphthalène-acétique ou ANA ou NAA) et les cytokinines (Kinétine ; Benzyladénine ou BAP ou 6 Benzyl-aminopurine) (C.C. CHEN et al, 1991).

En général, les milieux d'induction, de régénération, et d'enracinement se différencient par le type et les concentrations en phytohormones.

– *Les qualités physiques des milieux de culture*

Les milieux solides et les milieux liquides : la concentration en agar, ainsi que sa qualité peuvent avoir des effets nets sur la culture d'anthères du riz. L'agar est un polysaccharide (glucide) de haut poids moléculaire qui est un extrait d'algues du genre : *Gélidium*. Elle nécessite de l'ébullition pendant quelques minutes pour pouvoir se dissoudre (J. BOCCON GIBOD, 1984). Il a été démontré dans plusieurs études que les anthères cultivées sur les milieux liquides répondent mieux que celles cultivées dans les milieux solidifiés par l'agar. Les avantages du milieu liquide reposent sur les faits que les anthères ont un accès facile aux nutriments et que les substances inhibitrices produites par le tissu de l'anthère peuvent être éliminées (WERNICKE and KOHLENBACH, 1976 ; SUNDERLAND, 1978).

Le pH : le pH du milieu de culture est aussi un facteur critique sur la culture d'anthères. En général le pH est ajusté à 5.5–5.8.

Le paragraphe suivant nous informe des problèmes rencontrés sur la culture d'anthères *in vitro*.

3 – Les problèmes sur l'androgenèse

- Le premier problème en culture d'anthère est la faible efficacité de l'induction de cals et de régénération des plantes vertes surtout chez les sous-espèces *indica* (L. B. TORRIZO et F. J. ZAPATA, 1986 ; T. P. CROUGHAN, 1995).

- La production de plantes albinos est un phénomène commun pour la culture d'anthère de céréales (CLAPHAM, 1977). Chez le riz, la fréquence d'albinisme peut varier de 10 à 100 % (WANG et al. , 1978 et GENOVESI and MAGILL, 1979). Les facteurs de l'albinisme peuvent être : un facteur génétique, la température ou une concentration très élevée en 2, 4-D (20 mg/l ; WANG et al. 1978) ou en sucrose (9% ; C. C. CHEN 1978) dans le milieu d'induction de cal. Des études biochimiques ont montré que la production des plantes albinos est due à une lésion au niveau des gènes responsables du développement des chloroplastes et de formation des chlorophylles (WANG et al. 1974 ; BERNARD, 1980)

- Le niveau de ploïdie

La ploïdie des cellules dans les cals d'anthères est souvent instable, c'est la raison pour laquelle des plantes non haploïdes peuvent être produites (C. C. CHEN and C. M. LIN, 1981).

Le niveau de ploïdie des plantes régénérées peut être n , $2n$, $3n$ ou $4n$ (CHEN et al, 1974) mais la plupart sont haploïdes (12 à 40%) et diploïdes (double haploïdes, 40 à 60%).

Les plantes haploïdes sont souvent stériles et le dédoublement de chromosomes nécessite un traitement avec la solution de colchicine (0.1–0.2%) (L. SHIH-WEI et al.1991). Cependant, le traitement de la plante à la colchicine est compliqué et peut causer une mortalité due à l'effet toxique de l'agent. (Y. HENRI and J. DE BUYSER, 1980)

Dans d'autre cas on peut obtenir des plantes diploïdes mais stériles, ces plantes proviennent de la membrane de l'anthere ou des tissus filamenteux. (T. P. CROUGHAN, 1995).

Nous allons décrire à la deuxième partie les matériels végétaux et les méthodes que nous avons utilisées.

Deuxième partie :

MATERIELS ET METHODES

L'objectif de notre travail est d'utiliser la technique d'androgenèse du riz pour obtenir des plantes vertes haploïdes et des graines en vue de l'amélioration variétale de riz. Pour cela nous avons utilisé des paramètres déjà utilisés antérieurement et ayant donné de meilleurs résultats.

Nous allons voir dans cette deuxième partie les matériels végétaux utilisés et les différentes étapes de notre travail à savoir la culture de plantes donneuses d'anthères, l'induction de cals ou inoculation des anthères pour la formation des cals, la régénération des plantes à partir des cals et l'acclimatation des plantules obtenues.

I- MATERIELS VEGETAUX

1- Caractéristiques et systématique des variétés utilisées

Deux variétés de riz pluvial ont été utilisées pour cette étude : FOFIFA-154 et FOFIFA-159. Elles appartiennent à la famille des Graminées, genre *Oryza*, espèce *sativa* et à la sous-espèce *japonica*. Ce sont des nouvelles variétés de FOFIFA. Les graines proviennent du CIRAD Antsirabe.

La variété F-154 est une variété de création locale. C'est un hybride issu du croisement de Latsibavy x FOFIFA 62. Elle est cultivée dans les régions des Hauts Plateaux avec un rendement moyen de 3t/ha et une tolérance moyenne à la pyriculariose (ANNEXE I-2).

La variété F-159 est une variété hybride de l'IRAT 114 et du FOFIFA 133. C'est aussi une variété de création locale. Elle a une bonne productivité et une résistance moyenne à la pyriculariose. (ANNEXE I-1)

Ces deux variétés ont été déjà utilisées en culture d'anthères in-vitro dans le laboratoire de Biotechnologie en amélioration des plantes. F-159 a donné 16 % d'induction de cals et des plantules (Z. ANDRIANJAKA, 2002). Pour la variété F-154, le résultat n'a pas été précisé.

Nous avons choisi ces deux variétés pour poursuivre ce travail jusqu'à la régénération, à l'acclimatation et à la production de graines. Ces graines pourraient servir de matériels pour la sélection des lignées pures possédant les caractères intéressants comme la productivité ou la résistance aux maladies par exemples. Mais d'autres caractères portés par les gènes récessifs peuvent aussi s'exprimer dans les plantes haploïdes doublées obtenues.

2 – Culture de plante-mères, plantes donneuses d'anthères

Les graines bien sélectionnées ont été germées au laboratoire dans une étuve d'abord à 52 °C pendant trois jours pour la levée de dormance, puis à 28 °C et mises dans l'eau jusqu'à l'obtention de plantules vigoureuses. Ces plantules ont été transplantées au sol (ANNEXE III) mélangé avec du fertilisant chimique NPK (11, 22, 16) et du TAROKA (ANNEXE II), et arrosées avec de l'eau du robinet tous les jours. Elles ont été cultivées en serre dans laquelle les conditions de culture sont constantes : photopériode 16 heures ; température variant de 24 à 30 °C et lumière naturelle.

Les manipulations sur la culture d'anthères in-vitro proprement dite sont exposées dans le paragraphe suivant.

II- CULTURE D'ANTHERES IN-VITRO

1- Induction de cals

1- 1- Choix et récolte des panicules

Le stade de développement des pollens est un des facteurs importants qui influent la réponse en culture d'anthères. C'est pourquoi il est important de bien déterminer le moment de la récolte des panicules. Lorsque la plante commence à former des panicules, il faut attendre 4 à 7 jours pour que la distance entre la gaine de la feuille paniculaire et celle en dessous soit bien visible (RAKOTOARISOA, 2000). Cette distance est caractéristique de chaque variété et elle doit correspondre à quelques critères :

- la gaine de la feuille paniculaire est blanchâtre,
- les épillets sont mous, verts clairs ou jaunes clair,
- la position des anthères est proche du milieu de l'épillet

Et d'après des études anatomiques ces critères correspondent au stade uninucléé tardif et binucléé précoce des pollens (F. J. ZAPATA et al, 1991).

Cette distance varie de 5 à 12 cm pour la variété F-154 et de 7 à 15 cm pour la variété F-159.

Les trois premières panicules provenant des trois premières talles ont été récoltées, ce qui nous a permis d'étudier l'effet du rang de la panicule sur la réponse des anthères.

La collecte des panicules se fait le matin de sept à neuf heures ou l'après-midi de seize à dix-huit heures puisque la mitose s'effectue juste après ces intervalles de temps (F. J. ZAPATA et al, 1991). Les panicules ont été mises dans un sachet plastique bien fermé en évitant toutes sortes de contamination durant le transport.

1- 2- Prétraitement inductif et stérilisation

Le prétraitement inductif augmente le nombre d'anthères callogènes. Des études ont montré qu'un choc à basse température retarde la sénescence et maintient longtemps la viabilité des pollens qui vont former des embryons (F. J. ZAPATA et al. , 1991). Les observations microscopiques ont montré que les microspores commencent à se diviser pendant la période de prétraitement, de plus le prétraitement à basse température peut entraîner l'élimination des microspores faibles et non viables (N. LENKA and G. M. REDDY, 1994).

- Les panicules ont été lavées avec de l'eau distillée mélangée avec du savon liquide et du chlorox, leur paroi stérilisée avec de l'alcool 90°.

- Elles ont été ensuite enveloppées dans un papier Wattman imbibé d'eau distillée, l'ensemble mis dans un sachet plastique stérile et conservé dans le réfrigérateur à 10°C pendant 8 jours. La durée du prétraitement est identique pour toutes les panicules. Nous avons choisi cette durée de prétraitement huit jours qui a été trouvée efficace lors des travaux de nombreux chercheurs (V. S. REDDY, S. LEELAVATHI and S. K. SEN, 1985 ; C. A. QUIMIO and F. J. ZAPATA, 1990 ; F. J. ZAPATA et al. 1991 ; RAKOTOARISOA, 2000).

- Concernant la stérilisation, les panicules ont été immergées dans de l'alcool 90° pendant 5 mn puis dans du chlorox 40% pendant 20 mn.

- Elles ont été rincées à grande eau avec de l'eau distillée stérile. C'est la technique de stérilisation la plus efficace lors des travaux de RAKOTOARISOA en 2000 et RAVELOARISOLO en 2002.

1- 3- Choix des milieux et stérilisation

Nous avons choisi sept types de milieu d'induction (ANNEXE IV-1):

- Le milieu MS (MURASHIGE and SKOOG, 1962), utilisé dans notre laboratoire par Z. ANDRIANJAKA en 2002 avec lequel elle a obtenu des cals, et contenant 8g/l d'agar est comparé avec le milieu MS sans agar, MS liquide nommé MSL afin d'étudier l'effet de l'agar (J. BOCCON-GIBOD, 1984). La concentration en régulateurs de croissance est identique pour ces deux milieux.

- Deux milieux N₆ (CHU et al, 1975), l'un avec du maltose (N₆m) et l'autre avec du sucrose (N₆ témoin) ont été utilisés pour étudier l'effet de la source de carbone sur la réponse en culture d'anthere. Le milieu N₆ se différencie du milieu MS par leur composition chimique, surtout au niveau de la source d'ion ammonium NH₄⁺ et d'ion nitrate NO₃⁻. D'après de nombreux chercheurs. (L. G. VIJAYA, G. M. REDDY, 1997 ; S. K. ANITHA, G. M. REDDY 1996) le milieu N₆ avec du maltose peut donner des meilleurs résultats par rapport à celui contenant du sucrose. Le milieu N₆m contient en plus de kinétine. Le milieu N₆ a donné une fréquence en induction de cals plus élevée lors des travaux de CHU et al en 1975 (46 à 93 %) et de RAVELOARISOLO en 2002 (24.19 %).

- Deux milieux SK-I (S. K. RAINA, et al., 1989) ont été utilisés pour l'étude des effets de la caséine hydrolysate (CH), un mélange complexe d'acides aminés et du myoinositol qui est une vitamine. Le milieu SK-I témoin contient 500 mg/l de caséine hydrolysate et 100 mg/l de myoinositol alors que SK-Im ne les contient pas. Ces 2 milieux SK-I ont les mêmes concentrations en régulateurs de croissance : 2,4-D (2 mg/l), NAA (2.5mg/l), Kinétine (0.5 mg/l).

- Le milieu H2 qui est un milieu N₆ modifié par S. K. RAINA et al. (1989) a donné des résultats positifs d'après les travaux de RAKOTOARISOA en 2000 (0.53%).

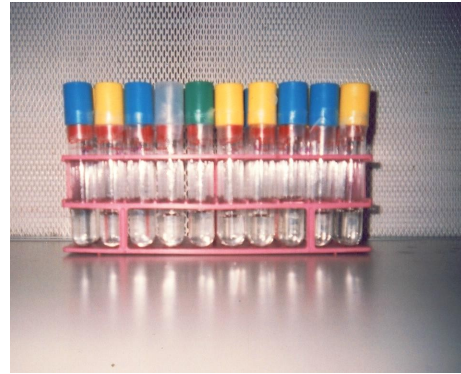
Après avoir mélangé les éléments constitutifs de chaque milieu ; ceux-ci ont été stérilisés à l'autoclave pendant 20 mn à 120°C, et portés sous hotte pour la culture.

Les tubes contenant les milieux solides sont inclinés de 45° pour obtenir une surface cultivable plus grande, tandis que les milieux liquides sont tenus verticalement.

La préparation de ces milieux est montrée par les figures 1.



Milieux solides



Milieux liquides

Fig.1 : Milieux de culture préparés sous hotte

1-4- Mise en culture des anthères

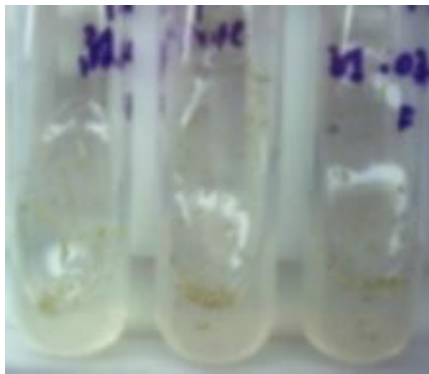
Les cultures des anthères se sont déroulées du sept février à 5 avril 2004.

Avant d'effectuer la manipulation, nous avons pris soin de stériliser les petits matériels comme le ciseau, les pinces et les boîtes de pétri. Tout le travail se fait sous hotte et à 15 cm près d'une flamme d'un bec bensen. A l'aide d'une paire de ciseau fin, les épillets ont été coupés à la base et les anthères ont été inoculées dans chaque tube à essai contenant le milieu d'induction.

Un épillet contient 6 anthères et on a environ 90 anthères par tube à essai. Les tubes à essai ont été ensuite fermés par leur couvercle et scellés avec du parafilm (Fig. 2). Les cultures ont été incubées à l'obscurité et à une température de 25°C pour l'induction de cal. Les cultures en milieux liquides ont été agitées à l'aide d'un agitateur rotatif.

L'observation des tubes contaminés se fait deux jours après la culture puis une fois par jour.

Les figures 2 montrent les anthères en culture.



Culture en milieu solide



Culture en milieu liquide

Fig.2 : Culture d'anthères du riz (*Oryza sativa*. L.)

Le nombre d'anthères cultivées par milieu et par variété est montré dans le tableau 1.

**Tableau 1 : Nombre d'anthères de riz (*Oryza sativa*) cultivées
par milieu et par variété**

Milieux d'induction Variétés	MS	MSL	N6	N6m	SK-Im	SK-I	H2	TOTAL
F-159	3780	3600	3420	3600	2070	2520	1890	20880
F-154	3330	3240	3060	3240	3150	3240	1260	20520

(MS : Milieu MURASHIGE and SKOOG Semi-solide, MSL : Milieu MURASHIGE and SKOOG Liquide, N6 : CHU et al, 1975 avec sucrose, N6m : N6 avec maltose, SK-I : RAINA et al 1989 ; SK-I-m : RAINA et al, 1989 sans caséine hydrolysate et myoinositol, H2 : Milieu N6 modifié par RAINA et al. en 1989)

Le tableau 2 montre le nombre d'anthères cultivées par variété et par rang de panicule.

Tableau 2 : Nombre d'anthères de riz (*Oryza sativa*) cultivées par variété et par rang de panicule

Variétés	F-159			F-154		
Rang de la panicule	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}
Nombre d'anthères cultivées	13590	5490	1800	12330	5580	2610

1-5 - Méthodes de calcul

Pour tous les calculs, nous avons suivi les méthodes de calcul adoptées par E. GUIDERDONI et ses collaborateurs en 1986 (E. GUIDERDONI et al. 1986).

- Le taux de contamination est évalué sans tenir compte du type de milieu.

$$\% \text{ de contamination} = \frac{\text{Nombre total de tubes contaminés}}{\text{Nombre total de tubes cultivés}} \times 100$$

- La fréquence d'induction de cal est exprimée par le pourcentage d'anthères callogènes.

$$\text{Pourcentage d'anthères callogènes} = \frac{\text{Nombre total d'anthères callogènes}}{\text{Nombre total d'anthères cultivées}} \times 100$$

$$\text{Nombre moyen de cals par anthère callogène} = \frac{\text{Nombre de cals obtenus}}{\text{Nombre d'anthères callogènes}}$$

2- Régénération des plantes

Les cals ayant 2 mm de diamètre ont été prélevés pour la régénération. La régénération comprend 3 étapes : le stress, le transfert en milieu de régénération et l'enracinement.

2- 1- Stress

Le stress consiste à déshydrater les cals puisque d'après J. BOCCON-GIBOD (1984), il est préférable de ne pas cultiver des explants mouillés, ils risqueraient de s'asphyxier. De plus, le stress favorise la néoformation des plantules.

Les cals sont stressés soit à l'aide de papiers filtres soit par traitement à l'ABA. Nous avons choisi le stress par papier filtre qui a donné des bonnes réponses pour la régénération par rapport au traitement avec l'ABA. (ANDRIANAIVO, 2002).

Les cals ont été placés sur un papier filtre stérilisé à l'étuve de 120° pendant 5 mn, puis mis dans une boîte de pétri fermée et enveloppée par un papier d'aluminium pour garder l'obscurité pendant 24 heures. On obtient alors des cals déshydratés.

2- 2- Régénération des plantules

Les cals stressés ont été repiqués sur les milieux de régénération. Trois types de milieux ont été utilisés : M1 régénération, MS régénération et H2 régénération (ANNEXE IV-2). Ces milieux proviennent des milieux d'induction, ils ne contiennent pas de 2,4-D, à la place il y a du BAP. Ce sont les milieux qui ont donné des meilleurs résultats parmi ceux qui ont été déjà utilisés au laboratoire de Biotechnologie en amélioration des plantes de l'Université d'Antananarivo.

Des exemples de résultats sont figurés dans le tableau 3.

Tableau 3: Nombre de plantes vertes obtenues dans les milieux de régénération

M_{1r} , MS_r , H_{2r} par les travaux antérieurs.

Milieux de régénération	M₁	MS	H₂ régénération
Auteurs et années	régénération	régénération	
ANDRIANAIVO, 2002	0.62% de plantes vertes		
RAMANANTSOA, 2003		7 plantes vertes	6 plantes vertes
RAVELOARISOLO, 2002		18 plantes vertes	

Les tubes contenant les cals repiqués ont été placés sous une intensité lumineuse fluorescente (2000 à 3000 lux) à 27°C avec une photopériode de 16h/8h lumière et obscurité (T. P. CROUGHAN, 1995). C'est la phase de formation de plantules (Fig.7).

2- 3- Enracinement

Lorsque les plantules atteignent la taille de 1 cm, elles ont été repiquées dans des tubes de grande dimension (25 cm de hauteur et 2.5 cm de diamètre) contenant le milieu d'enracinement, MS ϕ (fig. 9), la composition chimique figure en ANNEXE IV-3 .

.Le milieu MS ϕ ne contient pas de régulateurs de croissance et l'agar est remplacé par le phytigel. Ce milieu d'enracinement a donné les meilleurs résultats parmi les milieux utilisés (RAVELOARISOLO, 2002 ; RAMANANTSOA, 2003)

Ce milieu sert à favoriser l'enracinement des plantules. Les conditions de culture sont identiques à celles de la régénération.

Les milieux de régénération et les milieux d'enracinement ont été stérilisés de la même façon que les milieux d'induction.

2-4- Méthodes de calcul

$$\text{Pourcentage des cals transférés} = \frac{\text{Nombre total des cals transférés}}{\text{Nombre total des cals obtenus}} \times 100$$

$$\text{Pourcentage de régénération} = \frac{\text{Nombre de cals ayant régénéré des plantes}}{\text{Nombre total des cals repiqués}} \times 100$$

3- L'acclimatation

C'est une phase d'adaptation des plantules aux milieux extérieurs. Les plantules ont été cultivées soit directement au sol, soit dans le milieu d'acclimatation (4 l de solution Yoshida avec différents nutriments ; YOSHIDA, 1973) avant d'être cultivées au sol.

Nous avons pratiqué l'acclimatation en deux étapes : en milieu liquide puis au sol en serre.

3-1- Acclimatation en milieu liquide

Il s'agit de cultiver les plantules dans un milieu liquide qui est le milieu Yoshida (ANNEXE IV-4) pour les rendre vigoureuses avant de les repiquer au sol (YOSHIDA, 1973). Ce milieu a été utilisé par RAINA et ZAPATA en 1997 (RAINA et ZAPATA, 1997)

- Les plantules ont été retirées soigneusement du tube d'enracinement
- Les racines lavées avec de l'eau distillée pour enlever le reste du milieu et leur collet entouré par une éponge fine ont été insérés dans un trou sur une plaque servant de support.
- Le tout a été mis sur une cuvette contenant la solution nutritive (Fig. 14).
- La cuvette a été placée dans une salle de culture soumise à une intensité lumineuse 1000 à 2000 lux avec une photopériode 16/8 lumière/obscurité, à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et une humidité relative 60 à 65%. La solution nutritive est rajoutée au milieu tous les jours pour que les plantules ne manquent pas d'alimentation. Le milieu est changé toutes les 2 semaines et les plantules y restent jusqu'à ce qu'elles soient vigoureuses.

3-2- Acclimatation en serre

Les plantules vigoureuses ont été ensuite repiquées dans des pots contenant des sols de rizière et mises en culture en serre jusqu'à leur maturité. La préparation du sol ainsi que les conditions de culture sont identiques à celles des plantes donneuses d'anthères (Fig. 15).

3-3- Méthode de calcul

$$\text{Pourcentage des plantes acclimatées} = \frac{\text{Nombre total des plantes vertes acclimatées}}{\text{Nombre total des plantes vertes régénérées}} \times 100$$

Troisième partie :

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

I – EVALUATION DE LA CONTAMINATION

Nous avons évalué la contamination sans rendre compte du type de milieux utilisé. Le résultat sur la contamination est résumé dans le tableau 4.

***Tableau 4 : Nombre et pourcentage des tubes contaminés
lors de la culture d'anthères du riz (*Oryza sativa* L.)***

Variétés	Nombre de tubes cultivés	Tubes contaminés		Tubes non contaminés	
		Nombre	%	Nombre	%
F-159	321	89	27.72	232	72.27
F-154	288	60	20.83	228	79.16
TOTAL	609	149	24.46	460	75.53

La contamination est une multiplication de micro-organismes (bactéries ou champignons) à la surface du milieu de culture. Elle est causée par une mauvaise stérilisation des panicules ou des matériels ou due à un manque de précaution pendant la manipulation. Ces micro-organismes peuvent envahir le milieu entier et empêchent l'évolution des anthères. Les tubes contaminés peuvent avoir des différentes couleurs (noir, blanc, jaune ou rouge) selon la nature du micro-organisme. Les aspects des contaminations sont montrés dans la figure 3.



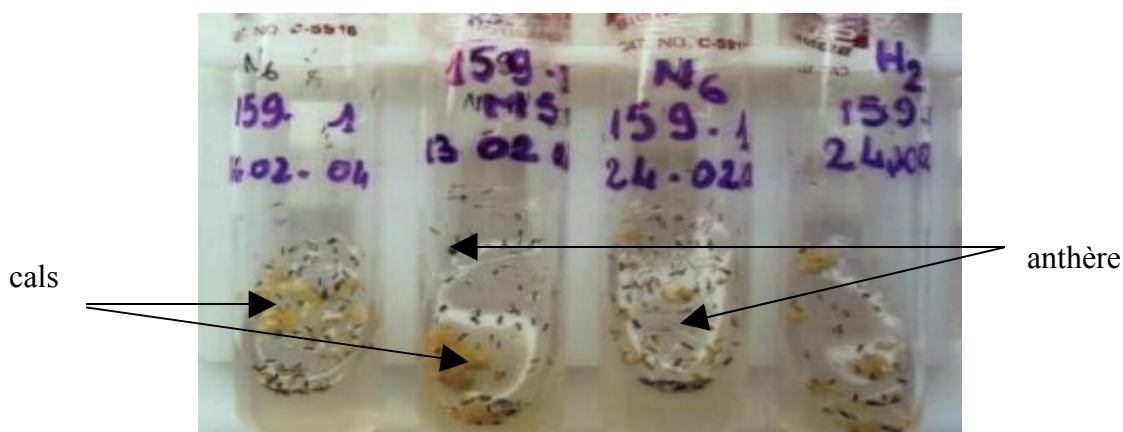
Fig 3 : Types de contamination observés lors de la culture d'anthères du riz (*Oryza sativa* L.), variétés F-154 et F-159

II- INDUCTION DE CALS

Des anthères de riz (*Oryza sativa*) des variétés F-154 et F-159 provenant des trois premières panicules ont été cultivées et réparties dans sept types de milieu d'induction.

L'apparition des cals commence 14 jours après la culture. Plusieurs anthères ont montré un développement de cals multiples. Les cals formés peuvent être embryogéniques ou non. Chez le riz (*Oryza sativa*) les cals non embryogéniques sont en général de couleur jaune clair ou marron et à paroi lisse tandis que les cals embryogéniques sont blancs, durs, ronds et peuvent se différencier partiellement en bourgeons (HEYSER, J. W. et al, 1983). La durée de culture, le nombre et la qualité des cals ainsi que la durée de survie des cals varient avec le milieu et le rang de panicule.

La figure 4 montre une vue d'ensemble des cals de la variété F-159 induits dans les milieux N6, MS et H2.



**Fig 4 : Cals induits de la variété de riz (*Oryza sativa* L.)
F-159 dans les milieux N₆, MS et H₂**

1- Effets des milieux de culture sur l'induction de cals

1-1 – Comparaison générale des effets des sept milieux d'induction

– *Variété F-159* : les résultats sur l'induction de cals dans chaque milieu d'induction sont montrés dans le tableau 5.



**Tableau 5 : Effet des milieux de culture sur l'induction de cals
d'anthères du riz (*Oryza sativa L.*) variété F-159**

Milieux d'induction	Nombre total d'anthères cultivées	Anthères callogènes		Nombre de cals obtenus	Nombre moyen de cals par anthères callogènes
		Nombre	%		
MS	3780	40	1.05	211	5.27
MSL	3600	10	0.27	10	1
N6	3420	88	2.57	209	2.37
N6m	3600	8	0.22	45	5.62
SK-I	2070	8	0.38	18	2.25
SK-Im	2520	11	0.43	30	2.72
H2	1890	31	1.64	77	2.48
TOTAL	20880	196	0.93	600	3.06

(MS : Milieu MURASHIGE and SKOOG Semi-solide, MSL : Milieu MURASHIGE and SKOOG Liquide, N6 : CHU et al, 1975 avec sucrose, N6m : N6 avec maltose, SK-I : RAINA et al 1989 ; SK-I-m : RAINA et al, 1989 sans caséine hydrolysate et myoinositol, H2 : Milieu N6 modifié par RAINA et al. en 1989)

Pour la variété **F-159** tous les milieux induisent des cals. La fréquence moyenne d'induction de cals est de 0,93 % et le nombre moyen de cals par anthère callogène est de 3.06 (Tableau 5 et fig. 5). Le milieu N₆ donne le meilleur résultat (2.57%) suivi des milieux H₂ (1.64 %) et MS (1.05%). SK-Im et SK-I ont donné des résultats moyens (0.43 %, 0.38 %) et ce sont les milieux MSL et N6m qui ont les résultats les plus faibles (0.27 % et 0.22 %). Il semble donc que pour cette variété, les milieux N₆, H₂ et MS sont favorables à l'induction de cal.

– **Variété F-154** : Le tableau 6 montre les résultats sur l'effet des milieux d'induction pour la variété F-154.

**Tableau 6 : Effet des milieux de culture sur l'induction de cals d'anthères
du riz (*Oryza sativa L.*), variété F-154**

Milieux d'induction	Nombre total d'anthères cultivées	Anthères callogènes		Nombre de cals obtenus	Nombre moyen de cals par anthères callogènes
		Nombre	%		
MS	3780	40	1.05	211	5.27
MSL	3600	10	0.27	10	1
N6	3420	88	2.57	209	2.37
N6m	3600	8	0.22	45	5.62
SK-I	2070	8	0.38	18	2.25
SK-Im	2520	11	0.43	30	2.72
H2	1890	31	1.64	77	2.48
TOTAL	20880	196	0.93	600	3.06

(MS : Milieu MURASHIGE and SKOOG Semi-solide, MSL : Milieu MURASHIGE and SKOOG Liquide, N6 : CHU et al, 1975 avec sucrose, N6m : N6 avec maltose, SK-I : RAINA et al 1989 ; SK-I-m : RAINA et al, 1989 sans caséine hydrolysate et myoinositol, H2 : Milieu N6 modifié par RAINA et al. en 1989)

Pour la variété **F-154**, les milieux MS liquide, N6, N6m ont induit des cals à des taux faibles, respectivement : 0.30%, 0.065% et 0.061% alors que les autres ne donnent aucun cal.

D'après ces résultats, on peut dire que la variété F-159 répond mieux à la culture d'anthères par rapport à la variété F-154.

La figure 5 résume les résultats sur l'induction de cals en fonction du milieu de culture des deux variétés de riz, F-154 et F-159.

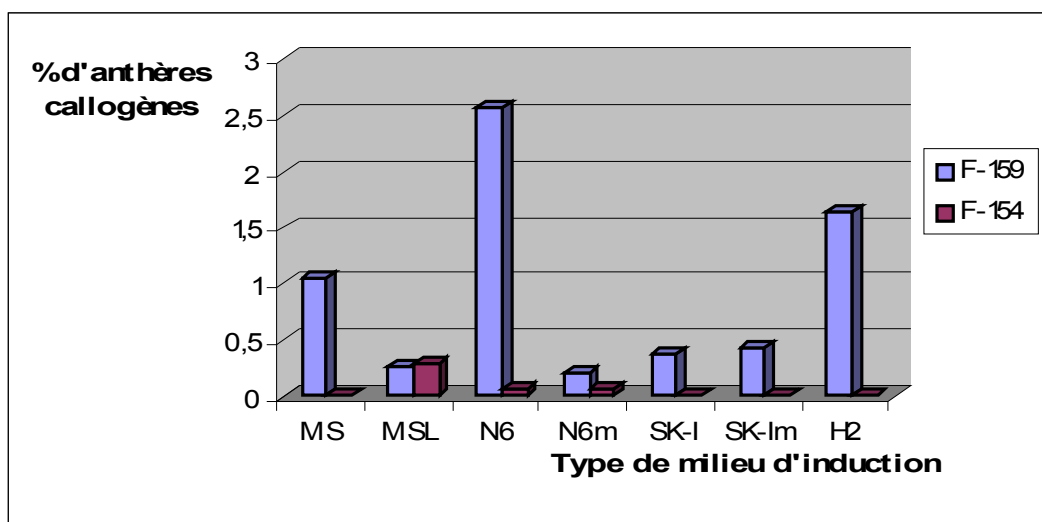


Fig. 5 : Histogramme montrant la variation de la fréquence d'induction de cals d'anthères du riz (*Oryza sativa* L.) en fonction du type de milieu, variétés F-159 et F-154

1- 2 – Comparaison de l'effet d'un milieu liquide et milieu semi-solide

Les milieux MS et MS liquide ont été utilisés afin de comparer leur effet sur l'induction de cals. Ces deux milieux contiennent les mêmes concentrations en composés chimiques, en vitamines et en régulateurs de croissance mais MSL ne contient pas d'agar.

- Dans les milieux MS liquides, la formation de cal commence bien avant les autres, juste deux semaines après la culture d'anthères. Pourtant la fréquence d'induction de cals est très faible pour tous les deux variétés (0.27% pour F-159, 0.30% pour F-154). Un cal seulement est produit par anthère callogène. De plus les cals n'augmentent pas de taille et dégénèrent une ou deux semaines après leur apparition. On n'observe pas de grande différence entre les deux variétés. La rapidité de formation de cals peut s'expliquer par le fait que les systèmes de culture en milieu liquide donnent aux microspores un accès facile aux substances nutritives et aux hormones (H. ZHOU and C. F. KONZAK, 1989).

- Dans les milieux MS semi-solides, les cals ne se forment qu'après 4 à 6 semaines de culture d'anthères. La variété F-154 n'induit aucun cal dans ce milieu tandis que chez F-159

on a obtenu 211 cals produits par 40 anthères callogènes parmi les 3780 anthères cultivées dans ce milieu. La fréquence d'induction de cal (1.05%) est plus élevée par rapport à celle du milieu liquide.

D'après ces résultats on peut dire que le milieu MS semble être favorable pour la variété F-159 mais pas pour la variété *F-154*.

1- 3 – Effet de la source de carbone

Parmi les paramètres étudiés, la source de carbone a une grande influence sur la réponse de culture d'anthères.

Deux types de milieux N6, l'un avec du maltose (N6m) et l'autre avec du sucrose (N6 témoin) ont été utilisés pour étudier l'effet de la source de carbone sur l'induction de cals.

- Pour la variété *F-159* le milieu N6 témoin donne une fréquence en induction de cals plus élevée (2.57 %) que le milieu N6 avec maltose (0.22 %). C'est donc le sucrose qui a un effet favorable sur l'induction de cals par rapport au maltose pour la variété F-159.

- Pour la variété *F-154* il n'y a pas de grande différence entre les deux milieux. Les résultats sont tous faibles : 0.065 % dans N6 et 0.061 % dans N6m.

1- 4 – Effets de la caséine hydrolysate et du myoinositol

- Pour la variété *F-159*, le milieu SK-Im qui ne contient pas de CH ni de myoinositol donne une fréquence d'induction de cal un peu plus élevée (0.43 %) par rapport au milieu SK-I témoin (0.38 %).

- Pour la variété *F-154*, aucun cal n'est obtenu sur les deux milieux SK-I.

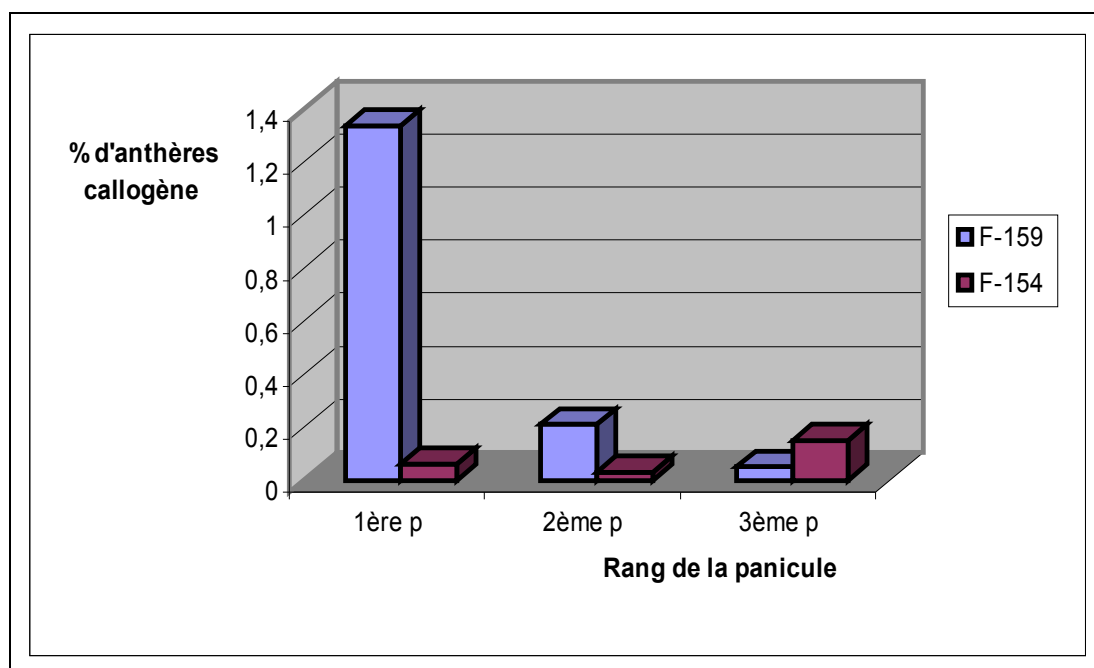
2- Effet du rang de la panicule sur l'induction de cals

-

Les résultats concernant l'effet du rang de la panicule sur l'induction de cals pour les deux variétés de riz sont indiqués dans le tableau 7 et la figure 6.

**Tableau 7 : Effets du rang de la panicule sur l'induction
de cals pour les deux variétés de riz (*Oryza sativa*) :**
F-154 et F-159

Variétés	Rang de la panicule	Nombre d'anthères cultivées	Anthères callogènes		Nombre de cals obtenus
			Nombre	%	
Variété F-159	1 ^{ère} panicule	13590	183	1.34	555
	2 ^{ème} panicule	5490	12	0.21	44
	3 ^{ème} panicule	1800	1	0.05	1
Variété F-154	1 ^{ère} panicule	12330	8	0.06	8
	2 ^{ème} panicule	5580	2	0.03	2
	3 ^{ème} panicule	2610	4	0.15	4



**Fig 6 : Histogramme montrant la variation de l'induction de cals
en fonction du rang de la panicule du riz (*Oryza sativa* L.)**
variétés F-154 et F-159

- Pour la variété **F-159**, ce sont les anthères des premières panicules qui induisent le plus grand nombre de cals. On a obtenu 555 cals sur 13590 anthères cultivées, ce qui donne 4.08% d'induction de cals. Avec les deuxièmes panicules, le nombre de cals induits diminue : 44 cals sur 5490 anthères (0.80%) et pour les troisièmes panicules : 1 cal sur 1800 anthères. Ce qui montre que les premières panicules semblent être plus favorables à l'induction de cals pour la variété F-159.

- Pour la variété **F-154** les résultats sont faibles avec toutes les panicules. Il n'y a pas de grande différence entre les trois rangs de panicules. Le rendement en cals varie de 0.03% à 0.15%.

III- TRANSFERT DES CALS SUR LES MILIEUX DE REGENERATION

Les cals ayant 1 à 3 mm de diamètre ont été stressés puis repiqués dans les milieux de régénération pour la formation des plantules. Le tableau 8 montre le nombre et le pourcentage des cals survivant et transférés dans les milieux de régénération.

Tableau 8 : Pourcentage des cals d'anthères de riz (Oryza sativa L.) transférés, variété F-159

Milieu d'induction	Nombre de cals induits	Cals dégénérés		Cals transférés	
		Nombre	%	Nombre	%
MS	211	8	3.79	203	96.20
MSL	10	10	0	0	0
N ₆	209	14	6.69	195	93.30
N ₆ m	45	1	2.22	44	97.77
SK-I	18	1	5.55	17	94.44
SK-Im	30	0	0	30	100
H ₂	77	15	0.19	62	80.51
TOTAL	600	49	8.16	551	91.83

(MS : Milieu MURASHIGE and SKOOG Semi-solide, MSL : Milieu MURASHIGE and SKOOG Liquide, N₆ : CHU et al, 1975 avec sucrose, N₆m : N₆ avec maltose, SK-I : RAINA et al 1989 ; SK-I-m : RAINA et al, 1989 sans caséine hydrolysate et myoinositol, H₂ : Milieu N₆ modifié par RAINA et al.en 1989)

- Pour la variété **F-159** parmi les 600 cals obtenus 49 cals (8.16%) ont dégénéré, et 92% ont été transférés. Tous les cals induits dans le milieu MS liquide dégénèrent avant leur transfert. Le pourcentage des cals transférés varie peu avec le type de milieu d'induction.

- Pour la variété **F-154** tous les cals induits ont dégénéré dans le milieu d'induction quelques jours après leur formation.

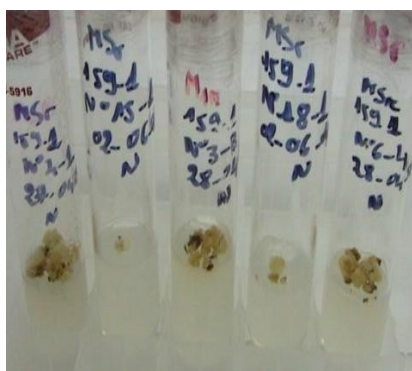
La dégénérescence des cals peut être due :

- soit à l'asphyxie comme dans les milieux liquides,
- soit à la contamination,
- soit au jaunissement du milieu

IV - REGENERATION ET CROISSANCE DES PLANTULES

Seuls les cals de la variété *F-159* arrivent au stade de régénération. Tous les cals survivants ont été transférés sans distinguer les cals embryogéniques et les cals non embryogéniques.

Les figures 7 montrent les cals en régénération.



*Cals dans les milieux
de régénération*



*Disposition à l'étagère des tubes
contenant les cals en régénération*

Fig.7 : Cals d'anthères de riz (*Oryza sativa* L.) en régénération, variété F-159

La répartition des cals dans les milieux de régénération est indiquée dans le tableau 9.

**Tableau 9 : Nombre de cals d'anthères du riz (*Oryza sativa* L.)
transférés dans chaque milieu de régénération avec leur milieu**

d'induction respectif

Milieux d'induction	Nombre total des cals transférés	Milieux de régénération		
		MSr	M1r	H2r
MS	203	169	17	17
MSL	10	0	0	0
N ₆	195	156	24	15
N ₆ m	44	44	0	0
SK-I	17	17	0	0
SK-Im	30	30	0	0
H ₂	62	49	5	8
TOTAL	551	465	46	40

(MS : Milieu Murashige and Skoog Semi-solide, MSL : Milieu Murashige and Skoog Liquide, N₆ : Chu et al, 1976 avec sucrose, N₆m : N₆ avec maltose, SK-I : Raina and Zapata, 1997, SK-I-m (modifié) : Raina and Zapata, 1997 sans caséine hydrolysate et myoinositol, H₂ : Milieu N₆ modifié par Raina et Zapata en 1989, MSr : Murashige and Skoog de régénération, M1r : milieu SK-I modifié par RAINA et al. en 1989, H₂r : H₂ régénération).

Parmi les cals transférés dans le milieu de régénération, certains ont dégénéré et d'autres se sont divisés et multipliés. Les cals non embryogéniques se divisent sans cesse et ne donnent pas d'embryons tandis que les cals embryogéniques, après dix jours à trois semaines de leur transfert commencent à former des bourgeons verts. Ces derniers se différencient ensuite en plantules.

Un cal régénère une ou plusieurs plantules. Il a formé soit des plantules vertes soit des plantules albinos ou les deux à la fois. Certains cals forment seulement des racines.

La figure 8 montre ces différents cas possibles de la régénération.



Plantules vertes

Plantules albinos

Cals enracinés

**Fig. 8 : Cas possibles de la régénération à partir des cals
de riz (*Oryza sativa* L.)**

Les plantules ayant 1 à 2 cm de taille ont été ensuite repiquées dans les mêmes milieux d'enracinement (MS ϕ) pour favoriser leur enracinement et activer leur croissance. Cette étape est illustrée par les figures 9 et 10.



**Fig. 9 : Plantules de riz (*Oryza sativa* L.) repiquées
dans le milieu d'enracinement (MS ϕ)**

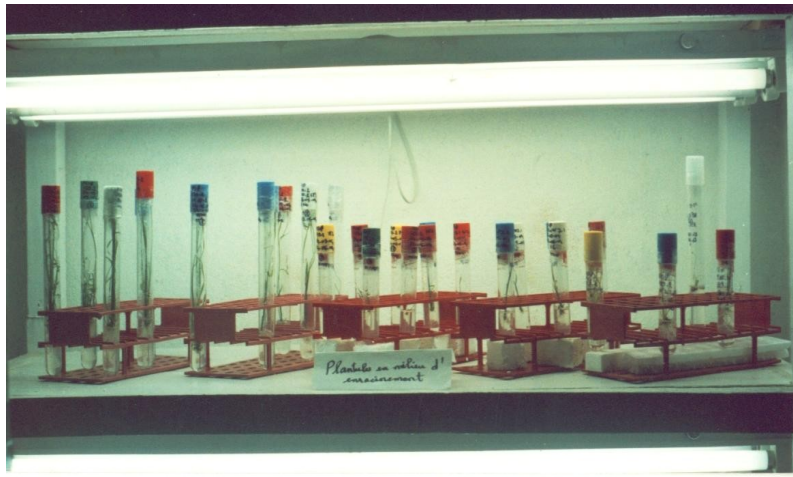
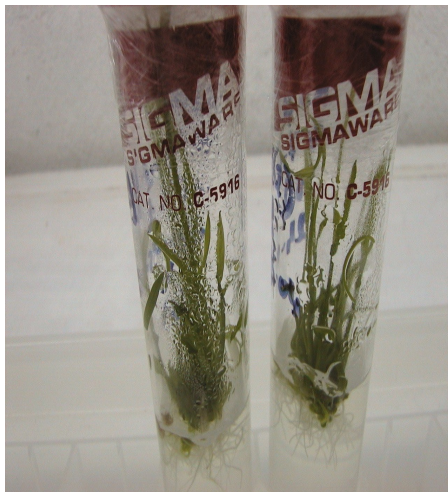


Fig. 10 : Disposition à l'étagère des tubes contenant les plantules de riz (*Oryza sativa* L.) en milieu d'enracinement

Dans ce milieu les racines se développent et cela active la croissance des plantules.

La figure 11 nous montre l'état des plantules vertes et albinos se développant dans le milieu d'enracinement.



Plantules vertes



Plantules albinos

Fig. 11 : Plantules de riz (*Oryza sativa* L.) développées dans le milieu d'enracinement



Le pourcentage de régénération et le nombre de plantules obtenues dans chaque milieu de régénération sont indiqués dans le tableau 10 et la figure 12.

***Tableau 10 : Résultats sur la régénération et le nombre des plantules de riz
(Oryza sativa, L.) obtenues : variété F-159***

Milieus de régénération	Nombre de cals repiqués	Nombre de cals ayant régénéré des plantules	Pourcentage de régénération	Nombre total de plantules obtenues	Nombre de plantules vertes	Nombre de plantules albinos
MSr	465	30	6.45	88	73	15
M₁r	46	1	2.17	1	1	0
H₂r	40	0	0	0	0	0
Total	551	31	5.62	89	74	15

MSr : Murashige and Skoog de régénération, M₁r : Provenant de la modification du milieu SK-I par RAINA et ZAPATA en 1989, H₂r : H₂ régénération)

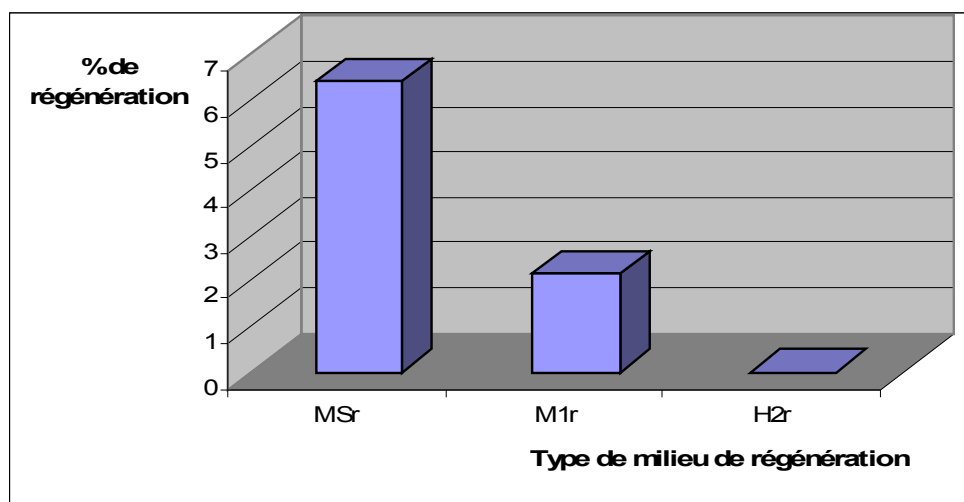


Fig. 12 : Histogramme montrant la variation de la régénération des plantules de riz (Oryza sativa L.) en fonction du type de milieu de régénération, variété F-159

Parmi les trois types de milieu de régénération c'est le milieu MSr qui donne le meilleur résultat. Dans ce milieu le pourcentage de régénération est 6.45% et on a obtenu 88 plantules dont 73 vertes et 15 albinos ; dans le milieu M_{1r} : 2.17% avec 1 plantule verte ; et dans H_{2r} : aucune plantule. Le milieu MSr semble être donc le plus favorable pour la régénération des plantes pour la variété F-159.

En faisant le rapport entre les plantules vertes et les plantules albinos, nous avons eu un taux élevé en plantules vertes (82.75%) (*Tableau 11*).

***Tableau 11 : Rapport entre les plantules vertes et les plantules albinos
de riz (*Oryza sativa L.*), variété F-159***

Nombre total des plantules obtenues	Plantules vertes		Plantules albinos	
	Nombre	%	Nombre	%
89	74	83.14	15	16.86

Le tableau 12 montre une récapitulation des paramètres qui nous ont permis d'obtenir des plantules (vertes ou albinos).

***Tableau 12 : Récapitulation des paramètres donnant des plantules de riz
(*Oryza sativa L.*), variété F-159***

Variétés	Rang de la panicule	Milieu d'induction	Milieu de régénération	Nombre de plantules obtenues	Types de plantules
F-159	Première	N ₆	MSr	73	Vertes
			M _{1r}	1	
		MS	MSr	15	Albinos

D 'après le tableau 12 on peut conclure que pour la variété F-159 :

- ce sont les anthères des premières panicules qui induisent des cals régénérant des plantules ;
- les cals induits dans le milieu d'induction N₆ régénèrent des plantes vertes et ceux induits dans le milieu d'induction MS donnent des plantes albinos ;
- le milieu MSr est favorable à la régénération des plantes.

V - ACCLIMATATION

Les plantules vertes vigoureuses comme celles indiquées par la figure 13 dans les milieux d'enracinement sont retirées des tubes à essai et acclimatées.



***Fig. 13 : Plantes vigoureuses de riz (Oryza sativa L.)
prêtes pour l'acclimation***

Les résultats concernant l'acclimation sont exposés dans le tableau 13

Tableau 13 : Résultats sur les plantules de riz (Oryza sativa L.) acclimatées

Milieux de régénération	Nombre total de plantules vertes, régénérées	Plantules acclimatées en milieu Yoshida		Plantules acclimatées en serre		Nombre de plantules survivant
		Nombre	%	Nombre	%	
MSr	73	59	80.82	28	38.35	18
M1r	1	1	100	1	100	1
Total	74	60	81.08	29	39.18	19

Parmi les 74 plantules vertes régénérées, 14 plantules ont dégénéré et 60 ont été acclimatées en milieu Yoshida dont 29 plantules restent pour l'acclimation en serre. Les figures 14 et 15 nous montrent ces plantules au stade d'acclimation.



Fig. 14 : Plantules de riz (Oryza sativa L.) acclimatées dans la solution Yoshida. (Après une semaine de repiquage)



Fig. 15 : Plantules de riz (Oryza sativa L.) acclimatées en serre. (En période de floraison)

Dix-neuf (19) plantules atteignent la floraison mais parmi elles une seule plante est arrivée à maturité et a donné des graines. Les autres sont tous stériles. Le pourcentage de dédoublement spontané des chromosomes est donc $1/19 \times 100 = 5.26 \%$. La figure 16 nous montre les graines obtenues.



***Fig. 16 : Graines double haploïdes de riz
(Oryza sativa L.), variété F-159***

DISCUSSION

Tous les travaux sur l'androgenèse dans le laboratoire de biotechnologie en amélioration des plantes ont pour objectif de produire des lignées haploïdes. Celles-ci permettent de fixer les caractères intéressants d'une variété hybride en une période de deux ans au maximum pour l'amélioration variétale du riz. Les études antérieures ont été basées sur la mise au point de la technique de culture d'anthères in-vitro ainsi que les facteurs qui y interviennent.

Concernant la contamination, le taux de contamination que nous avons eu (24,46 %) est moins élevé que celui de RAKOTOARISOA en 2000 (34,64 %) mais plus élevé que ceux des autres collègues (RAVELOARISOLO, 2002 : 13,09 % ; RAMANANTSOA, 2003 : 10,41%). La contamination n'est pas un facteur limitant sur l'androgenèse car elle peut être évitée en prenant des précautions sur les manipulations.

Induction de cals

Pour la variété F-159, les milieux d'induction N6, H2 et MS ont donné les meilleurs résultats sur l'induction de cals. Ceci peut être dû à la présence d'ion ammonium NH_4^+ qui augmente la quantité d'azote dans ces milieux (S.K.RAINA, and F.J. ZAPATA, 1997). Ces résultats sont comparables à ceux de ANDRIANJAKA en 2002. Pour la variété F-154, les milieux d'induction qui ont donné les meilleurs résultats sont MS liquide, N₆ et N₆ m. Ces résultats s'expliquent par l'interaction entre le génotype et le milieu d'induction sur la culture d'anthères (N. MANDAL et S. GUPTA, 1995 ; M.D. NGUYEN et F.J. ZAPATA, 1993 ; H. K. KHANNA et S. K. RAINA, 1998).

Nous avons observé que les cals induits dans le milieu liquide dégénèrent quelques jours après leur formation. Le problème dans le milieu liquide est l'asphyxie. De plus les milieux liquides peuvent être atteints facilement par la contamination. En faisant une comparaison entre les deux milieux SK-I, nous avons vu que la caséine hydrolysate et le myoinositol semblent être inutiles à l'induction de cals pour la variété F-159. Ce résultat est comparable à celui de nombreux chercheurs qui montre que la caséine hydrolysate peut entraîner la nécrose des anthères (CHEN et TSAY, 1984) et que le myoinositol n'est pas essentiel à la culture in

vitro. Ce sont les vitamines appartenant au groupe B, en particulier la vitamine B₁ qui sont les plus utilisées en culture in vitro (J. BOCCON GIBOD, 1984).

A part le milieu de culture, l'état de l'explant a aussi un effet sur la réponse d'anthères. Les anthères des premières panicules ont une induction de cals plus élevée, ceci s'explique par l'abondance des nutriments dans ces panicules. Ces résultats sont comparables à ceux de CHEN et TSAY (1984).

Si nous faisons une comparaison de nos résultats avec d'autres variétés utilisées antérieurement, nous avons vu que pour la variété F-159, la fréquence d'induction de cals qui varie de 0,22 à 2,57 % est un peu plus élevée par rapport à celle de deux variétés *indica* : Mailaka (0.60 %) et Kelimamokatra (0,35 %) (RAKOTOARISOA, 2000). Mais il est moins élevé que les résultats des variétés *japonica* comme ceux de ANDRIANJAKA en 2002 (16%) ANDRIANAIVO en 2002 (0 à 73,57), RAVELOARISOLO en 2002 (0 à 25,12 %) et RAMANANTSOA en 2003 (0 à 12,32%).

Pour la variété F-154, nous avons obtenu des cals (0.068%) mais les résultats sont plus faibles par rapport aux autres variétés japonica. En général, la variété F-159 réagit mieux à l'androgénèse par rapport à la variété F-154, ce qui explique que le génotype a une grande influence sur la culture d'anthères.

Régénération des plantes

Nos résultats sur le pourcentage de régénération et sur le nombre de plantules vertes sont comparables aux autres résultats (Tableau 14). Le milieu MSr semble être le plus favorable en régénération. Ceci confirme les résultats des études antérieures : (RAVELOARISOLO, 2002; RAMANANTSOA, 2003).

Parmi les facteurs étudiés, ce sont l'âge et la qualité des cals qui ont le plus grand effet sur la régénération des plantes. En effet la capacité de régénération diminue avec l'âge du cal. Les cals doivent être transférés après 10 jours de leur formation. Cependant les facteurs agissant sur la formation de cals ont tous des effets sur la régénération des plantes.

Des études au microscope électronique (C. S. SUN et al. 1982) ont montré que lorsque les cals sont transférés sur le milieu de régénération, le nombre des mitochondries, des plastes et

des ribosomes augmentent dans les cellules épidermiques méristématiques à partir desquelles les plantules vont se différencier.

Le pourcentage de plantules albinos est de 16,86 %. Ce taux d'albinisme est moins élevé par rapport à celui des études antérieures. Les plantes albinos peuvent être produites par différents facteurs, à savoir le génotype, les conditions de culture et la composition des milieux de culture.

Le tableau 14 montre quelques résultats d'induction de cals et de régénération de plantes.

Tableau 14 : Comparaison des résultats d'induction de cals et de régénération des plantes vertes de la variété F-159 et ceux de quelques variétés de riz (*Oryza sativa*L.)

Variétés	Induction de cals (%)⁽¹⁾	Pourcentage de régénération (%)⁽²⁾	Auteurs
Jaya (I)	-	15	J.S. SHANDU et al (1993)
IR 54 (I)	-	24	
Mailaka (I)	0,60	-	RAKOTOARISOA (2000)
Kelimamokatra (I)	0,35	-	
Japonica tapei 309 (J)	-	18,01	F. J. ZAPATA (1991)
IRAT 112 (J)	0 – 73,57	0,62	ANDRIANAIVO (2002)
F – 47 (J)	0 – 25,12	-	RAVELOARISOLO (2002)
Marotia (J)	0 – 5,74	-	RAMANANTSOA (2003)
F-159 (J)	16 %	-	ANDRIANJAKA (2002)
F- 154 (J)	-	0	
F-159 (J)	0 – 2,57	5,62	RAJAONARITININA (2004)
F- 154 (J)	0 – 0,068	0	

(1) : Pourcentage d'anthères callogènes par rapport au nombre d'anthères cultivées

(2) : Pourcentage des cals régénérant des plantes vertes par rapport au nombre de cals transférés

– : pourcentage non indiqué

Acclimatation

Le pourcentage des plantules acclimatées en milieu liquide par rapport au nombre de plantules vertes régénérées est de 81.08 %. Ce résultat est plus élevé par rapport aux travaux des autres collègues. Cependant beaucoup de plantules ont dégénéré dans ce milieu. D'après notre observation lorsque les plantules sont encore de petite taille (< 6 cm) dans le milieu d'enracinement, elles n'arrivent pas à survivre dans le milieu Yoshida. De plus les plantules ne doivent pas séjourner plus de quatre semaines dans le milieu liquide.

Concernant le taux de fertilité des plantes, 5.26 % des plantules survivant donnent des graines fertiles. Ce résultat est plus faible que celui de RAVELOARISOLO en 2002 (9 plantes fertiles sur 15 acclimatées).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail nous a permis d'obtenir des plantes et des graines double haploïdes de la variété F-159 en sachant les types de milieu d'induction et de régénération favorables pour la culture d'anthère in vitro.

Pour la variété F159, ce sont les milieux d'induction N₆, H₂ et MS qui ont donné les meilleurs résultats en induction de cals, respectivement 2.57 % 1.64 % et 1.05 %. Pour la variété F-154, les résultats sont faibles avec tous les types de milieu d'induction. De plus les cals de la variété F-154 ne survivent pas longtemps. La durée de prétraitement à froid était identique pour les deux variétés (8 jours à 10°C), ce qui explique que l'induction de cals dépend du génotype. Il semble que la variété F-154 n'est pas favorable à la culture d'anthères.

On peut dire, pour la variété F-159 que :

- Les milieux solides sont plus favorables à l'induction de cals que les milieux liquides.
- Le sucrose agit mieux en culture d'anthères par rapport au maltose.
- La présence de caséine hydrolysate (CH) ainsi que de myoinositol dans les milieux de culture ne sont pas indispensables à l'induction de cals.
- Le milieu d'induction N₆ suivi du milieu de régénération MSr favorise la production des plantes vertes. Le taux d'albinisme est faible pour cette variété.
- Ce sont les anthères des premières panicules qui ont donné les meilleurs résultats en androgenèse du riz.

En ce qui concerne les résultats sur les plantes fertiles, le taux de dédoublement spontané des chromosomes est de 5,26 %. Nous devons utiliser le traitement à la colchicine dans les prochaines études pour produire un maximum de graines double haploïdes fertiles.

En général l'objectif est atteint car nous avons obtenu des plantes haploïdes et des graines fertiles de la variété F-159 et au total nous avons obtenu 512 graines. Ces graines peuvent produire des lignées haploïdes doublées exprimant les caractères intéressants et peuvent être utilisées comme matériels dans des travaux de sélection pour l'amélioration variétale.

Actuellement ces graines sont en cours d'utilisation sur terrain pour d'autres études.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFZA R., SHEN M., ZAPATA F. J., XIE J., FUNDI H. K., KANG-SEOP L, BOBADILLA-MUCINO E., KODYM A., 2000. Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency. *Plant Science* 153. pp 155-159. ELSEVIER.
- ANDRIANAIVO H. V. S, 2002. Etudes de l'effet de l'irradiation sur la formation de cals et sur la régénération de plantes vertes par androgenèse chez la variété du riz " Rojofotsy " (*Oryza sativa* L. *ssp indica*). Mémoire de D. E. A. Option Physiologie Végétale. Faculté des Sciences Université d'Antananarivo.
- ANDRIANJAKA Z. N. 2002. Application de l'androgenèse, de la transgenèse et des marqueurs microsatellites pour l'amélioration variétale de riz (*Oryza sativa* L.). Mémoire de D. E. A. Option Physiologie végétale Faculté des Sciences Université d'Antananarivo.
- ANITHA S. K., REDDY G. M., 1996. Anther culture studies and selection of salt tolerant cell lines from *Indica* rice. *Proceeding of The Indian National Science Academy Part. B. Biological Sciences* 63 (1) pp. 99-106 India
- AUGE R., 1984. Les phénomènes physiologiques liés à la réalisation des cultures in vitro. Dans: *La culture in vitro et ses applications horticoles*. Chap. 3. J. B. Baillière LAVOISIER. Tec & Doc pp 41-46.
- AUGE R. et J. BOCCON GIBOD, 1984. Les applications à l'horticulture. dans: *La culture in vitro et ses applications horticoles*. Chap. 5. J. B. Baillière LAVOISIER. Tec & Doc. pp 75 – 102.
- BAJAJ Y. P. S., REINERT J., HEBERLE E. 1977. Factors enhancing in-vitro production of haploid plants in anthers and isolated microspores. In: Gautheret R. (ed). *La culture des tissus et des cellules des végétaux*. Mason. Paris. Pp 47-58.
- BERNARD, 1980. In vitro androgenesis in hexaploid triticales: determination of physical conditions increasing embryoid and green plant production. *Z. Pflanzenzücht* 85: 308-321
- BOCCON-GIBOD J., 1984. Les besoins nutritifs des tissus cultivés en conditions aseptiques. Dans: *La culture in vitro et ses applications horticoles*. Chap. 3. J. B. Baillière LAVOISIER. Tec & Doc. pp 41-46.
- CHEN C.C., TSAY H. S. and HUANG C. R., 1991. Factors affecting Androgenesis in Rice (*Oryza sativa* L.) in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 14 Rice. Edited by Y. P. S. Bajaj Springer-Verlag. PP 193-211
- CHEN C. C. and LIN C. M., 1976. Induction of rice plantlets from anther culture. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 17: 18 – 24
- CHEN C. C. and LIN C. M., 1981. Genotypic differences in plant production in anther culture of rice. In CHANG W.C. (ed). *Proc Symp Plant Cell Tissue Cult Acad Sinica*. Taipei. pp 199-203.

- CHEN C. C., 1978. Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. Crop Sci. 18: 905-906
- CHEN J. J. et TSAY H.S., 1984. Relationship between the time for callus initiation, callus age and the ability of organ regeneration from rice anther culture. J. Agric. Assoc. China 126: 2-9
- CHEN Y., LIANG L.T., ZHU J., WANG R.F., LI S.Y., TIAN W.Z. and ZHENG S.W. ., 1974. Studies on induction conditions and genetic expression of pollen plants in rice. Sci. Sin. 1: 40-51
- CHEN Y., ZUO Q. Z., LI S. Y., QU R.D., 1982. Plant regeneration from isolated rice pollen culture and some factors affecting induction frequency. In: Fujiwara A. (ed) Plant Tissue Culture 1982. Maruzen, Tokyo, pp 559-560.
- CHU C.C., WANG C.C., JUN, C. S., HSU C., YIN K. C., CHU C. Y. and BI F. Y., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci 16: 659-688
- CHU Q.R. XI P.J., ZHANG.Z. H., 1984. Morphological variation and cytogenetics of pollenclones derived from rice anther culture. Sanghai Agric. Sci. Tech. 11 (2): 3-4. Rice Abstr 1985, 8 (10): 196
- CLAPHAM, 1977. Haploid induction cereals. In: Reinert J. Bajaj YBS (eds). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 279-298
- CROUGHAN T.P., McKENZIE K.S., JODON N.E., PIZZOLATTO M.M, 1983. The use of anther culture to expedite the breeding and release of new varieties of rice. 75th Annu. Prog. Rep. Rice Res. Stn, pp 48-52
- CROUGHAN T. P., McKENZIE K.S., PIZZOLATTO M.M, 1985. The use of anther culture to expedite the breeding and release of new varieties of rice. 77th Annu. Prog. Rep. Rice Res. Stn, pp 64-65
- CROUGHAN T. P., 1995. Anther culture for doubled haploid Production. in: O. L. Gamborg, G. C. Phillips (Eds.). Plant cell, Tissue and organ culture, Fundamental Methods. Chap. 12. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1995. Printed in Germany.
- DE BEAUVILLE A., 1980. Botanique: Obtentions d'haploïdes in vitro à partir d'ovaires non fécondés de riz, *Oryza sativa* L. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 290, série D pp 489-492
- DEMARLY Y. et M.SIBI., 1989. Amélioration des plantes et Biotechnologies. John LIBBEY EUROTTEXT LONDON, PARIS AUPELF
- DEMARLY Y., 1992. Les plantes haploïdes. Coursier au CNRS pp 37-50

- FOROUGH-WEHR B., FRIEDT W. and WEGEL W., 1982. On the genetics improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. Theor. Appl. Genet. 62: 233-239
- GENOVESI A. D., 1990. Maize (*Zea mays* L.) in vitro production of haploids. In: Y.P.S. Bajaj (Ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Haploids in Crop Improvement I. Springer Verlag. Pp 176-203
- GENOVESI A. D. and MAGILL C. W., 1979. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. Crop Sci. 19: 662-664
- GUHA MUKERJEE S., 1973. Genotypic differences in the in vitro formation of embryoids from rice pollen. J. Exp. Bot 24: 139-144
- GUIDERDONI E., 1991. Gametic selection in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.) Plant Breeding Department, IRRI P. O. Box 933 Manila, Philippines Theor. Appl. Genet. (1991) 81 406-412
- GUIDERDONI E., 1992. Progrès récents des biotechnologies du riz. LE POINT SUR.. Synthèse, notes techniques et actualités. L'AGRONOMIE TROPICALE, 46-2. pp 137-153
- GUIDERDONI E., COURTOIS B., DECHANET R., et FELDMANN P., 1986. La production de lignées haploïdes doublées de riz (*Oryza sativa* L.) par culture d'anthers in vitro. L'AGRONOMIE TROPICALE 1986 41-3-4
- HARN, 1969. Studies on anther culture of rice. Korean J. Breed. 1: 1-11.
- HENRI Y. and DE BUYSER, 1980. Comparison of different media used in culturing anthers in vitro in soft wheat. Can J. Bot. 58: 977-1000
- HEYSER J. W., DYKES T.A., DEMOTT K.J. and NABORS M.W., 1983. High frequency, long term regeneration of rice from callus culture. Plant Science Letters-29 pp 175-182. Department of Botany and plant Pathology (USA)
- HU C., LIANG H.H., HUANG S.C., HO C.P. 1978b. An improved method of anther culture in paddy rice. In: Proc. Symp. Anther Cult. Sciences Press, Peking, pp 93-98
- IRRI, 1997. Rice Almanac. Second Edition IRRI Los Banos Philippines. CIAT Cali Colombia.
- JÄHNE A., LAZZERI P. A., JÄGEN-GUSSEN and LORZ H., 1991. Plant regeneration from embryogenic cell suspensions derived from anther culture of barley (*Hordeum vulgare* L.) Theor. Appl. Genet., 82: 74-80
- JÄHNE A., LORZ H., 1995. Cereal microspore culture. Plant Science 109 1-12
- KASHA et KAO, 1970. In : DEMARLY Y., 1992. Les plantes haploïdes. Coursier au CNRS pp 37-50

- KHANNA H. K. & RAINA S. K., 1998. Genotype X culture medium interaction, effects on regeneration response of three indica rice cultivars. Plant cell, Tissue and organ culture 52: 145-153. Kluwer Academic publishers. Printed in the Netherlands.
- KUSH G. S., BRAR D. S., ZAPATA F. J., NELSON R., McCOUCH S. and BOTTRELL D.G., 1994. Rice biotechnology at IRRI. Toward enhanced and sustainable Agricultural productivity in the 2000's. Breeding research and Biotechnology p 387-390. In: IRRI Rice
- LENKA N. and REDDY G. M., 1994. Role of media, plant growth regulators in callusing and plant regeneration from anther of indica Rice. Proc. Indian natn. Sci. Acad., B60, No-1, pp 87-92.
- LENTINI Z., REYS P., MARTINEZC. P., ROCAW. M., 1995. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. Plant Science 110 pp 127-138.
- LYNCH P.T., FINCH R.P., DAVEY M.R., and COCKING E.C., 1991. Rice Tissue Culture and its Application. Plant genetic Manipulation Group, Department of Botany. In: IRRI, 1991. Edited by KHUSH G.S., TOENNIESEN G. H. Biotechnology in Agriculture N°6. Rice Biotechnology (IRRI)
- MAHESHWARI S.C., TYAGI A. K., MALHOTRA K., 1980. Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms – the current status. Theor. Appl. Genet. 58: 193-206
- MALUSZYNSKI M. ,SIGURBJÖRNSSON B. , AMANO E., SITCH L. & KAMRA O., 1991. Mutants Varieties-data bank, FAO/IAEA database. Mutation Breeding Newsletter (MBSNL) Vienna, 38:16-32
- MANDAL N. et GUPTA S., 1995. Effect of genotype and culture medium on androgenese callus formation and green plant regeneration in *indica* rice. Indian Journal of Experimental Biology Vol. 33, October 95 pp 761-765.
- M. E. F B, 2004. Révue d'Information Economique : Publication trimestrielle de la Direction générale de l'Economie. Ministère de l'Economie, des Finances et du Budget. WWW.mefb.gov.mg
- MOHAPATRA P. K. et SAHU S. K., 1991. Heterogeneity of primary branch development and spikelet survival in rice panicle in relation to assimilates of primary branches, J. Exp. Bot. 42 : 871-879
- MURASHIGE and SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-477
- NGUYEN M. D., ZAPATA F. J., 1993. Effect of interaction between genotype and culture medium on callus induction and plant regeneration of anther culture of Vietnamese *indica* rice (*Oryza sativa* L.). International Rice research Notes 18 (3) 10-11, Hai Hung Vietnam.

- NIIZEKI and OONO, 1968. Induction of haploid plant from anther culture. Proc. Jpn Acad. 44 PP. 554-557.
- NITSCH C., 1974. Pollen culture – a new technique for mass production of haploid and homozygous plants. In Kasha K. (ed). Haploids in higher plants, advances and potential. Univ. Press, Guelph, pp 123-135
- PROTOCOL A. C. doc., 1998. Laboratory protocol for tissue culture techniques in rice anther culture
- QUIMIO C. A. and ZAPATA F. J., 1990. Cell Biology & Molecular genetics Diallel analysis of callus induction and green plant regeneration in rice anther culture. crop Science 30(1) 188-192, Philippines.
- RAINA S.K., BALACHANDRAN S.M., VIRMANI S. S. and ZAPATA F. J.. Improved medium for efficiency anther culture of some *indica* rice hybrids. Int. Rice Res. Newsletter, 14
- RAINA S. K. and ZAPATA F. J., 1997. Enhanced anther culture efficiency of *indica* rice (*Oryza sativa* L.) through modification of the culture media. Plant Breeding 116, 305-319.
- RAKOTOARISOA N. V., 2000. Contribution à la mise au point de technique d'induction de cals par la culture in vitro d'anthères de riz (*Oryza sativa* L. ssp *indica*) variétés «Mailaka» et «Kelimamokatra». Mémoire de D. E. A. Option Physiologie Végétale Faculté des Sciences Antananarivo.
- RAMANANTSOA R. H., 2003. Application de la culture d'anthères in-vitro sur sur la variété de riz (*Oryza sativa* L.) Marotia (3729) non irradiée et irradiée. Mémoire de D. E. A. Option Physiologie Végétale Faculté des Sciences Antananarivo.
- RAVELOARISOLO E., 2002. Etudes des effets de prétraitement à froid et du milieu de culture sur l'androgenèse in vitro chez les variétés de riz pluvial. Mémoire de D. E. A. Option Physiologie Végétale Faculté des Sciences Université d'Antananarivo.
- REDDY V. S., LEELAVATHI S. and SEN S. K., 1985. Influence of genotype and culture medium on microspore callus induction and green plant regeneration in anthers of *Oryza sativa*. Physiol. Plant 63: 309-314. Edited by C. H. Banman- Copenhagen
- SANDHU J. S., 1993. Callus induction and Plant regeneration from cultured Anthers of *indica* rice Varieties. Plant Tissue Cult. 3 (1) 17-21. (Biotechnology Center, Punjab Agricultural) India.
- SHIH-WEI L. and ZHI-HONG X., 1991. Anther culture for Rice Improvement in China. in: Biotechnology in Agriculture and Forestry 14 Rice. Edited by Y. P. S. Bajaj Springer-Verlag. Section III.
- SHEN J.H., LI M.F., CHENY.Q.and ZHANG Z.H., 1982. Breeding by anther culture in rice varieties improvement. Sci. Agric. Sin. 2: 15-19

- SNAPE, J. W., 1982. The use of doubled haploids in plant breeding. In: Induced variability in plant Breeding. Pp: 52-58 Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, the Netherlands
- SUN C.S., CHU C. C., LI S. Q., 1982. Ultrastructural changes of rice pollen callus cell grown on differentiation medium. Acta Bot. Sin. 24: 493 – 498
- SUN L.H., WANG, T.H., FENG Y.S., 1978. Experiments on ⁶⁰Co radiation treatment of anther and callus in rice. In: proc. Symp. Anther Cult. Science Press, Peking, pp 278-279
- SUNDERLAND N., XU Z.H., HUANG B., 1981. Recent advances in barley anther culture. In Proc. 4th Int. Barley genetics Symp. Univ. Press Edinburg, pp 699-703
- SUNDERLAND, 1978: Strategies in the improvement of Yelds in anther culture. In: Proc. Symp. Plant tissue culture. Science Press, Beijing, pp 65-86
- TORRIZO and ZAPATA, 1986. Anther culture in rice IV. The effect of abscisic acid on plant regeneration. Plant Cell Reports 5, 136-139
- VIJAYA L.G., REDDY G. M., 1997. Anther culture of *indica* rice. Technical improvement in callus induction and green plant regeneration. Journal of Genetics 1 Breeding 51(4) pp 295-301 India
- WANG C. C. SUN C. S., CHU Z., 1974. On the conditions for the induction of rice pollen plantlets and certain factors affecting the frequency of induction. Acta Bot. Sin. 16: 43-53
- WANG C.C., SUN C.S., CHU C.C. and WU C. S., 1978. Studies on the albinos pollen plantlets of rice. In: Proc. Symp. Plant tissue culture. Science Press, Beijing, pp 149-160
- WERNICKE and KOLENBACH H. W. , 1976. Investigation on liquid medium as a means of anther culture in Nicotiana. Z Pflanzenphysiol 79: 189-198
- WOO S. C. and TUNG I. J., 1972. Induction of rice plants from hybrids anthers of *indica* and *japonica* cross. Bot. Bull. Acad. Sin. 13: 67-70
- YOBOUE P. C. N., 1986. Variation de l'expression génétique dans une descendance androgénétique de riz à haut niveau d'homozygotie IAEA-SM-282/26. Institut de savanes. Centre de cultures vivrières Côte d'Ivoire p357-446.
- YOSHIDA S., 1973. In Yoshida S. Laboratory manual for physiological studies in rice. IRRI, Los Baños, 61-66
- ZAPATA F. J., TORRIZO L.B. and ANDO A. 1995. Current developments in plant Biotechnology for Genetic improvement: The case of rice (*Oryza sativa* L.) . World J. Microbiol. Biotechnol. 11 pp 393-399

- ZAPATA F.J., ALEJAR M.S., TORRIZO L.B., NOVERO A.V., SINGH V.P., SENHADIRA D., 1991. Field performance of anther culture derived lines from F-1 crosses of *indica* rices under saline and nonsaline conditions. THEORETICAL 1 Applied genetics 83 (1), 1991 6-11. IRRI, MANILA PHILIPPINES
- ZAPATA F.J., TORRIZO L. B., ROMERO R.O., ALEJAR M.S., 1982. Androgenesis in *Oryza sativa*. In: Fujiwara A (ed) Plant Tissue Cult. Maruzen, Tokyo, pp 531-532
- ZAPATA F. J., TORRIZO L. B., ALDEMITA R. R., NOVERO A. U., MAZAREDO A.M., VISPERAS R. P., M.S. LIM, MOON H. P. and HEN M.H., 1986. Rice anther culture: a tool for production of cold tolerant lines. In: Rice Genetics pp 773-780. IRRI, Philippines.
- ZHANG L. N. and CHU, Q. R. 1984, Characteristical and chromosomal variation of rice somaclones. Sci. Agric. Sin. 18 (4): 32-40
- ZHANG Z. H., 1982. Application of anther culture techniques to rice breeding. In: Rice tissue culture planning Conf. IRRI, Los Baños, Manila, pp 55-61
- ZHOU H. and KONZAK C. F., 1989. Improvement of anther culture methods for haploid production in wheat. Crop Sci., 29: 817-821
- ZHU D.Y. and WANG C.C., 1982 Plant regeneration and initiation of cell suspensions from root tip derived callus of *Oryza sativa* L. (rice). Plant Cell Rep. 5: 89-92.

ANNEXES

ANNEXE I :

I-1- CARACTERISTIQUES DE LA VARIETE DE RIZ (Oryza sativa L.) F-159

NOMENCLATURE	Nom	FOFIFA 159
	Nom malgache	Mahasoa
	Traduction littérale	Utile
	Numéro de collection	4178
	Numéro CIRAD	CIRAD 444
	Numéro experimental	Exp 926
	Parents	IRAT 114 et FOFIFA 133
DESCRIPTION	Type grain	Mi-long
	Ari station	Mutique
	Poids 1000graines (g)	29.5
	Egrenage (/9)*	5
	Couleur feuillage	Claire
	Longueur feuille (cm)	12
	Largeur feuille (mm)	9
	Port feuille paniculaire	Intermédiaire
	Hauteur (cm)	85
COMPORTEMENT	Cycle	Semi tardif
	Nombre de jour pour maturité	161
	Aptitude culturale	Pluvial
	Résistance à la verse (/9)*	3
	Pyriculariose (/9)*	4
	Brunissure de gaine (/9)*	4
	Productivité	Bonne
	Niveau indicatif (q/ha)	28
	Maximum observé (q/ha)	51
	Points forts et/ou intéressants	Grain apprécié Tolérance aux maladies
	Points faibles et/ou gênants	Tallage moyen

*: Notes 1 (le meilleur) à 9 (le pire), 5 étant l'intermédiaire

Source :J.L. DZIDO Sélectionneur, CIRAD-CA/CALIN
FOFIFA – CIRAD
PROGRAMME RIZ D'ALTITUDE (P.R.A)
PROGRAMME RIZ D'ALTITUDE MADAGASCAR
COMPTE-RENDU TECHNIQUE CAMPAGNE (1999-2000)

I-2- CARACTERISTIQUES DE LA VARIETE DE RIZ
(Oryza sativa L.) F-154

DESCRIPTION GENERALE	Nom	FOFIFA 154
	Numéro de collection	4131
	Origine	Création locale C30 F149/9/3/5
	Parents	Latsibavy/FOFIFA62
	Cycle végétatif total	145 jours
	Aptitude culturale	Pluvial
	Zone de culture	Régions des Hauts Plateaux
CARACTERISTIQUES VARIETALES	Hauteur de la plante	90 cm
	Port de la plante	Erigé
	Port de la feuille paniculaire	Erigé
	Type des grains	Long-fin
PADDY	Aristation	Aristule
	Longueur	9.4 mm
	Teinte	Jaune paille
	Poids de 1000 graines	31 g
CARYOPSE	Longueur	7.43 mm
	Translucidité	Bonne
CARACTERISTIQUES AGRONOMIQUES	Verse	Résistant
	Rusticité	Bonne
	Tolérance à la pyriculariose	Moyen
	Egrenage	Résistant
	Réponse aux engrais	Sensible à l'excès d'azote
RENDEMENTS EN ESSAI	Rendement moyen	3 t/ha
	Rendement maximum observé	5.7 t/ha
OBSERVATIONS PARTICULIERES	Vigueur au départ de la végétation	Bonne

Source : FOFIFA

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE APPLIQUEE AU
DEVELOPPEMENT RURAL
DEPARTEMENT DE RECHERCHES RIZICOLES, 1989

ANNEXE II :

COMPOSITION DU TAROKA

CONSTITUANTS	TAROKA SIMPLE	TAROKA PHOSPHATE
Matière organique %	34	28
Azote total %	1.78	1.17
Carbone%	22.4	15.6
Matière humique%	7.8	5.5
C/N	12.1	13.33
CAO%	9.32	18.89
MgO%	6.56	0.66
K ₂ O%	0.35	0.37
P ₂ O ₅ %	2.20	4.89
pH eau	7.2	7.4

Source : STOI AGRI Immeuble STOI Ankorondrano Antananarivo

ANNEXE III :

—

CARACTERISTIQUES DU SOL DE RIZIERE(LRI, 1996)

GRANULOMETRIE	TENEUR EN %
Argile (0-2 μ)	24.64
Limon fin (2-20 μ)	10.84
Limon grossier (20-50 μ)	5.61
Sable fin (50-200 μ)	12.97
Sable grossier (0.2-2mm)	45.94
Classe texturale	Limono-Argilo-sableux
MATIERES ORGANIQUES	
Matière organique totale	2.11
Carbone organique total	1.23
Azote total	0.75
C/N	16
ACIDITE	
pH eau	5.80
pH KCl	5.00
COMPLEXE (meq/100g)	
Ca	1.56
Mg	0.24
K	0.06
Na	0.05
Somme des cations Ca, Mn, Mg, K, Na	1.91
Capacité d'échange	5.61
S/T (degré de saturation en cations)	34
Assimilable (Olsen)	2.84

ANNEXE IV: COMPOSITION CHIMIQUE DES MILIEUX DE CULTURE

1- Milieux d'induction

Types de milieu Composants	MS (mg/l)	MSL (mg/l)	N6(mg/l)	N6m(mg/l)	SK-I (mg/l)	SK-lm (mg/l)	H2(mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650	1650					
(NH ₄) ₂ SO ₄			463	463			231
KNO ₃	1900	1900	2830	2830	3150	3150	2830
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370	370	185	185	9,024	9,024	3,7
KH ₂ PO ₄	170	170	400	400	540	540	400
KI	0,83	0,83	0,8	0,8	1	1	0,8
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	1,6	1,6	6	6	1,6
MnSO ₄ , 4H ₂ O	22,3	22,3	4,4	4,4	1,743	1,743	4,4
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	10	10	1,5	1,5	10	10	1,5
Caséine Hydrolysate					500	-	
Myoinositol	100	100			100		
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440	440	166	166	150	150	116,6
eSO ₄ , 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025	0,025			0,025	0,025	
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25	0,25			0,25	0,25	
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025	0,025					
Acide nicotinique	0,5	0,5	0,5	0,5	2,5	2,5	0,5
Pyridoxine HCl	0,5	0,5	0,5	0,5	2,5	2,5	0,5
Thyamine HCl	0,1	0,1	1	1	2,5	2,5	1
Glycine	2	2	2	2	2,5	2,5	2
2,4-D	2	2	2	2	2	2	2
NAA	0,5	0,5			2,5	2,5	2
Kinétine	0,5	0,5		0,5	0,5	0,5	0,5
Sucrose	40000	40000	60000		40000	40000	40000
Maltose				30000			
Agar	8000		8000	8000	8000	8000	8000
pH	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8

MS : Milieu MURASHIGE and SKOOG Semi-solide, MSL : Milieu MURASHIGE and SKOOG Liquide, N6 : CHU et al, 1975 avec sucrose, N6m : N6 avec maltose, SK-I : RAINA et al 1989 ; SK-I-m : RAINA et al, 1989 sans caséine hydrolysate et myoinositol, H2 : Milieu N6 modifié par RAINA et ZAPATA en 1989)

2- Milieux de régénération

MILIEUX/ COMPOSANTS	MSr(mg)	M1r(mg)	H2r
NH ₄ NO ₃	1650	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	231	231
KNO ₃	1900	3150	2850
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370	9.024	3.7
KH ₂ PO ₄	170	540	400
KI	0.83	1	0.8
H ₃ BO ₃	6.20	6	1.6
MnSO ₄ , 4H ₂ O	22.3	1.74	4.4
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	10	10	1.5
Myoinositol	100	100	100
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440	150	116.6
FeSO ₄ , 7H ₂ O	27.8	27.8	27.8
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	37.3	37.3	37.3
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025	-	-
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.25	-	-
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.025	-	-
Acide nicotinique	0.50	2	0.5
Pyridoxine HCl	0.50	2	0.5
ThyamineHCl	0.1	2	1
Glycine	2	2	2
BAP	2	2	2
NAA	1	1	2
Kinétine	0.50	0.50	0.50
Sucrose	30000	30000	30000
Agar	8000	8000	8000
pH	5.6-5.8	5.6-5.8	5.6-5.8

MSr : Milieu Murahige and Skoog (1962) avec du BAP

M₁ : Milieu SK-I (RAINA and ZAPATA, 1989) modifié par RAINA et ZAPATA en 1997 avec du BAP

H₂ : Milieu N₆ (CHU et al, 1975) modifié par RAINA et ZAPATA en 1989

3-Milieu d'enracinement

COMPOSANTS	MS enracinement MSφ (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ , 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	10
Myoinositol	100
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440
FeSO ₄ , 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	37.3
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.025
Acide nicotinique	0.50
Pyridoxine, HCl	0.50
Thyamine, HCl	0.1
Glycine	2
Sucrose	30000
Phytigel	1800
pH	5.6-5.8

MSφ : Milieu Murashige and Skoog (1962) sans régulateurs de croissance

4- Milieu d'acclimatation : Solution Yoshida

COMPOSANTES	Solution stock (g/10 l)	Quantité à prélever pour 1l de préparation (ml)
A : NH₄NO₃	914.0	5
B : NaH₂PO₄, 2H₂O	403.0	5
C: K₂SO₄	714.0	5
D: CaCl₂	886.0	5
E: MgSO₄, 7H₂O	3240.0	5
F: Elements traces:		
- MnCl ₂ , 4H ₂ O	15.0	5
-(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	0.74	
-H ₃ BO ₃	9.34	
-ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0.35	
-CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.31	
-FeCl ₃ , 6H ₂ O	77.0	
-Acide citrique monohydraté	119.0	
-pH	5.0	

- Dissoudre séparément puis ajouter 500cc d'acide sulfurique concentré
- Ajouter de l'eau distillée pour avoir 10 l de solution

Source: Yoshida, S. , D.A. Forno, J. H. Cock and K.A. Gomez, 1976. Routine procedures for growing rice plants in culture solution. Pages 61-66 in Laboratory manual for Physiological studies of Rice. International Rice Research Institute, Los Banos, Laguna, Philippines

Résumé

La culture d'anthere est une des techniques les plus pratiquées pour la production des plantes haploïdes à partir de matériels hybrides. Deux variétés de riz (*Oryza sativa*) pluvial (F154 et F159) ont été utilisées en androgenèse. L'objectif de notre travail est d'obtenir un maximum de plantes vertes et des graines.

Les résultats sur l'induction de cals ont montré des différences entre les deux variétés. Pour F-159, l'induction de cals dépend du type de milieu. Ce sont les milieux d'induction N6, H2 et MS qui ont donné les fréquences de cals induits les plus élevées, respectivement : 2.5 %, 1.64 % et 1.05 %. Tandis que pour F-154, le taux est très faible et après quelques jours les cals sont nécrosés.

Concernant la régénération des plantes, le milieu MS régénération ou MSr a donné le meilleur résultat. Le pourcentage de régénération est de 5.62 % pour F-159. 83.14 % des plantules obtenues sont vertes et 16.86 % sont albinos. Et après l'acclimatation des plantes vertes, la plupart des plantes sont stériles. Le taux de plantes fertiles est faible (5.26 %). Les plantes stériles peuvent être rendues fertiles en utilisant le traitement à la colchicine.

Les graines obtenues sont actuellement cultivées au champ pour évaluer la productivité.

Mots clés : Riz, androgenèse, haploïdes doublées, cal, milieu de culture, génotype

Abstract

Anther culture is one of the most technique to produce haploid plants from hybride materials. Two rainfed upland rice varieties F-154 et F-159 were planted and were studied using androgenesis.

Our objectif is to obtain a maximum of green plantlets and double haploid seeds.

Results show that for callus induction, there is a significant difference between those two varieties. For F-159, the callus induction depends on the type of medium. N6, H2 and MS media gave high frequency of calli induced, respectively : 2.5 %, 1.64 % and 1.05 %.

But for F-154, the rate is very low and after some days, the calli became necrosed.

Regarding the regeneration of plantlets, MS regeneration (MSr) medium gave the best results. The rate was 5.62 % for F-159, of which, 83.14 % were green and 16.86 % albinos. Then, after acclimatization of the plantlets on Yoshida's medium, most of the plantlets were sterile and some gave seeds.

These sterile plants would be used in the future using colchicine to obtain double haploid seeds. The seeds obtained are planted in the field to evaluate their productivity.

Key words : rice, androgenesis, double haploid, callus, culture medium, genotype