



**CLIVIA**

## **OBTENTION DE PLANTS DE TABAC HAPLOIDES PAR CULTURE D'ANTHERES**

Les cellules haploïdes (gamètes mâles contenues dans les grains de pollen) ne possèdent que la moitié du nombre normal de chromosomes ( $n$  au lieu de  $2n$ ). Elles renferment néanmoins toute l'information nécessaire à la régénération d'un individu complet mais stérile.

*In vitro*, on peut obtenir des plants haploïdes par androgenèse (culture de pollen).

Une méthode consiste à mettre en culture les anthères de boutons floraux en cours de développement.

### **PRINCIPE GENERAL**

Le TP consiste à mettre à germer des graines de tabac dans un mélange de tourbe et de terreau et récupérer au bout de 3 à 4 mois les boutons floraux obtenus.

Ceux-ci sont désinfectés, les anthères prélevées et mises en culture sur un milieu gélosé coulé en boîtes de Petri.

Les premiers embryons apparaissent au bout d'une quinzaine de jours.

### **MATERIEL NECESSAIRE**

- Un bac de germination contenant un mélange tourbe/terreau
- 20 boîtes de Petri de diamètre 55 mm
- Pincettes, scalpels
- Alcool à 70°
- Hypochlorite de calcium à 1 %

### **PREPARATION DU MATERIEL**

Jour J – 3 à 4 mois, semer les graines de tabac dans le bac de germination.

Jour J -1, stériliser le milieu tabac (T1) et le couler stérilement dans les boîtes de Petri.

Préparer les boîtes de Petri de la façon suivante :

- ouvrir le pot de milieu de culture
- verser le milieu dans un récipient d'environ 500 ml qui servira pour la stérilisation du milieu de culture
- ajouter 200 ml d'eau distillée
- faire fondre le milieu de façon à ce qu'il devienne limpide
- le stériliser à la marmite à pression. Pour cela, placer environ 2 litres d'eau au fond de la marmite. Poser le récipient dans le panier. Stériliser 30 mn à partir du sifflement de la soupape en maintenant la pression au maximum ou à l'autoclave (25 mn à 115°C).
- à la fin du temps de stérilisation, laisser refroidir sans enlever la soupape.
- Couler stérilement le milieu de culture dans des boîtes de Petri de diamètre 55 mm.

### **MANIPULATION**

Sur les plants de 3 à 4 mois, et au stade de la floraison, repérer les boutons non ouverts dont la longueur des sépales est égale à celle des pétales.

Les prélever au dernier moment et les réunir dans un Becher.

### DESINFECTION DES BOUTONS :

- 10 secondes dans un bain d'alcool à 70°
- 10 minutes dans de l'hypochlorite de calcium à 1 % (agiter pendant la désinfection).
- 3 rinçages de 5 minutes à l'eau distillée stérile

### MISE EN CULTURE :

- placer un bouton floral dans une boîte de Petri stérile
- l'inciser transversalement au scalpel de façon à enlever la base du bouton
- l'inciser longitudinalement de façon à voir les anthères (il y en a 5)
- les prélever en ôtant le filet (très important pour avoir seulement des cellules à n chromosomes)
- placer les anthères à la surface du milieu
- parafilmer les boîtes
- les placer à 24°C sous un faible éclairage (500 lux).

### **RESULTATS**

Au bout de 15 jours, les premiers embryons apparaissent à la surface des anthères. On peut alors les prélever et les repiquer éventuellement dans des flacons contenant le même milieu et les placer à la lumière (environ 2000 lux) pour obtenir des plantules au bout d'environ 45 jours.

