Application des vitrométhodes à la mise en oeuvre de programmes de sélection de plantes résistantes à des maladies

Michel Branchard

► To cite this version:

Michel Branchard. Application des vitrométhodes à la mise en oeuvre de programmes de sélection de plantes résistantes à des maladies. *Agronomie*, 1984, 4 (9), pp.905-911. hal-00884712

HAL Id: hal-00884712

<https://hal.science/hal-00884712>

Submitted on 1 Jan 1984

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Application des vitrométhodes à la mise en œuvre de programmes de sélection de plantes résistantes à des maladies

Michel BRANCHARD

Université Paris-Sud, Laboratoire d'Amélioration des Plantes (LA 115), Bât. 360, F 91405 Orsay Cedex

RÉSUMÉ

Le terme générique de « vitrométhodes » recouvre des techniques aussi diverses que la culture d'embryons, la culture de cals ou de cellules avec ou sans régénération de plantes, l'haplométhode (androgenèse et gynogenèse), la culture de protoplastes et leur fusion, le génie génétique.

Le principe de ces différentes techniques n'est pas rappelé, mais l'intérêt qu'elles peuvent présenter pour l'obtention de plantes résistantes aux maladies est développé (production d'hybrides interspécifiques ; obtention de variants, de mutants ; révélation de l'hétérogénéité présente dans la plante de départ ; introduction de gènes de résistance...).

Après avoir dressé un bilan des succès obtenus (*Nicotiana tabacum* - *Pseudomonas tabaci*, *Zea mays* - *Helminthosporium maydis* race T, *Solanum tuberosum* - *Phytophthora infestans*, *Saccharum officinarum* - *Helminthosporium sacchari* - maladie de Fiji - *Sclerospora sacchari*, *Brassica napus* - *Phoma lingam*, *Nicotiana sylvestris* - virus de la mosaïque du tabac, *Medicago sativa* - *Verticillium albo-atrum*, *Nicotiana tabacum* - *Alternaria alternata* - *Pseudomonas syringae*) et de certains essais délaissés ou en cours, l'exemple de l'obtention de plantes de maïs résistantes à *Helminthosporium maydis* race T est développé, ainsi que son interprétation la plus récente.

Pour conclure, les problèmes (avantages et difficultés) posés par ces nouvelles méthodologies ainsi que la possibilité de les intégrer dans un programme de sélection sont discutés.

Mots clés additionnels : Culture de tissus végétaux, cals, androgenèse, protoplastes, toxines.

SUMMARY

Use of in vitro methods in breeding programs for disease resistance in plants.

The term "in vitro method" covers many very different techniques, such as embryo culture, callus or cell culture, with or without plant regeneration, androgenesis and gynogenesis, protoplast culture and somatic fusion or genetic engineering.

The principles of these different techniques are not developed here but their use to obtain disease resistant plants is discussed (interspecific hybrids and variants or mutants with new characteristics of resistance, detection of mother plant heterogeneity by tissue culture, ...).

Examples are given of some successful applications (*Nicotiana tabacum* - *Pseudomonas tabaci*, *Zea mays* - *Helminthosporium maydis* race T, *Solanum tuberosum* - *Phytophthora infestans*, *Saccharum officinarum* - *Helminthosporium sacchari* - Fiji disease - *Sclerospora sacchari*, *Brassica napus* - *Phoma lingam*, *Nicotiana sylvestris* - tobacco mosaic virus, *Medicago sativa* - *Verticillium albo-atrum*, *Nicotiana tabacum* - *Alternaria alternata* - *Pseudomonas syringae*) and also of some unsuccessful ones or areas still under development. The method used to select maize plants resistant to *Helminthosporium maydis* race T is analyzed in particular together with its most recent interpretation.

Finally, the advantages and difficulties of *in vitro* methods are discussed.

Additional key words : Tissue culture, callus, androgenesis, protoplasts, toxins

I. VITROMÉTHODES UTILISABLES POUR L'OBTENTION DE PLANTES RÉSISTANTES À DES MALADIES

Les techniques de culture *in vitro* d'explants végétaux, qui permettent de manipuler une population importante d'individus dans des conditions de place et

de temps limitées, ont connu récemment un essor important. Certaines, comme la culture de méristèmes ou la micropropagation *s. str.*, conduisent à une production commercialisée, régulière et prospère.

La culture d'apex, qui est principalement utilisée pour produire un matériel sain, non virosé, et le multiplier, et la micropropagation (ou bouturage *in vitro*)

conduisent généralement à l'obtention rapide d'un matériel abondant et conforme à celui de départ.

Des méthodes plus récentes telles que la régénération de plantes à partir de cals, l'haplométhode (androgenèse et gynogenèse) et la culture de protoplastes puis leur fusion, n'ont quitté que depuis peu le domaine expérimental. Elles sont essentiellement utilisées pour l'obtention d'individus présentant des caractères nouveaux. Leur insertion dans les programmes de sélection classique, notamment en ce qui concerne la recherche de plantes présentant des caractères de résistance aux maladies, est en cours.

Ainsi l'utilisation de l'haplométhode (culture *in vitro* de cellules sexuelles mâles ou femelles) permet notamment de révéler instantanément les caractères récessifs.

Quant à la fusion somatique, totale ou partielle, entre protoplastes de plantes sensibles et résistantes à une même maladie, elle doit trouver son application notamment à partir d'un matériel d'origine sauvage, résistant, et d'un matériel cultivé, sensible. Il est à remarquer que, dans ce cas, l'utilisation préalable de l'haplométhode peut être nécessaire, les espèces cultivées présentant parfois un niveau de ploïdie différent de celui des espèces spontanées.

Toutefois, il ne faut pas oublier que, lors de telles manipulations, les gènes de résistance peuvent se trouver incorporés avec d'autres gènes susceptibles d'affecter de manière négative divers caractères agromonomiques.

Le choix de la (ou des) méthode(s) retenue(s) par l'expérimentateur sera précédé d'une réflexion sur les difficultés technologiques inhérentes à ces méthodes ainsi que sur leur probabilité de réussite. Le problème du crible des individus résistants ne doit pas en être écarté, en particulier celui des cribles précoces utilisant une ou plusieurs substances toxiques qui peuvent intervenir dans la pathogenèse.

Afin de donner au lecteur des éléments destinés à orienter cette réflexion sur l'utilisation des vitrométhodes pour la recherche de plantes résistantes, des exemples caractéristiques de mise en application suivie de l'obtention de résultats positifs ou non, seront développés. L'ensemble des résultats positifs actuellement obtenus sera ensuite analysé. Enfin, les difficultés et avantages de ces nouvelles méthodes seront discutés. Le lecteur désireux d'obtenir davantage de précisions à leur sujet, précisions qui n'ont pas leur place ici, pourra se reporter à des publications récentes les analysant de façon différente (CHAUSSAT & BIGOT, 1980; DEMARLY, 1981; COCKING *et al.*, 1981; BRANCHARD, 1982a).

La mise en œuvre pratique pourra utilement commencer par la consultation d'ouvrages tels que ceux de INGRAM & HELGESON (1980), de AUGE *et al.* (1981) et de WETTER & CONSTABEL (1982).

II. INTÉRÊTS RESPECTIFS DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE CULTURE *IN VITRO* ; QUELQUES EXEMPLES D'APPLICATION

A. Culture d'embryons

Elle est mise en œuvre lorsque la production d'hybrides interspécifiques par voie sexuée permet

l'introduction de gènes de résistance chez une plante cultivée, mais conduit à une incompatibilité entre les tissus maternels et l'embryon. La survie et le développement de ce dernier ne sont alors possibles que par prélèvement et repiquage sur un milieu de culture approprié.

Parmi les nombreux exemples existants, 2 peuvent être cités :

1) Essai de transfert de la résistance à la race 1 de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* par réalisation d'hybrides entre *Nicotiana tabacum* (sensible à cette maladie) et *Nicotiana repanda*, *N. stocktonii* ou *N. neosophila* (REED & COLLINS, 1978).

2) Essai de transfert de la résistance à *Plasmodiophora brassicae*, existant chez *Brassica campestris*, à *B. napus* par croisement entre *B. oleracea* (4 X) et *B. campestris* (colchiciné), puis nouveau croisement entre l'hybride ainsi obtenu et *B. napus* (SNELL, 1977).

B. Culture de tissus

1. Généralités

Les cultures de tissus peuvent être utilisées notamment pour l'induction et la sélection de plantes résistantes à des maladies (BRETTELL & INGRAM, 1979).

Selon la méthodologie utilisée pour cette sélection *in vitro*, il est possible d'obtenir plutôt des variants (DEMARLY, 1976; SIBI, 1981) ou plutôt des mutants, la classification ne pouvant être précisée qu'après étude de la descendance.

Dans le cas où l'on s'intéresse à l'obtention de mutants, le caractère sélectionné doit s'exprimer dans les cellules ou les protoplastes cultivés. Malheureusement, ces critères ne sont pas toujours satisfaits pour les caractères de résistance (exemple du couple *Beta vulgaris* - *Peronospora farinosa* cité par INGRAM, 1977). Cependant, d'autres cas sont connus où les gènes de résistance s'expriment *in vitro* : *Solanum tuberosum* - *Phytophthora infestans* (INGRAM, 1976), *Nicotiana tabacum* - *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (HELGESON *et al.*, 1976) ou *Lycopersicon esculentum* - *Phytophthora infestans* (WARREN & ROUTLEY, 1970).

Cette expression, ou non, des gènes de résistance *in vitro* peut être liée aux conditions de milieu, particulièrement aux différents facteurs de croissance utilisés (HABERLACH *et al.*, 1978).

Par ailleurs, la culture de cals sur milieu solide ne permet pas d'exposer uniformément et de façon reproductible les cellules au parasite. Les toxines excrétées par ce parasite présentent donc un intérêt particulier car elles peuvent être incorporées au milieu de culture ; ce dernier étant alors utilisé sous forme liquide ou solide.

Cependant, il paraît évident que seules peuvent être utilisées pour ce type de sélection, les toxines « hôte-spécifiques » (victorine, helminthosporoside...) ou constituant un déterminant important du pouvoir pathogène (toxine de *Pseudomonas phaseolicola*).

Cette recherche de plantes résistantes sur milieu renfermant une toxine suit un protocole différent, comme nous l'avons indiqué précédemment, selon que l'on s'intéresse à l'obtention de plantes mutantes ou variantes. Dans le premier cas, les cellules sont mises

en contact avec une concentration de toxine sublétales, ceci après mutagenèse ou non. Il faut rappeler que l'utilisation d'une lignée haploïde permet de révéler immédiatement une résistance déterminée par un ou plusieurs gènes récessifs.

Dans le cas où l'on souhaite obtenir des variants (JAUBERTIE *et al.*, 1978), les cellules sont d'abord mises en contact avec de faibles concentrations de toxine qui sont graduellement augmentées, à chaque repiquage, jusqu'à l'obtention d'une concentration sublétales.

Une telle modification progressive du milieu permet d'« habituer » les cellules, de définir un nouveau régime soit au niveau du fonctionnement de l'ADN codant, soit au niveau de la composition des populations d'organites cytoplasmiques. L'hérédité d'un tel phénomène est, le plus souvent, dissymétrique ; curieusement, il semble que les cas d'hérédité maternelle ne soient guère plus nombreux que les cas d'hérédité paternelle (SIBI, 1981).

L'étude génétique de la transmission du caractère de résistance va donc permettre de déterminer s'il s'agit d'un mutant ou d'un variant. En effet, la persistance de la résistance en l'absence de l'agent de sélection (toxine) peut correspondre à une adaptation épigénétique (variant), mais également à une adaptation physiologique à l'environnement, non héréditaire.

2. Exemple de l'obtention de plantes de maïs résistantes à *Helminthosporium maydis* race T

Les cals initiés à partir d'embryons immatures de maïs mâle-stériles (GENGENBACH *et al.*, 1977) sont cultivés sur des milieux contenant la toxine en concentration croissante. Les plantes sont régénérées périodiquement afin de préciser leur comportement vis-à-vis de la toxine, ce dernier pouvant différer de celui du cal ; celles obtenues après le 4^e cycle de sélection sont toujours mâle-stériles et sensibles à la toxine. Cependant, après le 5^e cycle, 2 plantes sont régénérées et présentent une certaine résistance ; elles sont mâle-fertiles. C'est seulement après le 6^e cycle de sélection que la résistance à la toxine est confirmée. Dans les cycles suivants, d'autres plantes résistantes sont également régénérées ; la plupart d'entre elles sont mâle-fertiles (52 sur 65).

Les essais biologiques sur les individus F1 issus de ces plantes résistantes indiquent que la résistance à la toxine est transmise uniquement par voie maternelle et qu'il en est de même pour la fertilité mâle.

Des infections de feuilles de plantes résistantes à la toxine par des spores d'*H. maydis* race T montrent qu'il existe une bonne corrélation entre la résistance de la plante au pathogène et celle à la toxine.

Au cours d'un autre cycle de sélection de plantes résistantes, BRETTELL *et al.* (1980) constatent que les plantes fertiles et résistantes à la toxine sont obtenues aussi bien à partir des cultures qui se sont développées sur milieu contenant la toxine qu'à partir des cultures témoins (repiquées sur milieu sans toxine). Par ailleurs, la descendance de ces plantes présente un phénotype identique à celui du parent femelle, eu égard à la fertilité pollinique et à la résistance à la toxine.

L'analyse des ADN mitochondriaux à partir d'enzymes de restriction (GENGENBACH *et al.*, 1981) a per-

mis de montrer que les lignées mâle-fertiles résistantes à la toxine n'ont pas pour origine la sélection de génomes mitochondriaux N (cytoplasme normal — plante ♂ fertile-résistante) coexistant initialement avec des génomes T (cytoplasme Texas — plante ♂ stérile — sensible) dans le cytoplasme de lignée T utilisée pour la sélection. Par ailleurs, des changements (perte ou réarrangement) au niveau de l'ADN mitochondrial ont été enregistrés en ce qui concerne les lignées résistantes à la toxine (en particulier, une bande située à 48 mm du haut de l'électrophorogramme). Mais en fait, les résultats ne permettent pas de séparer de façon univoque les changements obtenus suite à cette sélection et ceux probablement causés ou permis par les seuls processus de la culture *in vitro*.

3. Un autre type d'utilisation des cultures de tissus

Cette technique peut également servir pour révéler une hétérogénéité génétique présente dans la plante de départ et l'exemple le plus caractéristique est celui de la canne à sucre (TLASKAL, 1975).

En effet, des cultures de tissus suivies simplement d'une régénération de plantes ont permis d'isoler des sous-clones présentant une résistance à la maladie de Fiji plus importante que celle de la variété d'origine (KRISHNAMURTHI & TLASKAL, 1974). D'autres résultats, dont nous parlerons ci-après, ont été obtenus sur ce matériel qui a largement été exploité en culture *in vitro* (NICKELL, 1977).

C. Haploïdisation *in vitro*

Cette technique permet 2 approches différentes, mais complémentaires, de la résistance : l'étude génétique d'un caractère, la sélection.

1. Etudes génétiques de résistance à des maladies

L'exemple retenu est celui de l'obtention de lignées androgénétiques de piment (*Capsicum annuum*) à partir de plantes issues du croisement « Perennial » par « Yolo Wonder ». L'étude du comportement de telles plantes, après inoculation de 2 souches très différentes du même virus (virus Y de la pomme de terre), présente, selon les auteurs (POCHARD *et al.*, 1983), 3 avantages : chaque génotype peut être noté pour plusieurs lignées, à différents stades de développement et pour différents organes ; les effets de dominance sont absents ; les notations concernent des échantillons homogènes et non des plantes individuelles, comme dans un système d'analyse classique.

2. Régénération de plantes résistantes à partir de cellules ou d'embryons haploïdes

Une telle méthodologie est notamment définie par GROUT & WEATHERHEAD (1980) pour *Saintpaulia ionantha* : les grains de pollen, exposés à des agents mutagènes, sont mis en culture afin d'obtenir des plantes haploïdes. Après doublement chromosomique, les plantes sont testées pour déterminer celles qui sont résistantes au pathogène (*Pythium spp.*). Un 1^{er} cycle de multiplication végétative *in vitro* des individus

sélectionnés sera suivi d'un nouveau test de résistance. Les clones retenus seront abondamment multipliés.

Une approche similaire a permis l'obtention de résultats positifs par SACRISTAN (1982) sur le colza ; ils seront détaillés ci-après.

D. Culture de protoplastes

L'un des intérêts de cette technique est d'assurer rapidement et de façon homogène la mise en contact d'une grande quantité de matériel et d'un agent de sélection (toxine).

On peut également l'utiliser, comme la culture de tissus, pour révéler des potentialités qui ne sont pas mises en évidence dans les plantes mères ; ainsi MATERN *et al.* (1978) régénèrent, à partir de protoplastes issus de parenchyme foliaire de pomme de terre (cultivar « Russet Burbank »), des centaines de plantes sur les feuilles desquelles ils effectuent un test de sensibilité à la toxine excrétée par *Alternaria solani* (en fait, une préparation toxique semi-purifiée). Parmi ces plantes, des sensibilités à la toxine très diverses sont observées et permettent une classification en 4 groupes (plantes très sensibles, sensibles, intermédiaires et résistantes). Cette classification persiste après 2 cycles de multiplication végétative. Par ailleurs, il existe une très bonne corrélation entre la sensibilité des clones à la toxine et leur sensibilité à *A. solani*. L'étude génétique reste à effectuer.

Un autre intérêt des protoplastes est la possibilité de les faire fusionner. La fusion somatique doit permettre l'introduction de gènes de résistance dans un matériel sensible comme le laissent présumer quelques résultats préliminaires (SHEPARD, 1981). Le but ultime de cette expérimentation est la régénération de plantes ayant conservé leurs caractères agronomiques et dont les gènes de résistance s'expriment.

E. Génie génétique

Cette nouvelle méthodologie, consistant en l'introduction de chromosomes ou plus généralement de gènes spécifiques dans la cellule, est très prometteuse ; elle n'a actuellement pas encore permis d'obtenir de résultats dans le cadre de la recherche de résistance : elle ne sera donc pas développée ici. Pour mémoire, nous rappellerons cependant que l'introduction de nouveaux gènes dans la cellule n'entraîne pas nécessairement leur expression, ni leur intégration et leur transmission héréditaire.

III. PLANTES RÉSISTANTES OU À SENSIBILITÉ RÉDUITE VIS-À-VIS D'UN PATHOGENE, OBTENUES ACTUELLEMENT PAR UTILISATION DES VITROMÉTHODES

Les travaux mentionnés seront classés par ordre chronologique.

En 1973, CARLSON régénère des plantes de *Nicotiana tabacum* var. « Havana Wisconsin 38 » résistantes à *Pseudomonas tabaci*. A partir de plantes haploïdes (issues d'androgénèse) qui ont subi une mutagenèse chimique, il obtient des protoplastes et des cellules isolées qu'il met au contact d'un milieu contenant de la méthionine sulfoximine, un analogue de la méthionine dont la structure est également proche de celle de la toxine excrétée par *P. tabaci*.

Après avoir régénéré des plantes résistantes à cette substance et montré que la résistance se transmet selon un schéma classique, l'auteur établit que le déterminisme génétique est relativement complexe et diffère pour les 3 séries de plantes qui ont chacune pour origine un cal résistant distinct. Des concentrations élevées de méthionine libre sont observées dans les cals, mais également dans les tiges et les racines des plantes mutantes. CARLSON (1973) suggère qu'il faut davantage envisager une interférence avec la glutamine synthétase qu'une intervention directe dans le métabolisme de la méthionine. Pour lui, des concentrations intracellulaires importantes de cet acide aminé pourraient éviter l'entrée de son analogue dans les cellules.

Plusieurs auteurs ont travaillé sur la canne à sucre obtenant *in vitro* la régénération de plantes résistantes à différentes maladies. Le succès rencontré avec ce matériel peut certainement trouver son origine dans l'exploitation de l'hétérogénéité génétique importante qui semble présente dans les plantes-mères. Comme cela a été signalé ci-avant, des plantes résistantes à la maladie de Fiji, d'origine virale, ont été régénérées par KRISHNAMURTHI & TLASKAL (1974). HEINZ *et al.* (1977) mentionnent l'obtention de résistance à *Sclerotinia sacchari*, particulièrement au niveau du sous-clone « Pindar 70-31 » dont ils attendent le succès commercial.

Une technique plus sophistiquée, faisant appel à la mutagenèse chimique ou physique avec mise en contact, en milieu liquide, des cals et de la toxine, est utilisée pour obtenir des plantes résistantes à *Helminthosporium sacchari* (MEE & HEINZ, 1975). Plus de 800 plantes sont régénérées puis infectées à l'âge de 5 mois afin de déterminer leur comportement vis-à-vis du pathogène. Les auteurs remarquent que la fréquence des plantes résistantes régénérées à partir des cals traités (mutagenèse, toxine) n'est pas significativement supérieure à celle des plantes issues des cals témoins.

D'autres recherches concernant notamment la résistance au virus de la mosaïque ont également abouti à l'obtention de plantes résistantes (NICKELL & HEINZ, 1973).

Les travaux de GENGENBACH *et al.* (1977), traités ci-avant, concernant la régénération de plantes résistantes à *Helminthosporium maydis* race T ne sont mentionnés ici que pour mémoire.

BEHNKE (1979, 1980), à partir de cals issus de clones dihaploïdes de *Solanum tuberosum* irradiés aux rayons X et cultivés sur milieu contenant le filtrat de culture toxique de *Phytophthora infestans*, régénère des plantes ayant un comportement modifié vis-à-vis du parasite.

Cette résistance au filtrat persiste chez les cals issus de plantes régénérées à partir des cals résistants obtenus.

nus initialement. Elle est corrélée avec une croissance réduite du parasite sur les feuilles des plantes, mais n'engendre aucune diminution de la sporulation. Il faut souligner qu'ici encore, le traitement mutagène ne semble pas influencer le nombre de cals résistants obtenus.

Les résultats de MATERN *et al.* (1978) concernant la résistance à *Alternaria solani* ont déjà été mentionnés.

Les travaux de SACRISTAN (1982) portent sur l'obtention de plantes de *Brassica napus* résistantes à *Phoma lingam*. Des cals issus de plantes haploïdes et de cultures embryogènes de colza sont soumis à 2 procédés de sélection différents : soit les cultures se développent sur le filtrat de culture du champignon, qui est toxique, soit elles sont incubées avec des suspensions de spores du pathogène. Les tests de résistance à la maladie sont effectués en serre sur les plantes régénérées à partir des cals sélectionnés (seul le milieu avec filtrat de culture donne des résultats positifs).

L'étude génétique des plantes résistantes ou tolérantes ainsi obtenues est en cours, cependant l'auteur précise que les résultats préliminaires semblent indiquer une hérédité génique. Par ailleurs, il faut noter que certaines de ces plantes sont régénérées à partir des cultures témoins.

MURAKISHI & CARLSON (1982) ont obtenu des plantes présentant une certaine résistance au virus de la mosaïque du tabac (TMV-Flavum) à partir d'un clone haploïde de *Nicotiana sylvestris* inoculé, dont une partie est exposée aux rayons X (500 rads), l'autre non. Les nouvelles feuilles de ce matériel sont prélevées et déposées sur un milieu induisant la formation de cals. Les plantes régénérées à partir des cals sont testées, d'une part, pour leur résistance au virus, d'autre part, pour déterminer si elles sont indemnes de virus ou non. Les auteurs, à partir de 2 775 cals issus de matériel non irradié ont obtenu 33 plantes indemnes de virus et aucune plante résistante. Par contre, à partir des 3 210 cals issus de matériel irradié, ils ont régénéré 168 plantes indemnes de virus et 7 plantes résistantes. L'étude génétique est en cours.

LATUNDE-DADA & LUCAS (1983) ont régénéré, à partir de protoplastes, des plantes de luzerne présentant une tolérance accrue à *Verticillium albo-atrum*. Ces plantes étant polyploïdes, les auteurs suggèrent que l'effet observé est dû au nouveau dosage des gènes de résistance.

Le dernier travail actuellement couronné de succès est celui de THANUTONG *et al.* (1983), sur *Nicotiana tabacum* cv « Samsun ». Les auteurs obtiennent, à partir de protoplastes, des cals qu'ils soumettent à des filtrats de culture peu ou pas purifiés d'*Alternaria alternata* ou de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. Les plantes régénérées à partir des cals résistants sont testées pour leur résistance au pathogène. Après 2 cycles de sélection sur milieu toxique, des plantes résistantes à chacun des parasites sont obtenues alors qu'aucune n'avait pu l'être suite au 1^{er} cycle. La descendance de ces plantes (78 individus) présente 26 p. 100 de résistants à *P. syringae* alors que la descendance témoin n'en présente que 7 p. 100. Pour *A. alternata* (23 plantes), ce sont respectivement 9,3 et 0 p. 100 de résistants qui ont été obtenus. Les auteurs ont vérifié que les plantes résistantes ne présentaient pas d'anomalies chromosomiques apparentes.

IV. BILAN DE L'UTILISATION DES VITROMÉTHODES POUR LA SÉLECTION DE PLANTES RÉSISTANTES

A. Difficultés

1. Régénération des plantes

C'est un des facteurs limitants les plus importants. A partir de cellules isolées ou de protoplastes, la régénération de plantes n'est actuellement pas possible pour un nombre élevé d'espèces appartenant en particulier au groupe des céréales. Dans ce cas, l'intérêt de travailler au niveau cal, où cette étape est maîtrisée, ressort clairement.

La facilité de régénération d'une plante à partir d'un cal est fonction d'un certain nombre de facteurs, parmi lesquels le génotype du matériel utilisé occupe un rôle prépondérant. Ainsi, à partir d'un nombre élevé de génotypes, BRANCHARD (1972) sur *Nicotiana*, puis BECKERT & POLLACSEK (1979) sur maïs montrent que l'aptitude à régénérer est étroitement liée au génotype. Par ailleurs, GREEN (cité par SHEPARD, 1981) observe, chez le maïs, que le caractère de « régénérabilité » est transféré à travers les croisements et conclut, après analyse de la descendance, à la mise en cause d'un petit nombre de loci. Cependant, BRANCHARD (1972) observe que, même si quelques situations expérimentales peuvent s'expliquer simplement, l'apparition de bourgeons à partir de cals relève d'un mécanisme génétique complexe.

De plus, il semble intéressant de signaler que certains auteurs ont pu sélectionner des plantes à fort « pouvoir régénérant ». Ainsi BINGHAM *et al.* (1975), chez la luzerne, au cours de cycles successifs de sélection récurrente, obtiennent des plantes dont les cals présentent une fréquence de régénération qui évolue de 12 p. 100 (cycle 0) à 67 p. 100 (cycle 2).

2. Composition du milieu de culture

Elle peut influencer l'expression de la résistance *in vitro*, particulièrement au niveau de la concentration des facteurs de croissance (HABERLACH *et al.*, 1978).

3. Divers

Lors de l'utilisation des protoplastes, le phénomène d'hypersensibilité n'est pas toujours détecté.

Par ailleurs, le problème du tri des hétérocaryons résultant de fusions somatiques ne semble pas résolu à un stade suffisamment précoce pour éviter de manipuler un matériel abondant et en grande partie inutile.

B. Avantages

Les vitrométhodes permettent l'utilisation simultanée d'un grand nombre d'individus potentiels, dans de bonnes conditions d'homogénéité, sur une superficie relativement restreinte. Une telle économie de temps et de place se concrétise globalement par une économie de moyens.

Les vitrométhodes permettent également de mieux appréhender les mécanismes mis en œuvre dans les interactions hôte-parasite, notamment le rôle des phytotoxines (EARLE, 1978).

Les résultats obtenus devraient aussi aboutir à la mise au point de tests précoces. Les vitrométhodes peuvent être également à l'origine de croisements impossibles à réaliser dans la nature (croisements interspécifiques suivis de culture d'embryons, fusion de protoplastes) aboutissant à l'obtention de plantes résistantes, d'intérêt agronomique.

La révélation d'aptitudes nouvelles, suite à la culture *in vitro*, est observée avec intérêt et a été revue par divers auteurs (SKIRVIN, 1978 ; LARKIN & SCOWCROFT, 1981). L'inefficacité apparente de la mutagenèse, signalée par la plupart des auteurs utilisant cette technique simultanément avec la culture *in vitro*, doit être prise en considération et nécessite une étude particulière. De même, l'utilisation de toxine, comme crible destiné à augmenter le nombre de plantes régénérées résistantes à la maladie, ne paraît pas toujours apporter de résultats positifs convaincants et doit donc faire l'objet d'une réflexion approfondie.

En conclusion, on peut dire que les vitrométhodes n'en sont encore qu'à leur début en ce qui concerne leur application à l'obtention de plantes résistantes à des maladies.

Différentes études sont actuellement en cours sur des matériels aussi divers que le riz (LEBRUN, 1981), l'orge (BRANCHARD, 1982b), la laitue (BROWN, 1983) ou le melon (BOUABDALLAH & BRANCHARD, en préparation) ; elles laissent présager que les vitrométhodes sont promises à un développement important dans les prochaines années, en particulier lorsque les méthodes classiques se révèlent insuffisantes.

Ce texte correspond *pro parte* à une communication présentée lors de la réunion de la Société Française de Phytopathologie (Rennes, 13 et 14 mai 1982) sur le thème : Résistance aux maladies et amélioration des plantes.

Reçu le 18 août 1983.

Accepté le 29 mai 1984.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Augé R., Beauchesne G., Boccon-Gibod J., Decourtye L., Digat B., Minier R., Morand J.-Cl., Oudin Y., Vidalie H., 1982. *La culture in vitro et ses applications horticoles. Technique et Documentation*. Lavoisier (Paris), 152 p.
- Beckert M., Pollacsek M., 1979. Expression de la variabilité génétique du maïs (*Zea mays* L.) en différentes conditions de culture de tissus. *Ann. Amélior. Plantes*, **29** (5), 573-581.
- Behnke M., 1979. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plants. *Theor. Appl. Genet.*, **55**, 69-71.
- Behnke M., 1980. General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans*. *Theor. Appl. Genet.*, **56**, 151-152.
- Bingham E. T., Hurley L. V., Kaatz D. M., Saunders J. W., 1975. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. *Crop Sci.*, **15**, 719-721.
- Branchard M., 1972. Etude quantitative du bourgeonnement *in vitro* chez le genre *Nicotiana*. *Mémoires Soc. Bot. Fr.* (Colloq. Morphologie), 123-132.
- Branchard M., 1982a. Techniques nouvelles en Amélioration des Plantes. In : *Biotechnologies — Aperçus de la recherche internationale*. Colloque A.N.R.T. (Paris), 150-160.
- Branchard M., 1982b. *In vitro* culture of barley : a method to study *Rhynchosporium* scald disease and select plants resistant to rhynchosporide. In : *Variability in plants regenerated from tissue culture*. Earle D. E. & Demarly Y. Praeger C.B.S. Inc., 343-350.
- Brettell R. I. S., Ingram D. S., 1979. Tissue culture in the production of novel disease-resistant crop plants. *Biol. Rev.*, **54**, 329-345.
- Brettell R. I. S., Thomas E., Ingram D. S., 1980. Reversion of Texas male-sterile cytoplasm maize in culture to give fertile T-toxin resistant plants. *Theor. Appl. Genet.*, **58**, 55-58.
- Brown C., 1983. Steps towards the introduction of *Bremia* resistance in *Lactuca sativa* using tissue culture methods. In : Proc. of the 6th intern. protoplast symposium (posters). Ed. by I. Potrykus et al. Birkhauser Verlag, 274-275.
- Carlson P. S., 1973. Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science*, **180**, 1366-1368.
- Chaussat R., Bigot C., 1980. *La multiplication végétative des plantes supérieures*. Ed. Gauthier-Villars (Paris), 277 p.
- Cocking E. C., Davey M. R., Pental D., Power J. B., 1981. Aspects of plant genetic manipulation. *Nature*, **293**, 265-270.
- Demarly Y., 1976. La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs. I. Aspects théoriques. *Ann. Amélior. Plantes*, **26** (2), 117-138.
- Demarly Y., 1981. Voies nouvelles en Amélioration des Plantes. In : *Revue du Palais de la Découverte*, n° spécial 21. Colloque : « Les bases scientifiques de l'Amélioration des Ressources Alimentaires », 12-38.
- Earle D. E., 1978. Phytotoxins studies with plant cells and protoplasts. In : *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Ed. A. Thorpe. Proc. of the 4th intern. congress of plant tissue and cell culture. Calgary (Canada), 363-372.
- Gengenbach B. G., Green C. E., Donovan C. M., 1977. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **74**, 5113-5117.
- Gengenbach B. G., Connelly J. A., Pring D. R., Conde M. F., 1981. Mitochondrial DNA variation in maize plants regenerated during tissue culture selection. *Theor. Appl. Genet.*, **59**, 161-167.
- Grout B. W. W., Weatherhead M. A., 1980. A strategy for the production of disease resistant mutants. In : *Tissue culture methods for plant pathologists*. Ed. by Ingram D. S. and Helgeson J. P. Blackwell Scientific Public., 249-254.
- Haberlach G. T., Bude A. D., Sequeira L., Helgeson J. P., 1978. Modification of disease resistance of tobacco callus tissue by cytokinins. *Plant Physiol.*, **62**, 522-525.
- Heinz D. J., Krishnamurthi M., Nickell L. G., Maretzki A., 1977. Cell tissue and organ culture in sugarcane improvement. In : *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Ed. J. Reinert and Y. P. S. Bajaj. Springer-Verlag, 3-17.
- Helgeson J. P., Haberlach G. T., Upper C. D., 1976. A dominant gene conferring disease resistance to tobacco plants is expressed in tissue cultures. *Phytopathology*, **66**, 91-96.
- Ingram D. S., 1976. Growth of biotrophic parasites in tissue culture. In : *Encyclopedia of plant pathology 4. Physiological plant pathology*. Ed. R. Heitefuss and P. H. Williams. Springer-Verlag, 743-759.
- Ingram D. S., 1977. Applications in plant pathology. In : *Plant tissue and cell culture*. Ed. H. E. Street. Blackwell (Oxford), 463-500.
- Ingram D. S., Helgeson J. P., 1980. *Tissue culture methods for plant pathologists*. Blackwell Scient. Public., 272 p.
- Jaubertie J. P., Lafouasse M., Bervillé A., Branchard M., Casini R., Cornu A., Deshayes A., Vuillaume E., 1978. Recherche de variants résistants à des toxines par la technique de culture de cellules et de tissus végétaux. *Physiol. Vég.*, **16** (3), 401-409.
- Krishnamurthi M., Tlaskal J., 1974. Fiji disease resistant *Saccharum officinarum* var. 'Pindar' sub-clones from tissue cultures. In : *Proc. of the 15th congress of the Intern. Soc. Sugarcane technologists*, 130-137.

- Larkin P. J., Scowcroft W. R.**, 1981. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, **60**, 197-214.
- Latunde-Dada A. O., Lucas J. A.**, 1983. Somaclonal variation and reaction to *Verticillium* wilt in *Medicago sativa* L. plants regenerated from protoplasts. *Plant Sci. Lett.*, **32**, 205-211.
- Lebrun M. H.**, 1981. Utilisation de l'androgénèse pour l'obtention de variétés de riz résistantes aux phytotoxines de *Pyricularia oryzae*. Mise au point d'une technique de sélection. In : C. R. Symp. « Résistance du riz à la Pyriculariose » (Montpellier), 375-381.
- Matern U., Strobel G., Shepard J.**, 1978. Reaction to phytotoxins in a potato population derived from mesophyll protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **75**, 4935-4939.
- Mee G., Heinz D. J.**, 1975. Tissue culture for disease resistance. *Annu. Rep. Exp. Stn. Hawaiian Sugar Planters Assoc.*, 11-12.
- Murakishi H. H., Carlson P. S.**, 1982. *In vitro* selection of *Nicotiana sylvestris* variants with limited resistance to TMV. *Plant Cell Rep.*, **1**, 94-97.
- Nickell L. G.**, 1977. Crop improvement in sugarcane : studies using *in vitro* methods. *Crop Sci.*, **17** (5), 717-719.
- Nickell L. G., Heinz D. J.**, 1973. Potential of cell and tissue culture techniques as aids in economic plant improvement. In : *Genes, enzymes and populations*. Ed. by SRB A. M. Plenum Press, 109-128.
- Pochard E., Gebre Selassie K., Marchoux G.**, 1983. Oligogenic resistance to potato virus Y pathotype 1-2 in the line « Perennial ». *Capsicum Newsletter*, **2** (à paraître).
- Reed S. M., Collins G. B.**, 1978. Interspecific hybrids in *Nicotiana* through *in vitro* culture of fertilized ovules *J. Hered.*, **69**, 311-315.
- Sacristan M. D.**, 1982. Resistance responses to *Phoma lingam* of plants regenerated from selected cell and embryogenic cultures of haploid *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, **61**, 193-200.
- Shepard M. D.**, 1981. Protoplasts as sources of disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **19**, 145-166.
- Sibi M.**, 1981. *Hérédité et variants épigéniques obtenus par culture de tissus in vitro chez les végétaux supérieurs*. Thèse Doct. d'Etat. Université Paris-Sud (Orsay), 107 p. + planches.
- Skirvin R. M.**, 1978. Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica*, **27**, 241-266.
- Snell C. L.**, 1977. *Brassica oleracea* × *B. campestris* hybrids in forage rape and swede (*B. napus*) breeding. In : *Interspecific hybridization in plant breeding*. Proc. of the 8th Eucarpia Congress (Madrid, 1977), 339-343.
- Thanutong P., Furusawa I., Yamamoto M.**, 1983. Resistant tobacco plants from protoplast derived calluses selected for their resistance to *Pseudomonas* and *Alternaria* toxins. *Theor. Appl. Genet.*, **66**, 209-215.
- Tlaskal J.**, 1975. A note on disease resistant sub-clones derived by tissue culture techniques. *Sugarcane Breeder's Newsletter*, **36**, 71-72.
- Warren R. S., Routley D. G.**, 1970. The use of tissue culture in the study of single gene resistance of tomato to *Phytophthora infestans*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **95** (3), 266-269.
- Wetter L. R., Constabel F.**, 1982. *Plant tissue culture methods*. 2nd revised edition National Research Council of Canada (Ottawa), 195 p.