

## Teneur non conforme en ADN comme indicateur de variation somaclonale chez la pomme de terre

L. NOWBUTH et C. L. LÊ, Agroscope RAC Changins, CP 1012, CH-1260 Nyon 1

@ E-mail: [lotti.nowbuth@rac.admin.ch](mailto:lotti.nowbuth@rac.admin.ch)  
Tél. (+41) 22 36 34 424.

### Résumé

L'analyse au cytomètre de flux de plantes de pomme de terre régénérées à partir d'entre-nœuds a révélé que les noyaux cellulaires des plantes au phénotype non conforme avaient une teneur anormale en ADN. Quelques autres plantes régénérées, également d'apparence normale, présentaient de tels noyaux avec une teneur en ADN non conforme. Aucune des plantes régénérées ayant des noyaux normalement tétraploïdes ne présentait de différences phénotypiques par rapport à des plantes micropropagées non régénérées. Aucune relation n'a pu être établie entre le type de profil cytométrique et le type d'anomalies phénotypiques observées.

Les régénérants possédant un noyau cellulaire avec une teneur en ADN non conforme sont issus de mitoses erronées. Lors de cet événement, les chromosomes dupliqués sont inégalement répartis dans chacune des cellules filles. Ce phénomène de mitose inégale affecte des chromosomes différents pour chaque plante régénérée, ce qui génère une grande diversité de phénotypes.

### Introduction

On appelle variations somaclonales des modifications du phénotype des plantes qui apparaissent le plus souvent lors de la régénération *de novo* de plantules à partir de tissus déjà différenciés (fig.1). Pour produire des plantes génétiquement modifiées, la régénération doit donner des plantes conformes. Or, il apparaît que, même sans transformation, les plantes régénérées (appelées ici régénérants) à partir de tissus différenciés, indépendamment du type de tissus choisis, ne sont fréquemment pas conformes à la plante initiale (Lê *et al.*, 2001). De ce fait, il est important de comprendre la nature de ces modifications.

Une première étude des variations somaclonales, conduite dans le cadre de la régénération de la pomme de terre (Lê *et al.*, 1997), avait abordé ce phénomène sous son aspect phénotypique. Pendant plusieurs années, des plantes présentant des variations somaclonales ont été testées au champ; leur aspect et leur rendement agronomique ont été répertoriés. Cependant, la détection de ces variations s'est limitée à l'observa-

tion des changements phénotypiques, car il n'y avait que très peu de chances de trouver des marqueurs moléculaires pour les variations somaclonales, compte tenu de la tétraploïdie de la pomme de terre.

Le plus souvent, ces variations se conservaient au cours des repiquages, *in*

*vitro* comme au champ, et se retrouvaient même sur les plantes issues de tubercules de plantes anormales. Les variations somaclonales devaient donc être inscrites dans la cellule et n'étaient pas dues à un état physiologique ou à des conditions environnementales. On sait même qu'elles sont quelquefois à



Fig. 1. Plantules de pomme de terre (var. Bintje) régénérées à partir d'entre-nœuds.

Tableau 1. Teneurs en ADN des plantes de la récolte B, prélevées après cinq mois.

Id. du régénérant	Longueur de la plante (cm)	Teneur en ADN (en multiple de la quantité N d'ADN = 12 chromosomes)														Nombre de pics	
		3,5 X	4 X	4,5 X	5 X	6 X	6,5 X	7 X	8 X	9 X	10 X	12 X	13 X	14 X	16 X		
I_B_01	13,0		89,1						10,9								2
I_B_02	13,0		87,3						12,7								2
I_B_03	12,0		86,4						13,6								2
I_B_04	14,0		91,0						9,0								2
I_B_07	14,0		90,0						10,0								2
I_B_09	12,0		90,6						9,4								2
I_B_11	13,0		88,0						12,0								2
I_B_12	11,0		85,4						14,6								2
I_B_17	13,0		87,4						12,6								2
I_B_19	13,0		91,3						8,7								2
I_B_21	14,0		86,8						13,2								2
I_B_23	12,0		89,3						10,7								2
I_B_25	12,5		89,4						10,6								2
I_B_26	13,0		85,4						14,6								2
I_B_28	14,0		90,1						9,9								2
I_B_30	13,0		87,1						12,9								2
I_B_32	13,0		88,1						11,9								2
I_B_33	13,0		89,2						10,8								2
I_B_35	15,0		85,7						14,3								2
I_B_36	14,0		87,4						12,6								2
I_B_38	14,0		90,2						9,8								2
I_B_39	14,0		90,5						9,5								2
I_B_41	13,0		93,0						7,0								2
I_B_43	13,0		89,5						10,5								2
I_B_06	4,0					67,0						33,0					2
I_B_20	6,0					75,7						24,3					2
I_B_27	7,5					62,3			19,2			18,5					3
I_B_29	8,0					59,3			22,9			17,8					3
I_B_34	7,0					59,5			19,3			21,2					3
I_B_08	6,0					55,4			18,3			21,9			4,4		4
I_B_24	5,0					55,1			18,3			22,2			4,4		4
I_B_40	8,0					57,7			17,0			20,1			5,1		4
I_B_05	8,0		32,4			31,9			23,1			8,6			4,0		5
I_B_16	7,0			33,0		29,4			28,0			7,3			2,2		5
I_B_10	7,0	31,4				43,1			18,4			7,1					4
I_B_15	6,0			26,9		49,4				5,8		17,9					4
I_B_31	5,0				27,2	53,3					5,4	14,1					4
I_B_37	10,0				14,7	64,1					4,0	17,2					4
I_B_42	8,0					51,4		20,2				21,4			7,0		4
I_B_18	5,0							87,5							12,5		2
I_B_13	6,5						60,2	20,5					19,3				3
I_B_22	5,0						84,4						15,6				2
I_B_14	12,0			92,3							7,7						2

- Plante conforme aux témoins non régénérés.
- Plante avec une teneur en ADN non conforme et un phénotype anormal.
- Plante avec une teneur en ADN non conforme mais un phénotype normal.
- 89,0** Pourcentage de cellules avec une teneur définie en ADN par rapport au total des cellules comptées.

l'origine de caractéristiques agronomiques nouvelles, comme par exemple la tolérance à un environnement salin ou la résistance à un agent pathogène.

Le but de ce travail est d'étudier le phénomène des variations somaclonales de la pomme de terre cultivée, en considérant d'autres critères que les seules caractéristiques physiques apparentes (phénotype) de la plante.

Cette étude a été réalisée dans le cadre de l'Action COST 843 dont l'objectif principal vise à améliorer la qualité des plantes cultivées au moyen de la culture *in vitro*.

## Matériel et méthodes

Le contrôle de la conformité des teneurs en ADN des noyaux cellulaires des plantes variées propose une première approche du problème. Pour cela, nous avons procédé à la mise en culture, en cases climatisées, d'une série d'explants qui ont régénéré des pousses feuillées. Les régénérants récoltés après deux mois comprenaient un nombre particulièrement important de plantes au phénotype non conforme. Ces explants anormaux ont été conservés et une seconde récolte a été faite après cinq mois et une troisième après huit mois et demi. Le potentiel de régénération s'est estompé au-delà de cette période de culture et plus aucun régénérant n'est apparu sur ces cas-là.

Les trois premiers entre-nœuds des microboutures de pommes de terre de la variété Bintje ont été utilisés comme source d'explants, en s'inspirant de la technique déve-

loppée auparavant (Lê, 1991). Ces entre-nœuds ont été mis dans des boîtes de Pétri sur le milieu de régénération suivant: sels minéraux de base selon Murashige et Skoog, 1 mg/l thiamine-HCl, 0,5 mg/l pyridoxine-HCl, 0,5 mg/l acide nicotinique, 0,5 mg/l myoinositol, 30 g/l saccharose, 7 g/l bacto agar. Le milieu est ajusté à un pH de 5,9 avant autoclavage à 121 °C pendant quinze minutes; ensuite, 3,5 mg/l de zéatine riboside et 0,15 mg/l d'AIA sont ajoutés lorsque le milieu a atteint une température inférieure à 50 °C. La régénération a eu lieu dans une case climatisée à une température de 19 °C le jour, 17 °C la nuit et avec une luminosité de 50 à 70  $\mu\text{M}/\text{sec}\cdot\text{m}^2$  pendant 16 heures sur 24. Les régénérants ayant atteint une longueur d'environ 1 cm ont été récoltés après deux, cinq et huit mois et demi de culture et repiqués dans des tubes sur un milieu de propagation neutre, c'est-à-dire sans hormones. Après plusieurs repiquages, toutes ces plantes, ainsi que 31 microboutures non régénérées (plantes témoin), ont été analysées au cytomètre de flux PARTEC Ploidy Analyser (lire l'encadré) pour déterminer le contenu en ADN de leurs noyaux. Les noyaux ont été extraits de la partie supérieure des plantules comprenant l'apex, deux à trois feuilles avec les bourgeons axillaires, la tige et les pétioles. Pour les plantules de taille réduite, une plus grande quantité de la partie supérieure, avec plus de feuilles si celles-ci sont très petites, a été prélevée afin d'obtenir une quantité équivalente de noyaux.

Outre le profil des teneurs en ADN des noyaux, chaque plantule examinée a été photographiée. L'épiderme inférieur des feuilles a été retiré, coloré (Safranine, Bleu Astra et Fuch sine Diamant) et photographié au microscope.

## Résultats

Parmi les régénérants de la première récolte (A), prélevés après deux mois de culture, 72 régénérants ont survécu après treize repiquages. La taille moyenne de ces plantules est de 8,9 cm  $\pm$  4 cm.

Parmi les régénérants de la deuxième récolte (B), prélevés après cinq mois de culture, 43 régénérants ont survécu après onze repiquages. Leur taille moyenne est de 10,4 cm  $\pm$  3,4 cm (tabl.1).

Parmi les régénérants de la troisième récolte (C), prélevés après huit mois et demi, les quinze régénérants ont tous survécu après sept repiquages, dotés d'une longueur moyenne de 13,6 cm  $\pm$  1,1 cm.

31 plantules micropropagées par leurs bourgeons axillaires, non régénérées, ont servi de témoin. Leur taille varie entre 11 et 14,5 cm avec une moyenne de 12,9 cm et un écart-type de 1 cm.

## Témoins

Chacune des 31 plantules témoin analysées présente un grand pic très étroit pour la population des noyaux tétraploïdes (lire l'encadré «Définitions») et un pic plus petit pour une population de cellules ayant des noyaux octaploïdes (en phase quiescente G2 de leur mitose) (fig. 2a et 2b). Le pic tétraploïde comprend entre 87 et 93% des noyaux avec une moyenne de 89,9%

## Le cytomètre de flux

Le cytomètre de flux est un appareil qui compte et trie individuellement jusqu'à 100 000 particules microscopiques par minute selon des critères définis (taille, charges, émissions). Dans notre cas, le cytomètre a trié et compté les noyaux des cellules de microplantules de pommes de terre d'après leur fluorescence (DAPI) proportionnelle à leur teneur en ADN.

L'analyse au cytomètre de flux permet de déterminer uniquement la quantité d'ADN présente dans le noyau. Quand une plante est décrite comme ayant un contenu en ADN équivalent à un hexaploïde, cela n'implique pas nécessairement qu'elle contient six copies de chaque chromosome.

Étant donné que la plante de pomme de terre non régénérée est normalement tétraploïde, avec quatre copies de chacun des douze chromosomes, nous écrivons par convention 6X pour une plante ayant une fois et demie cette quantité d'ADN, donc six fois la quantité de base N de douze chromosomes pour la pomme de terre. En ce qui concerne le nombre de copies de chaque chromosome effectivement présent dans un noyau, seule une analyse cytologique pourrait permettre de le déterminer. Un certain nombre de plantes présentent d'ailleurs un multiple fractionné du nombre de chromosomes de base, par exemple 3,5X, 4,5X, 5,5X, etc.

Le cytomètre détecte sans équivoque la quantité d'ADN de  $\pm$  3 chromosomes de pomme de terre jusqu'à environ 8X. Nous nous sommes contentés d'une précision de  $\pm$  6 chromosomes (0,5), car il aurait fallu une double analyse (une seconde analyse avec un standard interne pour chaque échantillon) sans que la compréhension du phénomène en eût été changée. Cela n'a été fait que pour un nombre limité d'échantillons. Le caractère aneuploïde de ces plantes est démontré sans équivoque.

Nous avons estimé que les plantes régénérées ne se distinguent en rien des plantes témoins – ni dans leurs phénotype, longueur, couleur, forme des feuilles, pilosité, ni dans la teneur en ADN de leurs noyaux – étaient effectivement conformes, et que près de 90% de leurs cellules possédaient le caractère tétraploïde. La preuve absolue de leur conformité n'est toutefois pas établie, vu qu'il s'agit de plantes régénérées et donc potentiellement porteuses de variations somaclonales. Celles-ci peuvent en effet ne pas être apparentes.

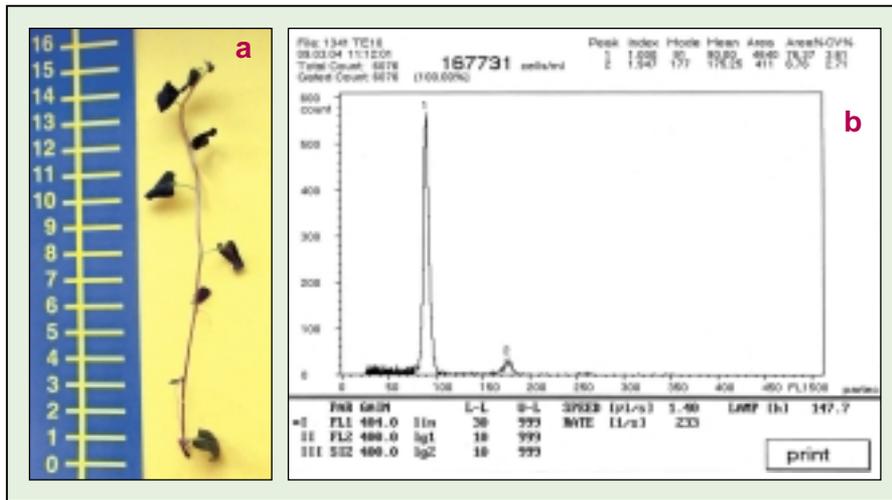


Fig. 2a et b. Plante de pomme de terre témoin (var. Bintje) micropropagée non régénérée, avec une grande population de cellules tétraploïdes (pic 1) et une petite population de cellules octaploïdes en phase G2 de leur mitose (pic 2). Chaque graduation de **a** correspond à 1 cm.

$\pm 1,6\%$  et donc le pic à double contenu d'ADN entre 7 et 13%, avec une moyenne de 10,1%. Ces témoins forment un groupe très homogène et ont été utilisés comme standard internes sur le cytomètre de flux.

## Régénérants récoltés après deux mois

### Plantes conformes aux témoins

Sur les 72 régénérants de la série A, 19 ont une teneur en ADN identique à celle des plantules micropropagées non régénérées utilisées comme témoins. Chez ces 19 individus, 85,7 à 92,4% des noyaux sont tétraploïdes et conséquemment 7,6 à 14,3% sont octaploïdes. En moyenne, 89,4% des cellules d'une plantule sont tétraploïdes et 10,6% sont octaploïdes avec un écart-type de 1,8%.

Leur grandeur moyenne est de 13 cm avec un écart-type de 1,3 cm.

### Plantes atypiques

Sur les 72 plantules, 53 ont des cellules dont le contenu en ADN diffère de celui des témoins (fig. 3a et 3b).

Dix plantules présentent, comme les témoins, deux populations de noyaux, mais le contenu en ADN de ces noyaux n'est pas conforme: huit plantules ont une teneur équivalente à six fois (6) l'haploïde et le deuxième pic à 12. Ce dernier pic représente les cellules avec double teneur en ADN et équivaut au pic des cellules en phase G2 – sauf que, dans ce cas, elles ne se divisent que difficilement, d'où un pourcentage plus élevé de cellules dans ce deuxième pic. La proportion de cellules en phase G2 diffère d'une plante à l'autre. Leur taille varie entre 4 et 14 cm, avec une moyenne de 7,5 cm et un écart-type de 2,9 cm. Les deux plantes restantes présentent un pic à 5 et 7, accompagnés chacun d'un pic double à 10 et 14 respectivement. La taille de ces deux plantules est de 10 et 8 cm.

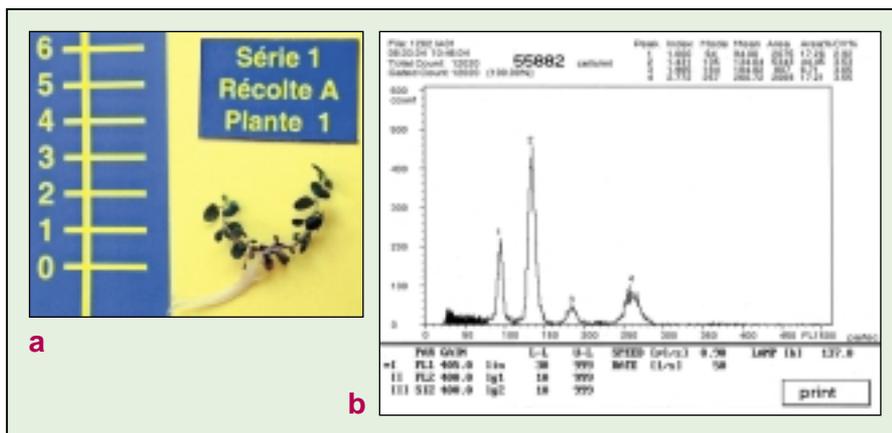


Fig. 3a et b. Plante de pomme de terre (var. Bintje) régénérée non conforme avec quatre populations de noyaux: 4X, 6X, 8X et 12X.

## Définitions

**Phénotype:** aspect physique, ensemble des caractères observables d'un organisme. Le phénotype est le reflet de l'interaction du génotype de cet organisme avec un environnement donné.

**Ploïdie:** nombre d'assortiments de chromosomes différents dans une cellule ou un organisme. Chaque assortiment de chromosomes est désigné par la lettre N. Un organisme ou une cellule n'ayant qu'un seul assortiment de chromosomes est appelé **haploïde**. Un organisme ayant deux copies de l'assortiment de chromosomes (2N) est dit **diploïde**, trois copies (3N) **triploïde**, quatre copies (4N) **tétraploïde**. La grande majorité des êtres vivants, de nombreuses plantes et presque tous les animaux, sont diploïdes.

Les variétés de pommes de terre commercialement cultivées dans le monde entier sont toutes tétraploïdes, sauf en Amérique du Sud (d'où les pommes de terre sont originaires et où certaines variétés archaïques diploïdes sont encore cultivées). Le nombre de chromosomes de base pour la pomme de terre est de  $N = 12$ . Le nombre de chromosomes dans chaque cellule de pomme de terre est donc  $4 \times 12 = 48$  chromosomes. Les pommes de terre tétraploïdes sont apparues spontanément il y a des centaines de milliers d'années ou même quelques millions d'années. Il existe donc dans la nature, en Amérique du Sud, des pommes de terre sauvages de ploïdies différentes.

**Polyploïdie:** une cellule ou un organisme est appelé polypléide lorsqu'il contient plus de 2N chromosomes. La pomme de terre cultivée avec 4N chromosomes est donc un organisme polypléide.

**Hyperploïdie:** état d'une cellule ou d'un organisme ayant un nombre de chromosomes supérieur à celui qui est communément trouvé dans cette espèce ou cette variété. Des pommes de terre ayant par exemple 6N chromosomes sont hyperploïdes. Par opposition, une cellule ou un organisme ayant un nombre de chromosomes inférieur à ce qui est commun est appelé hypoploïde.

**Aneuploïdie:** état d'une cellule ou d'un organisme ayant un nombre anormal de chromosomes et dont le nombre

de copies de chromosomes individuels n'est pas identique pour tous les chromosomes. La quantité d'ADN présente dans ces cellules est alors désignée par la lettre X.

**Euploïdie:** état d'une cellule ou d'un organisme possédant tout l'assortiment N de chromosomes et ayant pour chaque chromosome le même nombre de copies.

**Chimère:** organisme dont toutes les cellules ne contiennent pas un équipement génétique identique. Une plante chimère sectorielle possède des cellules chimériques distribuées de façon aléatoire. Par bouturage, elle est instable puisque la distribution des différents génotypes n'est pas constante. Une plante chimère pérclinale contient ces cellules chimériques distribuées en couche de façon symétrique dans le méristème. Un bouturage reproduit la même chimère.

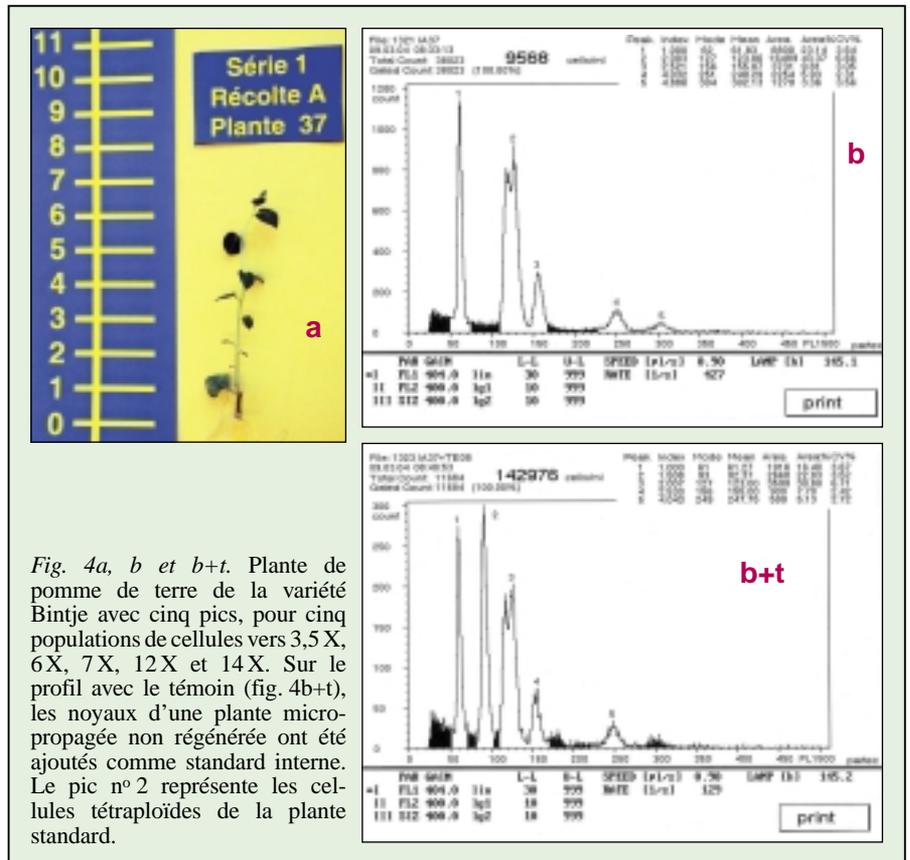
**Mitose:** processus de la division cellulaire qui engendre, à partir d'une cellule mère, deux cellules filles qui sont génétiquement identiques entre elles et avec la cellule mère.

**Métaphase:** étape de la mitose durant laquelle les chromosomes condensés s'alignent selon un plan équatorial sur un fuseau bipolaire dans la cellule en division.

**Anaphase:** étape de la mitose durant laquelle les chromosomes dupliqués encore appariés sont séparés et migrent le long du fuseau vers les pôles opposés de la cellule.

**Méristème:** tissus non différenciés de la plante (bourgeons et extrémités des racines), dans laquelle les cellules qui ont gardé leurs caractères embryonnaires se divisent pour produire de nouvelles cellules.

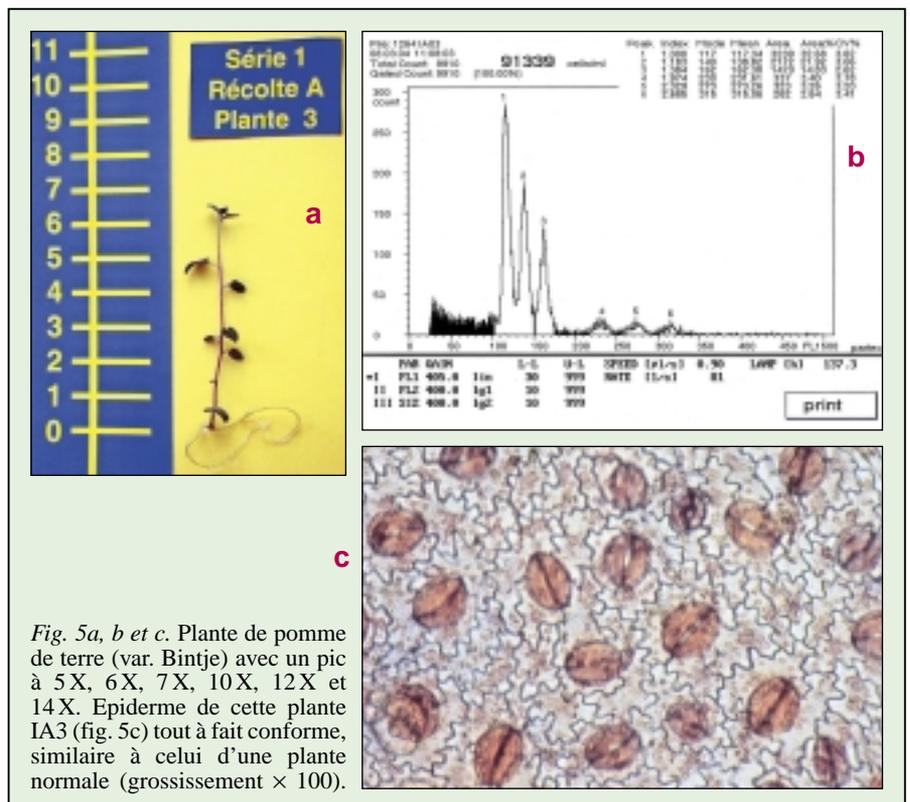
**Régulateurs de croissance:** hormones que la plante synthétise dans certains tissus, surtout dans les méristèmes en ce qui concerne l'acide indolyl acétique (AIA) et la zéatine riboside (ZR). Comme nous utilisons des tissus différenciés (les entre-nœuds) pour la régénération, ces hormones doivent être rajoutées au milieu pour permettre la division des cellules, leur croissance et leur différenciation. L'AIA est une substance qui se dégrade rapidement à la lumière.



Sur les 72 régénérants, 43 sont chimériques, c'est-à-dire qu'ils contiennent plus de deux populations (pics) de cellules (quantité Q et 2 fois Q pour les cellules en phase G2): 25 d'entre eux présentent trois pics, 14 présentent

quatre pics, deux plantules présentent cinq pics (fig. 4a, 4b et 4b+t) et deux possèdent même six populations de noyaux à teneur en ADN différente (fig. 5a, 5b et 5c).

Au microscope, les anomalies dans la



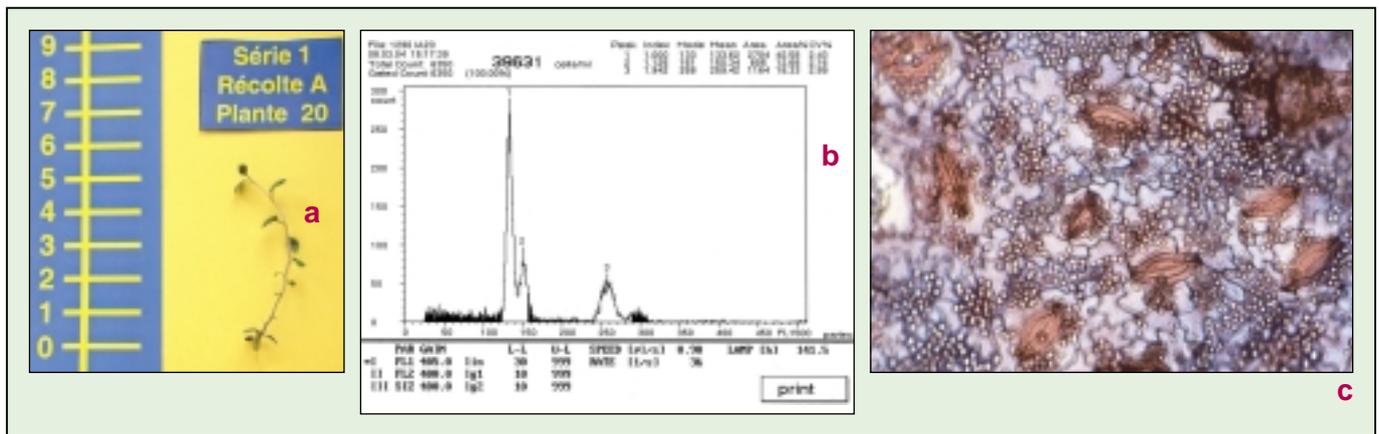


Fig. 6a, b et c. Plante de pomme de terre (va. Bintje) avec un pic à 6 X, 7 X et 12 X. L'épiderme de la plante IA20 avec des stomates déformés et des cellules épidermiques contient une quantité d'inclusions (grossissement  $\times 100$ ).

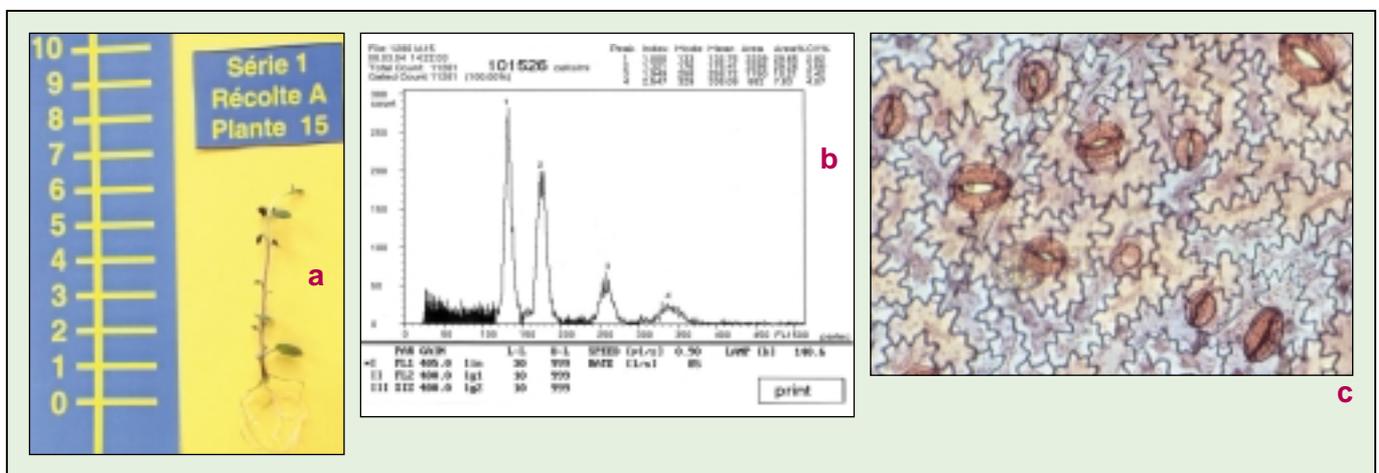


Fig. 7a, b et c. Ci-dessus: plante de pomme de terre (var. Bintje) avec un pic à 6 X, 8 X, 12 X et 16 X. L'épiderme normal de la plante IA15 contient des stomates normaux (grossissement  $\times 100$ ).

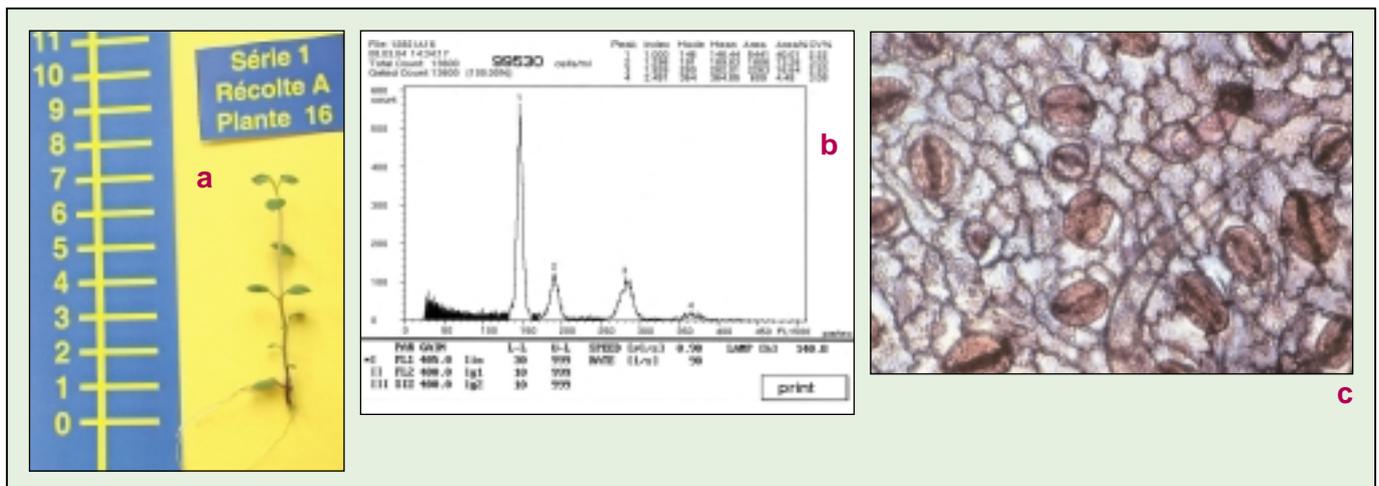


Fig. 8a, b et c. Ci-dessus: plante de pomme de terre (var. Bintje) avec un pic à 6 X, 9 X, 12 X et 18 X. Les cellules de l'épiderme de la plante IA16 n'ont pas la forme de pièces de puzzle typique mais les cellules de garde sont normales (grossissement  $\times 100$ ).

constitution de l'épiderme se révèle nombreuses et diverses: déformation des cellules de l'épiderme, des cellules de garde, inclusions de granules de métabolites secondaires, pigmentation rouge, etc. Comme pour l'aspect macroscopique des plantes, l'aspect microscopique

des cellules n'est pas non plus corrélé avec le profil cytométrique. Des plantes aux profils cytométriques anormaux presque identiques peuvent avoir des épidermes d'aspect très différent ou encore tout à fait normaux (fig. 6a, 6b et 6c; fig. 7a, 7b, et 7c; fig. 8a, 8b et 8c).

### Régénérants récoltés après cinq mois

#### Plantes conformes aux témoins (tabl.1)

Sur les 43 plantes de la série B récoltées après cinq mois de culture, 24 plan-

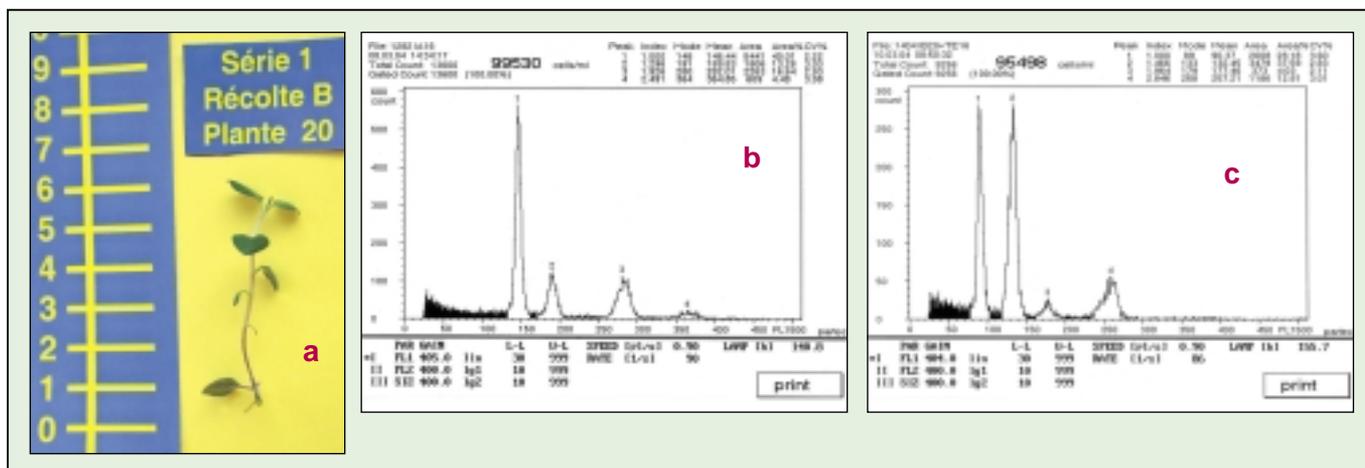


Fig. 9a, b et b+t. Plante de pomme de terre (var. Bintje) avec une population de cellules vers 6X et une deuxième vers 12X. Sur le profil avec le témoin, les pics 1 et 3 sont les cellules de la plante utilisée comme standard interne. Les pics 2 et 4 correspondent aux cellules de la plante IB20.

tules présentent des noyaux avec un contenu en ADN identique à celui des témoins micropropagés. La taille de ces 24 plantules varie de 11 à 15 cm avec une moyenne de  $13,1 \text{ cm} \pm 0,9 \text{ cm}$ . Le pic des noyaux tétraploïdes représente  $88,7\% \pm 2\%$  des cellules, donc celui des octaploïdes atteint  $11,2\%$ .

### Plantes atypiques

Pour les plantes non conformes, la population de cellules contenant une quantité d'ADN 6X et 12X est la plus fréquente. Dans cette catégorie, les plantes chimériques sont nombreuses.

Cinq plantules ne présentent que deux pics, mais avec un contenu en ADN atypique (fig. 9a, 9b et 9b+t). Quatre plantes présentent trois pics, huit plantes ont quatre pics et enfin deux plantules présentent cinq pics (fig. 10a et 10b).

### Régénérants récoltés après huit mois et demi

Peu de régénérants sont apparus sur les explants déjà âgés. Leur croissance, très lente, diminue encore au fil du temps.

Quinze explants d'environ 1 cm de longueur, qui étaient brunâtres et couverts de cals, ont pu être récoltés (fig.11). Transférées dans des tubes sur un milieu approprié (CMS-pdt sans vitamine), les plantules ont rapidement pris un aspect parfaitement normal, ne présentant aucun signe apparent de variation somaclonale. Après sept repiquages, les plantes récoltées ont été passées au cytomètre de flux. Les résultats montrent que 14 plantes sur les 15 ont un profil cytométrique identique aux témoins micropropagés non régénérés.

Ces 14 plantules présentent un pic avec

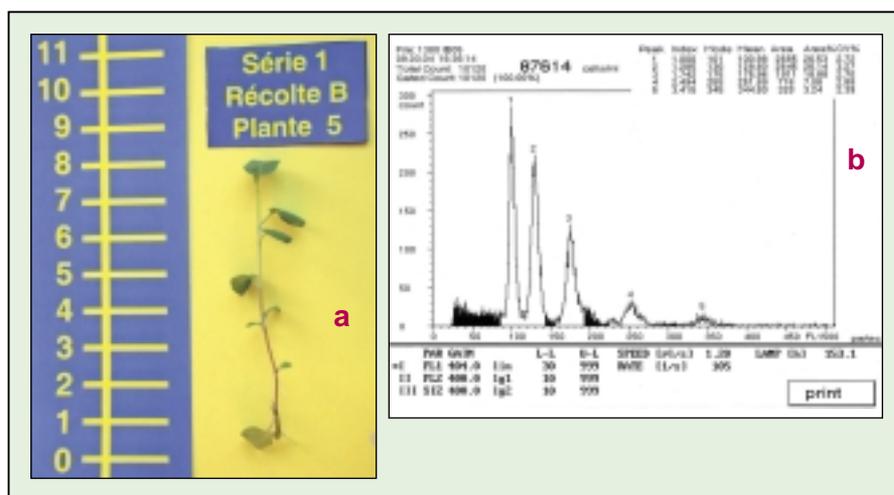


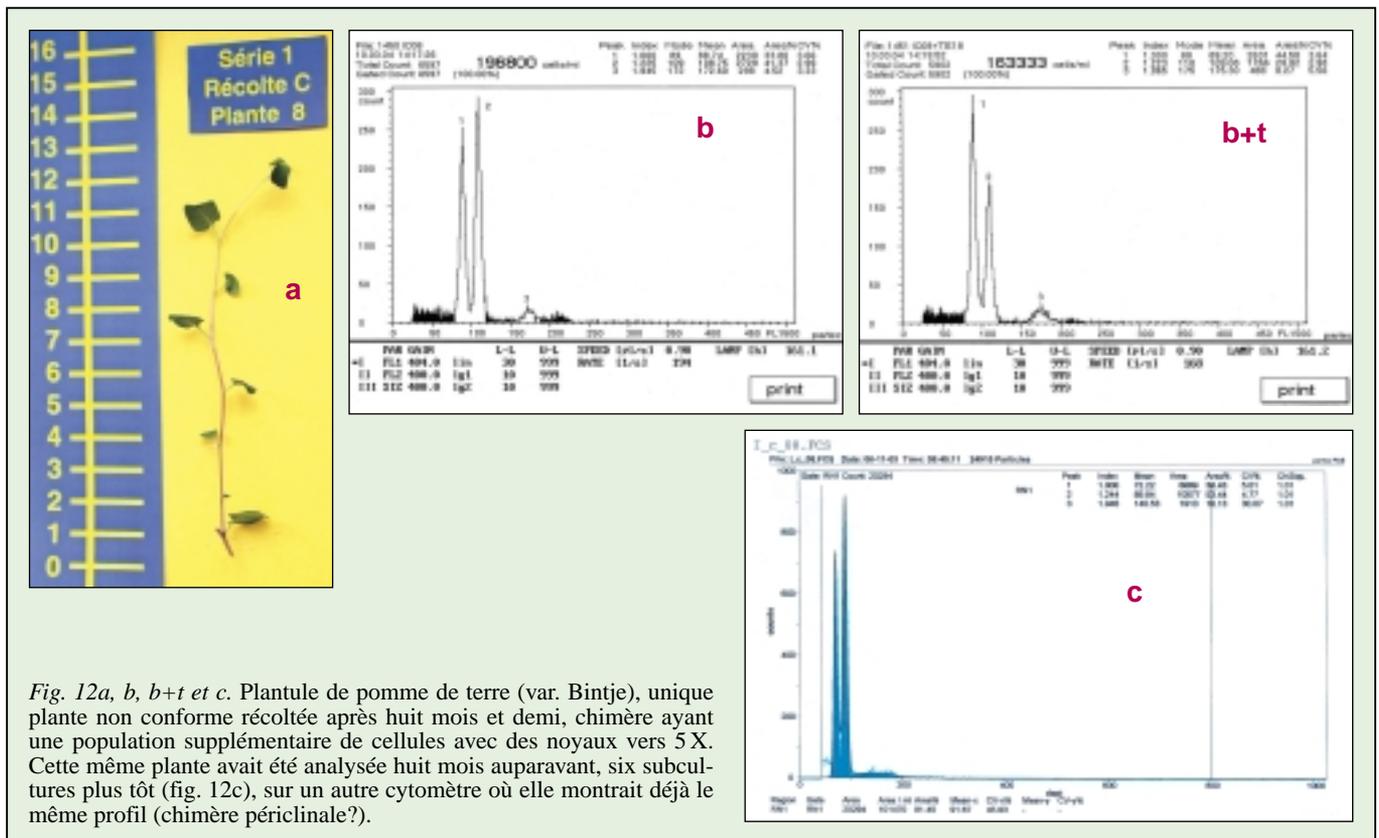
Fig. 10a et b. Plante présentant cinq populations de cellules avec 4X, 6X, 8X, 12X et 16X.

$89,1\% \pm 1,6\%$  des cellules pour 4N et un deuxième pic avec  $10,9\%$  des cellules à 8. Leur longueur moyenne est de  $13,6 \text{ cm} \pm 1,1 \text{ cm}$ , ce qui ne les distingue pas des témoins.

Une seule plantule montre un pic supplémentaire:  $42,4\%$  de ses noyaux cellulaires ont une teneur en ADN de 4X,  $51,9\%$  des noyaux à 5X et  $5,7\%$  à 8X; toutefois, cette unique plantule non con-



Fig. 11. Régénérants récoltés après huit mois et demi.



forme de la dernière récolte possède un phénotype conforme et une longueur (13 cm) tout à fait normale (fig. 12a, 12b, 12b+t et 12c).

## Discussion

### Mitose erronée

Etant donné qu'un certain nombre de cellules présentent des noyaux à teneur en ADN intermédiaire, non multiple de N, donc avec un équipement incomplet des douze chromosomes de base (par exemple 5,5 X), on parle, dans le cas présent, d'aneuploïdie.

Ces teneurs infidèles au matériel génétique de la cellule mère proviennent d'erreurs lors de la division. Durant la mitose, plus particulièrement au moment de l'anaphase, des chromosomes dupliqués ne sont pas répartis d'une manière égale dans les deux pôles de la cellule en division. Une des deux cellules-filles hérite alors de chromosomes supplémentaires qui auraient dû être alloués à l'autre (fig.13).

Dans les circonstances normales de la division cellulaire, les erreurs de mitose sont très rares. Dans la levure, elles sont estimées à moins de une division sur 100 000.

Lors de la régénération opérée à partir de tissus déjà différenciés, une ou quelquefois deux ou trois cellules (d'où les chimères) vont se diviser de façon

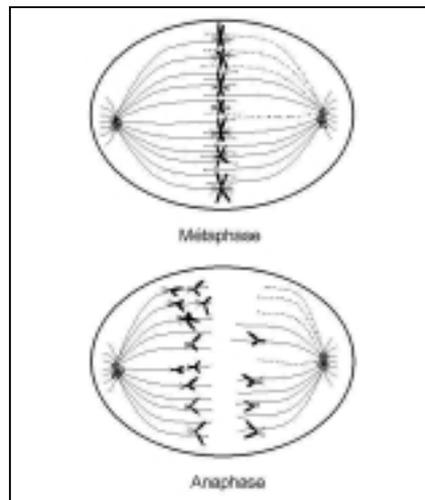


Fig. 13. Métaphase et anaphase.

aberrante, sous l'influence des régulateurs de croissance (AIA et ZR), pour se développer en méristème évoluant finalement en plantule.

Ce processus de mitose inégale lors de l'induction de la régénération explique l'apparition de plantes présentant des variations somaclonales. Les mécanismes exacts ne sont pas encore connus et les conditions qui dictent l'apparition de ce type de variations somaclonales pas encore bien cernées. On observe une diminution en fonction du temps du nombre de plantes normales et anormales apparues sur les mêmes cals (72 après deux mois, avec 74% de plantes anor-

males, 43 après cinq mois, avec 44% de plantes anormales, et 15 seulement après huit mois et demi, avec 7% (1 sur 15) de plantes anormales). La dégradation des régulateurs de croissance à la lumière explique cette diminution au fil du temps. Les régulateurs de croissance sont donc un élément significatif dans l'apparition d'anomalies de ploïdie et bien sûr jouent aussi un rôle dans l'induction de la régénération. Une expression mesurable du rapport entre l'apparition de variants et la quantité de régulateurs de croissance n'a toutefois pas été possible. En effet, le phénomène est trop sensible et il n'a pas été possible de maîtriser les paramètres pour standardiser les conditions: sur vingt boîtes de Pétri contenant huit explants, nous avons obtenu plus de 174 régénérants pour la présente expérience, dont 131 ont survécu aux repiquages successifs, pour seulement trois dans une répétition réalisée dans les mêmes conditions et avec le même milieu de régénération.

### Teneur non conforme en ADN et phénotype

Comment la teneur non conforme en ADN des noyaux cellulaires se manifeste-t-elle sur le phénotype d'une plantule? Les variations phénotypiques observées sur les plantules sont multiples: feuilles foncées ou claires, petites, poilues, rondes, rougeâtres, gaufrées,

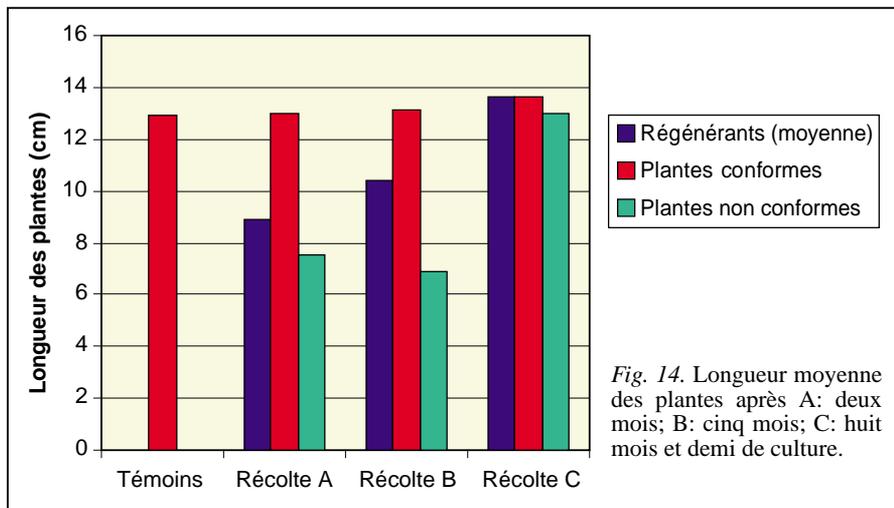


Fig. 14. Longueur moyenne des plantes après A: deux mois; B: cinq mois; C: huit mois et demi de culture.

tiges aux flavonoïdes bleuâtres au lieu de la couleur bordeaux, tiges plus poilues, modifications histologiques, accumulation de métabolites secondaires, etc. De toute évidence, il existe une relation entre la teneur non conforme en ADN et l'expression des gènes qui contrôlent l'aspect et le métabolisme de la plante. Toutes ces observations sont difficiles à systématiser et les formes intermédiaires innombrables. De ce fait, nous nous sommes limités à une donnée facilement mesurable, la longueur des plantes, qui reflète l'état général de leur croissance (fig.14).

Aucune plantule au profil cytométrique normal ne présentait de variation phénotypique apparente de quelque nature que ce soit. De toute évidence, les plantes, régénérées mais non transgéniques, que nous avons toujours désignées comme variations somaclonales, étaient des plantes avec une ploïdie anormale.

Les plantes régénérées conformes, qui ont une grande population de noyaux 4N et une petite population de noyaux en phase G2 à 8N, sont représentées, à deux exceptions près, par des plantes de 12 cm et plus et toutes ont présenté un phénotype tout à fait normal. La relation est univoque entre la conformité de la teneur en ADN de la plante, une bonne croissance et un aspect identique à celui des plantules micropropagées, non régénérées. Cependant, l'inverse ne se vérifie pas: un phénotype apparemment normal n'implique pas nécessairement que le profil cytométrique de la plante le soit également.

Pour toutes les plantes régénérées n'ayant pas une teneur conforme en ADN dans leurs noyaux, autant celles qui n'ont que deux populations de noyaux, par exemple à 6X et 12X, que celles qui ont jusqu'à six populations de noyaux, la relation entre la croissance de la plante, le phénotype et le type de

profil cytométrique ne peut être établie. Quelques plantules contenant de nombreuses populations de noyaux à différentes teneurs en ADN ont une croissance et un phénotype tout à fait normaux. L'anormalité est bien présente mais, dans nos conditions de culture *in vitro*, elle n'est pas apparente.

La majorité des plantes anormales sont chimériques. Elles présentent plus que les deux pics typiques (~90% de cellules 4N et ~10% de cellules 8N) des témoins non régénérés. Un certain nombre sont des chimères sectorielles car, en les multipliant par leurs bourgeons axillaires, on obtient des plantules de phénotypes différents, d'autres sont stables, et donc probablement des chimères péricleinales.

Les nombreuses variations phénotypiques, telles que celles portant sur la couleur et la taille des feuilles, la pilosité et la forme, se retrouvent très majoritairement dans des plantes dont la croissance est également réduite. Ce type d'aberrations chromosomiques provoque donc l'apparition de phénotypes variés, le plus souvent sur plusieurs caractères.

### Régulateurs de croissance, variations somaclonales et taux de régénération

Comme on l'a dit, la plus grande quantité de plantes régénérées est obtenue après deux mois de culture (récolte A) sur le milieu CMS-vitamines enrichi en AIA et en zéatine-riboside. C'est aussi ce milieu encore riche en hormones actives qui donne le taux le plus élevé de plantes non conformes.

Après cinq mois (récolte B), les régulateurs de croissance étant alors déjà passablement inactivés par la lumière, nettement moins de régénérants sont

apparues. Par contre, le taux de plantes apparemment conformes aux plantes non transformées est bien supérieur. Après huit mois et demi (récolte C), seules 15 plantules sont encore apparues et une seule a un profil cytométrique non conforme.

Aucune différence significative n'est apparente entre les plantes non conformes récoltées après deux mois et après cinq mois. On retrouve des profils analogues concernant leur teneur en ADN ainsi que leur caractère chimérique et leur phénotype. Donc, si la concentration en régulateurs de croissance actifs dans le milieu influence le taux de régénération et le taux de plantes variées par rapport aux régénérants conformes, elle ne semble pas influencer le type de variation.

### Valeur agronomique des variations somaclonales

Les plantes présentant des variations somaclonales ont été préconisées comme des sources de nouvelles caractéristiques. Les horticulteurs exploitent très volontiers les mutations, les variations somaclonales et les différents types de chimérisme pour conférer un autre aspect à une espèce ou à une variété. Les plantes ornementales doivent pouvoir être multipliées rapidement par voie végétative et ne doivent satisfaire que les goûts et préférences du client. Leur stabilité et leur survie à plus long terme ne sont souvent pas requises.

La sélection de clones de variants somaclonaux pour la création de nouvelles caractéristiques chez une plante maraîchère a bien entendu aussi été tentée sur la pomme de terre, principalement sur sa tolérance accrue à la salinité et sa résistance au mildiou (*Phytophthora infestans*). Les expériences sur ces derniers critères ont donné des résultats probants (Marconi *et al.*, 2001; Cassells *et al.*, 1991). Cela peut s'expliquer pour les plantes qui sont hyperploïdes, par la présence accrue de copies de gènes donnant à la plante les moyens d'opérer à plus grande échelle les adaptations métaboliques au milieu. Cependant, les plantes aneuploïdes qui ont acquis une caractéristique favorable – dans ces cas, une tolérance à la salinité ou une résistance accrue au mildiou – doivent avoir beaucoup d'autres qualités encore, afin de satisfaire aux exigences de la culture maraîchère. La plupart de ces plantes croissent mal *in vitro* comme en pot. Elles acquièrent, avec la présence d'un nombre accru mais dépareillé de chromosomes, également une série de caractéristiques défavorables.

## Conclusions

- Les variations somaclonales, qui consistent en une teneur non conforme en ADN dans les noyaux des cellules, se manifestent de façon singulière chez chaque plante régénérée. Il existe un très grand nombre de possibilités de distribution des chromosomes lors de ces mitoses inégales de cellules qui vont former un méristème puis régénérer une plante. Ces plantes montrent une grande variété de profils cytométriques et des phénotypes très variés; en outre, des profils semblables ne génèrent pas les mêmes phénotypes.
- Ce type de variation somaclonale qui se manifeste par une teneur non conforme d'ADN dans les noyaux des cellules est une anomalie. Aucun cas d'apparition de populations d'aneuploïdes mieux adaptés n'est connu dans la nature. De plus, en tant qu'aneuploïdes, leur fertilité est compromise. Leur stabilité au cours de multiplications par voie somatique (bourgeons ou tubercules) n'est pas non plus garantie. Pour les hyperploïdes euploïdes, de telles adaptations semblent bien avoir eu lieu, spontanément et naturellement, puisque les variétés de pommes de terre sauvages les plus archaïques sont diploïdes.

## Remerciements

La direction d'Agroscope RAC Changins est vivement remerciée pour avoir autorisé la réalisation de cette étude, ainsi que l'Action COST 843 (SER) pour son appui financier. Nos remerciements s'adressent également au professeur P. Küpfer (Université de Neuchâtel) pour son intérêt porté à ce travail et à tous nos collègues du service de culture *in vitro* d'Agroscope RAC Changins pour leur précieuse collaboration nécessaire au bon déroulement de ce travail. Notre gratitude s'adresse également au professeur Max-Bernhard Schröder (Station de recherches de Geisenheim, D) pour son introduction à la cytométrie de flux, au regretté professeur Alberto Soldati, au professeur Peter Stamp et à Marianne Wettstein pour leur aimable accueil à l'EPFZ pour l'utilisation de leur cytomètre de flux.

## Bibliographie

- Cassels A. C., Deadman M. L., Brown C. A. & Griffin E., 1991. Field resistance to late blight (*Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary) in potato (*Solanum tuberosum* L.) somaclones associated with instability and pleiotropic effects. *Euphytica* **56**, 75-80.
- Lê C. L., 1991. Aspects pratiques de la micropropagation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *Revue suisse Agric.* **23** (6), 357-358.
- Lê C. L., 2001. Factors influencing the *in vitro* regeneration of the commonly grown potato (*S. tuberosum* L.). In: COST 843 – Quality Enhancement of Plant Production through Tissue Culture. Extended Abstracts of Developmental Biology of Regeneration (WG1), 2nd Meeting, Roma, Italy, October 18-20, 2001, 32-33.
- Lê C. L., Nowbuth L., Hédiger S. & Collet G. F., 1997. Régénération *in vitro* de la pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum* L.). *Revue suisse Agric.* **29** (3), 143-150.
- Marconi P., Benavides M. & Caso O. H., 2001. Growth and physiological characterisation of regenerant potato (*Solanum tuberosum*) plants affected by NaCl stress. *New-Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **29**, 45-50.
- Nowbuth L. & Lê C. L., 2004. An important aspect of the somaclonal variations in potato (*S. tuberosum* L.): Aneuploidy. In: COST 843 – Quality Enhancement of Plant Production through Tissue Culture. Extended Abstracts, WG1 Nov. 18-21st, Edit. Ioannis Vlahos, Heraklion, Crete, Greece, 2004.

## Zusammenfassung

### Abweichende Gehalt an DNS als Indikator für somaclonale Variation der Kartoffeln

Kartoffel-Pflanzen – aus Internodien regeneriert – wurden im Flow-Cytometer untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass die Zellkerne der phänotypisch ungleichen Pflanzen einen ungewöhnlichen DNS-Inhalt aufwiesen. Einige Pflanzen mit normalem Aussehen enthielten aber auch in ihren Zellkernen einen abweichenden DNS-Gehalt. Keiner der Regeneranten mit normalem tetraploiden Kern zeigte phänotypische Unterschiede zu mikro-vermehrten nicht regenerierten Pflanzen. Es konnte keine Beziehung festgestellt werden zwischen dem cytométrischen Profiltyp und den beobachteten phänotypischen Abweichungen. Die Regeneranten mit einem abweichenden DNS-Gehalt im Kern stammen aus einer fehlerhaften Kernteilung. Dabei werden die Chromosomen ungleich auf die Tochterzellen verteilt. Dieses Phänomen der ungleichen Mitose führt bei jedem Regeneranten zu unterschiedlichen Chromosomensätzen und damit zu einer grossen Vielfalt der Phänotypen.

## Summary

### Non-conform DNA content as a marker of somaclonal variation in potato

The cytometric investigation of plantlets regenerated from potato internodes revealed that all the phenotypically non-conform plants had in their cells nuclei an abnormal content of DNA. But also a few apparently normal looking regenerants presented such nuclei with aberrant DNA content. None of the regenerants that had normal tetraploid nuclei exhibited phenotypic differences compared to micropropagated, non-regenerated plants. No relation could be established between the type of cytometric profile and the type of the observed phenotypic abnormalities.

The conclusion that could be drawn from these observations is that the regenerants having nuclei with abnormal DNA contents arose from cells which underwent erroneous mitosis. During this event, the duplicated chromosomes were unevenly distributed in each of the daughter cells. This phenomenon of uneven mitosis affects for each regenerant different chromosomes, therefore comes the large diversity of phenotypes.

**Key words:** *in vitro* regeneration, potato (*Solanum tuberosum*), somaclonal variation, aneuploidy.

## Riassunto

### Tenore non conforme in DNA come indicatore di variazione somaclonale nelle patate

L'analisi citometrica di piante di patata rigenerate a partire da internodi ha rivelato che i nuclei delle piante di fenotipo non conforme contenevano un tenore anormale in DNA. Altre piante, in apparenza normali, presentavano pure dei nuclei contenenti un tenore anormale in DNA. Nessun rigenerante a nuclei normalmente tetraploidi mostrava differenze fenotipiche rispetto a delle piante micropropagate non rigenerate. Non è stata stabilita alcuna relazione tra il tipo di profilo citometrico ed il tipo di anomalie fenotipiche osservate.

I rigeneranti possedenti un nucleo con un tenore in DNA non conforme derivano da mitosi erranee. Durante questo fenomeno, i cromosomi duplicati sono ripartiti in maniera ineguale in ognuna delle cellule figlie. Questo fenomeno di mitosi ineguale assegna per ogni rigenerante dei cromosomi diversi, ciò che spiega la grande diversità di fenotipi.