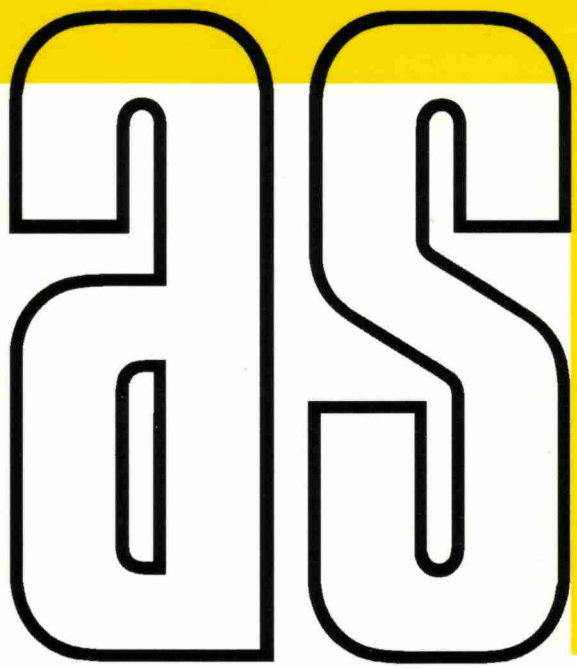
UNIVERSITÉS FRANCOPHONES

Sous la direction de
Emmanuel Picard

BIOTECHNOLOGIES, AMÉLIORATION DES PLANTES ET SÉCURITÉ ALIMENTAIRE



actualité scientifique

AUPELF•UREF

ÉDITIONS ESTEM

Biotechnologies, Amélioration des Plantes et Sécurité Alimentaire

Biotechnologies, Amélioration des Plantes et Sécurité Alimentaire

Coordonnateur
Emmanuel Picard

Actes des 6èmes Jounées Scientifiques du Réseau AUPELF.UREF
« Biotechnologies Végétales : Génie génétique des Plantes »
Université de Paris Sud XI
Centre Universitaire d'Orsay
du 30 juin au 3 juillet 1997

Éditions ESTEM
7 rue Jacquemont
75017 Paris
Tél. : 01 53 06 94 94

Tous les textes des Communications et des Affiches publiés dans ces Actes le sont sous l'entière responsabilité de leurs auteurs.

ISBN 2 84371 030 8
© 1999 Éditions ESTEM
Toute représentation ou reproduction, intégrale ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur, ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite (loi du 11 mars 1957, alinéa 1er de l'article 40). Cette représentation ou reproduction par quelque procédé que ce soit, constituerait une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal.

Les collections « *Universités francophones* » de l'UREF : un instrument vital pour l'évolution de l'espace scientifique francophone.

L'université des réseaux d'expression française (UREF), créée au sein de l'Association des Universités partiellement ou entièrement de langue française (AUPELF), est l'opérateur des Sommets francophones pour l'enseignement supérieur et la recherche.

Dans cette perspective, la collection ***Universités francophones*** que nous avons lancée en 1988 s'affirme aujourd'hui comme l'un des vecteurs essentiels d'une francophonie active et rayonnante.

Plus de 70 titres ont d'ores et déjà été publiés. Ce sont des ouvrages didactiques (manuels), des monographies faisant le point sur la recherche (série *Science en marche*) ou des actes de colloques organisés par les réseaux de l'UREF (série *Actualité scientifique*). Tous s'efforcent de répondre à des besoins identifiés dans des domaines prioritaires : santé, droit, sciences, économie, environnement, aménagement linguistique et sciences humaines. Tous abordent également des thématiques intéressant l'ensemble de la communauté scientifique universitaire. Dans ce but, nous nous efforçons de réunir des équipes de rédacteurs à caractère multilatéral.

Enfin, ce dispositif éditorial serait incomplet sans une politique de prix réaliste, tenant compte des différentes facettes économiques de la communauté francophone. Ainsi, les ouvrages font-ils l'objet d'une tarification préférentielle dans les pays du Sud.

Aux livres de la collection s'ajoutent trois revues de synthèse *(Sécheresse, Santé, Agriculture)* ainsi que des référentiels utilisant les supports les plus modernes de l'édition (cassette vidéo, vidéodisque, disque compact).

Avec ***Universités francophones***, L'AUPELF/UREF contribue efficacement à la circulation de l'information scientifique et technique. Elle apporte sa pierre à l'édification d'une bibliothèque scientifique universelle, dans laquelle la langue française se propose doublement et définitivement comme langue de culture et de science.

Professeur Michel Guillou
Recteur de l'UREF
(Université des réseaux d'expression française)

Sommaire

Les communications orales sont publiées dans l'ordre dans lequel elles ont été délivrées pendant les Journées Scientifiques d'Orsay. Puis sont placés, par section, les textes des affiches invitées qui nous sont parvenus. Enfin, classés par ordre alphabétique du premier auteur, les résumés de toutes les autres affiches sont publiés.

AVANT-PROPOS

ALLOCUTION INAUGURALE, *François GROS*

SECTION A : Apports des biotechnologies, de l'amélioration des plantes et de leur intégration dans des programmes de sélection. Enjeux pour la sécurité alimentaire. Communications orales A1 à A18 1

A1 : La sécurité alimentaire mondiale à l'horizon 2010. *Gérard Azoulay* 3

A2 : Biotechnologies et plantes à multiplication végétative : quelles stratégies ? *Georges Ducreux* 15

A3 : Les biotechnologies végétales : intégration chez le Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), pivot de l'agriculture oasienne. Cas du Maroc. *Ismaïl El Hadrami, Samir El Jaafari et Fouad Daayf* 23

A4 : Apport des biotechnologies à l'amélioration des bananiers. Résultats et perspectives. *Haicour Robert, Bui Trang Viet, Dhed'a Djailo, Bakry Frédéric, Cote François-Xavier* 29

A5 : Impact des travaux d'amélioration génétique et de biotechnologie du CRBP sur les productions de bananiers pour les consommations locales en Afrique de l'Ouest et Afrique Centrale. *Auboiron E., Achard R., Tomekpe K., Noupadja P., Tchango Tchango J.* 37

A6 : Amélioration des plantes à tubercules au Cameroun : cas du macabo *G. Tsala Ndzomo & D. Omokolo Ndoumou* 47

A7 : Les apports récents des biotechnologies pour l'amélioration des caféiers et la valorisation des ressources génétiques. *Hamon S., Anthony F., Barre Ph., Berthaud J, Boursot M., Chabrillange N., Charrier A., Chin-Long Ky., Combes M.C., Couturon E., Cros J, Dussert S., Engelmann F., Lashermes Ph., Le Pierrès D., Louarn J., Noirot M., Récalt C. & Trouslot P.* .. 51

A8 : Les biotechnologies appliquées à l'amélioration génétique et la propagation du Cacaoyer au Mexique. *O. Lopez-Baez, G. Fraire-Vazquez, B. Hernandez-Velasco, F. Holguin-Melendez, J. Cueto-Moreno, D. Crouzillat* 61

A9 : Micropropagation clonale par embryogenèse somatique du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq). Programmes de recherche liés au transfert d'échelle. *Alain Rival, Frédérique Aberlenc-Bertossi, Fabienne Morcillo, James Tregear, Jean Luc Verdeil, Yves Duval, Tristan Durand-Gasselin, Eugène K. Konan et Brou Kouame* 69

A10 : Collaboration internationale pour la maîtrise de la multiplication végétative *in vitro* du Cocotier (*Cocos nucifera* L). *V. Hocher, J-L Verdeil, F. Grosdemange, C. Huet, R. Bourdeix Y-P N'Cho, A Sangare, R. Hornung, H-J Jacobsen, E. Rillo, C. Oropeza et S. Hamon* 79

A11 : Le réseau *Atriplex* ou comment allier biotechnologies et écologie pour une sécurité alimentaire accrue en régions semi-arides et arides. *Kinet Jean-Marie, Benrebiha Fatima, Bouzid Sadok, Lailhacar Sergio et Dutuit Pierre* 89

A12 : Présentation d'un programme international d'amélioration du Blé dur pour le bassin méditerranéen. *M.M. Nachit, E. Picard, P. Monneveux, M. Labhilili, M. Baum, & R. Rivoal* .. 95

A13 : Les pôles régionaux et la recherche partagée en réseau : une stratégie pour intégrer les biotechnologies végétales dans l'amélioration des systèmes de culture au Maroc. *Samir El Jaafari, Mustapha Fagroud, Ismaïl El Hadrami & Emmanuel Picard* 107

A14 : Contribution des biotechnologies végétales à la sécurité alimentaire en zones sahéliennes. *Mme Sidikou Ramatou Djermakoye Seyni* 113

A15 : Les biotechnologies végétales et la sécurité alimentaire en Afrique : Cas des ignames. *Jeanne Zoundjihékpon, Perla Hamon, Jacques Boccon-Gibod et Bakary Tio-Touré* 123

A16 : Les biotechnologies, source de sécurité alimentaire pour demain ? *Sylvie Bonny* 131

A17 : La sécurité alimentaire de l'homme par le végétal et les technologies du vivant. *Pierre Dutuit, Jean Michel Dutuit et Yves Demarly* 143

A18 : Recherche agronomique et chercheur-agronome : quelles réponses face à l'insécurité alimentaire ? *P. Monneveux* 149

A19-A38 : Textes et résumés des Affiches. 157

Textes

A19 : Caractéristiques de production des vitroplants de palmier à huile plantés en Côte d'Ivoire en conditions agro-industrielles. *Konan E.K., Durand-Gasselin T., Cochard B., Rival A. et Kouame B.* 159

A20 : Quelques aspects de la culture du bananier *in vitro* au Vietnam. *Le Thi Ann Hong, Dao Thanh Bang, Nguyen Hang Phuong, Le Kim Hoan, Nguen Thuy An* 163

Résumés

A21 : Sélection et valorisation des microalgues à intérêt alimentaire et industriel. *Belkoura M., A. Benider, M Tahiri, R. Bouterfas et A. Dauta* 168

A22 : Biotechnologie et sécurité alimentaire. Cas de l'*Atriplex halimus* dans la production de viande de camelins et caprins dans la vallée du Drâa (Maroc). *Benchaabane A* 169

A23 : Activités de recherche en biotechnologies pour l'amélioration des céréales. *Benlhabib O.* 170

A24 : Connaissance, caractérisation et amélioration du palmier dattier. *M. Bennaceur, N. Bouguedoura, L. Bouhired. A. Benkhalifa et N. Bounaga* 172

A25 : Biotechnologies et gestion des ressources génétiques des Ignames Africaines. *Le Frère P. Biloa Adzegue* 172

A26 : Apports des Systèmes d'Information à la recherche partagée dans les domaines de l'agriculture et de la gestion de l'environnement : cas du pôle régional de Meknès. *M. Fagroud, A. El Bachiri & S. El Jaafari* 173

A27 : Bilan des 25 dernières années de recherche sur la culture *in vitro* du palmier dattier. Applications et tendances. *Ferry M., Navarro J., Ruiperez E.* 174

A28 : Biotechnologies et amélioration génétique des conifères. *J.-L. Fourré* 175

A29 : Évolution des terres de parcours et bilan fourrager dans les zones arides algériennes. *M. Houmani* 175

A30 : Expérience tunisienne en biodiversité, biotechnologie et bioéthique. *Jemmali A. et Ben Brahim N.* 176

A31 : Pôle régional de recherche et développement agricole pour le bour et la montagne. *Jlibene M., S. El Jaafari, et M. El Mekkaoui* 177

A32 : Contribution de la biotechnologie à l'amélioration du blé au Maroc. *Jlibene M.* 178

A33 : L'Institut de Formation de l'Industrie Meunière de Casablanca. *Z. Larhissi* 178

A34 : L'inoculation du soja : une arme contre la faim pour les pays en développement. *G.R. Mandimba* 180

A35 : Contribution de la culture *in vitro* dans l'amélioration de la production de bananes au Sénégal. *Mbodji Ousmane* 180

A36 : Intégration de l'haplodiploïdisation dans les programmes de sélection du blé et de l'orge à l'EMBRAPA/CNPT. *M.I. Moraes-Fernandes* 181

A37 : Intégration des biotechnologies dans la gestion des écosystèmes fragiles méditerranéens : un exemple de formation en réseau. *A. Ouahbi & S. El Jaafari* 184

A38 : Aspect public de la privatisation des semences. *C. A. Saint-Pierre* 185

SECTION B : Transgenèse : son impact et estimation des risques. Communications orales B1 à B8 187

B1 : Impact de la transformation génétique du colza. *A.M. Chèvre, F. Eber, P. Vallée, J. Pierre et M. Renard* 189

B2 : Impact de colzas transgéniques exprimant des inhibiteurs de protéases sur coléoptères phytophages et sur abeilles. *Lise Jouanin, Michel Bonadé-Bottino, Cécile Girard, Martine Le Métayer, Bruno Zaccomer, Anne-Lorraine Picard Nizou, Jacques Lerin, Minh Ha Pham Delègue.* 199

B3 : Régénération efficace et rapide de plantes transgéniques après transformation d'entre-noeuds de Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.)*via Agrobacterium tumefaciens. A. Beaujean, R.S. Sangwan et B.S. Sangwan-Norreel.* 209

B4 : La transformation génétique des arbres tropicaux fixateurs d'azote de la famille des casuarinacées. *Claudine Franche, Didier Bogusz, Laurent Laplaze et Emile Duhoux.* 217

B5 : Transformation génétique de la Pomme de Terre pour la production de plantes résistantes au PVY. *R. Gargouri-Bouzid, S. Rouis, A. Hassairi, K. Masmoudi et L. Lakhoua.* 223

B6 : Estimation des risques associés aux cultures transgéniques : Outils et contraintes. *Fabrice Pessel, Jane Lecomte, Claire Lavigne, Catherine Laredo, Antoine Messean, Pierre-Henri Gouyon* 229

B7 : Les risques liés à la commercialisation des plantes transgéniques. *Laine E., Haicour R., Menieux JJ.* 239

B8 : Incidence écologique de la diffusion des plantes transgéniques. *André Charrier et Sanou Jacob.* 249

B9-B16 : Textes et résumés des Affiches. 253

Textes

B9 : Vers la création de variétés d'épinard à teneur réduite en nitrate. *Charles G., L. Askouk, S. Leguillon, F. Damiolini, X. G. Xiao, M. Le Roux et M. Branchard* 255

Résumés

B10 : Régénération et transformation par biolistique chez *Digitaria sanguinalis* (L.) scop utilisant la méthode des couches cellulaires minces. *V.L. Bui, M.Y.T. Do, C. Gendy, J. Vidal et K. Tran Thanh Van* 259

B 11 : Transformation génétique de suspensions embryogènes de bananier (*Musa* AAB) par bombardement de particules. *Cote F.X., Legavre T., Grapin A., Valentin B., Monmarson S., Frigout O., Babeau J., D. Bakry, Teisson C.* 260

B12 : Application de la technique biolistique pour la transformation du blé (*Triticum aestivum L.*). *Delporte F., Jacqmin S. et Jacquemin J.-M.* 261

B13 : Définition d'un modèle d'embryogenèse somatique du blé dur (*Triticum durum* Desf.) propice à l'application d'une méthode de transformation génétique. *S. Fernandez et M. Coumans* 262

B14 : Production massive de transgènes OCI de pomme de terre (cv. Kennebec) par le système de transfert *Agrobacterium tumefaciens. Le Van Quy et D. Michaud* 264

B15 : Transformation génétique du tournesol (*Helianthus annuus* l.) par *Agrobacterium tumefaciens* : analyse de différents facteurs. *Molinier Jean* 264

B16 : Ingéniérie de la stérilité-mâle à l'aide d'un gène mitochondrial non-édité. Restauration de la fertilité par la stratégie des ARNm antisens. *Mouras M.* 265

SECTION C : Biotechnologies et sélection pour l'adaptation aux stress biotiques et abiotiques. Communications orales C1 à C5 269

C1 : Variation somaclonale et sélection *in vitro* pour l'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques chez le riz (*Oryza sativa* L.). *Bertin P., Lutts S., Van Sint Jan V., Costa de Macedo C. et Kinet J.-M.* 271

C2 : Apport des marqueurs biochimiques et moléculaires dans l'étude de la structure génétique des palmeraies marocaines. *K. Bendiab, M. Baaziz, K. Majourhat, et N. Mokhlisse.* 277

C3 : Recherche de critères physiologiques pour le tri de plantes tolérantes au sel. *M. Lachâal, C. Abdelly, N. Sleimi, M. Hajji, A. Soltani & C. Grignon.* 283

C4 : Transfert de caractères de résistance au *Verticillium* chez la Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) par fusion interspécifique de protoplastes avec *S. torijense* Hawkes. L. Elmesbahi, *R. Jadari, R.F.I. Gerungan, I. Mussio, O. Ellouz, L. Lakhoua, A. Ambroise, A. Servaes, G. Ducreux, D. Sihachakr.* 291

C5 : Typage moléculaire de variétés tunisiennes de palmier dattier en relation avec la résistance au bayoud. *Trifi Mokhtar, Benslimane Abdel-Ali, Rhouma Abdelmajid, Marrakchi Mohamed & Rode André.* 299

C6-C39 : Textes et résumés des Affiches. 307

Textes

C6 : Développement et utilisation de lignées isogéniques pour l'évaluation du rôle de la glaucescence dans l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le blé. *Latifa Qariani, Mohammed Jlibene & Samir El Jaafari* 309

C7 : Étude de la ségrégation transgressive pour la résistance de l'orge à *Pyrenophora teres. Cherif M. et M. Harrabi* 313

C8 : Évaluation de la résistance à la contrainte hydrique et calorique d'une collection de blé dur: recherche de paramètres précoces de sélection. *Ben Salem M., H. Boussen et Amor Slama..* 316

Résumés

C9 : Application de l'haplodiploïdisation par androgenèse *in vitro* pour l'amélioration de la tolérance aux basses températures chez le riz *(Oryza sativa L.).* Amssa *M. & J.Bouharmont* 326

C10 : Effets du NaCl et du polyéthylène glycol sur des cals de variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) différant par leurs niveaux de résistance aux stress hydrique et salin. *Almansouri M., Bajji M., Kinet J.M. et Lutts S.* 327

C11 : Biotechnologie et protection intégrée à l'égard des virus d'une culture sèche méditerranéenne : le Pois chiche. *Azmeh, K Makkouk, H Kawas* 328

C12 : Effets du stress salin sur la croissance et l'accumulation de solutés inorganiques et organiques chez *Atriplex halimus* L. : étude au niveau des cals cultivés *in vitro* et de plantes en hydroculture. *Bajji M., Lutts S. & Kinet J.-M.* 329

C13 : Sélection *in vitro* et caractérisation de lignées de blé dur (*Triticum durum* Desf.) résistantes à la sécheresse. *Bajji M., Almansouri M., Bouharmont J., Kinet J.-M. & Lutts S..* 329

C14 : Effet d'un stress hydrique sur l'accumulation de Proline, de chlorophylle et des ARNm qui codent pour la glutamine synthétase chez des variétés de blé dur (*Triticum durum*). *A. Belabed, K. Sadki et E. Htahri* 331

C15 : Quelques méthodes traditionnelles simples de lutte contre les attaques de plants en pépinière ou en plantation au Burkina Faso. *E.S. Da et H. Sary* 331

C16 : Impact des antiéthylènes, des antigiberellines et des cytokinines dérivées de la diphénylurée sur la régénération de plantes à partir d'embryons immatures de maïs avant et après la sélection *in vitro* sur ABA. *H. Dieng J. Collin et A. Comeau* 332

C17 : Amélioration génétique de la production de l'orge (*Hordeum Vulgare* L.) en zones semi-arides d'Algérie : sélection pour le rendement, la précocité, la biomasse et l'indice de récolte. *A. Djekoun et H. Bouzerzour* 333

C18 : Réaction des blés marocains (*Triticum spp*) à l'inoculation par des spores et filtrats de culture de quatre groupes de virulence de *Pyrenophora tritici repentis. R. Douimi et M. Jlibene.* 333

C19 : Hérédité des composantes de la résistance partielle à *Septoria tritici* chez le blé (*Triticum aestivum L*). *El Bouami Fouad et Jlibene Mohammed* 334

C20 : Étude des composantes de la résistance partielle de 16 génotypes de blé (*Triticum aestivum L.*) vis-à-vis de 27 isolats de *Septoria tritici. El Bouami Fouad et Jlibene Mohammed* 335

C21 : Sélection *in vitro* pour la résistance à la fusariose de l'épi chez le blé. *Eudes F., Collin J., Roux S. et Comeau A* 335

C22 : Effet de l'application foliaire de IAA et GA_3 et leur interaction sur la croissance du blé (*Triticum durum* Desf. var Leucomilan, AL) en conditions de salinité. *H. Gherroucha et A. Djekoun* 336

C23 : Effet du Biobras-6 sur la régénération *in vitro* chez la canne à sucre sous stress hydrique. *S. Gonzales, G. Ducreux, G. Ernesto et C. Francisco* 337

C24 : Identification et étude de la variabilité des principaux virus du piment en Tunisie. *F. Gorsane, H. Fakhfakh, M. Makni & M. Marrakchi* 337

C25 : Essai de mise au point d'un test précoce *in vitro* pour évaluer la résistance de la pomme de terre au *Verticillium dahliae Kleb. R. Jadari, L. Rossignol, A. Birouk, D. Sihachakr, F. Legrand, H. Chlyah et G. Ducreux.* 338

C26 : Réaction des blés marocains (*Triticum spp*) à l'inoculation par des spores et filtrats de culture de quatre groupes de virulence de *Pyrenophora tritici repentis. Jlibene, M. Douimi R.* 339

C27 : Hérédité de la résistance à *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter (*Septoria tritici* Rob. ex Desm.) chez le blé tendre. *Mazouz Hamid, Saadaoui El Mostfa, Jlibene Mohammed* 339

C28 : Quelques analyses concernant la physiologie des plantes régénérées dans des conditions de sélection *in vitro* chez le blé tendre. *Mihamou AZ, A. Belabed, M. Ibriz, P. Monneveux, E. Picard* 340

C29 : Application des hautes températures comme pression de sélection au cours de l'androgenèse *in vitro* chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.). *Mihamou AZ, E. Picard, A. Belabed, S. El Jaafari* 340

C30 : Composition isotopique du carbone et efficacité d'utilisation de l'eau chez le blé. *Faouzia Mokhtari, Eliane Deleens & Samir EL Jaafari* 341

C31 : Apport des biotechnologies dans l'amélioration de la tomate pour la résistance au flétrissement bactérien. *E. Nsika Mikoko* 342

C32 : Multiplication *in vitro* du macabo et analyse des peroxydases acides dans la recherche des marqueurs de résistance vis-à-vis de *Pythium myriotylum. Omokolo Ndoumou Denis et Tsala Ndzomo Guy* 342

C33 : Évolution des paramètres de stress hydrique du blé suite à la pulvérisation d'huile de lin. *R. Paul, A. Bourhanzour, M. Bennaceur et S. El Jaafari* 343

C34 : Infrastructures simplifiées pour la production de variétés d'agrumes indemnes de maladies de type viral par microgreffage d'apex *in vitro. Rizqi Abdelhak, Nadori El Bachir*..343

C35 : Description des aspects pratiques de production de variétés d'agrumes indemnes de maladies de type viral par microgreffage d'apex *in vitro. Rizqi Abdelhak, Nadori El Bachir, Anejjar Mohamed, Bani Aameur Ouafa* 344

C36 : Amélioration de la vigne par voie biotechnologique : le cas de l'eutypiose. *Roustan Jean-Paul, Dalmayrac Sylvie, Colrat Ségolène, Deswarte Corine, Fallot Jean* 344

C37 : Bases physiologiques d'adaptation des blés oasiens à la sécheresse : ajustement osmotique et photosynthèse. *Sabour Ilham, Samir El Jaafari & Philippe Monneveux* 345

C38 : Proposition d'une méthodologie de l'utilisation de la proline comme critère de sélection variétale et son application dans la recherche d'osmo-inducteurs influençant la réactivité du blé tendre au stress hydrique. *El Houssine Tahri* 346

C39 : Amélioration de l'embryogenèse somatique et de la tolérance à la salinité des plantes régénérées. *I. Zair, A. Chlyah et H. Chlyah* 347

SECTION D : Marquage moléculaire, biodiversité et sélection. Communications orales D1 à D11 ..... **349**

D1 : Qu'avons nous appris en analysant le génome d'*Arabidopsis thaliana ? Michel Delseny* 351

D2 : Utilisation des marqueurs moléculaires RFLP pour la caractérisation de la diversité génétique. *Mina Lalaoui-Kamal et Nour-Eddine Assali* 355

D3 : Applications des marqueurs moléculaires à l'étude de la résistance aux virus de la mosaïque jaune et de la jaunisse nanisante chez l'orge. *Bensalah B., Steyer S., Froidmont F. et Jacquemin J.M.* 361

D4 : Étude de la variabilité d'*Helianthus annuus* sauvages. *H. Serieys, M.C. Quillet, F. Kaan, A. Bervillé.* 373

D5 : L'arganier : un candidat à la domestication. *Fouzia Bani-Aameur* 381

D6 : Structure génétique de l'arganier *Argania spinosa L. Skeels, Abdelhamid El Mousadik* 389

D7 : Analyse de la diversité et des potentialités de fixation d'azote d'une collection locale de *Rhizobium* nodulant le haricot. *R. Mhamdi, M.E., Aouani, M. Jebara, R. Ghrir & M. Mars.*. 403

D8 : La détection des sérotypes de deux potyvirus des légumineuses (cabmv et blcmv) dans des plantes adventices au Togo. *K. et YE Atissime Dibahoma, S., Gumedzoe, M.Y.D., Akpagana, K.* 413

D9 : Utilisation des marqueurs génétiques pour l'identification et l'évaluation de la diversité génétique de l'Olivier (*Olea europaea* L.). *N. Ouazzani, R. Lumaret, P. Villemur.* 421

D10 : Étude de la régulation de la synthèse de l'amidon de maïs à l'aide de la génétique quantitative. *Mamoune Sène, Claudine Thévenot, Agnès Leonardi, Mathilde Causse et Jean-Louis Prioul.* 427

D11 : Biotechnologies et conservation des ressources génétiques à l'IPGRI (Institut international des ressources phytogénétiques). *Florent Engelmann.* 439

D12-D37 : Textes et résumés des Affiches. **445**

Résumés

D12 : Marqueurs isoenzymatiques et structures génotypiques de populations spontanées d'espèces du genre *Medicago. Abdelkefi Abbes, Biborchi Aziz, Boussaid Mohamed et Marrakchi Mohamed.* 447

D13 : Évaluation des péroxydases comme marqueurs de la tolérance à la salinité chez les céréales. Relation avec le calcium. *A. Aouad, M. Baaziz et M. Mergoum* 447

D14 : Variabilité génétique des caractères de la ramification des plantules d'arganier. *F. Bani-Aameur et A. Zahidi* 448

D15 : Identification de cultivars du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par l'amplification aléatoire d'ADN(RAPD). *Ben Abdallah A., Stiti K., Lepoivre Ph., Du Jardin P.* 449

D16 : Aptitude à l'embryogenèse somatique chez le pois : analyse diallèle et contrôle génétique. *M. Bencheikh* 449

D17 : Composition variétale des palmeraies marocaines révélée par méthode isoenzymatique. *Bendiab, K. et M. Baaziz* 450

D18 : Le germoplasme de blé dur en Algérie : son "érosion" et les perspectives de sa réhabilitation. *M. Benlaribi* 450

D19 : Embryogenèse somatique chez *Phoenix dactylifera* L. : effet du cultivar sur la composition phénolique et le brunissement des cals. *M. El Bellaj, A. El Idrissi-Tourane et I. El Hadrami* 451

D20 : Étude comparative d'hybrides interspécifiques issus de croisements entre quatre espèces d'Aegilops et des blés cultivés (*Triticum aestivum, T. durum*). *O.K. El Khlifi, O. Benlhabib et M. Malki* 452

D21 : Relation virulence et polymorphisme de l'ADN chez *Aschochyta rabiei* parasite du pois chiche (*Cicer arietinum*). *S. Hamza* 453

D22 : Variabilité morphologique chez des descendances maternelles d'*Atriplex halimus*. *Harzallah Hanène* 454

D23 : La collection des espèces végétales à la faculté des sciences agronomique, un exemple original de la conservation *in situ* de la diversité biologique. *A. Hounkpevi* 454

D24 : Variabilité génotypique et analyse biochimique des capacités embryogènes et organogènes des anthères et des embryons immatures chez le Blé. *J'Aiti F., Benlhabib O., Baaziz M. et El Hadrami I.* 456

D25 : Polymorphisme hétérochromatique intervariétal chez le blé dur et chez le blé tendre cultivés en Algérie. *N. Khalfallah et D. Hamouda* 457

D26 : Étude de la diversité allèlique des oméga-gliadines de la zone D, en relation avec les tests de technologie appréciant la valeur d'utilisation du blé tendre (*Triticum aestivum*. L). *D. Khelifi et G. Branlard* 458

D27 : Collecte et évaluation des ressources locales de blé dur pour la tolérance à la sécheresse : Prospections en zones Bour et Oasis marocaines. *Hachouma Lamini, Mohamed El Mekkaoui. Hakima Bahri, Samir El Jaafari* 458

D28 : Étude de la structure du complexe d'espèces des sétaires et de la diversité du millet (*S. italica*) et de son ancêtre sauvage (*S. viridis*) par des marqueurs AFLP. *M. Le Thierry D'Ennequin, O. Panaud, S. Siljak-Yakovlev et A. Sarr* 459

D29 : Étude de la variabilité génétique pour l'aptitude à l'androgenèse dans une collection française de blé dur (*Triticum durum* desf.). *A. Z. Mihamou, E. Picard, A. Belabed, D. Wertheimer* 460

D30 : La réponse *in vitro* de 11 génotypes de blé d'hiver au traitement avec NaCl. *Irina Moraru, Florentina Răducanu, Zglimbea et Romulus Gabriel* 460

D31 : Utilisation de lignées isogéniques en sélection du blé assistée par des marqueurs moléculaires : techniques et approches. *Najimi Bouchra et Samir El Jaafari* 461

D32 : Le rôle de l'organisation génétique du syndrome de domestication au sein du pool primaire du mil (*Pennisetum sp.*). *Poncet Valérie, Robert Thierry, Lamy Françoise et Sarr Aboubakry* 462

D33 : Polymorphisme des accessions de sorgho (*Sorghum bicolor*). *Raies Aly, Nadia Elfendri-Jarraya, Néjib Trigui, Farhat Chibani, Noureddine Chalbi, Habib Kallel* 463

D34 : Caractérisation moléculaire de cals embryogènes de deux cultivars de Palmier dattier, Deglet Nour et Takerboucht en vue de leur exploitation en création variétale. *Saka H.* 463

D35 : Déterminisme génétique de la régénération chez le tournesol. *Sarrafi A.* 464

D36 : Première mise en évidence du déterminisme sexuel chez le palmier dattier. *Siljak-Yakovlev Sonja, Benmalek Samir, Cerbah Malika, Coba de la Pena Teo, Bounaga Nicole, Brown Spencer et Sarr Aboubakry* 465

D37 : Tests aux champs et identification isoenzymatique des plantations d'hybrides d'Eucalyptus (*E. urophylla, E. alba*) dans la forêt d'État de Pasirmayang, Jambi. *Umboh Mij, D Duriadi, Nunung Nurjanah, SA Yani et A Husen* 466

SECTION E : Autres aspects récents des recherches en biotechnologies. Communications orales E1 à E6 467

E1 : Amélioration de la teneur en acides aminés essentiels par manipulation génétique de leur biosynthèse. *Valérie Frankard, Marc Vauterin and Michel Jacobs.* 469

E2 : Étude d'éléments de voies des MAP kinases impliquées dans l'embryogenèse précoce du colza. *Hamal A., Leprince A.-S., Jouannic S., Kreis M. et Y. Henry.* 475

E3 : Introgression du retard à la morphogenèse des glandes à gossypol de la graine de *Gossypium sturtianum* Willis chez la principale espèce de cotonnier cultivé (G. *hirsutum* L.). *Mergeai Guy, Baudoin Jean-Pierre, du Jardin Patrick, Vroh Bi Irié.* 481

E4 : Hybridation interspécifique chez le blé : progrès récents et perspectives d'avenir. *A. Comeau, CA St-Pierre, O. Maës et J. Collin.* 487

E5 : Divers systèmes de régénération nécessaires à l'application des biotechnologies pour l'amélioration de la Patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.).*D. Sihachakr, D. Nzoghé, I. Umboh, J.M. Cavalcante, I. Mussio, A. Servaes, D. Lavergne, G. Ducreux.* 495

E6 : Un modèle d'étude pour la régulation de l'accumulation d'un groupe ubiquitaire de protéines allergènes dans les plantes alimentaires. *Sabine Carpin, Saïd Hamdi, Rudolf Valenta, Françoise Schoentgen, Jean Claude Chénieux et Marc Rideau.* 507

E7-E45 : Textes et résumés des Affiches. 511

Textes

E7 : Relation entre l'activité spécifique des enzymes et la digestion de la paroi pour l'obtention de protoplastes de *Prunus cerasus* L. « Montmorency ». *Mehri-Kamoun Raoudha, Lepoivre Phillipe et Boxus Phillipe* 513

E8 : Utilisation de l'électrofusion de protoplastes pour l'amélioration de la Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *O. Ellouz, L. Lakhoua, R. Jadari, I. Mussio, A. Servaes, A. Ambroise, G. Ducreux, D. Sihachakr* 519

E9 : Production de fruits et d'embryons diploïdes par traitement à l'acide gibberellique des inflorescences non pollinisées du palmier dattier (*Phoenix dactylofera* l.). *A. Ben Abdallah, P. Lepoivre et P. Du Jardin* 524

E10 : Caractérisation de la capacité androgénétique de quelques variétés de blé dur d'origine tunisienne. *Slim Amara H., A. Daaloul, S. Benzaghou et P.Lepoivre* 526

Résumés

E11 : Les capacités de régénération par voie végétative de l'*Albizzia julibrissin.* Influence de la nutrition carbonée sur les phénomènes de callogenèse et d'organogenèse. *Alonso Lopez Alejandro, El Maataoui, M. Espaganac H.* 528

E12 : Exploitation de la transgenèse végétale chez *Arabidopsis thaliana*, une plante modèle, afin d'isoler des gènes d'intérêt pour améliorer les plantes cultivées. *Aubanelle L., Catterou M., Dubois F., Caron D., SangWan RS et Sandwan BS.* 529

E13 : Modifications des niveaux endogènes de cytokinines et régénération de bourgeons chez *Eucalyptus globulus* par l'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* souche 82.139. *Azmi A., Dewitte W., Landré P., Jouanin L. Van Onckelen H. et Chriqui D.* 530

E14 : Analyse des potentialités androgénétiques du pollen de palmier dattier. *Ben Abdallah A & Lepoivre Ph.* 531

E15 : Un exemple de production de molécules à haute valeur ajoutée par des cultures *in vitro* d'organes végétaux : synthèse d'hyoscyamine et de scopolamine chez *Datura innoxia* Mill. *M. Boitel-Conti, J.-C. Laberche, C. Ducrocq, P. Daria et B. Sangwan-Norreel* 532

E16 : Callogenèse et régénération chez le Pois chiche (*Cicer arietinum*). *L. Bouabdallah* 532

E17 : Effet du génotype et du milieu de culture dans la culture d'embryons immatures de blé dur (*Triticum durum* Desf.) et de blé tendre (*Triticum aestivum L.*). *Bouiamrine E., Mzouri K. & Amssa M.* 533

E18 : Intérêt du traçage isotopique pour l'étude, chez l'homme du devenir métabolique des productions végétales : l'exemple du blé dur enrichi en ^{13}C et des pâtes alimentaires.*P. Chargvardieff, M. Pean, S. Le Bras, S. Gaultier, J.-M. Antoine, D. Massicotte et F. Peronnet* 534

E19 : Haplodiploïdisation chez le blé dur (*Triticum turgidum* var *durum*). *H. Chlyah, N. Saidi, S. Cherkaoui, O. Lamsaouri, O. Chlyah, M. Mdarhri-Alaoul, O. Amail et A. Chlyah*..... 535

E20 : Effet à long terme du saccharose exogène sur l'interaction C/N chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) cultivée *in vitro. Dary Sima Boubacar, Van Quy Le et Yves Desjardins*.... 535

E21 : Obtention de plantes chlorophylliennes haploïdes de Blé dur et de Blé tendre par culture de microspores isolées. *De Buyser J. et Picard E.* 536

E22 : Initiation de suspensions cellulaires embryogènes à partir d'explants de bourgeons méristématiques en prolifération chez les bananiers. *D. Dhed'a et R. Haicour*..... 537

E23 : Étude comparative d'hybrides interspécifiques issus de croisements entre quatre espèces d'Aegilops et de blés cultivés (*Triticum aestivum, T. durum*). *O.K. El Khilifi, O. Benlhabib et M. Malki* 537

E24 : Stratégie de sélection par haplodiploïdisation. Cas d'une plante autogame, le piment. *Harzallah Hanène*..... 538

E25 : Régénération des plantes à partir des couches cellulaires minces de riz. *K.O. Hoang, T.B. Le et K. Tran Thanh Van*..... 539

E26 : Stimulation de l'androgenèse *in vitro* par un prétraitement des anthères au début de la phase d'induction. *Liette Laroche, Claude-André St-Pierre, Jean Collin, André Comeau* 540

E 27 : Influence du chlorure de sodium sur le développement de *Retama retam* Forssk (Webb.) *Ighilhariz Z.* 540

E28 : Régulation du métabolisme énergétique et de la signalisation au cours de l'embryogenèse somatique de la patate douce *Ipomea batatas* (l.)] : rôle de la NDPK. *Lavergne D., Nato A., Cavalcante Alves J.M., Sihachakr D., Veron M., Traincart F., Ducreux G.* 541

E29 : Multiplication végétative *in vitro* du sapin de Numidie *Abies numidica. F. Lebtahi et N. Boughedoura*..... 543

E30 : Amplification du palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.) par les voies de l'organogenèse, de l'embryogenèse somatique et de la réversion florale. *R. Masmoudi, B. Meziou, W. Krichen, L. Feki, A. Othmani & N. Drira* 543

E31 : Culture *in vitro* et qualité de l'arôme de la ciboulette (*Allium schœnoprasum l.). Mellouki Fouad, Vannereau Agnès, Cosson Louis* 544

E32 : Déterminisme génétique de quelques molécules caractéristiques du pattern phénolique et leur relation avec la couleur des téguments chez la féverole (*Vicia faba L*) : Leguminosae. *Merghem R, Duc G., Jay M.* 545

E33 : Essai de reproduction asexuée (marcottage) des feuilles de *Bryophyllum pinnatum* (Lam) Oken Crassulaceae. *L. Nancy*..... 546

E34 : Contribution à l'étude d'un module de signalisation associé au processus de l'embryogenèse somatique du blé. *A. Nato, A. Moursalimova, C. Fresneau, M. Mirshahi, D. Lavergne, Y. Henry, G. Ducreux et J. De Buyser* 547

E35 : Effets à long-terme du saccharose exogène sur la croissance, la photosynthèse et le métabolisme du carbone des plantes de tomate *in vitro. Van Quy Le, Guy Samson et Yves Desjardins*..... 549

E36 : Interaction cytosquelette cortical, paroi cellulaire chez les plantes. Contrôle de la division asymétrique de la cellule apicale de *Sphacelaria* (Fucophycée). *Ouichou Aïcha et Georges Ducreux*..... 550

E37 : Régénération intensive du pois (*Pisum sativum* l.) en présence de thidiazuron, *in vitro. Delphine Popiers, Brigitte S. Sangwan-Norreel*..... 551

E38 : Micropropagation de la patate douce (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) à partir du développement de bourgeons axillaires. *I. Robéne-Soustrade, H. Kodja, J. Figier* 551

E39 : Effet de l'apport exogène *in planta* d'acide 2,3,5 triiodobenzoique ou TIBA sur la régénération *in vitro* de Betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.). *Roussy Isabelle, Frédéric Dubois, Rajbir S. Sangwan and Brigitte S. Sangwan-Norreel* 553

E40 : Rôle du 3F-ip (4,4,4 trifluoroisopentenyladenine) et du CPPU (N-(2,chloropyridyl) 4-N' phénylurée)), molécules de synthèse à activité cytokinine, sur l'initiation et la multiplication de protocormes de régénération de *Phalaenopsis*. *Samson Isabelle, Hamama Latifa et Letouze Robert* 553

E41 : L'augmentation du taux de CO_2 atmosphérique permet d'atténuer les effets du déficit hydrique sur la croissance et la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses. *Rachid Serraj et Thomas R. Sinclair* 555

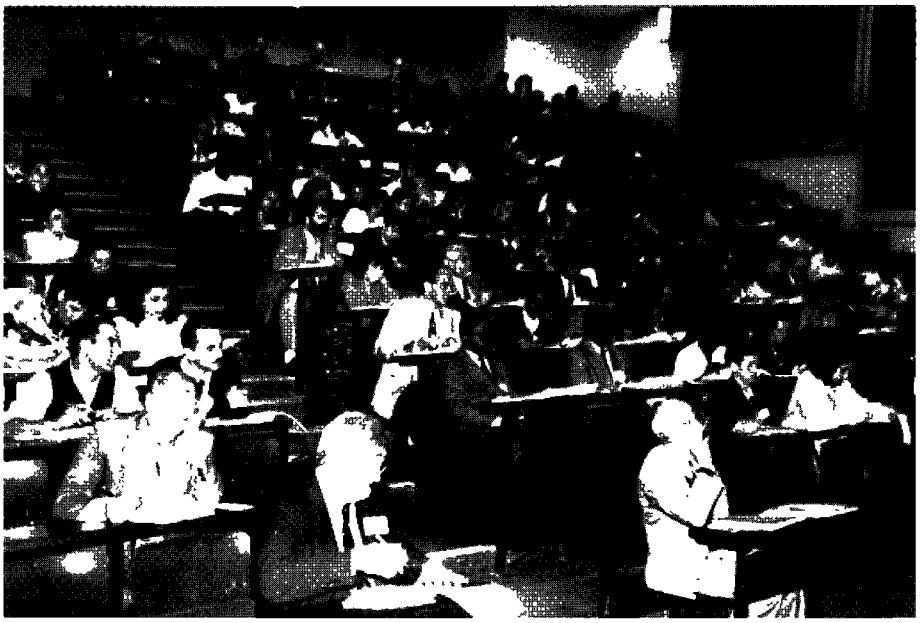
E42 : Gynogenèse *in vitro* du blé dur *Triticum durum* dans le cadre d'une création de tolérance à l'aridité: souches régénérant des plantes vertes. *Sibi M.L., Shekafandeh A.* 556

E43 : Obtention et électrofusion des protoplastes de la canne à sucre. *D. Sihachakr, S. Gonzales et G. Ducreux* 557

E44 : Régénération et caractéristiques agronomiques de vitroplants de triticale (*X-Triticosecale* Wittmack). *Yacoubi-Tej M'barka et Zid Ezzeddine* 557

E45 : Recherches sur les méthodes de sélection *in vitro* pour la tolérance au NaCl chez *Triticum durum. Zair I.* 558

Liste des auteurs **561**



Avant-propos

Suite aux décisions du Comité du Réseau de l'AUPELF.UREF « Biotechnologies Végétales : Génie génétique des Plantes », les 6èmes Journées Scientifiques se sont déroulées au Centre Universitaire d'Orsay (Université de Paris Sud XI) du 30 juin au 3 juillet 1997 sur le thème « Biotechnologies, Amélioration des Plantes et Sécurité Alimentaire ». Le thème de la sécurité alimentaire est immense. Il constitue un véritable défi pour l'humanité et plus particulièrement pour les scientifiques se préoccupant des plantes. Il n'est donc pas étonnant que ces Journées aient mobilisé les forces du réseau. Plus de 300 scientifiques francophones, membres ou non du réseau, se sont inscrits et plus de 230 provenant de 20 pays différents ont pu y assister sans compter les étudiants du centre d'Orsay qui sont venus écouter quelques conférences. Ces pays d'où venaient les congressistes sont l'Algérie, la Belgique, le Brésil, le Burkina-Faso, le Cameroun, le Canada, le Costa-Rica, la Côte d'Ivoire, la France, l'Italie, le Maroc, le Mexique, le Niger, la Mauritanie, la Roumanie, le Sénégal, la Syrie, le Togo, la Tunisie, et le Vietnam. Des collègues du Bénin, du Congo, d'Espagne, de Maurice et du Zaïre qui s'étaient inscrits n'ont pas pu venir, certains en raison des conflits se passant dans leurs pays.

Les travaux ont été ouverts par les allocutions de *M. Alain* ***Gaudemer***, Président de l'Université Paris Sud, de *M.* ***Bretteville***, Directeur de la Recherche à l'AUPELF.UREF, s'exprimant au nom du *Recteur Michel* ***Guillou***, et de *Georges* ***Ducreux***, élu nouveau Coordonnateur du réseau lors de la réunion de reconstitution du réseau du 30 juin. Nous sommes fiers que *M. François* ***Gros***, Secrétaire Perpétuel de l'Académie des Sciences, ait fait parvenir une allocution inaugurale, que malheureusement il n'a pas pu prononcer mais qui est publiée dans ces Actes. De même, notre gratitude va au *Professeur Yves* ***Demarly***, initiateur et coordonnateur du réseau de 1988 à 1996, qui n'a pas pu venir et qui avait fait parvenir un message d'amitié et de soutien au réseau pour ses travaux.

Le **Comité Scientifique** des Journées était composé de MM. les *Professeurs André* ***Charrier*** (ENSAM INRA), *Michel* ***Delseny*** (Univ. Perpignan), *Dominique* ***de Vienne*** (UPS Paris XI), *Georges* ***Ducreux*** (UPS Paris XI), *Florent* ***Engelman*** (IBGRI), *Yves* ***Hervé*** (ENSAR), *Jean-Louis* ***Prioul*** (UPS Paris XI) et *Aboubakry* ***Sarr*** (UPMC PARIS VI). Qu'ils soient tous ici remerciés pour leur travail et leur disponibilité.

Des 51 communications orales, choisies par le Comité Scientifique, et des 130 affiches présentées lors d'une session spéciale, on retiendra la diversité des approches scientifiques mises en œuvre pour améliorer les plantes. Sans dire que le réseau couvre tous les domaines de la science du végétal, force est de reconnaître qu'un grand nombre de secteurs, y compris les plus nouveaux, ont fait l'objet de présentations. Que tous les auteurs soient ici félicités pour la grande qualité de leurs communications.

Les enjeux, pour la sécurité alimentaire, de la génétique végétale et des biotechnologies et de leur intégration dans les programmes de sélection ont été exposés et débattus. On a pu se rendre compte que la recherche ne peut plus se faire de façon isolée et dans un climat de compétition, au détriment de l'échange et de la diversité d'approches. La constitution de grands réseaux transnationaux est l'une des meilleures garanties d'un progrès génétique et de sa diffusion sous forme de semences ou plants plus adaptés aux besoins multiples des communautés humaines. C'est la contribution modeste mais essentielle des chercheurs qui, sans résoudre tous les problèmes immenses de la sécurité alimentaire, font leur métier de sélectionneur dans le cadre de ces réseaux de recherche, intégrant toutes les approches : génétique,

biotechnologies, analyse des ressources génétiques, données évolutives, écologie, utilisateurs. Au cours de ces Journées le rôle non seulement nutritionnel mais aussi culturel, symbolique des plantes a été mis en avant : motivation supplémentaire pour assurer une meilleure gestion des ressources génétiques. Ont été abordés de plus les thèmes suivants : la transgenèse, son impact et l'estimation des risques ; les biotechnologies et l'adaptation aux stress abiotiques et biotiques ; le marquage moléculaire, la biodiversité et la sélection ; certains aspects récents des biotechnologies.

Enfin, la place du chercheur face au problème de la sécurité alimentaire, ne peut plus être uniquement celle d'un spécialiste dans sa tour d'ivoire. Quand il le peut, et s'il accède à un quelconque niveau de responsabilité, il devrait prendre des positions de citoyen, dans toutes les instances où il se trouve, pour aider à la garantie de la sécurité alimentaire.

Les Journées Scientifiques et ces Actes auront été financés principalement par l'AUPELF.UREF et par les frais d'inscription versés par les participants. Cependant, je remercie la *Division de la Recherche* du Centre d'Orsay pour l'aide financière complémentaire qu'elle nous a accordée, le *Comité d'Organisation et d'Accueil* (*Mlle Aïcha Ouichou, Mmes Annick Ambroise, Colette Gaisne, Lydia Largitte, Chantal Legall, Isabelle Mussio et Aline Servaes et MM. Jacques de Buyser, Michel Bethmont, Robert Haïcour, Yves Henry, Bruno Lascaux, Jean-Louis Mabout, Aimé Nato et Dara Sihachakr*), ainsi que *Mme Vergne, Mme Fillère, M Olive* et le *CESFO* pour leur aide.

Ces Actes permettront à chacun, je l'espère, de garder une trace de ce qui fut un moment extrêmement fort de la vie du réseau.

Dr Emmanuel PICARD,
Coordonnateur sortant et organisateur des Journées.

Allocution inaugurale des Journées scientifiques du réseau Biotechnologies : Génie génétique des Plantes Orsay le 1er Juillet 1997

François GROS,

Secrétaire Perpétuel de l'Académie des Sciences

Institut de France, 23 Quai de Conti, 75006 PARIS

Je voudrais, en tout premier lieu, remercier le Professeur Gaudemer qui nous accueille aujourd'hui dans sa grande Université. Je suis particulièrement reconnaissant au Recteur Guillou pour avoir permis l'organisation par l'AUPELF.UREF de ces journées scientifiques consacrées aux Biotechnologies. L'exercice de la langue française en partage et la francophonie ne sont pas que des symboles de reconnaissance mutuelle, de simples signes de ralliement, même si le véhicule d'idées que constitue une langue est singulièrement important en Sciences comme ailleurs, mais ils présupposent des échanges concrets qui s'inscrivent bien dans la dynamique propre à notre temps, non pour faire bloc contre une autre forme de culture ou d'expression, mais pour permettre une véritable solidarité dans l'effort de recherche et un partage franc et utile des connaissances. C'est ce à quoi on assiste aujourd'hui.

Je suis ici à un double titre : *comme représentant de l'Académie et comme biologiste.*

L'Académie des Sciences s'intéresse certes à beaucoup de sujets mais elle porte une attention toute particulière aux problématiques qui sont en rapport avec la Biologie moderne et ses applications. Elle l'a montré depuis quelques années à travers les rapports, colloques et publications qu'elle anime. Plusieurs rapports ont été destinés aux pouvoirs publics : le génie génétique, la brevetabilité du vivant, (et notamment du génome), la thérapie génique, la transgenèse et ses retombées agricoles, la Biodiversité et l'environnement, etc. L'Académie a consacré beaucoup d'efforts à la rénovation de la série biologique de ses comptes rendus.

En tant que biologiste, j'ai depuis plusieurs années, défendu dans toute la mesure de mes moyens, l'essor des Biotechnologies. C'est pourquoi, j'ai applaudi chaleureusement à la présente initiative dont je me permets de féliciter, à nouveau, l'AUPELF.UREF.

Les Biotechnologies appliquées à l'amélioration, à la propagation ou à la transformation du monde végétal, à des fins alimentaires ou non, sont très anciennes. Elles représentent une des activités les plus traditionnellement ancrées dans la gestuelle de l'homme : les Égyptiens connaissaient déjà l'art de faire le pain et de fabriquer des boissons fermentées telles que la bière. Dans un passé proche, par exemple dès le milieu des années 50, sont apparues les premières cultures de cellules végétales, en même temps que l'industrie des antibiotiques et des additifs alimentaires pour l'homme et le bétail connaissait un énorme essor dû à la sélection génétique de souches de micro-organismes à haute performance. C'était là, dans une certaine mesure, le prolongement des anciennes « Industries de fermentation » dont Pasteur et l'Ecole allemande avaient été les pionniers.

La sélection génétique des semences végétales a connu de très gros progrès. Mais deux révolutions techniques ont transformé la Biotechnologie végétale. Citons en premier lieu les techniques de propagation somatique (ou micropropagation végétative *in vitro)* qui ont eu un très gros impact sur la production horticole, sur celle des fruits et des arbres : qu'il s'agisse des ligneux, des palmiers à huile, des cocotiers, etc. Ces techniques

permettent, le plus souvent à partir des méristèmes, de produire, en quelque sorte, des « clones » doués de propriétés phénotypiques définies : pigments, qualité nutritive, robustesse, résistance naturelle aux virus, (lorsque le tissu original est lui-même dépourvu de virus), etc.

La seconde révolution est, bien entendu, liée à l'émergence du génie génétique et aux techniques de transgenèse qui ont débouché sur la production des fameux OGM (organismes génétiquement modifiés).

Comme vous le savez, on peut transférer dans des cellules embryonnaires végétales un ou plusieurs gènes étrangers dont l'expression conférera à la plante une propriété nouvelle spécialement recherchée pour sa valeur améliorante. Jozef Schell et Marc Van Montagu, dans le début des années 80, furent parmi les premiers à réaliser un transfert génétique en tirant parti du caractère singulier de certaines bactéries : l'une, *Agrobacterium tumefaciens*, responsable de la « Galle du Collet », l'autre, *Agrobacterium rhizogenes* responsable d'un « chevelu » racinaire anormal. Ces bactéries sont en effet aptes à transférer normalement une partie de leur matériel génétique dans le noyau des cellules végétales de certaines dicotylédones. Elles doivent cette propriété à la présence de plasmides dénommés, selon le type *d'Agrobacterium, Ti* ou *Ri*. Une partie seulement de ces plasmides –celle qui comporte les oncogènes dans le premier cas ou les gènes de croissance anormale des racines dans le second– est ainsi transférée, de sorte qu'en remplaçant les gènes à effets délétères par des transgènes à phénotype utile, on peut obtenir des populations de cellules végétales embryonnaires comportant un ou plusieurs gène(s) additionnels dans leur noyau. Les cellules transformées sont généralement sélectionnées par un marqueur de résistance et remises en culture en présence d'hormones de croissance facilitant la régénération. Elles reformeront donc une plante entière dite « transgénique » parce qu'ayant acquis artificiellement une information génétique additionnelle. La plupart des plantes de grande culture sont toutefois des monocotylédones réputées « insensibles à *Agrobacterium* ». En fait les japonais sont parvenus depuis peu, à obtenir du riz transgénique grâce à l'action de cette bactérie transformante. Il n'en demeure pas moins que certaines dicotylédones d'intérêt agronomique, comme le coton ou le soja, étant récalcitrantes à l'action *d'Agrobacterium,* on a dû faire appel à d'autres techniques de transfert. La plus communément utilisée consiste en un « bombardement » des cellules avec des particules de tungstène porteuses du gène à introduire, selon une technique dénommée « Biolistique ».

Aujourd'hui, des centaines de génotypes de plantes transgéniques ont ainsi été obtenues. Une bonne vingtaine d'entre elles a été jugée apte à utilisation par les autorités de contrôle américaines ou européennes. En général, les caractères (à déterminisme monogénique) que l'on s'est efforcé de faire exprimer pour améliorer les propriétés agricoles ou horticoles des plantes ainsi « traitées », concernaient la résistance aux herbicides, aux insectes, ou aux stress, la stérilité ainsi que la production de protéines ou d'huiles de qualité.

Mais la maîtrise ainsi acquise de l'extraordinaire usine chimique végétale s'efforce de répondre aussi aux préoccupations du monde industriel moderne. Parmi les améliorations qui pourraient ainsi avoir un grand impact économico-industriel citons :

- La modification des lignines destinées à l'industrie papetière, grâce au transfert de gènes codant pour les enzymes des biosynthèses de ces composés (notamment l'alcool cinnamylique déshydrogénase).
- L'optimisation des plantes oléagineuses destinées à l'industrie en augmentant, par la transgenèse, la production de lipides intéressants pour la lipochimie ou la production de biocarburants (production des acides gras libres utilisés pour les biocombustibles, les biodétergents, les lubrifiants) ;
- La production d'enzymes industrielles, etc.

Citons également –bien que cet objectif semble s'inscrire dans le long terme– l'utilisation de plantes comestibles comportant des antigènes doués de pouvoir vaccinant par voie orale.

Dans le domaine proprement agro-alimentaire, l'une des applications déjà en usage est le contrôle du ramollissement des fruits (tomates présentant une activité de dégradation des pectines extrêmement faible). Ce but est atteint en bloquant les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène. Citons également le contrôle de la coloration des fruits et, d'une manière plus générale, la protection des plantes cultivables.

À ce sujet, il convient de rappeler que près de 15 % des récoltes mondiales sont perdues du fait des déprédations causées par les insectes. Plusieurs transgènes conférant des résistances à ces phytophages ont donc été utilisés, l'exemple le plus connu de ces transgènes étant celui qui code pour l'endotoxine bactérienne de *Bacillus thuringiensis*, protéine douée d'un effet létal prononcé pour la plupart des larves d'insectes. Ce gène d'endotoxine a ainsi été transféré au coton, à la pomme de terre et au maïs. On a également eu recours à des gènes codant pour des inhibiteurs de protéases ou d'amylases.

La résistance aux virus est, elle aussi, objet d'une multitude d'approches assez fructueuses. Citons par exemple celle qui consiste à conférer le gène de la protéine de capside virale, protéine induisant une immunité aux virus à ARN.

D'autres stratégies sont également disponibles, pour la lutte contre les champignons : elles reposent également sur le recours à des gènes de « chitinases » qui dégradent les parois fongiques ou à ceux codant pour des enzymes capables d'activer les ribosomes.

Je voudrais conclure en dégageant trois remarques :

• La première est un constat : actuellement plusieurs millions d'hectares de plantes transgéniques sont cultivées à travers le monde. Environ 40 autorisations de plantes présentant des modifications de caractère agronomique et de caractéristiques alimentaires ont été délivrées, dont 80 % sur le marché américain. Une des questions clé concerne les PED ; les prévisions nous montrent clairement que la croissance démographique concernera largement ces pays. Quel accès auront-ils à ces nouvelles technologies ? Seront-ils clients forcés ? Ou copartenaires ? C'est là, peut-être, une des questions des plus brûlantes.

• La situation du maïs transgénique a soulevé en France de nombreux débats. Le moins qu'on puisse en dire est qu'ils ont révélé un défaut d'information du public, tant en ce qui concerne les immenses potentialités de la transgenèse végétale, que la nature des risques plausibles et des risques imaginaires.

Un article récent paru dans la lettre BIO du CNRS (Avril 1997) fait assez bien le point. On y discute des divers types de risques potentiels liés à la culture du maïs transgénique. Par ailleurs le colloque AUPELF.UREF consacrera une part importante de ses débats au problème de la transgenèse, de son impact et de l'estimation des risques. Parmi les risques qui doivent être pris en compte (et qui d'ailleurs, pour la plupart l'ont été), citons :

- Le transfert par le pollen des transgènes des OGM, vers les espèces adventices (espèces sauvages associées aux cultures), ou vers la microflore du sol.
- La génération d'individus résistants aux insecticides (dans le cas de la résistance aux agents de lutte contre les pyrales) ou aux antibiotiques, ce dernier caractère pouvant être transmis via les chaînes alimentaires.
- l'induction d'allergies, etc.

Il nous semble qu'en l'occurrence la solution ne réside ni dans une décision politique d'interdiction qui serait prise « à l'emporte-pièce » ni, à l'inverse, par une attitude de rejet « en bloc » de toute interrogation d'un public, qui est parfaitement fondée, de savoir ce qu'il en est ! Les OGM représentent une formidable avancée scientifique. Elles auront à

coup sûr, un impact considérable sur l'agriculture de demain. Mais des recherches fondamentales –de nature physiologique, biochimique et écologique– sont souhaitables afin de pouvoir répondre aux interrogations qui se font jour.

• Enfin, si dans ce colloque, l'accent est mis sur les Biotechnologies dérivées du génie génétique, n'oublions pas pour autant que ces mêmes biotechnologies ont d'autres « composantes » stratégiques extrêmement variées, que celles-ci soient cellulaires, enzymologiques, biophysiques ou autres.

Encore une fois, merci aux organisateurs et bonne chance aux participants !

SECTION A

Apports des biotechnologies, de l'amélioration des plantes et de leur intégration dans des programmes de sélection.

Enjeux pour la sécurité alimentaire.

Communications orales A1 à A18

A1 : La sécurité alimentaire mondiale à l'horizon 2010

AZOULAY G.
Faculté Jean Monnet, Université Paris Sud, 91405 ORSAY Cedex

La question de la capacité de la planète à nourrir ses habitants a retrouvé, à l'occasion du Sommet Mondial de l'Alimentation en 1996, une actualité nouvelle. De nouvelles inquiétudes sont apparues quant aux évolutions futures de l'offre et de la demande alimentaires mondiales dans le contexte de libéralisation croissante des échanges et de réduction de la fonction de régulation de l'État.

La question est aujourd'hui de penser les scénarios possibles d'évolution de la sécurité alimentaire mondiale à l'horizon 2010 et les formes d'organisation de l'économie mondiale agricole. Quel type de scénario va se mettre en place dans le cadre du processus de globalisation pour parvenir à répondre aux besoins alimentaires et nutritionnels de tous les habitants de la planète?

L'exceptionnel développement de la production de biens alimentaires qu'a connu le monde dans les 50 dernières années n'a pas mis fin au problème de la faim. La planète continue de ne pas nourrir tous ses habitants : 800 millions de personnes situées essentiellement en Afrique et en Asie souffrent de sous-alimentation (FAO, 1995).

La malnutrition et la famine ont longtemps été expliquées par une cause majeure unique, les problèmes de la production. L'accès aux biens alimentaires (Eischer, 1987) est progressivement devenu prépondérant dans la réflexion. « La vraie question n'est pas la disponibilité totale de nourriture mais son accès par les individus et les familles. Si une personne manque des moyens pour acquérir la nourriture, la présence de nourriture sur les marchés n'est pas d'une grande consolation » (Sen, Dreze 1990). Le concept de sécurité alimentaire s'analyse à différents niveaux ; mondial, régional, national, ménages, individu (Azoulay, Dillon, 1993). L'objectif final de la sécurité alimentaire est « d'assurer en tout temps et à tous les hommes l'accès matériel et économique aux aliments de base dont ils ont besoin ». Cette dimension « accès » du concept renvoie à la pauvreté. Les questions de répartition des ressources et d'emploi sont centrales tant au niveau national que mondial.

L'aggravation des déséquilibres dans la répartition des ressources à l'échelle de la planète est tel, qu'en 1994, 20 % de la population concentrait 85 % de la richesse mondiale. Les 20 % les plus pauvres ne disposaient que de 1,4 % de cette richesse (PNUD, 1995). Entre 1950 et 1992, le revenu moyen par habitant a triplé mais les 20 % les plus pauvres n'ont guère bénéficié de la mondialisation de l'économie. Leur part représente seulement 1 % des échanges mondiaux et à peine 0,2 % des crédits internationaux. Sur le plan nutritionnel, ces déséquilibres se traduisent par des écarts considérables des disponibilités énergétiques alimentaires (traduction en termes caloriques des disponibilités quantitatives par habitant) dans les différentes parties du monde (3600 calories aux USA contre 2200 en Inde).

DU CONSTAT AUX MODÈLES PROSPECTIFS GLOBAUX

Les analyses prospectives sur la sécurité alimentaire mondiale à l'horizon 2010-2020 font apparaître une double perspective :

- L'économie mondiale sera certainement en mesure de satisfaire la demande de la planète.
- Une large partie de la population mondiale ne parviendra pas à satisfaire ses besoins nutritionnels à des niveaux adéquats. L'Asie du sud et l'Afrique subsaharienne affronteront des déficits alimentaires résultant d'un développement sensible de la pauvreté.

Une vision prospective de la sécurité alimentaire mondiale repose, entre autres éléments, sur des anticipations sur la croissance de la population, des disponibilités énergétiques et des rendements.

La croissance démographique compromet-elle la sécurité alimentaire mondiale ?

La population mondiale a évolué de 2,7 milliards d'habitants en 1950 à 5,4 en 1990, soit un doublement en 40 ans. Le taux de croissance démographique global est passé d'un maximum de 2,1 % en 1965-1970 à 1,6 % en 1995 et devrait continuer de décroître à 1,3 % en 2005-2010 et 1 % en 2025. Avec une hypothèse moyenne de croissance, l'ONU estime qu'un nouveau doublement sera constaté en 2050 avec 10,8 milliards (7 milliards en 2010). Plus de la moitié de cette progression est inéluctable et résulte du rajeunissement passé de la structure par âge (Collomb, 1994).

D'ici l'an 2010, 94 % de la croissance de la population se produira dans les pays en développement. Ces projections dépendent de l'hypothèse de généralisation à l'ensemble du monde du type de fécondité rencontré dans les pays industrialisés. Elles dépendent du comportement des populations les plus fécondes, en particulier des populations africaines. L'Afrique comptera environ 900 millions d'habitants en l'an 2010. Le taux de croissance a été ramené de 3,2 à 2,9 % par les dernières études (ONU, 1994). Une baisse de la fécondité est actuellement constatée. Cette baisse ralentirait la croissance démographique qui, aujourd'hui, conduit à un doublement de la population en 24 ans. Le taux de fécondité est de 6,4 enfants par femme contre 3,8 pour l'ensemble des PVD. Certains pays (Ghana, Guinée, Sénégal, Cameroun, Côte d'Ivoire, République Centrafricaine, Kenya, Botswana) connaissent une baisse de la fécondité d'un enfant par femme en dix ans, au moins dans les villes. Dans les villes, un effet retard apparaît avec l'allongement de la scolarisation des filles, au moment du mariage et au moment du premier enfant.

Faiblesse et vulnérabilité de la croissance des disponibilités énergétiques dans les pays à faible revenu et à déficit vivrier

Le seuil exprimé en nombre de calories/jour nécessaire à une alimentation satisfaisante doit être de 1,55 fois le métabolisme de base. En deçà, les individus sont considérés comme souffrant de sous-alimentation chronique[1]. En 1960, les disponibilités alimentaires par habitant (DAH) étaient très inégalement réparties (3030 calories pour les pays développés et 1960 pour les PVD, soit 2300 en moyenne). La moitié de la population mondiale et trois quarts de la population des PVD disposaient de 1835

[1] La sous-alimentation chronique est définie comme un apport énergétique alimentaire insuffisant, en moyenne annuelle, pour maintenir le poids corporel et permettre une activité légère.

calories en moyenne, niveau à peine supérieur à la sous-alimentation chronique. L'écart entre PD et PVD s'est maintenu à 1000 calories-jour en 1970. L'incidence de la malnutrition était alors estimée à 900 millions de personnes, soit 35 % de la population des PVD. La décennie 1970 a vu des progrès rapides pour les PVD dans leur ensemble (2135 calories-jour). L'incidence de la malnutrition chronique, exprimée en pourcentage, a reculé dans les années 1980 (20 % contre 35 %), mais le recul est faible compte tenu de la croissance démographique (800 millions de personnes contre 900). Ainsi deux éléments importants caractérisent cette évolution :

- L'existence de disparités importantes dans les évolutions des DAH depuis 1970 (les résultats obtenus par l'Asie et l'importance de sa population entraînait l'indicateur d'ensemble, tandis que l'Afrique et l'Amérique latine ne progressaient pas ou très faiblement).
- La stabilité des progrès accomplis n'a pas été assurée dans beaucoup de PVD. Ces pays connaissent une grande vulnérabilité des résultats obtenus, contrairement aux pays industrialisés qui maintiennent ou accentuent de façon régulière les progrès obtenus.

La croissance des gains de productivité atteint-elle certaines limites ?

Le taux de croissance de la production agricole mondiale subit une tendance de long terme au ralentissement ; 3 % dans la décennie 1960, 2,3 % dans les années 1970 et 2 % entre 1980-1992.

Le ralentissement de la croissance peut être analysé de différentes façons ; il peut être perçu comme le signe inquiétant de l'existence de barrières dans la croissance des gains de productivité (baisse des innovations, érosion des sols, pollution atmosphérique, épuisement des nappes, salinité des terres irriguées, etc.). Il peut être aussi perçu comme le signe d'une évolution positive de la démographie mondiale, le niveau de consommation alimentaire par habitant atteignant pour une part de plus en plus grande de la population un seuil à partir duquel les augmentations de revenu ne se traduisent pas par une croissance de la demande.

Les terres potentiellement aptes à la culture représentent environ 70 % du total des terres. Mais des contraintes, variables selon les régions, limitent la capacité potentielle d'extension des superficies. L'Afrique subsaharienne représente à elle seule 44 % des réserves de terre aptes à une production pluviale et non encore exploitées. Mais, 71 % de ces réserves de terre subissent des contraintes pédologiques ou topographiques (FAO, 1995). Les potentialités d'extension des surfaces existent mais sont donc relativement limitées. Elles sont estimées par la FAO à environ 5 % des réserves, soit 90 millions d'hectares pour l'ensemble des PVD (Chine non comprise).

Au-delà de l'extension des surfaces cultivées, de l'irrigation et des intensités de culture, la croissance des rendements des principales cultures des pays industrialisés ne semble pas devoir être de même ampleur que celle constatée dans le passé. L'ampleur des efforts de recherche et la façon dont ces efforts se répartiront entre cultures et entre zones de la planète détermineront le niveau et la répartition des gains de productivité futurs.

Les modèles prospectifs ne convergent pas

Les modèles du Worldwatch Institute (L. Brown, 1995), du Groupe Consultatif pour la Recherche Agricole Internationale (G. Conway, 1994), de l'Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO, 1995), de l'International Food Policy Research Institute (IFPRI, 1995) et de la Banque Mondiale (Mitchell, Ingco, 1993) ne convergent pas.

Les hypothèses en matière de production et de rendement sont différentes. Le GCRAI fait l'hypothèse de la constance de la tendance au doublement des rendements en 30 ans. Sur les terres déjà cultivées, l'augmentation de la production alimentaire serait suffisante pour satisfaire les besoins globaux, à cause de l'apparition de variétés améliorées par génie génétique capables de rendements accrus et par la croissance de l'utilisation des engrais (30 kg d'azote à l'hectare en Asie, 15 en Amérique du sud, et 4 en Afrique contre 120 à 500 en Europe de l'Ouest et au Japon). L'irrigation a permis en 30 ans le passage de 100 à 170 millions d'hectares cultivés dans les PVD. La croissance des superficies irriguées serait de 60 % essentiellement en Asie (Inde et Chine). La dégradation des terres (2 milliards d'hectares depuis 50 ans, soit 17 % des terres cultivées) est cependant reconnue. L'érosion de l'eau, du vent, la perte des éléments nutritifs, la salinisation, l'acidification, le tassement, la pollution résultant de pratiques agricoles inadaptées comme la disparition des forêts (16 millions d'hectares par an) constituent une limite à la croissance de la productivité.

La FAO fait l'hypothèse d'un taux de croissance de la production agricole mondiale de 1,8 % entre 1995 et 2010. Cela est conforme à la tendance à la décroissance constatée sur le long terme. Cette réduction des rythmes de croissance n'est pas en soi négative, si pour une part de plus en plus grande de la population mondiale les augmentations de revenu ne se traduisent pas par une croissance de la demande. Elle ne l'est que parce que continuent d'exister des zones de niveaux de consommation insuffisants.

Les conclusions du modèle néo malthusien de L. Brown s'écartent des autres modèles. La production mondiale n'est plus capable de croître suffisamment pour satisfaire la demande solvable de biens alimentaires d'une population en expansion. La capacité de charge maximale de la planète est susceptible d'être atteinte par la pression démographique. Le recours au planning familial et au contrôle des naissances plus qu'aux politiques agricoles est alors indispensable. La sécurité alimentaire remplacerait pour la première fois la sécurité militaire dans les priorités des gouvernements.

Les modèles estiment le déficit global de l'offre de céréales entre 160 millions de tonnes (FAO), 200 millions (IFPRI), 210 millions (Banque Mondiale) et 700 millions (CGRAI), ce dernier chiffre incluant 400 millions de tonnes destinés à combler le besoin caché des pauvres. On assisterait, entre 1990 et 2010, à un déplacement de l'incidence majeure de la sous alimentation de l'Asie du sud vers l'Afrique subsaharienne et une faible réduction du nombre de personnes concernées serait constatée (730 millions contre 809).

Dans un tel cadre prospectif, deux scénarios globaux alternatifs sont envisageables :

1. Le maintien et le renforcement durable d'une division internationale du travail agricole issue des structures actuelles de l'économie alimentaire mondiale.
2. Le renforcement significatif de la base de production et la mise en œuvre de véritables stratégies globales de sécurité alimentaire dans les zones ou cette sécurité apparaît la plus menacée.

LE RENFORCEMENT DE LA DIVISION INTERNATIONALE ACTUELLE DU TRAVAIL AGRICOLE

Seul importe, dans ce modèle, le niveau des disponibilités mondiales. Une forme permanente et structurée de division internationale du travail agricole se maintient dans laquelle un petit nombre de pays grands producteurs satisfont les besoins alimentaires d'un nombre élevé de pays déficitaires. Ces pays déficitaires

s'approvisionnent sur le marché mondial et l'aide alimentaire vient combler l'impossibilité de certains d'entre eux de financer leurs importations commerciales.

Les pays industrialisés ont développé leurs productions grâce à des politiques publiques de soutien et ont capté plus des deux tiers du commerce international. La libéralisation des échanges, credo du GATT depuis 1948, n'a pas permis, dans le domaine agricole, l'application du principe des coûts comparatifs. Le libre échange intégral n'aurait pas eu d'autre effet que de faire disparaître, par exemple, l'agriculture de la CEE. La question alimentaire pose à tous les pays le problème politique, social et économique, de la sécurité de leurs approvisionnements, du maintien d'un mode de vie, d'une structure sociale, d'une culture.

La tendance pour les PVD de devenir de grands importateurs s'est constituée en même temps que les grands producteurs accroissaient leurs excédents. Les USA ont accru leur production de 41 % entre 1970 et 1980 et ont exporté 95 des 105 millions de tonnes supplémentaires produites. La CEE développait ses productions de plus de 55 millions de tonnes entre 1970 et 1990 et en exportait 87 %. Les politiques de soutien au secteur agricole ont permis cette croissance. Entre 1980 et 1990, les « équivalents subvention à la production » sont passés de 99 à 176 milliards de dollars pour les pays de l'OCDE, soit une croissance de 7,5 % en moyenne annuelle (OCDE, 1991). Cela correspond à une aide par exploitant de 15 000 dollars et une aide à l'hectare cultivé de 171 dollars.

À l'inverse, la taxation de l'agriculture était la règle en particulier en Afrique. Les besoins liés aux politiques d'industrialisation et au renforcement de l'État ont pénalisé l'agriculture, par la politique des prix ou par la surévaluation des taux de change ou des droits de douane.

Quelques conditions de viabilité de ce scénario

L'intégration de l'agriculture au GATT n'autorise la sécurité alimentaire mondiale que par la croissance de la productivité et la baisse de la natalité. La hausse des revenus et du pouvoir d'achat des pauvres est une condition de viabilité du modèle. Il est nécessaire que la division internationale du travail confère aux pays à déficit la capacité de dégager des revenus susceptibles de permettre l'importation de biens alimentaires (et d'autres biens). Les pays déficitaires doivent alors poursuivre leur spécialisation dans des cultures de rente dont les cours soient stables et/ou dans des productions industrielles dont la composante en travail est élevée. Ces dernières activités se situent souvent au-delà des spécialisations traditionnelles. La sécurité alimentaire au niveau national n'est pas menacée pour les PVD en forte croissance et ayant réussi leur diversification. Mais les spécialisations économiques supposent une réelle stabilité de l'ensemble des courants d'échanges. La stabilité des revenus des matières premières exportées est loin d'être assurée par le jeu du marché, même élargi. Les pays qui ne réussissent pas à se dégager du schéma traditionnel de l'exportation quasi-exclusive de matières premières risquent d'être exclus du modèle.

Les pays exportateurs, quant à eux, sont en mesure de réagir à une croissance de la demande solvable en augmentant leurs productions grâce à des soutiens internes toujours mobilisables et à la réversibilité des mesures de gel des terres. Cette capacité de répondre à la demande est assurée à l'horizon 2010.

En tout état de cause, on se situe dans le cadre d'une conception de la sécurité alimentaire fondée sur l'existence d'un marché mondial unique et homogène. L'accroissement de la demande mondiale serait satisfait par le commerce international. Ce modèle peut difficilement s'appliquer aux plus pauvres des pays ; 75 pays ont vu décroître leur production alimentaire par habitant dans la décennie 1980. Bon nombre,

malgré l'ajustement structurel, ne connaissent pas un processus de diversification et de croissance de leurs revenus à l'exportation.

Les effets de la libéralisation des échanges agricoles sur les Pays les Moins Avancés

L'impact de l'Uruguay Round sur la sécurité alimentaire des pays à déficit peut être fortement déstabilisateur à moyen terme. Les pays importateurs peuvent subir le contrecoup du processus de libéralisation. La réduction des soutiens a provoqué une baisse des excédents, des stocks publics et une hausse des cours mondiaux. L'impact sur la situation des pays déficitaires est négatif par la réduction des disponibilités, le renchérissement des coûts en devises des importations et la réduction de l'aide alimentaire.

Les pays à faible revenu et à déficit vivrier peuvent difficilement dans ce contexte, être incités dans le même temps, par les programmes d'ajustement structurel, à recourir aux importations pour assurer leur sécurité alimentaire, à limiter leurs stocks, à réduire les soutiens internes aux productions vivrières domestiques ou à la fourniture d'intrants. La conséquence de ces incertitudes pour les pays africains déficitaires est un déséquilibre commercial accru. Le risque d'une situation globale temporaire de déficit alimentaire et de hausse significative des prix constitue une hypothèse qui ne peut être exclue, alors que les mesures compensatoires envisagées restent aléatoires.

La marginalisation des pays les plus pauvres dans l'économie mondiale s'accroît. Leur participation au commerce se réduit de moitié dans la valeur des exportations mondiales passant à 0,6 % dans la décennie 1980 et se réduit d'un tiers dans les importations mondiales à moins de 1 %. En même temps, le taux d'ouverture de ces économies décroît de 17 à 14 %. Ces pays conjuguent donc un processus de marginalisation et une dégradation de leur développement humain.

L'instabilité des marchés mondiaux agricoles

Le contexte de globalisation conduit à une instabilité des marchés agricoles. La libéralisation des politiques et des marchés est censée provoquer une réduction des effets déstabilisants par une plus grande égalité dans l'accès aux marchés et l'élargissement de la production qui devrait accroître le nombre d'intervenants (les échanges s'accroissant, les fluctuations des prix doivent diminuer). La réduction de la spéculation et la baisse des coûts de transaction sont attendues de la croissance escomptée de la production. Ces arguments ne sont pas nécessairement vérifiés. Les distorsions sur le commerce international agricole ont été attribuées très largement aux politiques domestiques de soutien à l'agriculture. Mais les interventions des acteurs, grands négociants et spéculateurs, les variations climatiques jouent un rôle considérable.

Ainsi de fortes fluctuations des marchés agricoles s'instaureront probablement autour d'une tendance de baisse des prix à long terme. Les pays gros producteurs fondent alors leurs politiques d'exportation vers les marchés porteurs en gérant l'instabilité constante. La demande non solvable relève de l'aide alimentaire dont les pays producteurs assurent la livraison en tentant de se constituer des zones d'influence.

L'aide alimentaire

L'aide alimentaire joue un rôle déterminant dans ce scénario. Ce rôle est d'abord fonction du maintien des excédents. En 1995, la baisse de la production mondiale consécutive aux décisions du cycle d'Uruguay s'est traduite par une hausse sensible du prix des céréales et une diminution des stocks.

En 1994-1995 les stocks mondiaux de céréales ont atteint leur niveau le plus bas depuis 1981. La hausse des prix liée à cette baisse de la production réduit de 20 % le montant des quantités de céréales disponibles pour l'aide alimentaire cette année. Selon L'USDA, les stocks mondiaux de report ont été à la fin de la campagne 1995-1996 de 232 millions de tonnes contre 295 millions l'année précédente. Cela équivaut à la couverture de 49 jours de consommation, niveau le plus bas jamais enregistré. En 1973, les prix avaient doublé et les stocks mondiaux couvraient alors 55 jours de consommation.

En Afrique subsaharienne, l'impact de telles évolutions si elles devaient perdurer, serait considérable. Entre 1974 et 1994, le volume des importations céréalières a progressé à un taux annuel moyen supérieur à 5 %, passant de 4 à 11 millions de tonnes (18 % de la production domestique en fin de période). L'aide alimentaire a représenté, en moyenne sur la période 1984-1994, environ 40 % du total des importations céréalières. Cette aide a augmenté deux fois plus vite que ces importations.

Avec l'hypothèse d'une constance du revenu mondial, l'objectif de faire passer la ration calorique de 700 millions de pauvres de 1500 à 3000 calories/jour, impliquerait des besoins en aide alimentaire de 400 millions de tonnes. Cela équivaut à 40 milliards de dollars soit 20 fois la valeur de l'aide alimentaire en 1990. Enfin, le débat ancien sur l'efficacité de l'aide alimentaire sur le développement continue de se poser de manière décisive.

En tout état de cause, il ne peut être acquis, à moyen terme, que le recours à l'aide alimentaire et au marché mondial résorbe de manière permanente les manifestations de la faim. La satisfaction des besoins nutritionnels des populations des pays pauvres à déficit impose une toute autre approche en termes de stratégies nationales ou régionales de sécurité alimentaire.

LE RENFORCEMENT DES CAPACITÉS DE PRODUCTION ET D'ACCÈS DANS LES PAYS PAUVRES À DÉFICIT VIVRIER

La globalisation de l'économie peut entraîner des conséquences tout à fait préjudiciables sur l'accès des populations aux denrées alimentaires dans les pays qui ne participent pas à la course à la compétitivité. La sécurité alimentaire mondiale ne peut être seulement considérée du point de vue de la situation de l'offre et de la demande globale. Cette approche découle, on l'a vu, du postulat de l'existence d'un marché mondial unique et homogène. Il convient d'adopter un point de vue plus large, incluant la spécificité de la situation de l'offre et de la demande dans les pays à faible revenu. Dans ces pays, la demande et l'offre de produits alimentaires ne sont pas totalement séparées comme elles le sont dans les sociétés industrialisées. Une large partie de la population vit de l'agriculture et l'offre et la demande ne se distinguent pas clairement pour les petits producteurs. Le niveau de la demande dépend du niveau de revenus essentiellement agricoles. La croissance de l'offre nationale ne constitue cependant pas la condition suffisante pour permettre à tous les ménages d'atteindre la sécurité alimentaire. La question de la répartition des ressources devient alors partie intégrante de l'analyse.

Ce second scénario repose alors sur quelques postulats essentiels. La sécurité alimentaire mondiale résulte de la sécurité alimentaire des pays et des grandes régions du monde. Elle n'en est que la résultante. Le monde ne peut être considéré comme une zone unique, un marché homogène. L'action centrale en faveur de la sécurité alimentaire mondiale porte, dans cette perspective, sur les zones déficitaires et non sur

la capacité des grands exportateurs à couvrir les besoins estimés à l'échelle mondiale. La sécurité alimentaire des pays les plus pauvres ne devrait reposer que marginalement sur le marché mondial (importations commerciales et aide alimentaire) du fait notamment de sa forte instabilité. Les pays pauvres doivent pourvoir à leurs propres besoins alimentaires et la plupart d'entre eux en ont la capacité. L'investissement agricole devrait privilégier, dans les pays déficitaires, les zones elles-mêmes les plus déficitaires et pas seulement les zones les plus productives et les plus prospères. Ainsi, peut se mettre en place un processus de répartition plus équitable des ressources produites, même si le taux de croissance global obtenu n'est pas le plus élevé. Les solutions à moyen et long terme ne peuvent provenir que d'un développement agricole orienté vers les plus pauvres.

Dans une telle perspective, l'enjeu essentiel de la réflexion s'organise autour de quatre axes essentiels :

- La croissance de la production et de la productivité dans le respect des contraintes écologiques (par une « révolution doublement verte »?).
- Le renforcement significatif des stratégies et politiques de sécurité alimentaire.
- Le renforcement de la spécialisation internationale sur la base d'ensembles régionaux.
- La réduction des inégalités sociales internes.

Une « révolution doublement verte » est-elle envisageable ?

La révolution verte est-elle à bout de souffle ? De nombreux éléments ont été avancés dans ce sens, notamment par Lester Brown. Les problèmes qui en ont résulté sont connus : la pollution des eaux par les engrais, le plafonnement des rendements, le déboisement, les effets négatifs des pesticides, un changement de régime hydrique, des modes de production et de consommation exclusivement guidés par des stratégies de marché et non des besoins collectifs et l'accroissement des inégalités. Ce modèle présente des difficultés sérieuses de transposition vers l'Afrique subsaharienne, car ces conditions de réussite n'y sont pas réunies.

Une nouvelle révolution verte incluant les préoccupations d'équité et d'environnement peut-elle être envisagée ? Ce processus est présenté (GCRAI, 1994) comme une révolution plus productive et plus verte dans la mesure ou elle se préoccupe de la conservation des ressources naturelles et de la protection de l'environnement, une transformation de l'agriculture plus équitable et plus durable qui serait orientée vers l'objectif de sécurité alimentaire. La logique de la révolution verte initiale serait renversée car le point de départ serait la demande socio-économique des ménages pauvres. À cette fin, la recherche aurait pour objet de développer la production dans les zones à faible potentiel où se concentre la pauvreté rurale et de favoriser l'intensification dans les zones à haut potentiel tout en conservant les ressources naturelles et en respectant l'environnement.

L'accès aux technologies agricoles par les pays pauvres n'est pas assuré. Le changement technique est aujourd'hui intégré dans un système économique libéralisé et globalisé au niveau mondial. La compétitivité et le marché étant devenus la règle des comportements des acteurs étatiques et privés, certains États (dont les États-Unis) ont insisté pour que la question de la propriété intellectuelle soit traitée dans la négociation d'Uruguay. Les décisions prises renforcent la protection des droits de propriété. La protection par brevet devient donc de plus en plus le moyen de contrôle de l'information et de la compétition industrielle. Dans le domaine des biotechnologies, des réseaux se créent, structurant des pôles de recherche et des entreprises dans un processus de concentration du capital. Les interventions des États

industrialisés consistent alors à soutenir leurs systèmes nationaux d'innovation et à développer la protection de ces systèmes. Les autres États, alors que les systèmes publics de recherche traversent une crise, disposent de moins en moins de moyens d'intervention sur leur propre devenir économique et social. La question de l'accès des pays pauvres aux techniques agricoles retrouve donc une importance décisive. Le démantèlement des systèmes publics d'encadrement, de formation, de vulgarisation intervenu dans le cadre de la privatisation des entreprises publiques aggrave la situation.

Le renforcement significatif des stratégies et politiques de sécurité alimentaire

Atteindre la sécurité alimentaire au niveau national ou régional, c'est atteindre trois objectifs :

- Assurer des disponibilités adéquates de denrées alimentaires par une croissance de la production domestique et le recours au commerce international quand cela est nécessaire et possible. L'aide peut compléter les disponibilités seulement en cas d'urgence.
- Maintenir la stabilité de ces approvisionnements par la réduction des fluctuations de l'offre et des rendements, par une gestion adéquate des stocks nationaux, par le développement d'infrastructures de transport et de systèmes de commercialisation.
- Permettre l'accès par tous les individus aux denrées disponibles. Les politiques de redistribution des revenus, d'emploi et de consommation contribuent à cet objectif.

Aujourd'hui, les politiques de sécurité alimentaire, en particulier en Afrique, s'inscrivent dans la logique macro-économique de l'ajustement structurel. Ces approches de la sécurité alimentaire ont constitué la «dimension sociale» essentielle des politiques d'ajustement et le champ d'intervention prioritaire des mesures d'atténuation pour les groupes vulnérables des effets négatifs des politiques macro-économiques.

Le scénario alternatif remet au cœur du problème de la sécurité alimentaire mondiale les questions de croissance de la production, de productivité, d'emploi, de répartition du revenu. Autrement dit, le concept est reconsidéré dans toutes ses dimensions. À une approche qui privilégie le rôle des importations et de l'aide, on oppose une approche globale en terme de stratégie, condition d'une transformation agricole qui est un préalable à tout développement quel qu'en soit la forme.

Une spécialisation internationale sur la base d'ensembles régionaux

L'intégration régionale et la division régionale du travail en matière agricole et alimentaire constituent des procédures nécessaires en Afrique. Malgré le plan de Lagos de 1980, les résultats des tentatives d'intégration sont limités alors qu'existent plus de 150 organisations intergouvernementales.

Dans une procédure d'intégration régionale, la protection doit être assurée par un tarif extérieur commun établi à un niveau tel qu'il assure la compétitivité des céréales locales en limitant la concurrence des importations et stimule la production régionale de produits de base en permettant la croissance de la productivité. À l'intérieur de la zone, des mesures de libéralisation et la dynamisation du secteur privé assurent la stabilisation des marchés intérieurs.

Dans ce cadre de coopération régionale en matière de développement agricole, la spécialisation des agricultures sur la base des capacités maximales de charge et des coûts les plus bas par unité produite conduit à une répartition nouvelle efficace des cultures à l'échelle de la zone d'intégration.

Un mode nouveau de régulation et de partage du revenu national

Une des conditions de viabilité de ce modèle alternatif est la nécessité pour l'État de retrouver dans les pays à faible revenu et à déficit alimentaire, en particulier en Afrique, ses grandes fonctions de régulation de l'activité économique. Le marché à lui seul ne peut permettre d'atteindre la sécurité alimentaire dans ces pays. Les stratégies de sécurité alimentaire peuvent alors constituer un principe directeur de l'action publique et participer en cela à la réhabilitation du rôle de l'État. Faut-il rappeler que la satisfaction des besoins alimentaires et nutritionnels est, à la fois, l'objectif premier et la condition du développement, quelles qu'en soient ses formes ?

Les griefs faits à l'État en Afrique subsaharienne sont connus. De l'ambition d'être l'acteur essentiel d'une croissance accélérée, l'État se serait progressivement transformé en « État baudruche » à l'origine d'inefficacité et de gaspillage des ressources. Le monétarisme avait mis l'accent sur les échecs de l'intervention de l'État dans la régulation de l'économie. L'État ne trouve plus de place dans l'espace de l'analyse économique et devient étranger à un monde entièrement conçu autour de l'idée d'échanges privés. De là découle le principe du moins d'État, composante essentielle des programmes d'ajustement structurel, l'État étant créateur de distorsions (Friedman, 1962, 1979), de conflits artificiels (Hayek, 1943) dans la sphère des relations marchandes privées généralisées.

Mais les analyses socio-économiques et anthropologiques fondent l'étude de l'État post-colonial africain sur les pratiques traditionnelles du pouvoir. Ces pratiques du pouvoir (à structure patrimoniale) ont été progressivement institutionnalisées après les indépendances et ont abouti à des formes combinées de gestion moderne et traditionnelles. Ces formes incluent des structures juridiques et institutionnelles formelles et le maintien de systèmes d'obligations, de prébendes, de clientélisme qui supposent la captation par des «entrepreneurs politiques» des ressources publiques et leur redistribution selon des réseaux complexes de relations (Bayart, 1989).

L'hypothèse de l'existence d'un marché régulé par l'État n'est plus à démontrer en Asie (Wade, 1990). La gestion par l'État du processus de passage d'une stratégie à une autre et le maintien d'un haut niveau de cohésion sociale interne sont aussi des facteurs importants. Beaucoup de ces conditions n'ont pas été réunies en Afrique.

Pour l'État Africain, la régulation du partage du revenu national et la lutte contre les inégalités sociales découlent d'un renouvellement profond de son rôle. Certains éléments imposés par l'ajustement structurel doivent être remis en cause. Un problème majeur est le choix par l'État d'une stratégie globale, sa poursuite de manière constante et cohérente et sa capacité à la modifier quand l'environnement l'exige. Dans beaucoup de pays, des États autoritaires mais « mous » (au sens de Myrdall, 1969) n'ont pas isolé la gestion de l'économie publique de la recherche de rentes. Peu dÉtats disposent de la cohésion politique et sociale pour s'engager dans un processus de mise en œuvre de politiques de développement autonomes et « fortes » qui tirent avantage des opportunités du marché mondial grâce à une intervention publique aussi importante que nécessaire. Les pays ne disposent pas, en général, des institutions et des procédures qui assurent de manière permanente et fiable l'orientation du système économique et social dans son ensemble, c'est-à-dire la coordination des instruments de gestion de court terme (budget, crédit, prix) avec les activités d'investissement

matériel et humain à moyen et long terme. L'optimisation et la cohérence ne sont pas assurées et un catalogue de projets (quand il existe) relevant de logiques de marché n'assure pas automatiquement une cohérence macro-économique.

Par ailleurs, les processus d'élaboration des stratégies sectorielles ou globales ne prennent pas en compte les préférences individuelles ou collectives des populations. L'État ne peut donc ensuite mobiliser les citoyens dans la mise en œuvre des moyens nécessaires à la recherche d'objectifs qui ne sont ni inspirés, ni même souvent partagés par les citoyens. Les comportements des différents groupes sociaux, leur adhésion à un projet commun, (que ce projet soit national ou plus simplement sectoriel et local) constituent un facteur décisif de la réussite ou de l'échec d'une stratégie de sécurité alimentaire.

CONCLUSION

L'impératif de sécurité alimentaire au niveau mondial comme au niveau national s'impose, mais les moyens de l'atteindre diffèrent.

Le renforcement des capacités de production de biens alimentaires et des capacités d'accès des individus aux biens dans les zones les plus défavorisées constitue un modèle souhaitable. La mise en œuvre de véritables stratégies, stratégies cohérentes et constantes, mobilisant les différents acteurs est une pierre angulaire de ce scénario alternatif. Dans les pays pauvres à déficit alimentaire, en particulier africains, le renforcement de la *recherche* publique, une redéfinition de la nature et du rôle des États, l'intégration régionale constituent des conditions du succès de cette approche. Les capacités de résistance des États, les effets sociaux négatifs de l'ajustement, la paupérisation croissante et le développement de l'informel rendent ce processus à la fois plus difficile et plus nécessaire.

Bibliographie

1. AMIN S. (1988), L'État et la question du développement, Publisud
2. AZOULAY G., DILLON J.-C. (1993), La sécurité alimentaire en Afrique : Manuel d'analyse et d'élaboration des stratégies, Karthala - Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris.
3. Banque Mondiale (1986), Rapport sur le développement dans le Monde
4. BAYART J.-F. (1989), L'État en Afrique, Fayard.
5. CNUCED (1995), Les Pays les Moins Avancés, Rapport 1995, Genève.
6. COLLOMB P. (1994), Démographie et épuisement des ressources naturelles, INED
7. EISCHER C. (1987), Food security for Southern Africa, University of Zimbabwe.
8. FAO (1995), La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture 1994, Rome.
9. FAO (1993, 1995), L'agriculture mondiale à l'horizon 2010 : une étude de la FAO, édité par N. Alexandratos.
10. FAO (1995), Dimension planétaire de l'alimentation, l'agriculture et la sécurité alimentaire ; Texte préparatoire au Sommet Mondial de l'Alimentation
11. FRIEDMAN M. (1962), Capitalisme et liberté, Laffont, 1971.
12. FRIEDMAN M. et R. (1979), La liberté du choix, Belfond, 1980.
13. Groupe Consultatif de la Recherche Agronomique Internationale (1994), Sustainable Agriculture for a Food Secure World, sous la direction de Gordon Conway ; Oversight Committee du GCRAI.
14. HAYEK F. (1943), La route de la servitude, Librairie de Médicis, 1946.

15. International Food Policy Research Institute (1995), A 2020 vision for food, agriculture and the environnement, IFPRI.
16. LESTHAEGHE R. (1989), Social organisation, economic crisis and the future of fertility control in Africa ; Study in Démography, Univ. of California Press ; cité par T. Locoh, Pauvreté et croissance démographique en Afrique ; Vivre autrement ; Mars 1995.
17. LIPTON M. (1977), Why poor people stay poor : a study of the urban bias in world development, London, Temple Smith.
18. MALTHUS T. (1798), Essai sur le principe de population.
19. MITCHELL D.O., INGCO M.D. (1993), The world food outlook, Banque Mondiale.
20. MYRDALL G. (1969), L'État mou dans les pays sous-developpés, Tiers Monde, N°37
21. Nations-Unies (1994), Projections démographiques.
22. OCDE (1991), Tables of Producer Subsidy Equivalents and Consumer Subsidy Equivalents.
23. Programme Alimentaire Mondial (Avril 1995), Flux d'aide alimentaire, Interfais, Rome.
24. Programme des Nations-Unies pour le Développement (1995), Rapport sur le Développement Humain.
25. SEN A., DREZE J. (1990), Hunger and public action, Clarendon Press, Oxford
26. UNICEF (1994), La situation des enfants dans le monde.
27. WADE R. (1990), Governing the market : Economic theory and the role of government in East Asian industrialization, Princeton University Press.
28. Worldwatch Institute (1995), L'état de la planète.

A2 : Biotechnologies et plantes à multiplication végétative : quelles stratégies ?

DUCREUX G.
Laboratoire Morphogenèse Végétale Expérimentale
Université de Paris Sud XI Bât 360 F-91405 - ORSAY Cedex

Si la base de l'alimentation humaine repose sur les céréales, les plantes à multiplication végétative, et plus particulièrement les plantes à tubercules, jouent un rôle clé dans l'alimentation vivrière. Leur mode de propagation a conduit précocement à l'application des techniques de culture *in vitro* dans deux domaines étroitement liés : la multiplication conforme accélérée et l'éradication des agents viraux par culture de méristème. De plus, pour ces plantes dont l'histoire, la structure génétique et/ou la difficulté de maîtriser la reproduction sexuée limitent souvent l'emploi des méthodes de sélection conventionnelles, l'intégration des diverses solutions biotechnologiques dans les programmes d'amélioration n'est plus à justifier.

Si on reprend la comparaison avec les céréales, les particularités des plantes à multiplication végétative sont évidentes. Dans le premier cas, le produit consommé est directement issu de la reproduction sexuée, il est donc clair que la sélection génétique sera privilégiée. Dans le deuxième cas, il s'agit de gérer au mieux des méristèmes préexistants ou disponibles pour une multiplication clonale conduisant à une homogénéité génétique et à une plus grande fragilité vis-à-vis des agents pathogènes.

Il s'y ajoute un contexte agro-économique particulier. Les plantes à multiplication végétative tubérifères sont généralement des plantes vivrières. Leur exploitation est donc soumise à de fortes contraintes locales : utilisation de cultivars traditionnels, petites surfaces, techniques agricoles peu performantes ; autant de particularités qui limitent la commercialisation à grande échelle. Il faut y ajouter la richesse en eau des produits récoltés qui complique la conservation et la régularité de l'approvisionnement.

Ces différents aspects seront illustrés à partir de deux exemples : la pomme de terre et la patate douce, choisis d'une part pour leur importance économique qui les place juste après les céréales (tableau 1) mais aussi pour leur statut respectif (tableau 2). La patate douce est une plante tropicale; la pomme de terre, après une histoire complexe, est produite essentiellement dans l'hémisphère nord et a été introduite récemment en zone tropicale.

L'EXEMPLE DE LA PATATE DOUCE

Il s'agit d'une culture vivrière typique dont les problèmes d'amélioration se posent essentiellement à trois niveaux :

- pratiques agricoles traditionnelles et association avec d'autres cultures vivrières : bananier, haricot, manioc... ne favorisant pas les hauts rendements ;
- choix des cultivars fortement marqué par les habitudes alimentaires locales et favorisant le maintien de variétés inadaptées ;
- très fortes pressions parasitaires, en particulier virales, comme conséquence du mode de multiplication.

Que peut-on proposer comme solutions raisonnables et quel peut être l'apport des biotechnologies?

Tableau 1 : Production mondiale de quelques plantes de grande culture (FAO - 1996).

Plantes	Production (MT)	Surface (Mha)
Céréales		
Blé	584,8	230,2
Maïs	576,8	140.0
Riz	562,3	150,7
Tubercules		
Pomme de terre	294,8	18,3
Manioc	162,9	16,3
Patate douce	134,2	9,2
Igname	33,1	3,2
Taro	5,7	1,0

Tableau 2 : Production par continent de la Patate douce et de la Pomme de terre (FAO – 1996).

Continents	Production (MT)		%	
	Pomme de terre	Patate douce	Pomme de terre	Patate douce
Afrique	7,8	7,4	3,5	5,5
Amérique du Sud	12,1	1,3	5,5	1,0
Océanie	1,4	0,6	0,6	0,4
Asie	85,3	123,7	38,9	92,2
Amérique du Nord	28,2	1,1	12,8	0.8
Europe	84,6	0,06	38,5	0,0
Total	219,4	134,2		

Maintien et évaluation de la diversité génétique

Compte tenu des habitudes alimentaires et de la multiplication clonale, la diversité génétique est certainement importante mais insuffisamment préservée. Il faut donc développer ou initier les collections nationales en s'appuyant sur les technologies disponibles et déjà appliquées à la patate douce : constitution de vitrothèques à partir de matériel sain (cultures de méristèmes), mise en œuvre de la cryoconservation récemment disponible (Blakesley et al., 1995).

Il convient, dans le même temps, d'évaluer comparativement ces génotypes avec pour principaux critères : la précocité, le rendement et les qualités organoleptiques ou favorables à la transformation industrielle. Les ressources génétiques sauvages sont partiellement identifiées et doivent être évaluées en terme de résistance aux pathogènes (Nishiyama et al., 1975 ; Jones et Dukes, 1980).

À plus long terme, l'identification moléculaire de ces matériels permettra une meilleure exploitation de ces collections (Hattori et al., 1985).

La production de matériel de plantation sain

C'est probablement la priorité majeure à l'heure actuelle, les pratiques culturales conduisant à accroître la charge virale, ce qui se traduit, en particulier, par d'importantes pertes de rendement.

À court terme, la culture de méristème, associée à la multiplication végétative *in vitro*, permettent un assainissement simple et rapide du matériel et une amélioration conséquente de la productivité. À titre d'exemple, on peut citer les résultats obtenus avec des variétés chinoises (tableau 3) (Lepoivre et Colinet, 1996).

Tableau 3 : Rendement en tubercules de la Patate douce (poids frais).

Variétés	Site de l'essai	Rendement		
		Kg/parcelle		Augmentation % par rapport au Témoin
		- Virus	+ Virus	
Yanzhishu	Guangshu	23,3	11,6	100.8
Shuzimia	Guangshu	37,8	20,2	87,1
Guangshu 70.9	Guangshu	29,5	25,5	15,6
Kanghanzhong	Guangshu	25,8	21,0	22,8
Zhounong	Guangshu	41,1	30,8	33,4
Guangshu 16	Guangshu	42,9	30,7	39,7

D'après Lepoivre et Colinet, Atelier Régional « Patate douce », Libreville, Janvier 1996

La disponibilité de cultivars assainis et performants exige le maintien et le contrôle de l'état sanitaire mais surtout la mise en place de filières de transfert procurant de façon régulière et répétitive du matériel de plantation sain aux cultivateurs. Il convient également que le coût de ces semences n'obère pas les gains en productivité. Les succès obtenus en ce domaine chez la pomme de terre autorisent à privilégier cette approche.

A plus long terme, la mise en œuvre pratique de l'embryogenèse somatique, disponible chez la patate douce (Cavalcante-Alves et al., 1994 ; Sihachakr et al., 1997) et des études épidémiologiques couplées à l'identification des virus (Colinet et Kummert, 1995 ; Colinet et al., 1994 ; Colinet et al., 1996) devraient encore améliorer la fourniture et une meilleure exploitation du matériel de plantation sain.

Quelles perspectives pour l'amélioration génétique ?

Elles ne sont pas vraiment définies et à envisager à plus long terme l'assainissement du matériel disponible étant prioritaire; de plus l'identification des ressources génétiques disponibles est encore trop partielle. Il faut y ajouter une physiologie de la floraison, encore mal comprise, limitant le succès des croisements. Les résultats prometteurs concernant la régénération des protoplastes, (Sihachakr et Ducreux, 1987 ; Sihachakr et Ducreux, 1993), la maîtrise des étapes de l'embryogenèse somatique (Sihachakr et al., 1997) et la faisabilité de la transformation (Prakash et Varadarajan, 1992 ; Otani et al., 1993) sont autant de contributions à des avancées dans ce domaine.

En conclusion, les possibilités d'amélioration de la patate douce restent directement corrélées à son statut de plante tropicale vivrière à multiplication végétative. Le point clé reste actuellement la fourniture fiable de matériel de plantation sain et la préservation de la variabilité génétique. Les perspectives d'amélioration et de sélection existent compte tenu des avancées récentes, en particulier dans le domaine des biotechnologies, et le gain génétique devrait être important puisque la patate douce a été relativement peu travaillée. Mais cet objectif ne semble pas prioritaire pour les pays concernés qui ont les clés en main.

L'EXEMPLE DE LA POMME DE TERRE

Bien qu'il s'agisse également d'une plante tubérifère à multiplication végétative, le statut de la pomme de terre est complètement différent. D'une part, si elle reste fréquemment une plante vivrière, elle est également exploitée comme plante de grande culture, d'autre part, bien qu'originaire d'Amérique du Sud, la pomme de terre a été adaptée puis améliorée pour les conditions environnementales de l'hémisphère nord. Dans les régions tropicales chaudes la pomme de terre a été importée, voire « imposée », même si la mondialisation des goûts alimentaires en fait un légume de plus en plus prisé, parfois à contresens des habitudes de consommation locales.

La conséquence logique de cette histoire est que la pomme de terre, contrairement à la patate douce précédemment envisagée, n'est pas adaptée aux conditions climatiques tropicales.

Problèmes posés par l'adaptation de la pomme de terre aux régions tropicales

Dans l'état actuel de la sélection, l'obtention de rendements satisfaisants n'est possible qu'en altitude ; les problèmes de la culture en zones tropicales basses sont à plusieurs niveaux :

Agronomiques : les conditions climatiques tropicales ont un effet dépressif sur l'activité photosynthétique et la tubérisation. Il s'y ajoute une faible tolérance à la sécheresse et à la salinité. Ce dernier problème peut être partiellement réglé par l'utilisation judicieuse de l'irrigation et des cultures associées, en particulier pour la production vivrière. Mais la correction des paramètres physiologiques de base ne peut être obtenue qu'à partir d'une amélioration génétique complexe et prenant appui sur les ressources génétiques d'Amérique du Sud plutôt que sur les cultivars actuels qui, dans la majorité des cas, ont été transférés directement de l'hémisphère nord (Spire et Rousselle, 1996 ; Ellisèche, 1996).

Pathologiques : ce sont probablement les problèmes les plus épineux compte tenu de la multitude des attaques parasitaires en condition tropicale et de la multiplication clonale. Ces maladies sont aussi bien d'origine virale, que bactérienne (*Pseudomonas*) que fongique (*Alternaria*) ou encore liées aux nématodes. La pression des insectes vecteurs ou prédateurs amplifie ces effets (Kerlan et al., 1996). Dans ce cas également, en dehors d'une lutte intégrée difficile à mettre en œuvre et peut-être illusoire, la solution passe par une amélioration génétique à long terme prenant effectivement en cause les paramètres spécifiques aux régions tropicales.

La fourniture et la disponibilité de semences saines

Traditionnellement les semences utilisées sont les tubercules de l'année précédente. Cette poursuite sur une longue durée de la multiplication de clones existants a favorisé l'extension des maladies virales; extension amplifiée par l'existence d'insectes vecteurs. Ces pratiques ont conduit à terme, malgré la mise en œuvre d'une sélection sanitaire sévère au champ, à l'élimination de certaines variétés (Ducreux et al., 1986). Il est maintenant bien connu que la solution est venue de la culture *in vitro*. D'abord avec l'« invention » de la culture de méristèmes et de ses conséquences positives sur l'assainissement de la majorité des maladies à virus (Kerlan et al., 1996), puis la mise en œuvre de la multiplication végétative accélérée (Nozeran et al., 1977) couplée ou non à la tubérisation *in vitro* (Charles et al., 1992 ; Charles et al., 1995 ; Désiré et al., 1995 a et b). Si on y ajoute les possibilités récentes de cryoconservation, il existe

désormais tout un ensemble de techniques permettant de gérer au mieux la fourniture renouvelée de semences de plantation saines et performantes.

Si cette approche a donné ses preuves dans l'hémisphère nord, qu'en est-il pour les régions tropicales ?

Dans de trop nombreux cas encore les tubercules de semence sont importés, ce qui se traduit par un coût élevé et/ou des problèmes d'approvisionnement. La solution, à court terme, passe par l'adaptation, en fonction des contraintes agro-économiques locales, de la production *in vitro* de tubercules sains. Les réussites dans ce domaine dans plusieurs pays tropicaux ou sud-méditerranéens attestent de l'efficacité de ces méthodes. De plus, ces techniques ouvrent la voie à la valorisation rapide de nouveaux cultivars issus d'une amélioration génétique prenant en compte la spécificité des conditions tropicales.

Exploitation et problèmes économiques

Jusqu'à une période récente, on peut considérer que la pomme de terre a été utilisée comme un légume d'appoint. La généralisation des pratiques alimentaires dominantes a conduit à un accroissement significatif de la production de pomme de terre en zones tropicales et la demande reste encore insatisfaite. Il convient donc de favoriser une extension des surfaces de culture cantonnées pour l'essentiel actuellement, pour des raisons rappelées plus haut, aux régions en altitude. Dans l'attente d'une amélioration génétique nécessaire, mais forcément à plus long terme, des études pour une meilleure gestion agronomique de la pomme de terre, dans ces conditions climatiques particulières, s'imposent. Il s'y ajoute la mise en œuvre de solutions pour la conservation des tubercules afin de limiter les pertes post-récoltes : élimination exagérée d'eau, attaques parasitaires, prédateurs ; sans parler de questions plus techniques comme l'adaptation de la teneur en matière sèche.

Pour tous ces problèmes, et nous avons vu qu'ils sont nombreux, on peut trouver localement des solutions à court terme ou tout au moins des possibilités d'accroître significativement les rendements. Mais les solutions à long terme sont différentes chez la pomme de terre et la patate douce. Dans ce dernier cas, il s'agit d'une plante vraiment tropicale, les ressources génétiques, sauvages et cultivées, peuvent être disponibles en fonction des programmes, il s'agit plutôt de définir les priorités. Pour la pomme de terre, compte tenu du fait que les variétés cultivées en zones tropicales ont, pour l'essentiel, été transférées de l'hémisphère nord, l'amélioration génétique est le point clé à condition qu'elle prenne en compte les principales contraintes identifiées.

En conclusion, pour revenir au titre de l'intervention « Biotechnologies et plantes à multiplication végétative : quelle stratégies? », quel est le bilan et que pouvons nous proposer ? Pour les deux exemples choisis, les réponses peuvent s'articuler autour de trois questions :

- Que savons-nous faire ? Gérer les méristèmes préexistants afin de préserver les ressources génétiques, assainir les semences et les rendre disponibles en quantité suffisante. Nous avons vu que, dans ces domaines, les techniques de bases de la culture *in vitro* étaient performantes et adaptées.
- Que pouvons-nous faire ? La tentation est de répondre : tout ! Pour ces deux exemples, et plus particulièrement pour la pomme de terre, toutes les biotechnologies dans le domaine cellulaire comme dans le domaine moléculaire sont disponibles. Elles peuvent donc être utilisées comme moyen de franchir les verrous de l'amélioration conventionnelle et d'accélérer le progrès génétique. Le problème réside dans le choix des priorités qui ne sont certainement pas les mêmes pour les régions tropicales.

- Que devons-nous faire ? Prendre en compte, avant tout, les exigences et les contraintes locales, qu'elles résultent des conditions climatiques ou/et du cadre socio-économique. Il ne s'agit plus seulement de mettre à disposition les biotechnologies mais de produire, grâce à leur aide, des cultivars performants, au sens large du terme, pour contribuer à la sécurité alimentaire.

Bibliographie

1. BLAKESLEY D., AL MAZROOEI S. HENSHAW G. (1995), Cryopreservation of tissue of sweet potato (Ipomoea batatas) : the use of sucrose and dehydration for cryoprotection. Plant Cell Reports, 15:259-263.
2. CAVALCANTE ALVES J.-M., SIHACHAKR D., ALLOT M., TIZROUTINE S., MUSSIO I., SERVAES A , DUCREUX G. (1994), Izozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (Ipomoea batatas (L.) Lam.). Plant Cell Reports, 13:437-441.
3. CHARLES G., ROSSIGNOL L., ROSSIGNOL M. (1992), Environmental effects on potato in vitro. J. Plant Physiol., 139:708-713.
4. CHARLES G., ROSSIGNOL L., ROSSIGNOL M. (1995), Mise au point d'un modèle de développement et de tubérisation contrôlés et synchrones chez la pomme de terre. Acta Bot. Gallica, 142:289-300.
5. COLINET D., KUMMERT J. (1993), Identification of a sweet potato feathery mottle virus isolate from China (SPFMV-CH) by the polymerase chain reaction with degenerate primers. J. Virol. Methods, 45:149-159.
6. COLINET D., KUMMERT J., LEPOIVRE P. (1994), Molecular evidence that the whitefly transmitted sweet potato mild mottle virus belongs to a distinct genus of the Potyvirideae. Arch. Vi, 141:125-135.
7. COLINET D., KUMMERT J., LEPOIVRE P. and SEMAL J. (1996), Identification of distinct poty-viruses in mixedly-infected sweet potato by the polymerase chain reaction. Phytopathology, 84:65-69.
8. DÉSIRÉ S., COUILLEROT J.-P., VASSEUR J. (1995a), Dormance et germination des microtubercules de pomme de terre (Solanum tuberosum L.) produits *in vitro* : effets de la concentration en saccharose du milieu de tubérisation, de la durée de conservation à 4°C et d'un traitement avec de l'acide/gibberellique. Acta bot. Gallica, 142:371-378.
9. DÉSIRÉ S., COUILLEROT J.-P., VASSEUR J. (1995b), Germination en serre des microtubercules de Pomme de terre (Solanum tuberosum L.) produits *in vitro* · influence du diamètre, de la densité de plantation et de l'âge des microtubercules sur le rendement. Acta bot. Gallica, 142:379-387.
10. DUCREUX G., ROSSIGNOL L., ROSSIGNOL M. (1986), La pomme de terre. La Recherche, 17:193-203.
11. ELLISECHE D. (1996), Aspects physiologiques de la croissance et du développement. In La pomme de terre ; P. ROUSSELLE, Y. ROBERT et J.-C. CROSNIER, ed. INRA : 71-124
12. HATTORI T., NAKAGAWA T., MAESHIMA M., NAKAMURA K., ASAHIT (1985), Molecular cloning and nucleotide sequence of c DNA for sporamin, the major soluble protein of sweet potato tuberous roots. Plant Mol. Biol., 5:313-320.
13. JONES A., DUKES P.D. (1980), Heritabilities of sweet potato resistance to rootknot caused by Meloidogyne incognita and M. javanica. J. Am. Soc Hortic. Sci., 105:154-156.
14. KERLAN C., PRIOU S., JOUAN B., PASCO C., PRIOR P., SAMSON R., CORBIERE R., TIVOLI B., BEDIN P., DUVAUCHELLE S., ANDRIVON D., ELIMANE R. ET PERRATON B. (1996), Maladies In La pomme de terre ; P. ROUSSELLE, Y. ROBERT et J.-C. CROSNIER, ed. INRA : 231-336.
15. LEPOIVRE P., COLINET D. (1996), Impact of virus diseases in sweet potato in the Guangdong province of China. In Compte Rendus de l'atelier régional patate douce. Libreville, Gabon, 9-13 Janvier 1996, pp. 11-21.
16. NISHIYAMA I., MIYAZI T., SAKAMOTO S. (1975), Evolutionary autoploidy in the sweet potato (Ipomoea batatas (L.) Lam.) and its progenitors. Euphytica, 24:197-208.
17. NOZERAN R., BANCILHON-ROSSIGNOL L., GRENAN S. (1977) Nouvelles possibilités d'obtention et de multiplication rapide de clones sains de pomme de terre (Solanum tuberosum L.). C. R. Acad. Sci. Paris, 285:37-40.

18. OTANI M., MII M., HANDA T., KAMADA H., SHIMADA T. (1993) Transformation of sweet potato (Ipomoea batatas (L.) Lam.) plants by Agrobacterium rhizogenes. Plant Science, 94:151-159.
19. PRAKASH C.S., VARADARAJAN U. (1992), Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. Plant Cell Reports, 11:53-57.
20. SIHACHAKR D., DUCREUX G. (1987), Plant regeneration from protoplast culture of sweet potato (Ipomoea batatas Lam.). Plant Cell Rep., 6: 26-328.
21. SIHACHAKR D., DUCREUX G. (1993), Regeneration of plants from protoplasts of sweet potato (Ipomoea batatas L., Lam.). In Biotechnology in Agriculture and 22. Foretry, 23 Plant protoplasts and genetic engineering. Y.P.S.Bajaj ed. Springer Verlag:45-59.
23. SIHACHAKR D., HAÏCOUR R., CAVALCANTE ALVES J.M., UMBOH I., NZOGUE D., SERVAES A., DUCREUX G. (1997), Plant regeneration in sweet potato (Ipomoea batatas L, Convolvulacées). Euphytica, 96:143-152.
24. SPIRE D., ROUSSELLE P. (1996), Origine socio-historique. In La pomme de terre , P ROUSSELLE, Y. ROBERT, J.-C. CROSNIER, ed. INRA:25-48.

A3 : Les biotechnologies végétales : intégration chez le Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), pivot de l'agriculture oasienne. Cas du Maroc.

EL HADRAMI I.[1]*, EL JAAFARI S.[2], DAAYF F.[1]

[1] Laboratoire de Physiologie Végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences-Semlalia, BP. S15, 40 001 Marrakech-Maroc.

(* pour toute correspondance)

[2] Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences, Meknès-Maroc

LE PALMIER DATTIER : QUELQUES DONNÉES CONCERNANT SON ÉCOLOGIE ET SON IMPORTANCE SOCIO-ÉCONOMIQUE

Le Palmier dattier joue un rôle non négligeable sur la scène socio-économique particulièrement dans les pays du Maghreb. C'est une monocotylédone qui fut dénommée *Phoenix dactylifera* par Linné en 1753. Cette dénomination relève de la forme des fruits, les dattes, qui se présentent sous forme de doigts (*dactylus* en latin). Le dattier fait partie de la famille des *Arecaceae* (*Palmaceae*) qui comprend environ 2600 espèces la plaçant parmi les monocotylédones au 4^{e} rang après les graminées, les liliacées et les orchidées.

Le Palmier dattier occupe des superficies considérables et se trouve représenté par environ 90 millions de plants de par le monde. Sa culture fût introduite dans différentes régions telles que les État-Unis d'Amérique, le Mexique, l'Argentine, l'Australie et l'Espagne. Les Palmeraies les plus importantes sont localisées en Afrique du Nord et au Moyen-Orient et constituent une source de vie pour plus de 10 millions d'habitants.

Phoenix dactylifera est connu comme étant l'arbre du désert qui plonge ses racines dans l'eau en mettant la tête au soleil. En effet, cette espèce pérenne pousse, en général, dans des cuvettes ou des dépressions présentant une nappe phréatique affleurante ou semi-affleurante. La présence de l'eau, entre autres, est primordiale permettant une production moyenne de 15 à 200 kg de dattes par arbre et par an. Cet écart dans la productivité est lié à la culture traditionnelle ou moderne du dattier mais également à la variété cultivée. Au Maroc, la production dattière a connu des facteurs de réduction de 10 en comparant des années sèches et pluvieuses. La datte produite représente le pain des habitants et, depuis longtemps, la clé de la sécurité alimentaire dans les oasis où elle est la base d'une activité commerciale, des échanges et des trocs contre les denrées alimentaires de première nécessité. À titre d'exemple, environ un million d'habitants au Maroc tirent 50 % de leur revenu à partir du dattier. En Tunisie, 10 % de la population dépend de l'agriculture oasienne où la datte occupe une place d'une importance certaine ; et en Algérie, le dattier représente le gagne-pain de près de 2,2 millions d'habitants.

Par ailleurs, le Palmier dattier est une espèce bien adaptée au climat saharien et sub-saharien. Sa présence dans ces zones marginalisées lui confère un rôle écologique

certain. Il limite ainsi l'avancement et l'agrandissement des espaces steppiques ou désertiques connus pour leur biodiversité et leur fragilité. Le dattier contribue également à limiter les dégâts d'ensablement dans ces régions oasiennes, et en jouant un rôle d'écran protecteur contre le rayonnement solaire intense dans ces zones chaudes du globe, il permet l'installation de cultures sous-jacentes diversifiées.

L'IMPORTANCE SOCIO-ÉCONOMIQUE ET ÉCOLOGIQUE DU SECTEUR PHOENICICOLE SERA-T-ELLE MAINTENUE DANS L'AVENIR ? ET QUEL EST OU SERA ALORS LE DEGRÉ D'INTÉGRATION DES OUTILS BIOTECHNOLOGIQUES CHEZ LE DATTIER ?

Le dattier produit une seule fois par an (à l'exception d'un pourcentage plus ou moins négligeable des Palmiers du Niger où une deuxième production atypique survient en Avril-Mai). Ceci conduit les phoeniciculteurs à délaisser le dattier pour d'autres activités et cultures plus rentables. À terme, ce délaissement se traduit par le vieillissement des palmeraies et l'arrêt d'extension de l'aire de culture du système.

Par ailleurs, le dattier fait face actuellement à de nombreux problèmes. C'est le cas notamment de ***(i)*** la sécheresse des années 80 qui, au Maroc, a conduit à l'élimination d'environ 350 000 pieds ; ***(ii)*** l'installation de palmeraies oligo ou monovariétales orientant le marché vers l'exportation (cas de la Tunisie et de l'Algérie où la variété Deglet Nour occupe environ 50 %) et ***(iii)*** de certaines maladies telles que la maladie vasculaire connue sous le non de « bayoud » qui a abaissé, en un siècle, le patrimoine phoenicicole marocain de 15 millions de pieds à 4,25 millions actuellement. Au Maroc, devant cette situation alarmante, un plan de restructuration des palmeraies est lancé depuis 1978. Il a pour objectif, entre autres, de mettre à la disposition des phoeniciculteurs 3 millions de palmiers en 15 à 20 ans et de doubler la production de dattes vers 2007. Cependant les actions actuelles entamées depuis 1987 n'ont enregistré que 15 à 20 % des prévisions. De 1993 à 2007, la demande en vitroplants est estimée à 2,5 millions avec des besoins annuels dépassant les 200 000 plants.

LES MÉTHODES BIOTECHNOLOGIQUES PEUVENT-ELLES RÉPONDRE À CES BESOINS ET CES DÉFIS ?

Deux méthodes de micropropagation du dattier sont en cours de recherche et/ou de développement : l'organogenèse et l'embryogenèse somatique.

L'organogenèse permet d'obtenir des bourgeons et pousses adventives sur les tissus de plusieurs types d'explants (bourgeons axillaires, base de jeunes feuilles de cœurs de rejets, jeunes inflorescences...). Elle peut être directe ou indirecte en passant par un stade cal. L'embryogenèse somatique, quant à elle, appelée encore embryogenèse asexuée, désigne la formation en condition *in vitro* d'embryons à partir d'une ou plusieurs cellules somatiques ou germinales sans fusion gamétique. Les embryons somatiques produits sont, en principe, génétiquement identiques et capables de produire des clones à partir de génotypes donnés. Les explants utilisés sont pratiquement les mêmes que pour la technique d'organogenèse. Les explants provenant de la base de jeunes feuilles de cœurs de rejets ainsi que les inflorescences (Zaid et Tisserat 1983 ; Drira et Benbadis 1985 ; Zaid 1989 ; Ait-Chitt 1989 ; Aissam 1993 ; Bhaskaran et Smith 1992 ; Booij et al. 1993 ; Baaziz et al. 1994 ; El Hadrami 1995 ; El Hadrami et Baaziz 1995 ; El Hadrami et al. 1995) sont cependant les plus utilisés.

Ces deux techniques de micropropagation, l'organogenèse et l'embryogenèse somatique, se trouvent, malheureusement, limitées par de nombreux facteurs (Ait-Chitt 1989 ; Aissam 1993 ; El Hadrami 1995) qui résident essentiellement dans *(a)* la lenteur dans la réactivité des explants (1 à 2 ans pour obtenir des souches bourgeonnantes ou des embryons somatiques), *(b)* les coefficients de multiplication qui restent encore faibles et aléatoires chez certains cultivars actuellement proposés pour la multiplication, *(c)* la récalcitrance de certains cultivars, *(d)* le brunissement des tissus et des milieux qui entravent la multiplication et causent parfois des pertes totales en matériel végétal, *(e)* les pertes de vitroplants à l'acclimatation et en champ, et *(f)* la présence de contaminations endophytiques principalement des *Bacillus* qui causent des pertes considérables en matériel végétal et qui apparaissent à des temps variables allant de la première semaine à quelques mois après la mise en culture. Il a été montré que « l'apparition » tardive des bactéries coïncide avec la chute des teneurs en phénols dans les tissus ; et on assiste, généralement, à une multiplication importante des agents contaminants sur les tissus et les milieux non nécrosés par comparaison aux tissus et milieux qui le sont (El Hadrami 1995). Ainsi, il a été montré que la multiplication de ces *Bacillus* peut être considérablement réduite par l'apport d'antibiotiques ou encore par des composés phénoliques dans les milieux de culture (Cherkaoui 1997).

AU MAROC, QUEL EST L'ÉTAT ACTUEL DE L'INTÉGRATION DE L'OUTIL BIOTECHNOLOGIQUE CHEZ LE PALMIER DATTIER ?

Au Maroc, on note l'utilisation privilégiée de la technique d'organogenèse qui, en principe, permet une certaine authenticité variétale. Ainsi, en terme de multiplication, 140 000 vitroplants issus d'une vingtaine de génotypes marocains ont été produits par cette méthode. Ceci ne représente malheureusement que moins de 15 à 20 % par rapport aux besoins et aux prévisions du programme de réhabilitation des palmeraies au Maroc. *A long terme, n'existe-t-il pas un danger d'érosion génétique progressive du patrimoine phoenicicole en n'utilisant que la seule technique d'organogenèse et en ne proposant à cette technique que les cultivars qui intéressent les phoeniciculteurs?*. Plus de 200 variétés de palmier traditionnellement multipliées ne sont pas encore proposées pour leur multiplication *in vitro*. En terme de transformation génétique du dattier, tout reste à faire. A titre d'exemple, la sélection sur le terrain a mis en évidence la présence de quelques cultivars résistants au « bayoud ». Quels sont les mécanismes biochimiques et moléculaires impliqués dans cette résistance?; quel est ou sont les gènes de résistance ? Et peut-on transférer ce ou ces gènes d'une variété à l'autre et par quelle voie ? Ce ne sont là que quelques questions qui restent encore posées et qui donnent du fil à tordre pour les chercheurs et les améliorateurs de l'espèce.

POURQUOI ACCUSE-T-ON CE RETARD PAR RAPPORT AUX PRÉVISIONS DU PROGRAMME NATIONAL DE RESTITUTION ET RÉHABILITATION DES PALMERAIES MAROCAINES ?

Le retard en ce qui concerne la multiplication et l'amélioration génétique du dattier est en partie lié à l'utilisation de la seule technique d'organogenèse. L'intégration de l'embryogenèse somatique, technique connue pour ses coefficients de multiplication élevés dans les programmes de multiplication et d'amélioration génétique s'impose actuellement plus que jamais pour combler le déficit en vitroplants et, entre autres, élargir et maintenir la biodiversité de l'espèce. Le retard est également lié à la récalcitrance de nombreux cultivars vis-à-vis de la multiplication *in vitro* mais aussi au manque d'infrastructures suffisantes et de compétences humaines sans oublier les

différentes contraintes qui limitent la réussite à grande échelle des techniques de multiplication.

QUE FAUT-IL FAIRE POUR RATTRAPER LE RETARD ET COMBLER LE DÉFICIT EN VITROPLANTS ?

Le Palmier dattier est une espèce pérenne à multiplication lente. Dans tous les pays phoenicicoles et particulièrement au Maroc où une réduction des deux tiers des palmeraies s'est opérée en moins d'un siècle, les programmes de réhabilitation et d'extension de l'aire de culture du dattier ne peuvent aboutir sans le développement d'une recherche multidisciplinaire continue et intensifiée pour lever les contraintes qui entravent sa multiplication *in vitro*. Ils ne peuvent également donner des résultats satisfaisants à moyen terme sans la mise en place d'infrastructures suffisantes (laboratoires spécialisés) et la formation de compétences humaines dans le domaine.

En conclusion, on peut relever que l'application des méthodes biotechnologiques chez le dattier se trouve encore à l'état embryonnaire et particulièrement au Maroc. Les coefficients de multiplication souhaités sont encore loin d'être atteints et tout reste à faire en ce qui concerne les stratégies de transformation pour l'amélioration génétique de cette espèce de grande importance socio-économique. On peut espérer, dans les quelques années à venir, par l'emploi de moyens technologiques et biotechnologiques (variétés mieux adaptées et plus productives, datte à longue durée de conservation, multiplication intensive et extension de l'aire de culture du dattier...) la remise en valeur des oasis où la sécurité alimentaire est étroitement liée au dattier.

Remerciements

Ce travail est réalisé dans le cadre du Fonds Francophone de la Recherche « Jeune Équipe de Recherche associée à l'AUPELF-UREF, JER 3008 » et Bourse de Recherche de l'AUPELF-UREF. Il bénéficie également d'une Bourse de Reherche de la FIS (FIS, D/1937-2).

Bibliographie

1. AISSAM F. (1993), Thèse de 3e cycle, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences-Semlalia, Marrakech-Maroc : 109 p.
2. AIT-CHITT M. (1989), Problèmes rencontrés en culture *in vitro* du Palmier dattier par la technique d'organogenèse. C.R. II Séminaire Maghrébin sur la multiplication rapide du Palmier dattier par les techniques de culture *in vitro*. Marrakech, 9-12 Octobre 1989·27-36.
3. BAAZIZ M., AISSAM F., BRAKEZ Z., BENDIAB K., EL HADRAMI I., CHEIKH R. (1994), Electrophoretic patterns of acid soluble proteins and active isoforms of peroxidase and polyphenoloxidase typifying calli and somatic embryos of two reputed date palm cultivars in Morocco. Euphytica 76:159-168.
4. BHASKARAN S., SMITH R.H. (1992), Somatic embryogenesis from shoot tip and immature inflorescence of *Phoenix dactylifera* cv. barhee. Plant Cell Reports 12:22-25.
5. BOOIJ I., MONFORT S., MACHEIX J.J. (1993), Relationships between peroxidases and budding in date palm tissues cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35:165-171.
6. CHERKAOUI B. (1997), Thèse de 3e cycle, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences-Semlalia, Marrakech-Maroc.

7. DRIRA N., BENBADIS A. (1985), Multiplication végétative du Palmier dattier par réversion en cuture *in vitro* d'ébauches florales de Reds femells. J. Plant Physiol., 119:227-232.
8. EL HADRAMI I. (1995), Thèse d'Etat en Biotechnologie et Physiologie Végétales, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences-Semlalia, Marrakech-Maroc: 227 p.
9. EL HADRAMI I., BAAZIZ M. (1995), Somatic embryogenesis and analysis of peroxidases in *Phoenix dactylifera* L.. Biologia Plantarum 37(2):197-203.
10. EL HADRAMI I., CHEIKH R., BAAZIZ M. (1995), Somatic embryogenesis and plant regeneration from shoot-tip explants in *Phoenix dactylifera* L.. Biologia Plantarum 37(2):205-211.
11. Options Méditerranéennes (1996), Le Palmier dattier dans l'Agriculture d'Oasis des Pays Méditerranéens. Ed. CIHEAM : 260 p.
12. ZAID M. (1989), Thèse d'Université, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, 92 p.
13. ZAID A., TISSERAT B. (1983), *In vitro* shoot tip differenciation in *Phoenix dactylifera* L. Date palm J., 2:163-182.

A4 : Apport des biotechnologies à l'amélioration des bananiers. Résultats et perspectives.

HAICOUR R.[1], BUI TRANG V.[2], DHED'A D.[3], BAKRY F.[4], COTE F.X.[4]

[1] Laboratoire de Morphogenèse végétale expérimentale, Bât 360, Université de Paris Sud XI, 91405 Orsay Cedex. (France)

[2] Laboratoire de Physiologie Végétale, Khoa Sinh, DHTH, Hôchiminh-Ville, Vietnam.

[3] Université de Kisangani Faculté des Sciences C/o Ridja D. Buma, SOTEXKI B.P. 14897 Kinshasa Zaïre

[4] CIRAD-FLHOR, Avenue Val de Montferrand, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

Les plus anciennes références aux bananiers sont écrites en sanscrit et datent de 500 ans avant J.-C. Le Grec ancien consigne la campagne d'Alexandre le Grand en Inde en 327 avant J.-C. et on y mentionne la banane. Pline l'ancien rapporte sur les bananiers (pala) dans son histoire naturelle. Plus tard la banane apparaît tant chez les musulmans que chez les chrétiens comme le fruit défendu du Paradis.

Les bananiers sont cultivés essentiellement pour la consommation de leurs fruits. Cependant les diverses portions de la plante donnent lieu à des utilisations telles que couverture d'abris ou emballage des denrées alimentaires avec les feuilles ou portions de limbes, alimentation du bétail ; confection de flotteurs avec les pseudo troncs ; fourniture de fibres provenant des faisceaux libéro-ligneux des gaines foliaires ; décoration avec les inflorescences ; dégustation sous forme de légume du bourgeon inflorescentiel en phase mâle ; modèles architecturaux pour la décoration de lieux de culte.

Les bananiers et bananiers plantains sont cultivés dans le monde sur les cinq continents, dans près de 120 pays des zones tropicales et subtropicales.

Les productions bananières ont un rôle majeur à différents niveaux : alimentaire (c'est la nourriture de base d'une population estimée à plus de 400 millions d'individus) social et économique ainsi qu'à celui de l'environnement.

La production annuelle a été estimée à plus de 81 millions de tonnes (FAO 1994) dont 36 % issus de l'Amérique Latine, 34 % de l'Afrique et 29 % de l'Asie et pacifique.

On distingue deux grandes filières de production : celle des bananiers en culture pure dont les fruits sont destinés à l'exportation qui représente moins de 10 % de la production totale de bananes et celle des bananiers en polycultures destinés à l'approvisionnement des marchés locaux. Cette production vivrière provient de petites exploitations familiales dans lesquelles les résidus fournissent du paillis et les feuillages assurent une protection pour d'autres plantes telles que haricots, arachides, caféiers.....

DONNÉES BIOSYSTÉMATIQUES

Les bananiers sont des monocotylédones, zingibérales de la famille des musacées appartenant au genre *Musa* section *eumusa* (2n = 22).

Les bananes comestibles sont issues, pour l'essentiel, de deux espèces sauvages diploïdes, *M. acuminata* (génome A) et *M. balbisiana* (génome B). Les plantes de ces deux espèces portent des fruits remplis de graines et se reproduisent aussi bien par voie sexuée que par multiplication végétative à partir des rejets provenant du développement des bourgeons axillaires souterrains portés par un corme. Les processus d'évolution et de domestication ont abouti à la sélection par l'homme de variétés stériles et parthénocarpiques chez lesquelles la pollinisation des fleurs n'est plus nécessaire pour la formation des fruits.

Les variétés actuelles consommées sont, pour la plupart, des clones triploïdes stériles, aspermes, issus tantôt de la seule espèce *M. acuminata* (groupe AAA), tantôt de croisements interspécifiques entre les espèces *M. acuminata* et *M. balbisiana* (groupe AAB et ABB). Il existe plus rarement des variétés diploïdes (AA et AB) et des clones tétraploïdes de nature interspécifique.

UNE CULTURE FRAGILISÉE PAR LES MALADIES ET LES PRÉDATEURS

Les bananiers se comportent comme des herbes géantes et perennes pour lesquelles la rotation de culture avec d'autres végétaux n'est guère pratiquée. D'autres caractéristiques viennent renforcer la vulnérabilité de cette production :

- le mode de propagation végétatif ;
- des cultures industrielles monoclonales. À l'heure actuelle, la totalité de la production des bananiers pour l'exportation provient du seul sous-groupe Cavendish où les cultivars ne diffèrent entre eux que par des mutations. Il ne s'agit au total que d'une dizaine de clones : Lacatan, Valéry, Poyo, Grande Naine et Petite Naine William... distingués par leur taille et quelques caractères associés.

Tous ces cultivars sont difficiles à différencier les uns des autres par les méthodes les plus fines de la biologie moléculaire. Par ailleurs, ils ont sensiblement le même comportement vis-à-vis du complexe parasitaire.

- une extension des maladies à travers le monde ;
- l'apparition de nouvelles races d'agents pathogènes.

Outre une modification des pratiques culturales, l'amélioration des variétés existantes et la création de nouveaux cultivars résistant aux maladies permettraient d'éviter une baisse de productivité, alors que corrélativement, les besoins s'accroissent, ne serait-ce qu'en liaison avec la démographie.

En effet, pour la plupart des affections (maladie de Panama due au *Fusarium oxysporum*, maladie de Moko due au *Pseudomonas solanacearum*, le Bunchy Top dû au virus BBTV), il n'y a pas de traitement chimique fiable. La destruction des plantes atteintes est la seule méthode efficace de contrôle. Pour les autres maladies (prédateurs tels que charançons, nématodes, maladie des raies noires due au *Mycosphaerella fijiensis*...) le coût des traitements chimiques s'accroît d'autant que de nouvelles souches très virulentes apparaissent. Ce coût devient donc prohibitif pour les petits fermiers, les traitements étant parfois même difficile à réaliser du fait de la dispersion des bananiers de case, voire dangereux pour l'environnement. Il faut donc avoir recours à d'autres méthodes afin de pourvoir les actuels cultivars de résistances ou de créer de nouveaux génotypes performants dans ce contexte de contraintes.

L'AMÉLIORATION DES BANANIERS

La création variétale par croisements

Cette stratégie est menée dans le monde par de nombreux groupes de chercheurs appartenant au CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) à la FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola), à l'IITA (International Institute of Tropical Agriculture) au CRBP (Centre de Recherches Régionales sur Bananiers et Plantains) à l'EMBRAPA-CNPMF (Centro National de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical)...

Deux stratégies radicalement différentes sont utilisées pour le bananier. La première vise l'obtention de variétés tétraploïdes, la seconde l'obtention de variétés triploïdes.

En dépit de leur forte stérilité, certaines variétés triploïdes produisent de rares gamètes maternels non réduits (n = 3x = 33) qui, après pollinisation avec un clone diploïde, seront à l'origine de graines contenant des embryons tétraploïdes, susceptibles de germer (Menendez et Shepherd, 1975 ; Bakry et Horry, 1992). La première stratégie de croisement consiste à associer l'intégralité du génome de la variété cultivée, issue de gamète non réduit, à un génome paternel haploïde porteur de résistances, pour créer des hybrides tétraploïdes proches de la variété maternelle de référence et résistants aux maladies.

Le CIRAD pour sa part a développé une stratégie originale d'amélioration basée sur la création de triploïdes à partir du matériel végétal diploïde naturel ou amélioré (Bakry et al., 1990). Après avoir été sélectionnés, les meilleurs diploïdes sont traités à la colchicine pour induire la formation d'auto ou d'allotétraploïdes. Ces tétraploïdes et d'autres diploïdes sont ensuite croisés en vue de la synthèse d'individus triploïdes.

Apports des biotechnologies à l'amélioration des bananiers

En complément aux programmes d'amélioration génétique par croisement, des méthodes non conventionnelles ont été ou sont en cours de développement afin de lever certains verrous liés en particulier a la biologie des bananiers cultivés.

La micropropagation in vitro des bananiers par la prolifération de méristèmes végétatifs *in vitro* a connu un essor remarquable au cours de cette dernière décennie (pour revue Cronauer et Krikorian 1986). Cette méthode est maintenant largement utilisée pour échanger du matériel génétique, mais aussi pour produire du matériel de plantation. Avec un marché annuel estimé à 40 millions de vitroplants, le bananier est l'une des plantes de grande culture, les plus multipliées *in vitro*. L'intérêt du vitroplant est lié à sa bonne qualité sanitaire vis-à-vis des ravageurs, bactéries et champignons, à sa rapidité de multiplication, à ses performances agronomiques. En particulier, l'utilisation des vitroplants permet de mieux contrôler les infestations racinaires de nématodes (*Radopholus similis*), l'une des principales contraintes de la culture.

Cela étant, de nombreuses variations morphologiques et agronomiques sont apparues sur des plantes issues de prolifération *in vitro* (Vuylsteke et al., 1991). Le développement de la micropropagation nécessite donc une maîtrise des causes de la non conformité des vitroplants (Côte et al., 1993). En corollaire plusieurs équipes de recherche se sont attachées à accroître la variabilité des bananiers du sous-groupe Cavendish par l'exploitation de ces variations somaclonales (Daniells et Smith, 1993) ou encore par l'induction artificielle de mutations (Novak et al., 1990).

Ainsi, par exemple, un clone variant, Pei-Chiao, a été sélectionné à Taïwan pour sa résistance à la maladie de Panama race 4. Ce clone alors porteur de caractères agronomiques défavorables, après avoir été multiplié *in vitro*, a fait l'objet d'une autre

sélection, débouchant sur des individus résistants à la maladie et améliorés pour les caractères de production (Tang et Hwang, 1994).

• *L'approche moléculaire*

Les marqueurs moléculaires RFLP nucléaires et cytoplasmiques ont permis de caractériser la variabilité génétique, de déterminer le taux d'hétérozygotie de certains clones et de préciser les relations phylogénétiques entre les formes sauvages et les formes cultivées (Carreel et al., 1994).

Par ailleurs, une première carte génétique du bananier a abouti au positionnement de 90 loci (58 marqueurs RFLP, 4 marqueurs isozymes et 28 marqueurs RAPD) dont 77 ont pu être répartis en 15 groupes de liaisons et 13 loci indépendants. Cette carte a été complétée avec 30 marqueurs microsatellites. Une seconde carte a été établie : elle comporte environ 350 marqueurs répartis en 11 groupes de liaisons correspondant au nombre génomique de base des bananiers (Noyer et al., 1997). L'étude combinée de ces deux cartes a permis d'établir la première ébauche d'une carte squelette basée sur 130 marqueurs « locus spécifique » qui pourra être mise à profit pour poursuivre des stratégies de sélection assistée par marqueurs.

• *Les haplométhodes*

À l'exception des bananiers sauvages, tous les diploïdes utilisés en hybridation présentent une hétérozygotie génique (20 à 70 %) et de l'hétérozygotie structurale (translocations et inversions de portions de chromosomes), qui renforcent leur stérilité et induisent une forte variabilité des populations gamétiques quand elles existent. L'efficacité des programmes d'amélioration pourrait être accrue en utilisant des lignées plus fertiles. Les premières plantes androgénétiques de bananiers ont été obtenues par culture d'anthères du clone sauvage « *Long Tavoy* » de l'espèce *M. acuminata* (Bakry et Horry, 1992). Les facteurs qui gouvernent l'induction des cals androgénétiques (stades de prélèvement des anthères, milieux de culture) et la régénération de plantes entières ont pu être précisés par la suite. À ce jour, de nombreux cals et plantes haploïdes et diploïdes ont été obtenus à partir de différents clones de *M. acuminata* et de *M. balbisiana*. Parmi les utilisations des structures haploïdes, il convient de mentionner dès à présent les protoplastes issus de cals androgénétiques, comme éléments parentaux pour la fusion de protoplastes.

• *La culture d'embryons zygotiques*

Les graines de bananiers qui résultent des pollinisations manuelles sont souvent mal formées et présentent parfois des défauts de maturation. En semis de pépinière, leur taux de germination est très faible, de l'ordre de 0 à 25 % selon les croisements. Le sauvetage d'embryons *in vitro* a permis d'augmenter très significativement ce taux, puisqu'il peut atteindre jusqu'à 95 % dans les conditions optimales d'utilisation (Bakry et Horry, 1992). Dans les programmes d'amélioration des bananiers, le recours à cette technique a permis d'obtenir des descendances plus nombreuses et d'accéder à de nouvelles combinaisons parentales.

• *Le développement des suspensions cellulaires*

Les suspensions cellulaires chez les bananiers correspondent à la mise en place d'un nouvel outil. En effet, elles sont à l'origine du développement de l'embryogenèse somatique, de la mise en œuvre de la cryoconservation, des transformations génétiques et sont le matériel le plus utilisé comme source de protoplastes.

L'initiation de suspensions cellulaires embryogènes a été réalisée à partir :

- de cals embryogènes issus d'embryons immatures de taxons diploïdes séminifères (Escalant et Teisson, 1988 ; Chatelet, 1992 ; Marroquin et al., 1993) ;
- de cals originaires de tissus du corme ou de la base des jeunes feuilles (Novak et al., 1989) ;
- de scalps provenant de la prolifération d'apex de rejets cultivés *in vitro* (Dhed'a et al., 1991) ;
- de cals embryogènes issus de culture de jeunes mains mâles (Escalant et al., 1994).

Ces suspensions peuvent donner naissance à d'énormes quantités d'embryons somatiques, qui pourraient être utilisés comme moyen de propagation, méthode alternative à la micropropagation ci-dessus évoquée (sous réserve d'études en cours, de la conformité des plantes ainsi régénérées).

La cryoconservation a été envisagée pour conserver à long terme les ressources génétiques de bananiers. Cette technique évite le repiquage des plantes *in vitro* qui représente une lourde charge de travail pour l'entretien de grandes collections et peut aussi générer l'apparition de mutations et occasionner des pertes d'accessions par des contaminations ou des erreurs (Panis et al., 1990). Associée à l'embryogenèse somatique, la cryoconservation permet de stocker, sous la forme de suspensions cellulaires congelées, une production industrielle de vitroplants.

• *La culture de protoplastes et les fusions somatiques*

D'une façon générale on considère que les protoplastes de bananiers sont récalcitrants. Cependant, à condition de les cultiver sur couche nourricière, et/ou à très forte densité, deux équipes ont obtenu des régénérants (Megia et al., 1993 ; Panis et al., 1993).

Jusqu'à présent, seuls les protoplastes provenant de suspensions cellulaires embryogènes ont présenté une aptitude au développement conduisant dans les cas les plus favorables à la régénération directe via l'embryogenèse somatique. Certaines de ces plantes sont en cours d'évaluation agronomique pour étudier l'incidence de l'étape « protoplaste » sur les variations somaclonales.

Ce verrou étant levé il est désormais possible d'envisager la fusion de protoplastes dans l'optique d'un élargissement de la variabilité. Cette méthode permettrait d'accélérer les croisements ou même d'effectuer des croisements difficiles ou impossibles à réaliser par hybridation classique compte tenu de la stérilité de certains « géniteurs » diploïdes. L'hybridation somatique est d'abord envisagée entre bananiers diploïdes pour créer des tétraploïdes puis des triploïdes par rétrocroisement. La création de triploïdes synthétiques par fusion de protoplastes haploïdes et diploïdes fait partie d'un programme de recherches soutenu par la communauté européenne. En outre, l'obtention de protoplastes d'origine foliaire a été réalisée. Ils pourront également être utilisés dans les protocoles de fusion même s'il ne sont pas régénérants en l'état de protoplastes parentaux. Enfin les protoplastes considérés comme unité cellulaire autorisent la mise en œuvre des transformations par électroporation (Sagi et al., 1994) ce qui sur le plan théorique devrait éviter la formation de chimères.

• *La transformation génétique*

Les travaux concernant la mise au point des techniques de transformation génétique chez les bananiers sont très récents. Ils impliquent plusieurs centres de recherche spécialisés dans les biotechnologies qui sont pour l'essentiel l'Université Catholique de Leuven, l'Université du Texas, le CATIE, l'IAEA et le CIRAD.

Les premiers résultats ont conduit à l'obtention de transformants stables de bananier par des bombardements de particules appliqués à des suspensions cellulaires (Sagi et al., 1995) et par des inoculations d'*Agrobacterium tumefaciens* sur des sections de méristèmes végétatifs cultivés *in vitro* (May et al., 1995). L'essentiel des efforts de recherche a été jusqu'à maintenant consacré à la mise au point des méthodes de transfert de gènes. Le transfert de gènes d'intérêt agronomique pourrait cependant débuter dans un avenir proche. Parmi ceux-ci, une priorité serait accordée aux gènes de résistance aux virus (Cucumber Mosaic Virus, Banana Bunchy Top Virus), compte tenu de l'absence de bananier naturellement résistant et de l'émergence de stratégies visant l'acquisition de ces résistances par transformation génétique. Par ailleurs, les dégâts majeurs occasionnés par les charançons et les nématodes chez les bananiers justifient que les programmes de recherche soient initiés rapidement (inhibiteurs de protéases, gènes de *Bacillus thuringiensis*...). De la même façon, les dégâts très importants causés par les organismes fongiques du genre *Mycosphaerella* motivent déjà des recherches de gènes de résistance aux champignons (chitinases, protéines antifongiques,...). La modification de voies métaboliques pour le contrôle de la maturation des fruits (gène antisens de l'ACC synthase) est envisagée par plusieurs équipes. La possibilité de produire, dans la banane, l'antigène de l'hépatite B dans le but de disposer d'un vaccin oral est en cours d'étude par l'Université de Cornell (USA). Elle pose cependant des questions relevant de la bioéthique.

En guise de **conclusion**, force est de constater que les bananiers sont des plantes d'intérêt ; cependant il y a peu de temps que l'on s'est intéressé à eux sous un angle biotechnologique. Lors de la dernière décade, grâce à ces nouvelles approches, la connaissance de ces plantes s'est considérablement accrue. Les outils ainsi forgés ont déjà permis une meilleure diffusion du matériel végétal, la création de nouveaux génotypes. L'ensemble de ces techniques contribue et contribuera sans nul doute à l'amélioration tant qualitative que quantitative de la production bananière, et participent donc à l'établissement de la sécurité alimentaire.

Bibliographie

1. BAKRY F., HORRY J.-P. (1992), Evidence for androgenesis in bananas. In : Book of Poster Abstract, XIIIth EUCARPIA Congress, July 06-11th 1992, Angers, France : 133-134.
2. BAKRY F., HORRY J.-P. (1992), Tetraploid hybrids from interploid 3x x 2x crosses in cooking bananas. Fruits, 47:641-647.
3. BAKRY F., HORRY J.-P., TEISSON C., TÉZENAS DU MONTCEL H., GANRY J (1990), L'amélioration génétique des bananiers à l'IRFA-CIRAD. Fruits, n° spéc. : 25-40.
4. CARREEL F., FAURÉ S., GONZALES DE LÉON D., LAGODA P.J.L., PERRIER X., BAKRY F., TÉZENAS DU MONTCEL H., LANAUD C., HORRY J.-P. (1994), Évaluation de la diversité génétique chez les bananiers diploïdes (Musa sp.). Génétique, sélection, évolution, 26 (suppl. 1):125-136.
5. CHATELET C. (1992), Régénération chez *Musa* sp. : recherche des conditions d'établissement de suspensions cellulaires d'espèces diploïdes et triploïdes. Thèse de doctorat de l'université de Montpellier II 84 p.
6. CÔTE F.X., DOMERGUE R., MONMARSON S., SCHWENDIMAN J., TEISSON C., ESCALANT J.V. (1996), Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA (cv. Grand Nain). Physiologia Plantarum 97:285-290.
7. CÔTE F.X., Sandoval J., Marie P., Auboiron E. (1993). Variations in micropropagated bananas and plantains : literature survey. Fruits, 48 : 15-23.

8. CRONAUER S.S., KRIKORAN A.D. (1986). Banana. In : Biotechnology in agriculture and forestry : volume 1, Y.P.S. Bajaj éd., Berlin, Allemagne, Springer-Verlag, p. 233-252.
9. DANIELLS J.W., SMITH M.K. (1993). Somatic mutation of bananas : their stability and potential. In : Proceedings of the international symposium on recent developments in banana cultivation technology, R.V. Valmayor et al. éd., Los Banos, Philippines, INIBAP-ASPNET, p. 162-171.
10. DHED'A D., DUMORTIER F., PANIS B., VUYLSTEKE D., DE LANGHE E. (1991), Plant regeneration in cell suspension cultures of cooking banana cv. « Bluggoe » (*Musa* spp. ABB group). Fruits, 46:125-135.
11. DODDS K.S. (1943), Genetical and cytological studies of Musa. V. Certain edible diploids. Journal of Genetics, 45:114-137.
12. ESCALANT J.V., TEISSON C. (1988). Embryogenèse somatique chez *Musa* sp. C.R. Acad. Sci. 306 (III) 227-281.
13. ESCALANT J.V., TEISSON C., CÔTE F.X. (1994). Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (Musa sp.). *In vitro* Cellular and Developmental Biology, 30:181-186.
14. MARROQUIN C.G., PADUSCHECK C., ESCALANT J.V. et al (1993), Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. *In vitro* Cell . Dev. Biol,29:43-46.
15. MAY G.D., AFZA R., MASON H.S., WIECKO A., NOVAK F.J., ARNTZEN C.J. (1995), Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via Agrobacterium-mediated transformation. Bio/Technology, 13:486-492.
16. MEGIA R., HAÏCOUR R., TIZROUTINE S., BUI TRANG V., ROSSIGNOL L., SIHACHAKR D., SCHWENDIMAN J. (1993). Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cv « Bluggoe » (Musa ssp. AAB group). Plant Cell Reports, 13:41-44.
17. MENENDEZ T., SHEPHERD K. (1975). Breeding new bananas. World Crops, May-June . 104-112.
18. NOYER J.-L., DAMBIER D., GRIVET L, LANAUD C., LAGODA P. (1997), A saturated map of diploid banana, *Musa acuminata* (microsatellites, RFLP, Isozymes, RAPD and AFLP). Plant and animal genome V, San Diego, USA. In press.
19. NOVAK F.J., AFZA R., VAN DUREN M., PEREA-DALLOS M., CONGER B.V., XIOLANG T. (1989), Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA, AAA) and cooking (AAB) bananas. Bio/Technology, 46:125-135.
20. NOVAK F.J., AFZA R., VAN DUREN M., OMAR M.S. (1990), Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot tips of banana and plantain (Musa cvs.). Tropical Agriculture, 67:21-28.
21. PANIS B., WITHERS L., DE LANGHE E. (1990), Cryopreservation of *Musa* suspensions cultures and subsequent regeneration of plants. Cryo-Letters, 11:337-350.
22. PANIS B., VAN WAUVE A., SWENNEN R. (1993), Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa ssp.*). Plant Cell Reports, 12:403-407
23. SAGI L., REMY S., PANIS B., SWENNEN R., VOLCKAERT G. (1994), Transient gene expression in electroporated banana protoplasts (Musa spp.cv. « Bluggoe », ABB group) isolated from embryogenic cell suspensions. Plant Cell Rep, 13:262-266.
24. SAGI L., PANIS B., REMY S., SCHOOFS H., DESMET K., SWENNEN R., CAMMUE B. (1995), Genetic transformation of banana and plantain (Musa spp.) via particle bombardement. Bio/Technology, 13:481-485.
25. TANG C.Y., HWANG S.C. (1994), Musa mutation breeding in Taiwan. In The improvement and testing of Musa : a global partnership, La Lima, Honduras, 27-30 avril 1994. Montpellier, France, INIBAP, p. 219-227.
26. VUYLSTEKE D., SWENNEN R., DE LANGHE E. (1991), Somaclonal variation in plantains (Musa spp. AAB group) derived from shoot-tip culture. Fruits, 46:429-439.

A5 : Impact des travaux d'amélioration génétique et de biotechnologie du CRBP sur les productions de bananiers pour les consommations locales en Afrique de l'Ouest et Afrique Centrale

AUBOIRON E., ACHARD R., TOMEKPE K., NOUPADJA P., TCHANGO TCHANGO J.
CRBP - BP 832 Douala - Cameroun

INTRODUCTION

Les bananiers, et plus particulièrement le sous-groupe AAB plantain, constituent la première ressource alimentaire des régions Ouest et Centre de l'Afrique avec une consommation de l'ordre de 150 kg par personne et par an d'après la FAO. Or, ces cultures sont durement attaquées par plusieurs agents pathogènes dont essentiellement les champignons responsables des cercosporioses noire et jaune (*Mycosphaerella fijiensis* et *M. musicola*), des nématodes (*Rhadopholus similis*,...), le charançon noir (*Cosmopolites sordidus*) et différents virus (CMV, BBMV, BSV, BBTV,...).

En conséquence, les rendements et la durée de vie des plantations sont réduits. Le maintien des surfaces et éventuellement l'accroissement de celles-ci nécessitent une quantité de matériel végétal difficile à réunir avec la seule exploitation des rejets produits dans les parcelles existantes. De plus, la médiocre qualité de ce matériel végétal contribue à la propagation des parasites.

Le seul moyen de lutte actuellement efficace contre les champignons implique des traitements chimiques hors de portée de la grande majorité des planteurs. La lutte contre les nématodes et les charançons implique également l'utilisation de pesticides mais l'impact de ces parasites peut être grandement réduit par la plantation de matériel végétal sain sur des terrains sains ou assainis. Pour les viroses, le seul moyen de lutte connu à ce jour est l'éradication des plants atteints.

Cependant, des variétés résistantes aux différents agents pathogènes existent et plusieurs hybrides résistants à la cercosporiose noire ont d'ores et déjà été créés. Les autres agents pathogènes commencent à être considérés dans les programmes de création variétale et les nouvelles voies d'amélioration, incluant les biotechnologies, permettront d'importants progrès.

Le CRBP[1] possède une triple vocation : recherche, développement et formation. Au niveau national (Cameroun), il a pour rôle de répondre aux problèmes qui se posent aux productions bananières pour les consommations locales. Au niveau régional (Centre et Ouest de l'Afrique), il met en place des coopérations scientifiques et techniques destinées à résoudre les problèmes communs à l'ensemble de la région. Au niveau international, il développe ses thèmes de recherche en relation avec différents centres de recherche (CIRAD-FLHOR, CATIE, Université de Louvain, ODA-NRI, INIBAP/IPGRI). Les travaux du CRBP se basent sur des recherches pluridisciplinaires considérant l'ensemble de la filière, du producteur jusqu'au consommateur.

La diffusion de matériel végétal de plantation est un des axes majeurs de l'activité de développement. Elle a pour objectifs de satisfaire la demande en matériel végétal de

plantation de qualité, de promouvoir la plantation de matériel sain sur terrain sain et de mettre à la disposition des planteurs de nouveaux cultivars plus performants adaptés aux besoins locaux.

STRATÉGIE

La première étape est la mise au point des outils nécessaires à la réalisation du projet, notamment en biotechnologie, et la sélection de variétés et d'hybrides performants. Afin de mieux répondre aux besoins spécifiques à ces régions, le CRBP mène son propre programme d'amélioration variétale qui vise à créer des hybrides de type plantain résistants à la cercosporiose noire, aux nématodes et aux charançons. Des accords de partenariat sont établis avec différentes structures de recherche et développement implantées dans les zones de production. Le CRBP assure un appui technique, la formation technique et la fourniture de vitroplants. La gamme de variétés sélectionnées est proposée à nos partenaires pour constituer des parcelles de démonstration des potentialités de ces variétés dans les différentes zones de production. Les variétés retenues par les planteurs, et également par les consommateurs, sont ensuite introduites en plus grand nombre pour constituer des parcelles de multiplication rapide de rejets qui fourniront le matériel de plantation à distribuer aux planteurs. Les informations obtenues sur l'intérêt de chacune des variétés dans les différentes zones de production, les types d'utilisation des fruits des nouvelles variétés ainsi que les contraintes particulières permettent de mieux cibler les nouvelles actions à entreprendre. Les nouvelles sélections sont progressivement intégrées.

IMPLICATION DES BIOTECHNOLOGIES

Les biotechnologies constituent un ensemble d'outils qui interviennent à différents niveaux dans ce projet.

En premier lieu, la micropropagation par prolifération de bourgeons est utilisée couramment pour produire les vitroplants nécessaires à la diffusion de matériel végétal et répondre aux besoins de la recherche. Elle permet de garantir l'aspect sanitaire du point de vue des nématodes et charançons. Avec une indexation virale préalable, elle offre les meilleures garanties sanitaires. Cette application simple des biotechnologies constitue un outil indispensable à l'assainissement des cultures et permet de proposer les nouvelles variétés aux planteurs.

La culture d'embryons zygotiques, également d'application courante, est indispensable pour le programme d'amélioration. En effet, l'obtention d'hybrides par certains croisements comme ceux du schéma "3x x 2x" n'est possible qu'avec le sauvetage *in vitro* des embryons obtenus.

Des travaux sont menés pour maîtriser l'embryogenèse somatique et les suspensions cellulaires régénérantes sur les cultivars plantain (Auboiron et al, 1995) selon le protocole décrit par Cote et al. (1996) dans le but d'exploiter cette technique pour la multiplication *in vitro* et la conservation, en incluant les techniques de cryoconservation. Avec des suspensions cellulaires régénérantes des cultivars plantains, le CRBP disposera d'un matériel de choix pour initier des projets d'amélioration par transfert de gènes avec les laboratoires maîtrisant l'ensemble des aspects des transformations génétiques et disposant de gènes d'intérêt pour les plantains. Un cultivar diploïde fait également l'objet d'une mise au point ; les suspensions régénérantes devant, dans ce cas, être utilisées comme matériel de base dans le cadre du programme de création d'hybrides triploïdes : pour réaliser des

hybridations somatiques avec un haploïde de façon à créer directement un hybride triploïde (2x + 1x → 3x) ou pour créer le tétraploïde (2x + 2x → 4x) destiné à une dernière étape d'hybridation conventionnelle (4x x 2x→3x).

D'autres travaux visent à mettre au point la duplication chromosomique par un traitement *in vitro* à la colchicine pour doubler les diploïdes destinés à l'étape finale du schéma de création de triploïdes (4x x 2x → 3x).

Le développement des techniques de marquage biochimique et moléculaire est en cours de développement pour augmenter les possibilités du CRBP en terme de caractérisation, indispensable au programme d'amélioration.

SÉLECTION

Les variétés exploitées localement dans les différentes régions du champ d'action du CRBP représentent une très faible partie de la diversité existante. Il s'agit essentiellement de variétés du sous-groupe plantain pour les bananes de type "à cuire" et de quelques bananes "dessert". Or, l'ensemble de ces variétés est très sensible aux cercosporioses et également aux nématodes et aux charançons. Des variétés d'autres sous-groupes de bananes de type "à cuire" et de type "dessert" présentent des caractères de résistance ou de tolérance. Le CRBP a donc naturellement commencé par évaluer les variétés existantes présentant un potentiel. Celles-ci proviennent de la collection du CRBP qui compte près de 400 variétés, auxquelles s'ajoutent de nouvelles introductions obtenues auprès de l'INIBAP[2]. Quelques-unes des nouvelles variétés ont été sélectionnées en plus des quelques plantains les plus performants (tableau 1). L'évaluation intègre les qualités agronomiques des variétés mais également les caractéristiques des fruits produits, les utilisations possibles de ceux-ci et leur acceptabilité pour le consommateur. Ces études en cours permettront d'affiner progressivement la sélection.

Tableau 1 : Variétés proposées pour la diffusion de matériel végétal de plantation.

	Cultivar		Intérêt agronomique (* Données indicatives obtenues au CRBP avec une fertilisation réduite 60g N/an et 60g K2O/an)			Utilisation identifiée des fruits x bon, (x) passable, o mauvais, - non évalué						
groupe	sous-groupe	cultivar	Poids régime (kg)	Durée de cycle (mois)	Comportement vis à vis de la cercosporiose noire	Fruit dessert cru	Chips	Frites (mûr)	Beignets	Fruits bouillis	Farines	Pulpe pilée
Bananes type "à cuire"												
AAB	Plantain	French Clair	17	11	sensible	0	x	x	x	x	x	-
	Type French	French Sombre	17	11	sensible	0	x	x	x	x	x	-
		Amou	14	12	sensible	0	x	x	x	x	x	-
		Kafong Matintu	14	11	sensible	0	x	x	x	x	x	-
		Njock Ion	26	15	sensible	0	x	x	x	x	x	(x)
		Essong	14	12	sensible	0	x	x	x	x	x	-
	Plantain	Bitord	10	11	sensible	0	x	x	x	x	x	-
	Type faux corne	Mbouroukou N°1	10	11	sensible	0	x	x	x	x	x	-
		Big Ebanga	9	12	sensible	0	x	x	x	x	x	x
	Popoulou/Mayo Mavé	Popoulou CMR	13	10	sensible	0	x	-	x	-	x	-
	Lalmas	Lalmas	17	10	sensible	0	-	x	x	x	x	-
ABB	Pelipita	Pelipita	26	13	tolérant	0	x	x	x	x	x	-
	Bluggoe	Poteau Nain	-	-	tolérant	0	-	-	x	-	-	-
		Bluggoe	-	-	tolérant	0	-	-	x	-	-	-
Bananes type "dessert"												
AAcv	Mbrocerpe der	Pisang Mas	6	10	résistant	x	-	-	x	-	-	-
AAA	Cavendish	Petite Naine	-	-	sensible	x	-	-	x	x	-	-
		Poyo	-	-	sensible	x	-	-	x	x	-	-
	Gros Michel	Gros Michel	-	-	sensible	x	-	-	x	x	-	-
	Ibota	Yangambi km5	18	12	résistant	x	-	-	x	-	-	-
AAB	Mysore	Pisang Ceylan	20	11	résistant	x	-	-	x	-	-	-
Hybrides												
AAAB	"à cuire"	IRFA 904	24	11	résistant	o	(x)	(x)	x	x	-	-
		PHA 3	22	11	résistant	o	-	-	x	-	(x)	-
	"mixte"	PHA 1	25	11	résistant	x	-	-	x	-	-	-
	"dessert"	PHA 2	22	11	résistant	x	-	-	x	-	-	-

AMÉLIORATION VARIÉTALE AU CRBP

Le CRBP[1] a développé depuis 1992 un programme d'amélioration variétale suivant le schéma de création d'hybrides tétraploïdes (3x x 2x → 4x) (Chesman, 1932) (figure 1), avec pour objectif de créer des hybrides résistants à la cercosporiose noire, les plus proches possibles des plantains (Jenny et al., à paraître). L'originalité de ce programme réside dans la diversité des parents plantains hybridés (qui est possible grâce à la richesse de la collection du CRBP, qui couvre la quasi-totalité de la diversité du sous-groupe plantain) et dans la particularité des parents mâles diploïdes *acuminata* résistants utilisés. En effet, le CRBP utilise le parent diploïde *Musa acuminata burmanicoïdes* type Calcutta 4, classique de ce type de programme (Bakry & Horry 1992, Swennen R. & Vuylsteke 1993), mais aussi un hybride, le M53 et plusieurs variétés de la sous-espèce Banksii. Le M53 ayant une hétérozygotie importante (≈ 43%), une autofécondation a été réalisée pour sélectionner les meilleurs individus de première génération comme géniteurs mâles.

Figure 1. Schéma de création d'hybrides tétraploïdes.

Bananier AAB Plantain — Fertile

X

Diploïde *acuminata* — Fertile — Résistant à la cercosporiose noire

↓

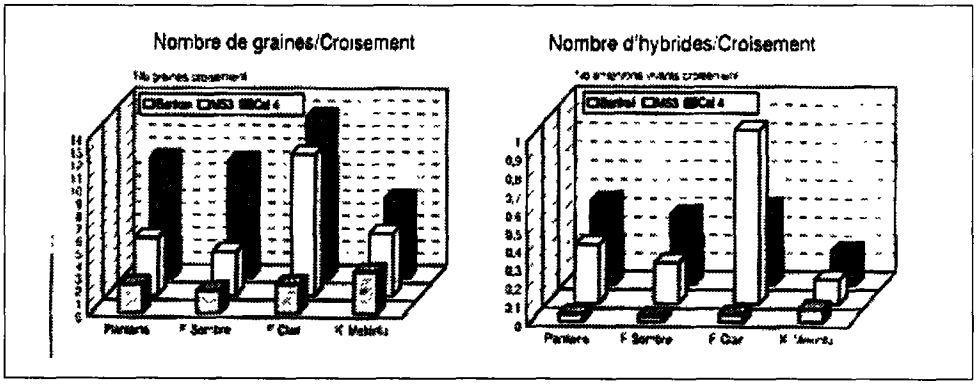
Sauvetage des embryons *in vitro*

↓

Sélection des hybrides
- Tétraploïdes AAAB
- Résistants à la cercosporiose noire
- Fruits de type plantain

La fertilité femelle s'est exprimée sur 46 des 63 variétés de plantain de type French hybridées. Si les hybridations réalisées avec Calcutta 4 s'avèrent globalement plus fécondes que celles réalisées avec M 53, en terme de nombre d'hybrides produits, ce résultat est inverse pour le parent femelle plantain, French clair (figure 2). Le couple French Clair / M 53 est également le plus performant pour la production d'hybrides tétraploïdes. Les hybridations réalisées avec les variétés de la sous-espèce Banksii produisent très peu d'hybrides (figure 2).

Figure 2. Performances des principaux croisements.



Quatre cent hybrides ont été créés depuis 1992. Parmi les 150 premiers, 42 sont tétraploïdes. Quatorze d'entre eux ont été retenus pour leur résistance à la cercosporiose noire, leurs qualités agronomiques et organoleptiques (tableau 2). Ils sont en cours d'évaluation multilocale (dernière étape de sélection). Les meilleurs rejoindront prochainement les variétés sélectionnées pour la diffusion auprès des planteurs. Les résistances ou tolérances aux nématodes et au charançon sont maintenant intégrées dans les critères d'amélioration de ce programme.

Cependant, les possibilités de ce schéma sont limitées et les hybrides tétraploïdes présentent systématiquement quelques défauts comme une fertilité femelle non nulle qui peut induire la formation de graines dans les fruits. Or, il existe maintenant une alternative avec les nouveaux schémas de création d'hybrides triploïdes (Bakry et al., 1990), potentiellement beaucoup plus performants. Un programme de création d'hybrides triploïdes (figure 3) a donc été initié au CRBP pour répondre à un objectif à plus long terme. Cette voie d'amélioration a été rendue possible grâce à des études de fond sur la génétique des bananiers. Celles-ci ont largement utilisé les outils de marquage biochimique (Horry & Jay, 1988) moléculaire (Fauré et al, 1994 ; Carreel, 1994) qui permettent actuellement d'orienter le choix des parents diploïdes à améliorer en vue de créer des hybrides triploïdes. L'étape finale de ces hybridations conventionnelles implique le doublement chromosomique d'un des parents, qui est en cours de mise au point au CRBP. Les biotechnologies auront encore un rôle très important dans ce programme, notamment pour s'affranchir des barrières de stérilité ou d'incompatibilité.

Figure 3. Schéma de création d'hybrides triploïdes.

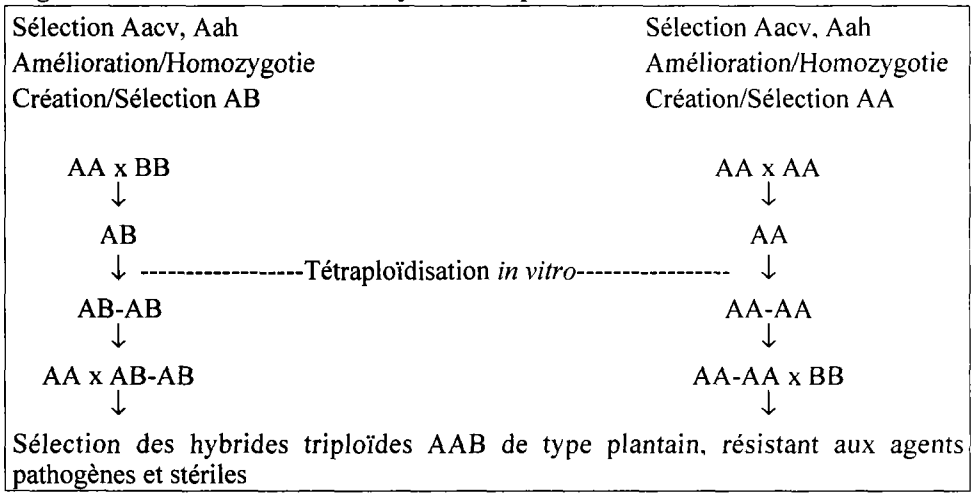


Tableau 2 : Hybrides tétraploïdes du CRBP préselectionnés (évaluation préliminaire sur un pied).

Cultivar	Parents			Intérêt agronomique				Utilisation identifiée des fruits x : bon ; (x) : passable ; o . mauvais ; - : non évalué						
				Poids régime cycle 1 (kg)	Durée de cycle (mois)	Poids régime cycle 2 (kg)	Comportement vis à vis de la cercosporiose noire	Fruit dessert cru	Chips	Frites (mûr)	Beignets	Fruits bouillis	Farines	Pulpe pilée
Hybrides AAAB type "à cuire"														
CRBP 001	Mbaf	x	Calcutta 4	23	13	22	résistant	o	x	x	x	x	-	-
CRBP 014	Amoung	x	Calcutta 4	12	12	14	résistant	o	-	-	x	x	-	-
CRBP 015	Amoung	x	Calcutta 4	14	14	20	résistant	o	x	x	x	x	-	-
CRBP 036	French Clair	x	M 53	12	12	12	résistant	o	-	-	x	x	-	-
CRBP 038	French Clair	x	M 53	16	12	13	résistant	o	-	-	x	-	-	-
CRBP 039	French Clair	x	M 53	19	11	18	résistant	o	x	x	x	x	-	-
CRBP 065	French Rouge 3	x	M 53	-	-	24	résistant	o	-	-	x	x	-	-
CRBP 069	French Sombre	x	M53	12	12	16	résistant	o	-	-	x	-	-	-
CRBP 085	French Sombre	x	M53	19	12	21	résistant	o	(x)	-	x	x	-	-
CRBP 100	French Clair	x	M 53	16	11	16*	résistant	o	-	-	x	x	-	-
CRBP 101	French Sombre	x	Calcutta 4	11	11	18	résistant	o	-	-	x	-	-	-
CRBP 102	French Sombre	x	Calcutta 4	11	11	22	résistant	o	-	-	x	-	-	-
CRBP 105	French Sombre	x	Calcutta 4	10	10	22	résistant	o	-	-	x	-	-	-
CRBP 120	French Clair	x	M 53	13	10	15	résistant	o	-	-	x	-	-	-
				* plant couché par le vent avant maturité										
French Clair	Plantain French moyen traité contre la cercosporiose noire			20	10	19	sensible	o	x	x	x	x	x	-

EXPLOITATION DE CE MATÉRIEL VÉGÉTAL POUR LE DÉVELOPPEMENT DES CULTURES LOCALES

Au Cameroun, la Province du Sud-Ouest constitue la plus importante zone de production (30 % de la production nationale). Elle alimente 70 % des approvisionnements des marchés de la ville de Douala. La Province du Centre alimente la ville de Yaoundé qui constitue le deuxième plus grand marché de plantain du Cameroun. Aussi, les premiers efforts ont-ils été réalisés dans ces provinces avec l'implantation de parcelles de multiplication et de démonstration à Ekona (Centre IRAD[3]) et à Kumba (PSCC[4]), à Yaoundé (GAPYSEM[5]) et à Njombé (CRBP) (figure 4). L'ensemble des parcelles compte 8 000 vitroplants qui devraient permettre de diffuser 32 000 à 64 000 rejets la première année. La demande actuelle en rejets concerne essentiellement des variétés de plantain, mais de nouvelles variétés sont proposées dont certaines sont résistantes à la cercosporiose noire.

Au niveau régional, des collaborations ont été établies avec la Guinée (PGM2[6]), le Tchad (ONDR[7]), la Guinée Équatoriale (PRSCC[8]), le Congo (Agricongo) et le Gabon (CENAREST[9], IGAD[10] et Agrogabon) (figure 4). L'ensemble des envois effectués regroupe 4 500 vitroplants multipliés à partir de matériel végétal *in vitro* provenant de l'INIBAP (état sanitaire du matériel végétal contrôlé). En effet, le CRBP1 est mandaté pour assurer cette multiplication *in vitro* pour les pays d'Afrique de l'Ouest et Centrale par l'INIBAP qui est en charge des mouvements de germoplasme de bananiers et plantains au niveau international. Le potentiel global de production de rejets de ces parcelles devrait être de 18 000 à 36 000 rejets la première année. La diversité variétale proposée devrait permettre de découvrir dans chaque zone de production, de nouveaux cultivars plus performants.

Figure 4a. Diffusion de matériel végétal dans le Centre et l'Ouest de l'Afrique.

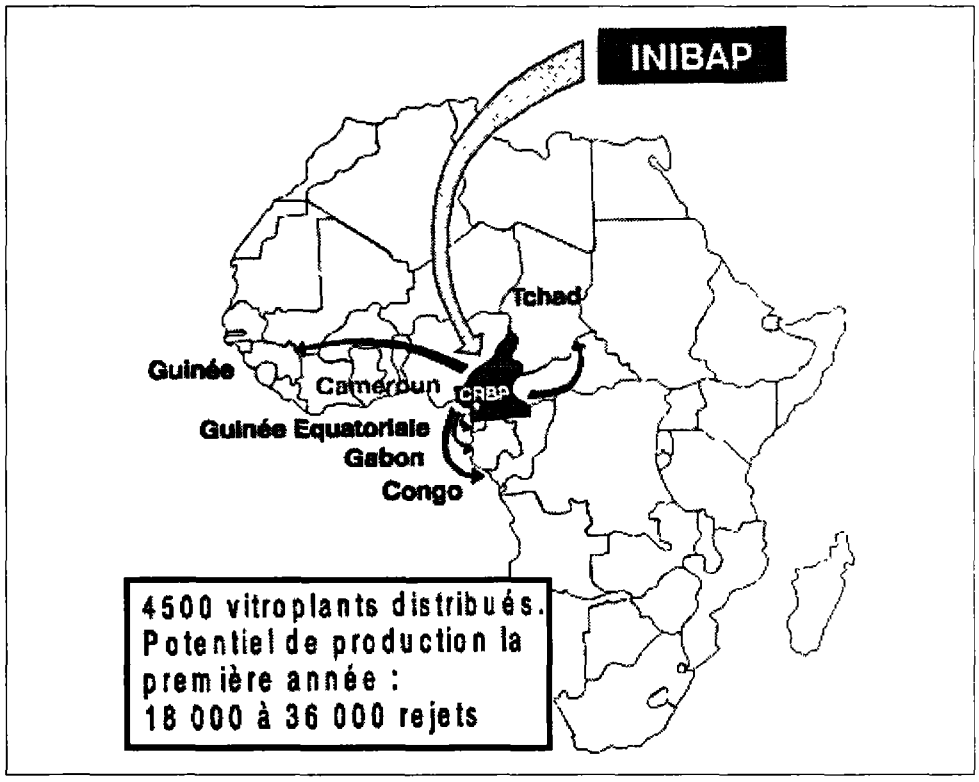
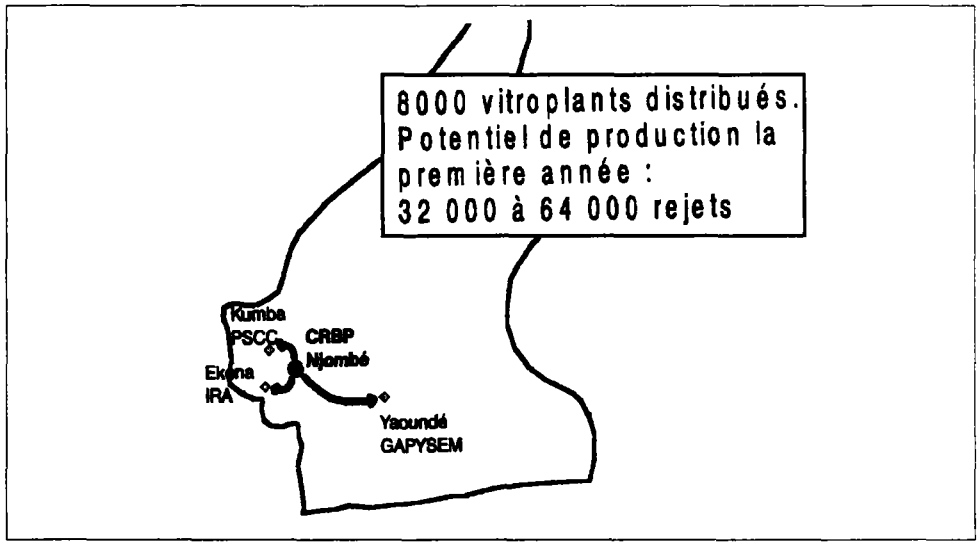


Figure 4b. Diffusion de matériel végétal au Cameroun.



CONCLUSION-PERSPECTIVES

Les planteurs disposent, dans les zones de production, de matériel végétal sain et de qualité. Ce matériel est distribué sous une forme qu'ils connaissent bien, le rejet. Ils pourront choisir eux-mêmes les nouveaux cultivars qui les intéressent en les jugeant dans leurs zones de production. Les organismes de développement associés disposent des moyens techniques (multiplication rapide *in vivo*) pour acquérir une autonomie de production de rejets et ainsi générer une activité qui réponde directement aux demandes des planteurs tout en s'autofinançant.

Les outils simples de biotechnologie que sont la micropropagation et le sauvetage d'embryon ont permis d'importantes réalisations. L'exploitation plus large du potentiel des biotechnologies pourra encore augmenter l'impact de ces travaux en amplifiant considérablement les possibilités de l'amélioration variétale, mais aussi de la conservation et de l'utilisation des ressources génétiques.

De nouveau hybrides tétraploïdes plus performants, dont ceux du CRBP, seront bientôt disponibles en attendant les produits des programmes de création d'hybrides triploïdes.

L'impact de ces travaux au niveau des plantations est représenté par les quantités de rejets mis à la disposition des planteurs et les nouvelles variétés introduites dans les zones de production. Cependant, il est trop tôt pour vérifier l'adoption réelle de ces nouvelles variétés par les planteurs et l'augmentation de production inhérente à cette diffusion de matériel végétal. Les enquêtes agro-économiques réalisées par le CRBP devraient permettre d'évaluer cette augmentation quand celle-ci sera effective. D'autre part, de nouvelles collaborations devront être établies pour satisfaire au maximum les besoins de l'ensemble des pays l'Ouest et du Centre de l'Afrique. Dans cette perspective, une convention de collaboration a été passée avec la République Centrafricaine (ICRA[11]) et avec le Congo (DGRST[12]).

[1] CRBP : Centre de Recherches Régionales sur Bananiers et Plantains.
[2] INIBAP : International Network for Improvement of Bananas and Plantains.
[3] IRAD : Institut de Recherches Agricoles pour le Développement.
[4] PSCC : Projet Semencier Café Cacao.
[5] GAPYSEM : Groupement Agropastoral de Yaoundé - Semences.
[6] PGM2 : Projet Guinée Maritime 2.
[7] ONDR : Office National de Développement Rural.
[8] PRSCC : Projet de Relance du Secteur Café Cacao, maintenant station de DUMASI.
[9] CENAREST : Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique.
[10] IGAD : Institut Gabonais d'Appui au Développement.
[11] ICRA : Institut Centrafricain de Recherche Agronomique.
[12] DGRST : Délégation Générale de la Recherche Scientifique et Technique.

Bibliographie

1. AUBOIRON E., GRAPIN A., COTE F.X., TEISSON C. (1995), Application de l'embryogenèse somatique à la gestion et à l'utilisation des ressources génétiques sur bananier. AUPELF-UREF - Réseau génie génétique des plantes. 5e journées Scientifiques : Biotechnologies et ressources génétiques. Dakar, Sénégal, 13-15 décembre 1995.
2. BAKRY F., HORRY J.-P. (1992), Tetraploid hybrids from interploid 3x/2x crosses in cooking bananas. Fruits d'Outre-mer. 47(6):641-655.
3. CARREEL F., LAGODA P.J.L., NOYER J.-L., GONZALES DE LEON D., PERRIER X., TEZENAS DU MONCEL H., HORRY J.-P. (1994), Evaluation of the banana (*Musa* spp.) Genetic diversity with RFLP ; Chloroplastic and mitochondrial polymorphisms. Poster présenté à EUCARPIA Genetic ressources section : evaluation and exploitation of genetic ressources pre-breeding, Clermont-Ferrand, France, 15-18 mars 1994.
4. CHEESMAN E.E. (1932), Genetic and cytological studies of *Musa*. I Certain hybrids of the Gros Michel Banana. Journal of Genetics. 26(3):231-312.
5. COTE F.-X., DOMERGUE R., MONNMARSON S., SCHWENDIMAN J., TEISSON C., ESCALANT J.V (1996). Embryogenic cell suspensions from the male flower of Musa AAA cv. Grand nain Physiologia plantarum. 97:285-290.
6. FAURÉ S., BAKRY F., GONZALES DE LEON D. (1994). Genetic mapping of the diploid genome of the bananas (*M. Acuminata*). Dans Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pests, Montpellier, France, 7-9 septembre 1992, CIRAD et INIBAP.p 77-92.
7. HORRY J.-P., JAY M. (1988), Distribution of anthocyanins in wild and cultivated banana varieties Phytochemistry. 27:2667-2672.
8. JENNY CH., AUBOIRON E., BEVERRAGI A. Adaptating hybridization strategy to produce plantain type hybrids at CRBP. Fruit d'Outre-Mer (à paraître).
9. SWENNEN D., VUYLSTEKE D. (1993), Breeding black sigatoka resistant plantains with wild banana Tropical Agriculture. 70:74-77.

A6 : Amélioration des plantes à tubercules au Cameroun : cas du macabo

TSALA NDZOMO G., OMOKOLO NDOUMOU D.
Département des Sciences Biologiques
Laboratoire Associé Francophone (LAF 314)
École Normale Supérieure, Université de Yaoundé I
B.P. 47 Yaoundé (Cameroun) ; tél./fax : (237) 22.86.74/e.mail : tsala@syfed.cm.refer.org

INTRODUCTION

Au Cameroun, la sécurité alimentaire (ou l'autosuffisance alimentaire) fait l'objet d'un souci particulier qui se manifeste dans les programmes des Ministères en charge de l'Agriculture et de la Recherche Scientifique. En effet, les programmes « céréales », « tubercules et racines amylacées », « banane et plantain », « fruits tropicaux », « palmier à huile » et « production des semences » concourent tous à l'autosuffisance alimentaire.

Ainsi, selon la volonté politique affichée à travers ces différents programmes, chaque Camerounais doit pouvoir manger à sa faim. Pour cela, le Cameroun doit produire en quantité suffisante et à moindre coût tout ce que consomment traditionnellement ses habitants. Cette option prend toute une autre dimension face à la crise économique qui secoue le Cameroun depuis quelques années, crise à laquelle la dévaluation du franc CFA est venue s'ajouter.

PLACE DU MACABO DANS LA PRODUCTION VIVRIÈRE

Dans la production vivrière au Cameroun, le macabo occupe la troisième place après le manioc et le plantain. C'est la deuxième plante vivrière à tubercules consommée au Cameroun, avec une production moyenne de 82 264 mille tonnes pour une superficie cultivée de 10 336 ha environ (1984-1985/1989-1990).

L'amélioration du macabo est une nécessité pour les raisons suivantes :

- C'est une plante indigène à tubercules très consommée (tubercules et feuilles) ;
- Cette plante ne figure pas dans le programme national de recherche sur les plantes à tubercules et amylacées ;
- Sa bonne valeur nutritive pour l'alimentation humaine (glucides et sels minéraux) ;
- Sa contribution à la politique d'autosuffisance alimentaire et l'environnement économique actuel au Cameroun.

La culture du macabo au Cameroun rencontre quelques problèmes. À cause de ces problèmes, sa culture ne se développe que très peu. En effet, cette plante fait l'objet d'une attaque par un parasite (champignon) qui est endémique dans le sol. Ce parasite s'attaque aux racines qui, une fois infectées, finissent par pourrir, entraînant ainsi la mort de la plante.

Par ailleurs, les techniques culturales traditionnelles ne permettent pas la pratique d'une culture extensive du macabo. Lorsqu'on plante une bouture, on récolte les

tubercules et, pour la saison suivante, on ne dispose que de la même bouture comme semence pour planter. Le développement de la culture du macabo se heurte donc en plus au problème de la production des semences.

C'est donc dans ce contexte que le projet conduit par le Laboratoire Associé Francophone 314, mène la recherche sur l'amélioration du macabo.

Tableau : nombre et biomasse des tubercules par pied des différentes catégories de plantes . CIV : plantes issues des vitroplants : BT: boutures traditionnelles.

	CV blanc		CV rouge		CV jaune	
	CIV	BT	CIV	BT	CIV	BT
Nombre de tubercules/Pied	12,8 ± 2,4	7,5 ± 1,6	10,2 ± 2	5 ± 1.1	0	0
Biomasse des tubercules/Pied (kg)	2,2 ± 0,6	1,7 ± 0.2	2 ± 0,4	1.1 ± 0,2	0	0
% pieds formant des rejets	86	13	74	10	100	64
Nombre de rejets par pied	5 ± 2	1 ± 0	4 + 1	1 ± 0	6 ± 2	3 + 1

Notre programme de travail comporte deux volets principaux :

- Produire en grande quantité des plants sains.
- Transférer les caractères de résistances de la variété jaune aux variété rouges et blanches.

APPROCHE ET RÉSULTATS

Notre approche s'explique par le fait que, jusqu'à ce jour, le programme de sélection par les méthodes de génétique classique n'a pas donné de résultats concluants et, l'utilisation des fongicides pour lutter contre le pathogène est inefficace du fait de son caractère endémique dans le sol.

Pour ce travail, nous disposons naturellement de trois cultivars de macabo au Cameroun :

- Le cultivar blanc : très productif et sensible au parasite.
- Le cultivar rouge : productif et sensible au parasite.
- Le cultivar jaune : improductif et insensible au parasite.

Mise au point de milieux pour la régénération « in vitro » des plantes de macabo

Acclimatation et essais en champs.

Multiplication végétative

Production de semences, création de clones.

Étude de la fleur

Le macabo fleurit rarement naturellement. Il faut induire la floraison par traitement à la gibbérelline. Au terme de ce traitement on obtient des fleurs qui se forment à l'aisselle des pétioles.

Cette étude comprend donc :

• L'induction de la fleur.

• L'identification des différents stades de développement des anthères en vue d'obtenir des plantes haploïdes par la culture d'anthères.

• L'obtention des protoplastes à partir des plantes haploïdes et :
  - coculture des protoplastes avec le pathogène dont la virulence a été atténuée (UV) ;
  - sélection d'individus résistants ;
  - régénération des plantes ;
  - fusion des protoplastes (cv jaune X cv blanc ; cv. Jaune X cv. rouge).

Étude du pathogène

• *Identification du pathogène*

L'agent pathogène a été isolé à partir des échantillons de sol prélevés dans la rizosphère des plantes de macabo. Plusieurs champignons ont été isolés mais, seul *Pythium myriotylum* est responsable de la pourriture racinaire chez cette plante.

• *Recherche de marqueurs de résistance c/o le macabo (études des protéines des parois en collaboration avec l'Université de ROUEN).*

Les tests de sensibilité au pathogène ont montré que le cv. Jaune est résistant tandis que les cv. blanc et rouge sont sensibles.

Ce constat nous a emmené à faire une étude sur les interactions biochimiques entre le macabo et *Pythium myriotylum*. Nous nous sommes intéressés aux péroxydases qui constituent un groupe important d'enzymes des parois. La paroi est en effet le premier point de contact entre les deux organismes, et les péroxydases sont connues pour leur implication dans les infections végétales.

Les premiers résultats montrent des différences constitutives dans les profils isopéroxydasiques acides des trois cultivars (objet du poster N°???).

CONCLUSION

• Nous avons mis au point une méthode de production (multiplication) *in vitro* de semences de macabo.

• Le rendement en champs de ces semences indemnes du pathogène est d'environ 80 % supérieur à celui des semences traditionnelles.

• Les plantes issues des vitroplants sont infectées assez tardivement.

• Le nombre de rejets par plante issue des vitroplants est d'environ cinq fois plus élevé.

• Le programme de recherche sur le transfert des caractères de résistance du cv. Jaune aux cv. blanc et rouge se poursuit à travers la production des plantes haploïdes, la fusion des protoplastes et la recherche des protéines responsables de la résistance vis-à-vis de *Pythium myriotylum*.

Bibliographie

1. TONG XU et al. (1994), Journal of Zhejiang, Agricultural University 20(3):221-227.
2. TONG XU et al., (1995), Acta Mycologica Sinica 14 (1) 37-43.
3. OMOKOLO N.D. et al. (1995), C.R.Acad.Sci. Paris, Sciences de la Vie 318:773-778.
4. TSALA G.N. et al. (1996), Plant Peroxydase Newsletter N°8 17-24.
5. OMOKOLO D. et al. (1996), Annals of Botany 77:153-158.

A7 : Les apports récents des biotechnologies pour l'amélioration des caféiers et la valorisation des ressources génétiques

HAMON S.[1], ANTHONY F.[2], BARRE Ph.[1], BERTHAUD J.[1], BOURSOT M.[3], CHABRILLANGE N.[1], CHARRIER A.[4], CHIN-LONG K.[1], COMBES M.C.[1], COUTURON E.[5], CROS J.[1], DUSSERT S.[1], ENGELMANN F.[6], LASHERMES Ph.[1], LE PIERRÈS D.[7], LOUARN J.[3], NOIROT M.[1], RÉCALT C.[1], TROUSLOT P[1].

[1] - ORSTOM, BP 5045 - Montpellier, France ; [2] - CATIE, Aparto 59, 71170 - Turrialba, Costa Rica ; [3] - ORSTOM, BP 434 - Man, Côte d'Ivoire ; [4] - ENSAM, Place Viala, F - 34060 - Montpellier, France ; [5] - ORSTOM, BP 11416 - Niamey, Niger ; [6] - IPGRI - Via delle Sette Chiese 142, I-00145 - Rome, Italie ; [7] - ORSTOM - Nouméa, Nouvelle-Calédonie

INTRODUCTION

Des collectes de caféiers spontanés ont été réalisées de 1966 à 1987 dans les forêts d'une dizaine de pays africains couvrant la zone intertropicale, de la Guinée-Conakry à Madagascar. Près de 15 000 génotypes originaux sont conservés en champ dans les collections de base des stations de recherche agronomique.

La diversité spécifique des caféiers connus, est de l'ordre de 80 espèces, réparties en deux sous-genres *Coffea* et *Psilanthus*. Elles sont diploïdes (2n = 22 chromosomes), généralement allogames, à l'exception de *C. arabica*, espèce tétraploïde (2n = 44 chromosomes) et autogame préférentielle (Berthaud et Charrier, 1988). L'étude de leur diversité aux niveaux intra et interspécifique est largement documentée, pour des caractéristiques très variées comme les caractères botaniques (Charrier 1978, Berthaud 1986, Anthony 1993) ; les caractères d'intérêt agronomique (Berthaud et al. 1984, Anthony et Le Pièrres 1987) ; la diversité révélée par les marqueurs enzymatiques (Berthou et al 1980, Berthaud 1986, Anthony 1993) et les relations génétiques en croisement (Charrier 1978, Louarn 1993, Le Pièrres 1995).

L'objet de cet article est de situer les uns par rapport aux autres, les apports récents des biotechnologies aussi bien dans la structuration de la variabilité du complexe d'espèces des caféiers par les marqueurs moléculaires que pour la conservation des ressources génétiques à long terme grâce aux possibilités apportées par la culture *in vitro*.

ORGANISATION ET STRUCTURATION GÉNÉTIQUE DU COMPLEXE DES CAFÉIERS

La variation de l'ADN cp chez les espèces diploïdes

La variation de l'ADN chloroplastique (cp) des caféiers a été évaluée par 2 approches complémentaires (Cros, 1994) : i) le polymorphisme de site ou de longueur des fragments de restriction du génome ADNcp; ii) la divergence d'une séquence chloroplastique non codante trnL-trnF.

Pour l'approche RFLP, l'ADN total des caféiers a été digéré séparément par 3 enzymes puis hybridé avec 15 sondes hétérologues couvrant 95 % du génome ADNcp de la laitue. La majorité des couples enzymes/sondes ne révèlent pas de polymorphisme : sur 112 sites, 8 seulement sont polymorphes (moins de 1 %), et ils se situent tous dans la grande région simple copie. Pour l'ensemble des 27 espèces, 11 chlorotypes sont distingués.

Les régions intergéniques, supposées plus variables que les parties codantes, ont été étudiées pour augmenter le nombre de caractères en vue de l'analyse phylogénétique.

Les 2 zones concernées sont situées dans la grande région simple copie :

- L'intergène atpB-rbcL (sous-unité B de l'ATP synthétase et rubisco de taille supérieure à 900 paires de bases (pb) ; la recherche de polymorphisme par RFLP a mis en évidence 4 mutations.
- Les régions non codantes adjacentes aux gènes codant pour les ARN de transfert de la leucine (L) de la thréonine et de la phénylalanine (T et F) ; l'amplification par PCR a montré un maximum de polymorphisme sur trnL-trnF ; ce fragment a donc été séquencé pour 40 génotypes ; la séquence (sur 377 pb) est très conservée avec des sites de mutation ponctuelle et la localisation de 5 « indels » (insertion/délétion) (Cros et al. 1998).

L'ensemble des caractères polymorphes entre les génotypes de caféiers et Psilanthus - 8 sites, 32 caractères - représente peu de mutations par rapport au nombre de sites étudiés (513). Seule l'analyse cladistique permet l'analyse conjointe des caractères polymorphes de nature différente. Elle a été fondée sur le principe de parcimonie selon Wagner qui minimise le nombre de mutations sur les branches de l'arbre phylogénétique.

Au moins 6 clades sont mis en évidence entre les espèces du sous-genre Coffea :

A *C. canephora, C. congensis, C. brevipes.*

B *C. liberica, C. kapakata.*

C *C humilis, C. stenophylla.*

D *C. arabica, C. eugenioides, C. sp. Moloundou.*

E *C. bertrandi, C. humblotiana, C. millotii.*

F *C. racemosa, C. salvatrix, C. pseudozanguebariae, C. sessiliflora.*

Les deux taxons de Psilanthus bien que très proches des caféiers du sous-genre Coffea ne partagent avec eux aucune synapomorphie. *P. ebracteolatus* qui ne possède aucune mutation propre, semble le plus proche des espèces du sous-genre Coffea.

L'hérédité de l'ADNcp a été observée à l'aide de marqueurs moléculaires utilisant la PCR chez un croisement inter-spécifique entre *C. arabica* et *C. canephora*, et dans le cas d'un croisement intra-spécifique de *C. canephora*. Les deux études indiquent une hérédité strictement maternelle de l'ADNcp (Lashermes et al. 1996a).

La variation de taille du génome des caféiers diploïdes

La cytométrie en flux (CMF) permet de déterminer aisément la teneur en ADN nucléaire lorsque celui-ci est coloré par des fluorochoromes. Cette nouvelle technique, développée par Cros et al. (1995) a permis d'estimer la quantité d'ADN chez les caféiers. Pour 77 génotypes, des populations de noyaux isolés ont été colorées par l'iodure de propidium (IP ; non spécifique des bases). Pour trente neuf génotypes, le 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI ; AT spécifique) a été également utilisé. Les

mesures ont porté sur 12 espèces diploïdes et sur l'espèce *C. arabica*, en utilisant des échantillons de feuilles de caféiers cultivés en serre.

L'espèce tétraploïde *C. arabica* présente la plus forte quantité d'ADN, 2,61 pg par noyau, soit environ le double des caféiers diploïdes. Elle varie chez ces derniers de 0,95 pg pour *C. racemosa* à 1,78 pg pour *C. humilis*. La variation de la taille du génome des espèces diploïdes est continue, avec 3 groupes statistiquement différents :

- Groupe 1 : 0,90 à 1,30 pg.
  C. sessiliflora, C. racemosa, C. pseudozanguebariae.
- Groupe 2 : 1,30 à 1,60 pg.
  C. congensis, C. brevipes, C. canephora, C. eugenioides, C. stenophylla, C. sp F.
- Groupe 3 : 1,60 à 1,80 pg.
  C. humilis.

Les différences observées peuvent s'interpréter en fonction de l'origine éco-géographique des espèces, de leurs caractéristiques phénologiques et de la fertilité de leurs hybrides interspécifiques. Pour ce dernier point, si on compare la taille du génome des espèces parentales avec la fertilité des hybrides interspécifiques (Louarn 1993), on constate que les symptômes de stérilité deviennent très importants dès que la différence de quantité d'ADN des espèces parentales dépasse 0,3 pg.

La cytométrie en flux est une technique d'emploi courant pour la détermination des niveaux de ploïdie. Il est toutefois possible d'obtenir des mesures très précises si certaines procédures sont optimisées. Barre et al. (1996) ont montré que la cytométrie en flux permet d'obtenir des mesures précises de la taille des génomes de deux taxons (*C. liberica dewevrei* et *C. pseudozanguebariae*). L'iodure de propidium (IP) et le *Petunia hybrida* ont été utilisés, respectivement, comme fluorochrome et standard interne. La linéarité de la relation entre la quantité d'ADN et le signal fluorescent digitalisé a été vérifiée et des conditions expérimentales optimales ont été définies pour l'estimation de la position des pics (moyenne et mode), le temps de coloration (au moins deux minutes), le voltage du photomultiplicateur (557 V) et de la concentration en IP (330 µg/ml). Les tailles de génome de *C. liberica dewevrei* et de *C. pseudozanguebariae* ont été estimées avec précision (respectivement 2C=1,421 ± 0,005 pg et 2C=1,129 ± 0,005 pg).

Barre et al (1998a) ont réalisé une étude simultanée par cytofluorométrie et hybridation chromosomique *in situ* sur des descendants interspécifiques (*C. liberica dewevrei* x *C. pseudozanguebariae*). La méthode d'hybridation *in situ* est efficace sur les caféiers et les différences génomiques sont suffisantes pour que les chromosomes des deux espèces se distinguent parfaitement au niveau des hybrides F1. Toutes les plantes hybrides F2 analysées ont 22 chromosomes mais sont constituées de contributions parentales différentes. Une relation linéaire a été établie entre le nombre de chromosomes de *C. pseudozanguebariae* présent chez l'hybride et la valeur de la quantité d'ADN correspondante des noyaux extraits. Cette relation entraîne 2 conclusions majeures, d'une part la différence de quantité d'ADN entre les 2 espèces est portée par plusieurs chromosomes et d'autre part la CMF, technique simple et rapide, donne une estimation de la composition parentale des hybrides G2. Cette approche peut permettre, dans un programme d'introgression de caractères provenant d'espèces sauvages, de cribler rapidement les plantes ayant peu de chromosomes de l'espèce non cultivée.

La variabilité biochimique des espèces diploïdes

Les premières analyses sur la diversité biochimique des espèces ont été réalisées sur des espèces malgaches (Rakotomalala et al. 1992). Une étude extensive menée sur 25 espèces, 9 pour la région guinéo-congolaise, 9 pour l'Afrique de l'Est et 7 pour Madagascar a été réalisée pour la composition en acides chlorogéniques, la caféine et les mozambiosides des grains par dosage HPLC (Anthony et al. 1993). Les analyses multivariées qui ont été réalisées ont mis en évidence deux grandes voies métaboliques différentes. L'une conduit à de très faibles quantités d'acides chlorogéniques (< 2,5 % de matière sèche) et de caféine (< 0,3 % de matière sèche). L'autre conduit à de fortes concentrations d'acides chlorogéniques (> 4,5 de matière sèche) et de caféine (> 0,4 % de matière sèche). La voie métabolique des faibles teneurs se trouve chez les espèces de Madagascar et chez les espèces d'Afrique de l'Est (*C. pseudozanguebariae* et *C. salvatrix)* tandis que la voie des fortes teneurs est présente chez toutes les autres espèces africaines. La mise en évidence de caféine chez quelques taxons malgaches (Clifford et al. 1991) pourrait signifier que les échanges ont eu lieu entre le continent africain et Madagascar au cours de l'évolution.

La détermination des teneurs en acides chlorogéniques est effectuée par HPLC après de nombreuses séries d'extraction. La possibilité d'analyse au sein de grandes populations de grains de café verts nécessite une méthode de purification précise, rapide et non-biaisée. Ky et al. (1997) ont testé cinq protocoles différents de purification. Le premier consistait à utiliser successivement différents solvants organiques, le second était basée sur la filtration au travers d'une cartouche, le troisième utilisait l'action combinée de deux réactifs, et les deux derniers étaient des simplifications du troisième protocole. La méthodes de purification la plus simple s'est révélée être la plus rapide, la plus précise et la moins biaisée. Par conséquent, cette méthode pourrait être utilisée en routine afin de quantifier les acides chlorogéniques dans les grains verts de café et l'accession à des études de grandes descendances contrastées, ce qui pour le moment n'a jamais pu se faire chez les caféiers, ouvrant ainsi la voie au positionnement génétique de ces caractères.

Origine et variabilité de *Coffea arabica*

Le principal centre de diversité de C. arabica se situe au Sud-Ouest de l'Éthiopie. Des caféiers « spontanés » de cette espèce ont également été trouvés sur le plateau de Boma au Soudan et sur le mont Marsabit au Kenya (Berthaud et al., 1980).

L'analyse du polymorphisme par « RFLP » du génome nucléaire de *C. arabica* montre : i) l'absence de locus présentant plus de deux allèles ; ii) une distance génétique plus élevée que si *C. arabica* était un autotétraploïde ; iii) les espèces diploïdes les plus proches de *C. arabica* sont *C. congensis*, *C. eugenioides*, et *C. canephora* (Lashermes et al., 1996b)

L'analyse de la séquence de l'espaceur intergénique ITS2 de l'ADN ribosomique permet de conforter la nature des progéniteurs de *C. arabica* : pour la voie maternelle *C. eugenioides* ou *C sp.* Moloundou ; pour la voie paternelle nucléaire *C. congensis* ou *C. canephora* (Lashermes et al. 1997).

L'ensemble de ces résultats converge vers une origine amphidiploïde de *C. arabica*. Une restauration de la fertilité et l'adaptation à une niche écologique spécifique auraient été obtenues à la suite du changement de niveau ploïdie, accompagnant le croisement des 2 espèces diploïdes. La formation de diplogamètes a été observée chez des hybrides interspécifiques et serait favorisée par des basses températures chez les caféiers. L'autofertilité de *C. arabica* aurait été une condition indispensable à son

maintien et à la colonisation d'une aire marginale. Le caractère autogame pourrait provenir d'un des deux parents ou résulter du contexte génétique hybride.

Le mode de formation de *C. arabica* est sans aucun doute responsable pour une large part de la faible diversité génétique observée à l'intérieur de cette espèce par des marqueurs moléculaires de type isozymes (Berthou et al. 1980) ou RAPD (Lashermes et al. 1996c). De plus, l'histoire récente de la caféiculture et le mode de dispersion des caféiers cultivés font que les variétés de *C.arabica* cultivées à travers le monde proviennent d'un nombre réduit de génotypes. La base génétique étroite des cultivars rend difficile l'amélioration variétale de cette espèce, pour la résistance aux maladies en particulier.

Des marqueurs « RAPD » ont été utilisés avec succès pour analyser la diversité génétique parmi des accessions sauvages et cultivées de *C. arabica* (Lashermes et al. 1996b). La base génétique étroite des cultivars est confirmée. En revanche, une large diversité est observée dans le matériel sauvage, illustrant l'intérêt des prospections. Des résultats suggèrent une différenciation génétique Est-Ouest en Éthiopie qui constitue le centre primaire de diversification de *C. arabica*. L'important effet d'hétérosis, observé chez des hybrides intergroupes, pourrait être lié à cette différenciation génétique. La méthode RAPD apparaît performante pour l'étude de la variabilité génétique et la classification du germoplasme de *C. arabica*.

CARTOGRAPHIE ET MARQUEURS MOLÉCULAIRES

Cartographie génétique

Une carte de liaison génétique du caféier (*C. canephora*) totalisant 1402 cM a été établie sur la base d'une population de plantes haploïde-doublées (Lashermes et al. 1994a). Des marqueurs « RFLP » comme des marqueurs utilisant la PCR (RAPD) ont permis la construction de 15 groupes de liaison. Des clones d'ADN génomiques de caféier ainsi que des ADNc ont été utilisés. Au total, 47 marqueurs RFLP et 100 marqueurs RAPD sont positionnés sur la carte de liaison. Un niveau relativement faible de polymorphisme est observé. Quatre-vingts un pour cent des marqueurs RAPD et 85 % des marqueurs RFLP présentent une ségrégation significativement non différente ($P < 0,01$) du ratio 1:1 (Paillard et al. 1996).

Localisation chromosomique de caractères d'intérêt agronomique

La disponibilité d'une carte de liaison moléculaire du caféier offre de nombreuses perspectives tant pour des études génétiques que pour l'amélioration des espèces de caféier.

La distribution du comportement en croisement observée au sein des génotypes confirme que l'auto-incompatibilité chez *C. canephora* est un système gamétophytique contrôlé par 1 locus (S). La faible production de graine dans des cas de croisements incompatibles pourrait indiquer l'existence de pseudo-incompatibilité. Une analyse de liaison par des marqueurs moléculaires indique que le locus S est associé à un marqueur RFLP sur le groupe de liaison 9 (Lashermes et al. 1996d). La disponibilité d'un marqueur associé devrait faciliter l'analyse génétique de l'auto-incompatibilité en relation avec les programmes d'amélioration génétique des caféiers.

Introgression de caractères originaux d'espèces non cultivées

La qualité du café est en rapport avec les nombreux composés biochimiques identifiés dans la graine. Le plus connu, la caféine, varie de 0 à plus de 3 % de la matière sèche. Chez les caféiers cultivés, elle varie du simple au double dans les lots de cafés Arabica

(0,6-1,7) et Robusta (1,2-3,3), et le café sans caféine est produit par traitement industriel. Les tentatives d'obtention de cafés sans caféine réalisées à Madagascar dans les années 70 (Charrier 1978) par croisement entre les deux espèces cultivées par des espèces sauvages produisant un café sans cet alcaloïde n'ont pas abouti.

Cette étude génétique a pu être relancée par la découverte d'un caféier spontané de Kenya/Tanzanie et dont les graines sont dépourvues de caféine (*C. pseudozanguebariae*) et la création d'hybrides 2x plus fertiles avec les caféiers cultivés *C.canephora* et *C.liberica* (Louarn 1993). Une étude génétique est développée sur la 2ème génération du croisement le plus avancé *C. pseudozanguebariae* X *C. liberica* (Barre et al., 1996). Elle porte sur plusieurs caractères d'intérêt technologique polymorphes chez ces 2 espèces. L'hérédité du poids des graines (et de leur taille) est très classiquement celle d'un caractère quantitatif à effet additif (Charrier et Berthaud, 1975). Dans le cas d'un croisement entre *C. liberica* par une espèce sauvage sans caféine, les hybrides F1, contiennent de la caféine mais en quantité inférieure à la moyenne des parents (0, 18 % MS vs 0,47). Cependant la racine carrée de la teneur en caféine est additive suggérant que ce caractère dépend du produit de 2 variables additives comme la surface des feuilles. L'analyse de 80 hybrides G2 a révélé l'existence de gènes majeurs pour le contrôle de la teneur en caféine et en hétéroside diterpène spécifique de *C. pseudozanguebariae* qui interviendrait dans l'amertume du café boisson (Barre et al. 1998b). L'absence de caféine serait contrôlée par un gène majeur récessif par rapport à la présence. Un gène majeur codominant interviendrait dans le contrôle de la teneur en hétérosides. La présence de gènes majeurs est favorable à une stratégie d'introgression, cependant des corrélations existent entre teneurs en caféine et en hétéroside, le poids de 100 grains, la taille des feuilles et la durée du cycle de fructification.

LES TECHNIQUES DE CONSERVATION *IN VITRO*

Dans une première étape, l'étude de conditions permettant le maintien à moyen terme de caféiers en recherchant des conditions optimales de vie ralentie ont été effectuées sur quatre espèces *C. congensis, C. canephora, C. liberica* et *C. racemosa* (Bertrand - Desbrunais et al. 1990). *C. congensis* et *C. liberica*, espèces à croissance naturellement lente se maintiennent bien sur des milieux contenant 1,3 mM de 6-benzyladenine (BAP). Les espèces à croissance plus rapide (*C. canephora* et *C. racemosa*) présentent une légère callogenèse mais 1,3 mM semble acceptable pour ces 4 espèces. Des essais ont également montré pour *C. arabica* les possibilités de réduire la concentration en saccharose du milieu à 20 g l-1 et la température à 20 °C (Bertrand-Desbrunais et al. 1992). Jouve et al. (1991) ont testé également la possibilité de conserver des pousses feuillées de *C. arabica* en conditions d'hypoxie à différentes températures. La survie s'est avérée bonne mais la reprise des pousses feuillées, après un mois à 27°C s'est avérée plus faible. Les bases d'une tentative de conservation des ressources génétiques caféières par stockage *in vitro* étaient en place.

Vitrothèque et collection représentative

Le problème majeur auquel doit faire face le gestionnaire de banque de gènes est l'accessibilité des collections à un large ensemble d'utilisateurs. Le concept de « core collection » (collection représentative) est une voie d'approche. Cette collection est définie comme un ensemble qui comporte, avec un minimum de redondance, le plus possible de diversité génétique. Une telle collection n'est pas appelée à remplacer la collection de base mais à faciliter son accessibilité (Hamon et al. 1995a, Noirot et al. 1996).

Pour élaborer une collection représentative, l'organisation génétique du pool génétique des caféiers a été examiné à 3 niveaux : biogéographie, ressources génétiques et données disponibles (Hamon et al 1995). Cette analyse montre qu'une collection représentative de caféiers devrait consister en 88 groupes de diversité de 3 types en fonction du niveau de connaissance : un groupe pour *Coffea arabica*, un groupe par sous ensemble de diversité pour les espèces biens connues telle que *C. liberica* et *C. canephora* et une catégorie avec un grand nombre d'espèces négligées. Différentes stratégies sont appliquées en fonction des catégories. Après avoir défini les groupes de diversité, des tests sont réalisés, en utilisant les données disponibles sur *C liberica*, par une nouvelle méthode (la stratégie des composantes principales). Les résultats montrent que 50 % de l'inertie peut être obtenue avec 10 % des 338 génotypes, 90 % est obtenue avec 50 % des génotypes ce qui correspond bien au modèle défini par Noirot et al. (1996).

Une core collection *in vitro* des espèces africaines de caféiers diploïdes, structurée en 32 groupes de diversité, a été établie en 1991 et conservée en conditions de vie ralentie pendant plus de trois années (6 cycles de culture). L'objectif initial était de conserver 20 accessions par groupe, avec 4 représentants par accession. Un modèle statistique a été développé pour analyser l'évolution des taux de survie au sein de chaque groupe de diversité. L'adéquation du modèle a été démontrée. L'analyse de la survie indique une variabilité très large des accessions pour leur réponse aux conditions de conservation et confirme l'importance de structurer le complexe des caféiers jusqu'au niveau infraspécifique. Les différences mises en évidence au niveaux intra et inter-groupes ont eu des conséquences importantes sur la représentativité génétique de la « core collection » in vitro (Dussert et al. 1997). Quatre classes de groupes de diversité ont pu être établie sur la base des paramètres du modèle.

A Aucune perte en 6 repiquages.

B Perte régulière mais se stabilisant vers 50 %.

C Perte rapide à 50 % dès le premier repiquage mais stable ensuite.

D Perte régulière conduisant à la disparition complète à 6 repiquages.

L'absence de corrélation avec l'origine éco-géographique des groupes de diversité a été démontrée. Les espèces *C. congensis* et *C. humilis* ne posent aucun problème pour la conservation *in vitro* (groupe A). Pour des applications pratiques, la conservation a été maintenue lorsque la dérive génétique intra-groupe est inférieure à 50 %. Enfin, pour *C. canephora*, *C. stenophylla*, *C. racemosa*, *C. sessiliflora* et *C. sp. Moloundou* la conservation *in vitro* n'est pas applicable dans les conditions définies précédemment.

Cryoconservation

Les apex de microboutures *in vitro* de *C. racemosa* et *C. sessiliflora* supportent la congélation dans l'azote liquide en utilisant la technique d'encapsulation-déshydratation (Mari et al. 1995). Une accumulation intense d'amidon est notée après une nuit de culture des apex sur le milieu standard. Les apex de *C. sessiliflora* nécessitent 3 à 10 jours de préculture dans un milieu liquide contenant 0,75 M de saccharose, tandis que ceux de *C. racemosa* nécessitent une augmentation progressive de la concentration en saccharose de 0,5 à 1 M. Après la période de déshydratation, les cellules de certains apex sont très endommagées, présentant des granules osmophiles sur la surface du plasmalemme. Pour d'autres apex, les cellules sont moins endommagées, montrant des vésicules d'exocytose à la périphérie de la membrane plasmique. Après congélation, des taux de survie de 27 à 37 % ont été obtenus pour

C. racemosa et *C. sessiliflora* respectivement. Deux modes de croissances sont observés : développement direct des primordium foliaires ou callogenèse.

Les facteurs influant sur la cryoconservation des embryons de caféiers ont été étudiés (Engelmann et al. 1995). Divers paramètres peuvent avoir une influence significative sur les possibilités de cryoconservation des embryons zygotiques et somatiques de plusieurs espèces à semences récalcitrantes et intermédiaires telles les caféiers. Les embryons ne doivent être utilisés que si leur état physiologique est optimal, notamment en ce qui concerne leur degré de maturité et leur état métabolique. La modification des conditions de reprise peut grandement améliorer le taux de survie des embryons zygotiques. Dans certains cas, une préculture sur un milieu à forte concentration en saccharose est nécessaire pour induire la tolérance à la dessiccation et à la cryoconservation.

La manipulation des embryons zygotiques excisés des graines avant leur congélation reste cependant difficile et nécessite de nombreux équipements. De plus, seuls de petits effectifs peuvent être traités simultanément. Face à ce constat, des essais de cryoconservation de graines entières ont été tentés sur l'espèce *C. arabica* (Dussert et al. 1997). Un taux de germination de 70 % a pu être obtenu après un prérefroidissement à -50°C avant immersion dans l'azote liquide. Toutefois après 3 mois de culture, uniquement 30 % des graines avaient donné des plantules soulignant une faiblesse de l'albumen induite par le froid. Par contre, lorsque les embryons sont extraits de graines cryoconservées par immersion directe dans l'azote liquide sans prérefroidissement le taux de survie atteint 97 % et tous les embryons viables donnent des plantules. L'application de cette procédure à d'autre espèces est en cours de mise en œuvre.

CONCLUSION

Par différentes approches moléculaires, taille du génome, chimie du grain.... la structuration génétique du complexe a été élucidée et des marqueurs sont disponibles pour l'exploitation de l'énorme diversité disponible. Ceci d'autant que les croisements interspécifiques sont mieux maîtrisés et les descendants sélectionnés très tôt. Les techniques de culture *in vitro* et de cryoconservation ont progressé et rendent possible la conservation indéfinie de tout matériel génétique. Les diverses biotechnologies disponibles ont permis des avancées significatives pour l'amélioration génétique des caféiers et la gestion de leurs ressources génétiques et d'une manière plus large pour les plantes pérennes à semences récalcitrantes. Il reste cependant à les faire partager et les rendre plus accessibles aux pays du sud.

Bibliographie

1. ANTHONY F. (1993), Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers : collecte, gestion d'un conservatoire et évaluation de la diversité génétique. TDM 81, ORSTOM, Paris, 320 p.
2. ANTHONY F., LE PIÈRRES D. (1987), La diversité génétique de l'espèce *Coffea congensis* Froehner : évaluation en Côte d'Ivoire de caféiers sauvages originaires de la République centrafricaine. Café Cacao Thé 31:251-266.

3. ANTHONY F., CLIFFORD M.N., NOIROT M. (1992), Biochemical diversity in the genus *Coffea* L. : chlorogenic acids, caffeine and mozambioside contents. Genetic Resources and Crop Evolution 40:61-70.
4. ANTHONY F., DUSSERT S. (1996), Descriptors for coffee (*Coffea* spp. and *Psilanthus* spp.) IPGRI, Rome, Italie, 37 p.
5. BARRE P., NOIROT M., LOUARN J., DUPERRAY C., HAMON S. (1996) Reliable flow cytometry of nuclear DNA content in Coffee trees. Cytometry 24:32-38.
6. BARRE P., LAYSSAC M., D'HONT A., LOUARN J., CHARRIER A., HAMON S., MICHEL N (1998a), Relationship between parental chromosomic contribution and nuclear DNA content in the interspecific hybrids : *C. pseudozanguebariae* and *C. dewevrei*. 96:301-305.
7. BARRE PH., AKAFFOU S., LOUARN J., CHARRIER A., HAMON S., NOIROT M. (1998b), Inheritance of caffeine and heteroside contents in an interspecific cross between a cultivated coffee species *Coffea liberica* var *dewevrei* and a wild species caffeine-free *C. pseudozanguebariae*. Theor Appl Genet, 96:306-311.
8. BERTHAUD J., ANTHONY F., LE PIERRÈS D. (1984), Les caféiers de la Nana. résultats des observations faites en collection en Côte d'Ivoire. Café Cacao Thé 28:3-12.
9. BERTHAUD J., CHARRIER A. (1988), Genetic resources of Coffea. In Coffee Vol 4 : Agronomy. RJ Clarke & R. Macrae Eds. Elsevier Applied Science (London) : 1-42
10. BERTHAUD J. (1986), Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploïdes : évaluation de la richesse génétique des populations sylvestres et de ses mécanismes organisateurs. TD 188, ORSTOM, Paris, 372 p.
11. BERTHOU F., TROUSLOT P., HAMON S., VEDEL F., QUETIER F. (1980), Analyse en électrophorèse du polymorphisme biochimique des caféiers : variation enzymatique dans 18 populations sauvages, variation de l'ADN mitochondrial dans les espèces *C. canephora, C. eugenioides* et *C. arabica*. Café Cacao Thé 24:313-326.
12. BERTRAND-DESBRUNAIS A., NOIROT M., CHARRIER A. (1990), Slow growth in vitro conservation of coffee (*Coffea spp.*) : Influence of low concentration of 6-benzyladenine Plant Cell Tissue & Organ Culture 27:333-339.
13. BERTRAND-DESBRUNAIS A., NOIROT M., CHARRIER A. (1992), Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea spp.*) : 2 influence of reduced concentrations of sucrose and low temperature. Plant Cell Tissue & Organ Culture 31:105-110.
14. CHARRIER A. (1978), La structure génétique des caféiers spontanés de la région malgache (*Mascarocoffea*). Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea). Mémoire ORSTOM 87, 223 p.
15. CHARRIER A., BERTHAUD J. (1975), Variation de la teneur en caféine dans le genre *Coffea*. Café Cacao Thé 19 : 257-264.
16. CLIFFORD MN., GIBSON C.L., RAKOTOMALALA JJ.R., CROS E., CHARRIER A. (1991), Caffeine from green beans of *Mascarocoffea*. Phytochemistry 30:4039-4040.
17. CROS J. (1994), Implications phylogénétiques des variations de l'ADN chloroplastique chez les caféiers. Thèse Montpellier II, 160 p.
18. CROS J., COMBES M.C., CHABRILLANGE N., DUPERRAY C., MONNOT DES ANGLES A., HAMON S. (1995), Nuclear DNA content in the subgenus *Coffea* (*Rubiaceae*) : inter and intra-specific variation in African species. Can J Bot 73:14-20.
19. CROS J., COMBES M.-C., TROUSLOT P., ANTHONY F., HAMON S. CHARRIER A. LASHERMES P (1998), Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *coffea L.*, Mol Phyl Evol 9:109-111.
20. DUSSERT S., CHABRILLANGE N., ANTHONY F., ENGELMANN F., RÉCALT C., HAMON S (1997), Variability response within a coffee (*Coffea* spp.) core collection under slow growth conditions. Plant Cell Reports 16:344-348.
21. DUSSERT S., CHABRILLANGE N., ENGELMANN F., ANTHONY F., HAMON S. (1997), Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica L.*) seeds : importance of the precooling temperature. Cryoletters 18:269-276.
22. ENGELMANN F., DUMET D., CHABRILLANGE N., ABDELNOUR-ESQUIVAL A , ASSY-BAH B., DERREUDRE J., DUVAL Y. (1995), Factors affecting the cryopreservation of coffee, coconut and oil palm embryos. Plant Genetic Resources Newsl. 103:27-31.
23. HAMON S., DUSSERT S., NOIROT M. (1995a), Core collections - accomplishments and challenges. Plant Breeding Abstracts 65:1-8.
24. HAMON S., NOIROT M., ANTHONY F. (1995b), Developing a coffee core collection using the principal components score strategy with quantitative data In Core Collection of Plant Genetic Resources. Eds Hodgkin et al. Wiley-Sayce Publication : 117-126.
25. JOUVE L., ENGELMANN F., CHARRIER A. (1991), Effets de l'hypoxie et de la température sur la conservation *in vitro* de pousses feuillées de *Coffea arabica*. Café Cacao Thé 35:205-210.

26. KY C.L., NOIROT M., HAMON S. (1997), Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans (*Coffea* sp.). J. Agric. Food Chem. 45:786-790.
27. LASHERMES P., COUTURON E., CHARRIER A. (1994a). Doubled haploids of *Coffea canephora* : development, fertility and agronomic characteristics Euphytica. 74:149-157.
28. LASHERMES P., COUTURON E., CHARRIER A. (1994b), Combining ability of doubled haploids in *Coffea canephora*. Plant Breeding 112:330-337.
29. LASHERMES P., CROS J., COMBES M.C., TROUSLOT P., ANTHONY F., HAMONÊS., CHARRIER A. (1996a), Inheritance and restriction fragment length polymorphism of chloroplast DNA in the genus *Coffea* L. Theor. Appl. Genet 93:626-632.
30. LASHERMES P., COMBES M.C., TROUSLOT P., ANTHONY F., CHARRIER A. (1996b), Molecular analysis of the origin and genetic diversity *of Coffea arabica* L. : Implications for coffee improvement. Euphytica 87 : 23-29.
31. LASHERMES P., TROUSLOT P. ANTHONY F., COMBES M.C.,CHARRIER A. (1996c), Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. Euphytica 87:59-64.
32. LASHERMES P., COUTURON E., MOREAU N., PAILLARD M., LOUARN J. (1996d), Inheritance and genetic mapping of self-sterility in *Coffea canephora* Pierre. Theor. Appl. Genet. 93:458-462.
33. LASHERMES P., COMBES M.C., TROUSLOT P., CHARRIER A. (1997). Phylogenic relationships of coffee-tree species as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Theor. Appl. Genet. 94:947-955.
34. LEPIÈRRES D. (1995), Étude des hybrides interspécifiques tétraploïdes de première génération entre *C. arabica* et les caféiers diploïdes. Thèse de l'Univerité de Paris XI, Orsay, 190 p.
35. LOUARN J. (1993), La fertilité des hybrides interspécifiques et les relations génomiques entre les caféiers diploïdes d'origine africaine. Thèse Paris XI Orsay, 190 p.
36. MARI S., ENGELMANN F., CHABRILLANGE N., HUET C., MICHAUX-FERRIÈRE N. (1995), Histocytological study of apices of coffee (*Coffea racemosa* and *C.Êsessiliflora*) *in vitro* plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique. Cryo-Letters 16:289-298.
37. NOIROT M., ANTHONY F., HAMON S. (1996). The principal component scoring - a new method for constituing a core collection. Genetic Resources and Crop Evolution 43·1-6.
38. PAILLARD M., LASHERMES P., PÉTIARD V. (1996), Construction of a molecular linkage map in coffee. Theor. Appl. Genet. 93:41-47.
40. RAKOTOMALALA J.J., CROS E., CLIFFORD M., CHARRIER A. (1992), Caffeine and theobromine in green beans from mascarocoffea. Phytochemistry : 31:1271-1272.

A8 : Les biotechnologies appliquées à l'amélioration génétique et la propagation du Cacaoyer au Mexique

LOPEZ-BAEZ O.[1], FRAIRE-VAZQUEZ G.[1], HERNANDEZ-VELASCO B.[1], HOLGUIN-MELENDEZ F.[1], CUETO-MORENO J.[1], CROUZILLAT D.[2]

[1] INIFAP CE Rosario Izapa, km 18 route à Cacahotan, Tapachula. 30700, Chiapas, Mexique. B.P. 96. tél./fax 52 (962) 3 01 54.

[2] Centre de recherche Nestlé-Tours. 101 av. Gustave Eiffel, Notre-Dame d'Oe. B.P. 9716. 37097 Tours cedex, France. tél./fax: 47 49 14 14.

INTRODUCTION

Originaire de l'Amérique tropicale, le cacaoyer *Theobroma cacao L.* est un arbre dont les graines fournissent le produit alimentaire consommé sous le nom de chocolat. De plus, le beurre contenu dans les fèves a des applications dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

Le cacaoyer est un produit important du commerce mondial et a un rôle très important dans l'économie de près de 45 pays.

Au Mexique, la superficie plantée est de 90 000 hectares avec une production annuelle de 41 000 tonnes de fèves. Les rendements moyens de cacao marchand par hectare restent très faibles : 300-400 kg.

La production cacaoyère se trouve en général affectée par trois grandes contraintes :

a) La maladie de la « pourriture brune » causée par *Phytophthora palmivora.*

b) La culture de variétés de bas potentiel productif.

c) L'âge des plantations, dont environ 80 % ont plus de 40 ans.

Due aux problèmes posées par la culture et la multiplication des variétés améliorées, l'Institut National des Recherches Agronomiques et Forestières (INIFAP) du Mexique, développe un programme de recherche à la station de Rosario Izapa, en Tapachula, Chiapas.

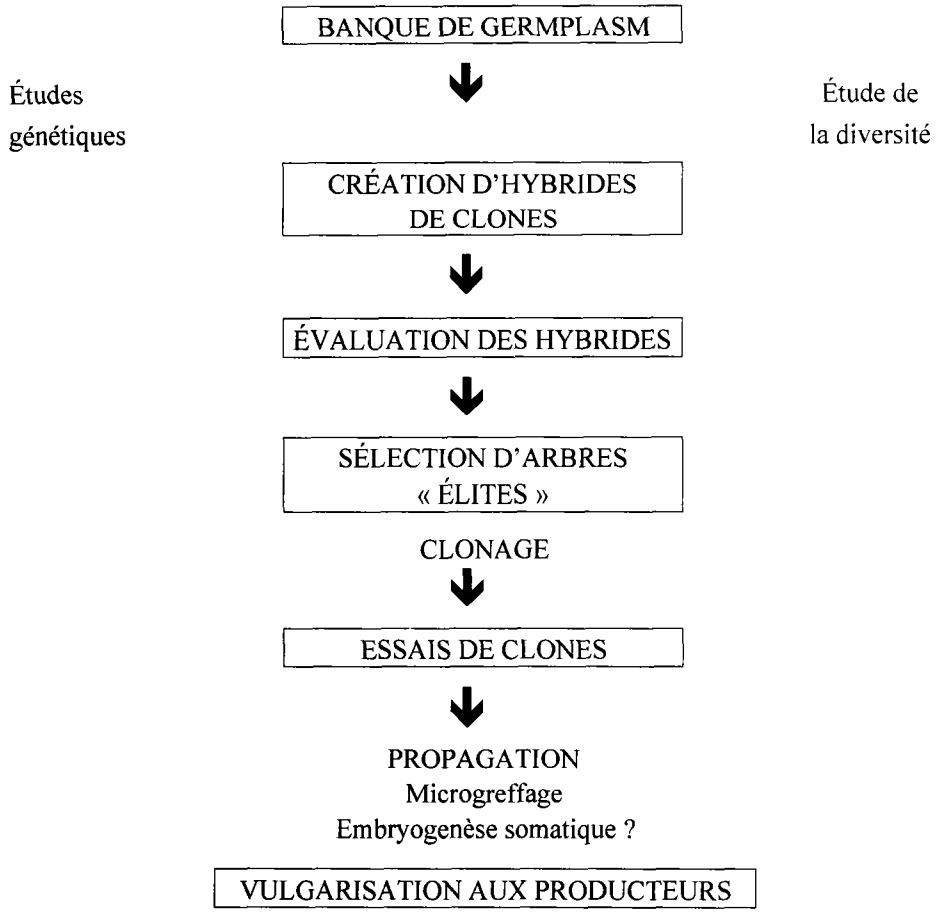
Les objectifs de ce programme sont l'augmentation du rendement, l'amélioration de la résistance aux maladies, et la qualité des fèves. Dans cette communication sont présentés les progrès obtenus dans ce programme de recherche.

LA STRATÉGIE D'AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE

La stratégie d'amélioration et de sélection appliquée chez le cacaoyer est schématisée dans la **figure 1**. Elle est basée sur la création de descendances F1 ou « hybrides de clones », suivie de la sélection individuelle des meilleurs arbres pour la formation de clones qui sont évalués dans des essais clonaux.

Ce schéma comporte différentes étapes fondamentales, qui sont : l'établissement d'une collection et son étude ; l'hybridation et l'évaluation des descendances interclonales, la sélection clonale et la propagation végétative des meilleurs clones.

Figure 1. Stratégie d'amélioration génétique et sélection de cacaoyer au mexique.



ÉTAT ACTUEL DES TRAVAUX ET RÉSULTATS

Le germoplasme et son étude

La collection de germoplasme du cacaoyer de l'INIFAP comporte 175 clones venant de 9 pays d'Amérique. Elle est conservée sous forme de collection vivante dont les individus sont multipliés par bouturage.

L'étude de cette collection comprend : la description des caractères de la cabosse et de la fève ; l'analyse RFLP de l'ADN nucléaire et la réaction de sensibilité à *Phytophtora palmivora*. La caractérisation botanique a été initiée en 1994, les résultats de la variation des caractères de la cabosse et de la fève, obtenus sur 105 clones, sont présentés dans le **tableau 1**, et sont indicatifs d'une forte variabilité pour ces caractères.

Tableau 1 : Caractère de la cabosse et de la feve de 105 clones de la collection de l'INIFAP. 1997.

CARACTERE	C.V.	VAL. MAX.	GENOTYPE	VAL. MIN.	GENOTYPE
Cabosse					
Poids	19.3	778.7	ICS-1	287.8	SCA-6
Longueur	14.3	24.7	RIM-13 RIM-68	12.3	SIAL-93
Diamètre	7.3	9.6	EET-94	6.5	SCA-6
Fèves					
No. par cabosse	13.4	44.8	IMC-67	22.1	Esm. Amar.
Poids frais	19.1	205.7	UF-11	74.9	SCA-6
Poids sec	21.3	1.76	UF-12	0.57	SCA-6
Teneur en coque	22.2	11.8	RIM-223	4.0	9-TAB-986

VAL. MAX = Valeur maximale.
VAL. MIN = Valeur minimale.
C V = Coefficient de Variation.

Une comparaison des clones basée sur leurs origines, permet d'établir que les clones Mexicains, en général, présentent de cabosses et de fèves avec des valeurs supérieures à la plupart des clones importés.

L'analyse RFLP du germoplasme a été initiée en 1996. L'ADN génomique a été obtenu à partir de feuilles fraîches ; pour l'hybridation, 5 picogrammes de chaque échantillon ont été digérés par l'enzyme de restriction Hind III. L'analyse, encore incomplet, montre que d'un groupe de 30 sondes RFLP, appliquées sur 124 clones, 29 d'entre elles (9 7%) permettent de distinguer le polymorphisme présent dans ce groupe, en générant 56 bandes polymorphes. Le polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN permet de différencier 77 des 124 génotypes étudiés.

Les génotypes restants (47) sont séparés en 6 groupes ; chaque groupe comporte un certain nombre de clones où il n'a pas été possible d'établir de différences au niveau des génotypes.

L'intégration des données botaniques et moléculaires dans une analyse comprenant l'ensemble des génotypes, encore incomplète, montre que les génotypes Mexicains constituent, excepté pour certains clones prospectés dans la Forêt « Lacandona », une population à base génétique réduite et s'apparentant aux génotypes du Guatémala.

D'autre part, des génotypes provenant du Brésil, d'Équateur, du Costa Rica et du Pérou apparaissent très divergents. Ces résultats confirment ainsi des études précédentes faites sur du matériel Mexicain et suggèrent d'augmenter la diversité de la collection de germoplasme de l'INIFAP, par l'importation ainsi que par de nouvelles prospections dans la forêt et dans des anciennes plantations.

L'évaluation de la réaction du germoplasme à *Phytophthora palmivora* est réalisée par l'inoculation de fruits âgés de 3 mois, qui restent attachés à la plante. Le fruit est inoculé au centre, en deux points opposés, chaque point avec une goutte contenant environ 24,000 zoospores. Pour chaque clone un échantillon minimum de 15 fruits est utilisé. Les observations du taux de fruits infectés et du diamètre moyen de la tache de tissu nécrosé, sont faites six jours après inoculation. En prenant le diamètre de la tache, comme critère de sélection, un clone est considéré résistant lorsque cette valeur est inférieure à 2 cm.

Les résultats obtenus sur 60 clones évalués, indiquent que 38 présentent une réaction de résistance, car leur diamètre ne dépasse pas la valeur limite. Le classement de ces clones est présenté dans le **tableau 2**. Parmi les plus résistants on peut signaler : SCA-6, EET-400, 9-TAB-986, 12-TAB-986, CHUAO-120, 8-CHI-986, SPA-9, SCA-12, POUND-7, UF-705, EET-48, et CC-225.

Tableau 2. Clones de cacaoyer de la collection de l'INIFAP résistants à *P. palmivora.*

GENO TYPE	DIAM. DE LESION	INFECTION %	GENO TYPE	DIAM.DE LESION	INFECTION %
SCA-6	0	0	ICS-1	0.91	100
9-TAB-986	0	0	RIM-24	1.01	61
CHUAO-120	0	0	PA-121	1.01	100
8CHI-986	0	0	RIM-88	1.07	49
12-TAB-986	0	0	EET-59	1.64	100
SGU-85	0	0	STA CLARA-3	1.13	100
UF-705	0	0	RIM-228	0.81	100
CC-225	0	0	ESM.AMAR	1.02	100
EET-400	0.01	5	IQ-1	1.04	100
EET-95	0.02	10	SIAL-407	1.11	100
EET-48	0.03	9	EET-164	1.13	86
SPA-9	0.04	17	EET-399	1.60	25
SCA-12	0.08	5	NA-34	1.16	93
POUND-7	0.09	25	RIM-105	1.16	67
EET-376	0.03	51	CATIE-1000	1.80	95
RB-46	0.11	100	EET-94	1.79	100
RB-41	0.2	62	UF-296	1.22	100
PORCEL-3	0.42	100	UF-667	1.35	64
PA-13	1.67	67	PI-1963	1.76	100
PA-169	0.56	100	ICS-6	1.53	100
EET-164	0.71	86	PI2-1962	1.54	100
OC-77	1.92	100	SIAL-56	1.76	100
CC-210	1.74	100			

ÉVALUATION ET SÉLECTION D'HYBRIDES INTERCLONAUX

La sélection générative, c'est-à-dire la création et l'évaluation d'hybrides interclonaux a débuté en 1984. À partir de cette année, 66 croisements ont été testés à partir d'essais comparatifs installés entre 1984 et 1988.

Les essais d'hybrides sont implantés suivant un dispositif statistique en randomisation totale mono-arbre. Contrairement aux essais d'hybrides, les essais de clones sont plantés suivant un dispositif en blocs au hasard dont chaque unité est composée de 8 plantes.

Les principaux résultats de cette étape apportent les informations sur la vigueur, la précocité en production, le rendement et la sensibilité au *Phytophthora*. L'analyse de la production montre une forte vigueur hybride pour la croissance, la précocité et le rendement. Plus de 48 % des hybrides testés sont supérieurs à l'*amelonado* régional cultivé par les paysans. Les hybrides les plus producteurs sont généralement aussi les

plus précoces, avec un début de production à partir de la deuxième année après plantation et une entrée en pleine production cinq ans après plantation, soit environ 3 ans avant les *amelonados* locaux. La production des meilleures familles se situe autour de 1,5 à 2 tonnes de cacao marchand. Les meilleures descendances ont été obtenues lorsque les clones importés POUND-7, SCA-6, EET-48, EET-59, CC-266 sont croisés aux clones Mexicains RIM-2, RIM-23, RIM-48 et RIM-75.

Les meilleurs arbres sélectionnés à partir des premiers essais d'hybrides ont été clonés et mis en essai de confirmation au champ depuis 1995. Dans le **tableau 3** sont présentés les rendements par plante par an des 15 meilleures sélections ; parmi les plus productrices on peut noter les sélections 8 ; 9 ; 12 ; 20 ; 21 et 24 ; certaines d'entre elles avec des rendements qui sont supérieurs à 2 kg par arbre par an. Ce matériel végétal constitue la prochaine sortie variétale et pourra être mis à la disposition des planteurs d'ici à trois ans.

Tableau 3 : caractéristiques des arbres élite sélectionnés dans de familles d'hybrides.

GÉNOTYPE	No. DE SÉLECTION	REND. ANNUELLE g	POIDS DE FÈVES SÈCHES (g)
CC-210 x RIM-23	1	1256	0.86
CC-210 X RIM-75	4	612	0.96
CC-210 X RIM-75	5	1228	1.12
SCA-6 X RIM-2	8	2460	0.64
SCA-6 X RIM-2	9	2504	1.04
POUND-7 X EET-48	12	3744	0.97
POUND-7 X RIM-2	13	672	1.3
EET-59 X CC-266	16	1980	1.12
POUND-7 X RIM-23	20	2728	1.01
IMC-67 X RIM-23	21	2652	1.0
SCA-6 X RIM-75	24	3240	0.98
SCA-6 X RIM-75	25	1088	0.88
SCA-6 X RIM-23	27	1984	0.88
POUND-7 X RIM-75	30	1032	1.22
POUND-7 X RIM-75	31	1244	1.12

Des études pour évaluer le comportement vis-à-vis du *Phytophthora* des clones sélectionnés sont en cours. Des résultats préliminaires indiquent la présence de hauts niveaux de résistance au pathogène dans ces descendances.

En même temps, des parcs à bois des meilleures sélections sont mis au champ maintenant afin d'appuyer la multiplication végétative en masse.

CARTOGRAPHIE DES GÈNES D'INTÉRÊT AGRONOMIQUE

La mise en évidence d'une liaison entre un caractère et un marqueur, ainsi que sa cartographie, constitue l'étape préliminaire pour la mise en place d'une sélection assistée par marqueurs moléculaires. Cette stratégie d'association des marqueurs QTL à des caractères agronomiques a été déjà mise en place pour d'autres populations de cacaoyer.

Avec cette base, une population ségrégeante de 500 plantes obtenues à partir du croisement entre le clone POUND-7 (Péruvien, Forastero, auto-incompatible,

fortement résistant au Phytophthora) et le clone RIM-76A (Criollo, Mexicain, sensible au Phytophthora, auto-compatible) a été établie au champ en 1996, en deux localités. Sur cette population, deux caractères agronomiques (diamètre du tronc et hauteur de la couronne) ont été déjà évalués 7 mois après la plantation ; l'analyse des QTL pour ces caractères commencera bientôt.

Dans l'avenir, on envisage l'étude d'autres caractères d'intérêt agronomique tels que le rendement, le nombre d'ovules par ovaire, la réaction à *Phytophthora*, le poids des fèves, le contenu de matière grasse, entre autres.

PROPAGATION DES VARIÉTÉS AMÉLIORÉES

Pour la multiplication des meilleurs clones, une technique de propagation par microgreffage en plantule a été mise au point; ce procédé est caractérisé par :

- L'utilisation d'une plantule âgée de 10-15 jours comme porte-greffe.
- L'utilisation de porte-greffes à génotypes compatibles avec les greffons ; après évaluation d'un certain nombre, les clones POUND-7, EET-48, SPA-9, EET-59, et CC-210 ont été retenus.
- Le greffage pratiqué est la greffe en écusson dont le bourgeon déjà « démarré » a entre 1 et 2 mm de longueur.
- Le succès de cette voie de propagation oscille entre 60 et 80 % et la reprise de la croissance du bourgeon est très rapide ; 4 mois après le greffage de plantes prêtes à être plantées au champ sont obtenues.

Un essai préliminaire d'adaptation pour la production en masse de plantes par cette voie de propagation montre qu'un rendement moyen de 10 000 plantes est possible tous les mois.

À partir de résultats obtenus auparavant concernant l'induction d'embryogenèse somatique à partir des explants de tissu maternel, des expériences en cours, sont orientées vers l'adaptation de ce protocole aux génotypes sélectionnés par l'INIFAP.

À présent, des pièces florales de 4 génotypes ont été mises en culture en suivant un protocole d'induction-expression dans un milieu « MS » complémenté avec 2,4-D et kinétine à diverses concentrations. Les premiers résultats montrent la formation de tissu à aptitude embryogène à partir de pétales et de staminodes dans un génotype. Les premiers embryons obtenus ont été transférés dans d'autres milieux afin de poursuivre leur germination et leur conversion en plantules *in vitro* ; jusqu'au présent leur développement semble être normal.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus jusqu'à présent, même s'ils sont encore incomplets, apportent des progrès remarquables qui pourraient être utiles pour la revalorisation de la culture du cacaoyer dans les régions tropicales du Mexique.

La description morphologique complétée par les marqueurs moléculaires a révélé un polymorphisme très important et permet une bonne caractérisation de la majorité de clones étudiés.

La diversité observée dans la collection s'avère relativement élevée. Cette base génétique actuellement disponible, pour le moment, apparaît suffisante pour le développement d'un programme d'amélioration génétique basé sur l'obtention d'un effet hétérosis entre des génotypes éloignés génétiquement. L'estimation des distances génétiques entre les clones pourrait permettre d'obtenir des effets d'hétérosis en évitant de croiser des individus génétiquement trop proches.

En ce qui concerne l'hybridation, les descendances testées ont une vigueur et une précocité tout à fait remarquables ; leur première récolte intervient deux ans après leurs plantations. Ils montrent un potentiel de rendement de 1,5 à 2 tonnes de cacao marchand à l'hectare, en conservant un haut niveau de résistance au *Phytophthora*, ce qui dépasse largement la production des cacaoyers cultivés traditionnellement dont les rendements oscillent entre 300 et 400 kg à l'hectare en plantation adulte. Ces clones améliorés pourraient être mis à la disposition des planteurs bientôt.

D'autre part, dans le cas du cacaoyer, plante pérenne, allogame, à long cycle, la sélection assistée par marqueurs moléculaires permet d'envisager un certain nombre d'applications. Une nouvelle voie de recherche en cours, intégrant l'utilisation des marqueurs QTL pour la résistance à Phytophthora et d'autres caractères agronomiques devrait permettre d'associer des caractères intéressants avec des marqueurs et de cette manière initier une sélection plus efficace.

Par ailleurs, les résultats obtenus sur la propagation par microgreffage et l'extrapolation du protocole d'induction d'embryogenèse somatique à partir de pièces florales sont très encourageants, car une application très importante du clonage, soit par microgreffage soit par embryogenèse somatique, serait la multiplication végétative d'arbres élite « F1 » sélectionnés parmi les produits de croisements contrôlés entre clones.

Une amélioration de la production peut être directement acquise par le clonage des meilleurs individus sélectionnés dans des familles d'hybrides ; cela conduirait à des variétés cultivées sous forme de populations où les combinaisons favorables manifestant le plus d'hétérosis seraient directement multipliés et exploités.

Ainsi, le microgreffage et l'embryogenèse somatique peuvent engendrer des modifications fondamentales aux stratégies de sélection et de multiplication du cacaoyer par une meilleure exploitation des possibilités offertes par le clonage, surtout pour les caractères de résistance aux maladies et qualité de fèves.

De plus, la maîtrise de la régénération par embryogenèse somatique ouvre les voies à de nombreuses applications comme la transformation génétique, la création de variation somaclonale, l'hybridation somatique et la mutagenèse induite, lesquelles constituent des opportunités importantes pour l'amélioration génétique du cacaoyer.

Les résultats obtenus jusqu'à présent, constituent un progrès très important et établissent les bases pour que de nombreuses études d'intérêt fondamental ou appliqué chez le cacaoyer puissent être réalisées concernant l'amélioration, le determinisme du contrôle génétique des caractères et la régénération par embryogenèse somatique *in vitro*.

Bibliographie

1. CROUZILLAT D., LERCETEAU E., PETIARD V., MORERA J., RODRIGUEZ H., WALKER D., PHILLIPS W., RONNING C., SCHNELL R., OSEI J., FRITZ P. (1996), *Teobroma cacao* L. : a genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. Theor. Appl. Genet. 93:205-214.
2. ENGELS J.M.M., BARTLEY B.G.D., ENRIQUEZG.A. (1980), Cacao descriptors, their status and *modus operandi*. Turrialba (Costa Rica) 30:209-218.
3. LERCETEAU E. 1996. Diversité génétique, recherche de QTL et analyse des profils protéiques de fèves de *Theobroma cacao* L. pendant la fermentation. Consequences sur la qualité. Tesis de Docteur en Sciences de l'Université Paris XI Orsay. 257p.

4. LÓPEZ B.O.Y., MÉNDEZ W.D. (1992), Características de la flor y la semilla del germoplasma de cacao *Theobroma* cacao L. selectionado en Rosario Izapa, Chiapas Agricultura Técnica en México 18 (1):39-48.
5. LÓPEZ B.O., MULATO B.J.Y., LÓPEZ A.I. (1992), Recursos fitogenéticos del cacao *Theobroma* cacao L. disponibles en México. Agricultura Técnica en México 18 (1):25-38.
6. LÓPEZ B.O. (1994), Embryogenèse somatique et régénération de plantes de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales. Tesis de Docteur en Sciences de l'École Nationale Supérieure Agronomique de Rennes. Rennes, France. 137 p.
7. LÓPEZ B.O. (1995), Características del fruto del germoplasma de cacao *Theobroma cacao* L. seleccionado en Rosario Izapa, Chiapas, México. Agricultura Técnica en México 21 (2):127-137.
8. LÓPEZ B.O., CUETO M.J., FRAIRE V.G. (1995), Progress in cocoa *Theobroma* cacao L. breeding in Mexico. *In* : Internacional Workshop on Cocoa Breeding Strategies, 18-19 oct. 1994, Kuala Lumpur, Malaysia. Proceedings : 18-25.
9. LÓPEZ B.O., FRAIRE V.G.Y., CUETO M.J. (1996), Breeding for genetic resistance to *Phytophthora disease* in Mexico. *In :* International Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement. INGENIC, 25-26 november, Salvador, Bahía, Brasil. Abstracts.
10. RABOIN L.M., PAULIN D., CILAS C., ESKES A.B. (1993), Analyse génétique de quelques caractères quantitatifs des fleurs du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Leur intérêt pour l'évaluation de la diversité de l'espèce. Café Cacao Thé 37 (4):273-282.
11. ZADOKS J.C. (1996). Phytopathological aspects of disease resistance and resistance breeding in cocoa : an external review. *In*: International Workshop on the contribution of disease resistance to cocoa variety improvement, 25-26 nov., Salvador, Bahia, Brasil. Abstracts: 6-7.

A9 : Micropropagation clonale par embryogenèse somatique du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq). Programmes de recherche liés au transfert d'échelle

RIVAL A.[1], ABERLENC-BERTOSSI F.[1], MORCILLO F.[1], TREGEAR J.[1], VERDEIL J.-L.[1], DUVAL Y.[1], DURAND-GASSELIN T.[2], KONAN E.K.[2], KOUAME B.[2]

[1] CIRAD-CP/ORSTOM - Laboratoire de Ressources Génétiques & Amélioration des Plantes Tropicales. B.P. 5045, 34032 Montpellier, Cedex 01, France.

e-mail : rival@orstom.fr

[2] IDEFOR/DPO - Station Principale de La Mé. 13 BP 989 Abidjan, Côte d'Ivoire.

INTRODUCTION

La micropropagation clonale du palmier à huile (*Elaeis guineensis Jacq*) par embryogenèse somatique a été obtenue par diverses équipes de recherche à travers le monde (Corley et al., 1977 ; Pannetier et al., 1981 ; Paranjothy, 1984). Les protocoles de multiplication végétative *in vitro* ainsi établis ont conduit à la production de plusieurs millions de vitroplants clonaux à ce jour. Les avantages de cette stratégie pour les programmes d'amélioration variétale ont été bien établis sur un plan théorique (Soh, 1986 ; Meunier et al., 1988). Ils ont été validés par l'étude du comportement au champ des régénérants sur plus de 2 500 ha de plantations clonales (Duval et al., 1995, 1997).

Le changement d'échelle opéré à partir du début des années 80 a permis de mettre en évidence plusieurs facteurs qui limitent encore aujourd'hui le développement commercial du procédé de micropropagation.

Les contraintes identifiées lors du changement d'échelle ont ainsi été à l'origine de programmes de recherche fondamentale dans les domaines de la physiologie de la plante et de la semence, ainsi que de la biologie moléculaire.

Le but du présent article est de présenter les différentes étapes franchies par le groupe ORSTOM/CIRAD/IDEFOR, et ses partenaires dans les pays producteurs, lors du développement à l'échelle pilote d'un protocole de micropropagation du palmier à huile par embryogenèse somatique.

MISE EN PLACE D'UN PROCÉDÉ DE PRODUCTION

Le clonage du palmier à huile (*Elaeis guineensis Jacq*) est réalisé par embryogenèse somatique sur des cals d'origine foliaire, à l'aide du protocole décrit précédemment (Pannetier et al., 1981, Duval et al., 1995). La callogenèse est obtenue à l'obscurité (27°C) sur un premier milieu de culture contenant du 2,4-D. Après 12 à 20 semaines, les cals sont isolés et transférés sur un nouveau milieu appauvri en auxines. Les formations embryogènes se développent à la surface des cals après un délai de culture variable. Elles sont ensuite isolées et transférées sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance. Dans les cas favorables, une embryogenèse adventive se met en place et

conduit à une prolifération indéfinie des cultures d'embryons. On obtient donc des cultures polyembryoniques stabilisées, dans lesquelles les embryons somatiques les plus âgés se développent en pousses feuillées, qui sont isolées manuellement et transférées sur un milieu d'enracinement. Ce milieu, enrichi en auxines permet un enracinement *in vitro* des pousses feuillées en 8 semaines environ. Les plantules obtenues sont ensuite sevrées sous tunnel d'acclimatation durant un mois, puis transférées en pré-pépinière. Elles subissent alors les mêmes traitements que les plantules issues de semis.

Les transferts de technologie à partir du Laboratoire de recherche vers les unités de production à l'échelle pilote ont été initiés en 1982. Un laboratoire, conçu pour une capacité de production annuelle de 250 000 vitroplants a été construit à l'IDEFOR-DPO (Côte d'Ivoire). En 1985-86, deux autres Laboratoires basés sur le même modèle furent ouverts en Indonésie, chez des partenaires du secteur privé (SOCFINDO) et public (IOPRI - Indonesian Oil Palm Research Institute). Simultanément, une unité semblable était installée en Malaisie, en collaboration avec une agence nationale de développement (FELDA - Federal Land Development Authority). Une filiale de droit privé du CIRAD fut créée (TROPICLONE S.A.) en 1987 et un laboratoire de production construit en France, dans les environs de Montpellier.

ÉVALUATION DU PROCÉDÉ PILOTE EN CÔTE D'IVOIRE

Depuis 1981, les chercheurs de l'IDEFOR-DPO (Institut des Forêts - Département des Plantes Oléagineuses) conduisent des recherches en collaboration avec l'ORSTOM et le CIRAD-CP, au sein du Laboratoire de Multiplication Végétative de la Station Principale de La Mé. Le protocole de régénération a été évalué sur une grande échelle grâce a un programme soutenu de plantation d'essais clonaux. Après plus de quinze ans d'activité, le laboratoire de l'IDEFOR-DPO a acquis une somme considérable de données sur les performances du procédé (Duval et al., 1995, 1997, Konan et al., 1996).

Depuis l'ouverture du Laboratoire, 496 palmiers ont été clonés, appartenant à diverses origines génétiques, incluant des individus pisifera, des rétrocroisements [*Elaeis guineensis* x (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*)] et des individus clonaux. Tous les palmiers prélevés ont fourni des cals sur explants foliaires en suivant le procédé de micropropagation standard. Le taux de callogenèse varie en fonction de l'origine génétique de la plante mère. En outre, pour un croisement donné, les taux de callogenèse varient considérablement, avec des coefficients de variation compris entre 20 et 175 %. Sur l'ensemble des palmiers clonés, 82 % ont présenté au moins une fois une embryogenèse somatique effective. Ce phénomène est extrêmement lent (jusqu'à deux ans) et demeure difficile à maîtriser. À ce jour, le Laboratoire a produit plus de 750 000 plants à partir de 216 clones. La surface totale plantée en clones en Côte d'Ivoire (essais génétiques + plantations commerciales) atteint 800 hectares.

Sur les 22 clones plantés en essais en Côte d'Ivoire, 16 présentent des rendements en huile à l'hectare supérieurs au matériel témoin issu de reproduction sexuée (L2T x D10D). Les gains de productivité sont de 10 à 54% pour ces clones. En outre, 15 clones produits par les laboratoires SOCFINDO, IOPRI et ORSTOM ont montré des rendements supérieurs de 8 à 44 % à ceux du témoin. La mise en évidence au champ de clones à très haut potentiel confirme les prévisions théoriques réalisées par les sélectionneurs (Soh, 1986 ; Meunier et al., 1988) sur l'intérêt de multiplier végétativement les individus d'élite sélectionnés dans les tests de descendance.

Toutefois, le changement d'échelle effectué dans les différentes unités pilotes a mis en évidence divers obstacles à la diffusion du protocole.

FACTEURS LIMITANTS

Le changement d'échelle effectué au cours des années 1980-1990, en collaboration avec différents partenaires et sur des lieux de production différents, a révélé partout les mêmes contraintes. Les principaux facteurs limitants ont été identifiés dans deux domaines majeurs : les coûts de production et la conformité génétique des régénérants.

Coûts de production

Les protocoles de culture *in vitro* sont, d'une manière générale, extrêmement lents chez les palmacées, chaque étape nécessitant des délais bien supérieurs à ceux observés chez d'autres espèces. Ces caractéristiques ont été également décrites chez le cocotier (*Cocos nucifera L.*) par Verdeil & Buffard-Morel (1995). En moyenne, 18 mois sont nécessaires entre le prélèvement du plant mère et la sortie ex-agar des premiers lots de production de plantules (Duval et al., 1995). Ces caractéristiques ont un impact négatif sur les coûts de production, en augmentant le taux d'occupation des infrastructures et donc les frais fixes. En outre, le procédé dans son ensemble reste exigeant en main d'œuvre, car plusieurs étapes font appel à des opérations manuelles extrêmement délicates (sélection et isolements des cals, choix des structures embryogènes compétentes, séparation des pousses feuillées avant induction racinaire,...). Ces coûts de production élevés ne permettent pas d'abaisser le prix de vente des vitroplants en deçà de 7 fois le prix des semences hybrides améliorées (soit 3 à 5 US$ par plant). En outre, le protocole de régénération en cours aujourd'hui ne permet pas une production à grande échelle, c'est-à-dire de l'ordre de 10^4-10^5 plants par clone et par an. Très peu de clones peuvent actuellement offrir une production annuelle de l'ordre de 10^4 plants. Pour un clone donné, la gestion des cultures et la stratégie de production déterminent à elles seules la disponibilité en vitroplants pour l'acheteur. Par conséquent, la demande doit s'adapter aux contraintes de la production, ce qui n'est évidemment pas acceptable d'un point de vue commercial.

Conformité des régénérants

Les essais clonaux ont révélé la présence de palmiers variants, avec une fréquence moyenne de 5 %, dans les populations de régénérants (Duval et al., 1995). Ces variants présentent une anomalie du développement floral, initialement appelée « mantled » par Corley et al. (1986). Elle se caractérise par une féminisation des pièces florales mâles chez les fleurs des deux sexes. Deux des verticilles internes sont modifiés, et leur développement conduit à une altération de la morphogenèse des fruits qui montrent alors des carpelles surnuméraires en lieu et place des étamines vestigiales entourant normalement la drupe. Le fruit prend alors un aspect mantelé (ou « mantled » en anglais). La gravité du phénomène est variable ; elle peut n'avoir qu'une faible incidence sur la production d'huile si elle n'empêche pas la nouaison (c'est le cas pour l'anomalie « légère ») mais elle conduit à un avortement partiel ou total dans les cas d'anomalie « grave ». La détection précoce des variants somaclonaux de type « mantled » revêt donc une importance considérable pour le développement commercial du procédé de régénération.

PROGRAMMES DE RECHERCHE EN COURS

Suspensions embryogènes

Des progrès considérables ont récemment été réalisés dans le domaine de la production de plants par embryogenèse somatique, grâce au développement de systèmes basés sur le concept de « semences artificielles » (Redenbaugh, 1993). Le phénomène d'embryogenèse somatique est alors employé pour la production à grande échelle d'embryons individualisés qui présentent un développement relativement synchrone. Le développement des embryons peut être stoppé à un stade donné, soit en suivant la procédure naturelle d'entrée en quiescence (telle qu'on la rencontre chez l 'embryon zygotique), soit en usant de méthodes artificielles, telles que le stockage à basse température. Les embryons somatiques, qui sont le plus souvent encapsulés dans un gel nutritif/antifongique, sont par la suite utilisés comme de semences classiques, et semés in vitro ou directement en sol (Fujii et al., 1992).

Des suspensions embryogènes de palmier à huile ont été obtenues et décrites par plusieurs auteurs (De Touchet et al., 1991 ; Teixeira et al., 1995) dans le but de développer des systèmes de micropropagation à grande échelle qui soient potentiellement automatisables (voir Bajaj, 1991, revue). À ce jour, des suspensions embryogènes ont été isolées pour plus de 20 clones. La concentration en structures embryogènes est de l'ordre de 10^5 par litre, avec un taux de multiplication moyen de 4 par mois de culture. Les caractéristiques de ces suspensions permettent donc d'envisager leur utilisation pour la micropropagation à grande échelle du palmier à huile. D'après Sondahl (1991), la multiplication des suspensions embryogènes en bioréacteur expérimental est possible. Les premiers palmiers produits par suspensions embryogènes sont aujourd'hui en cours d'évaluation au champ en Côte d'Ivoire.

Les plantules issues d'embryons somatiques isolés sont généralement moins vigoureuses que celles issues de la germination de l'embryon zygotique dans la graine. Ce relatif manque de vigueur peut être la conséquence d'une maturation incomplète des embryons somatiques in vitro (Crouch, 1982). Les protéines de réserve de l'embryon zygotique constituent des marqueurs d'intérêt pour l'évaluation du degré de maturité et donc d'aptitude à la dessiccation des embryons somatiques (Redenbaugh et al., 1986). Chez le palmier à huile, nos recherches ont pour but la compréhension des phénomènes régissant l'accumulation des protéines de réserve dans le but de : i) améliorer la vigueur des plants régénérés à partir des suspensions embryogènes précédemment décrites, et ii) pouvoir réaliser une conservation à moyen terme des embryons à température ambiante, sous forme de semences artificielles encapsulées (Mc Kersie et al., 1995) ou par cryoconservation (Engelmann, 1991; Dumet et al., 1993). Les recherches récentes effectuées dans notre groupe (Morcillo et al., 1997) ont démontré que les globulines de type 7S, qui sont les protéines de réserve majeures chez le palmier à huile, peuvent être utilisées comme marqueurs de la maturation chez les embryons zygotiques de palmier à huile.

Par ailleurs, les oligosaccharides ont été également impliqués dans l'acquisition de la tolérance à la dessiccation chez les embryons (Leprince et al., 1993). Ces composés (raffinose et stachyose) jouent un rôle très important dans la création d'un état vitreux du contenu cellulaire au cours de la dessiccation ; ils assurent ainsi la protection de la structure cellulaire contre la cristallisation des solutés. Le rapport [saccharose/(raffinose + stachyose)] peut être donc considéré comme un indicateur fiable de la capacité des embryons à supporter une dessication partielle. Chez les embryons zygotiques de palmier, ce rapport décroît brutalement, de 68 à 14, entre le 3^e et le 4^e mois après fécondation, et il chute jusqu'à 5,2 au 6^e mois (Aberlenc-Bertossi et

al., 1995 ; Chabrillange et al., 1996). Chez les embryons somatiques, la résistance à la dessication a pu être améliorée à l'aide de traitements *in vitro* à l'ABA et au saccharose, appliqués en fin de phase de maturation.

Physiologie du vitroplant

Les pertes subies lors de l'acclimatation des vitroplants ont une influence directe sur les coûts de production, car elles interviennent en fin de procédé, lorsque le plant a déjà acquis une valeur importante. Un programme de recherche visant à connaître le statut physiologique du matériel régénéré et son évolution lors du sevrage a été initié dans notre équipe (Rival *et al.*, 1994, 1996, 1997a,e). Ces travaux ont permis de mettre en évidence une activité photosynthétique se manifestant très précocement au cours du développement *in vitro* du plant. Les pertes au sevrage devaient donc être attribuées plutôt à des problèmes de gestion des cultures (qualité de l'enracinement, degré de développement des plants destinés à l'acclimatation) qu'à la qualité intrinsèque du matériel produit.

Les phénomènes physiologiques contrôlant l'enracinement *in vitro* chez le palmier à huile ont été étudiés (Rival *et al*, 1997b). Le suivi de l'activité péroxydasique totale au cours des phases d'induction/expression a permis de fixer les conditions de culture permettant des taux d'enracinement satisfaisants (85-95%) pour l'ensemble des clones produits.

Conformité génétique

• *Marqueurs biochimiques de l'anomalie « mantled »*

Plusieurs marqueurs biochimiques potentiels destinés à la détection précoce de l'anomalie « mantled » dans les cals ou les vitroplants ont été évalués. Ainsi, nous avons procédé à la recherche de marqueurs protéiques dans les cals de prolifération (Marmey et al., 1991), par analyse des profils électrophorétiques des différents types de cals. En outre, la teneur en régulateurs de croissance endogènes (cytokinines) a été évaluée en relation avec la variation somaclonale (Besse et al., 1992). Cependant, il a été extrêmement difficile de tester la validité de ces marqueurs à grande échelle, en raison soit du manque de répétabilité (dans le cas des marqueurs protéiques), soit du coût très élevé (dans le cas des cytokinines endogènes) des techniques développées.

Plusieurs approches moléculaires sont aujourd'hui suivies pour l'étude de la variation somaclonale chez le palmier à huile. Elles concernent pour partie l'étude de la structure de l'ADN génomique en relation avec l'anomalie florale, à l'aide des techniques de cytométrie en flux et d'analyse RAPD, RFLP et AFLP. L'expression différentielle du génome chez les régénérants normaux et variants est étudiée, en collaboration avec l'Institut de Biotechnologie des Plantes d'Orsay, en suivant une approche ddRT-PCR. Le but de ces travaux est à la fois de comprendre les mécanismes moléculaires régissant les variations somaclonales et, à moyen terme, de mettre à disposition des unités de production un outil de détection précoce, permettant d'éliminer les variants en amont de la plantation.

• *Contrôle du taux de ploïdie*

L'analyse par cytométrie en flux a permis de montrer que les cals embryogènes et les plants (issus de semis ou de micropropagation in vitro) présentaient le même niveau de

ploïdie (Rival et al., 1997c). Trois types de cals embryogènes d'origine foliaire on été analysés : cals nodulaires compacts (régénérant des palmiers normaux à 95 %), cals à croissance rapide (régénérant des palmiers anormaux à 98 %), et cals friables (à l'origine des suspensions embryogènes). Les cals à croissance rapide, à l'origine de palmiers variants, ne présentent pas de différence dans leur niveau de ploïdie. Ces résultats confirment l'hypothèse d'une origine épigénétique de la variation somaclonale chez le palmier à huile.

• *Analyse RAPD*

Les analyses par marqueurs RAPD, effectuées sur l'ADN génomique des régénérants normaux/anormaux, si elle a permis d'identifier un polymorphisme interclonal, n'a cependant pas mis en évidence de différence liée à l'anomalie « mantled » ni au procédé de micropropagation dans son ensemble (Rival et al., 1997d). L'absence de polymorphisme lié à la variation somaclonale après l'examen de près de 8 900 bandes indique une fréquence extrêmement faible de polymorphisme chez les régénérants. Cette fréquence est inférieure aux 0,05 % rapportés par Munthali et al. (1996) au cours de travaux ayant mis en évidence 3 cas de polymorphisme pour 5 607 bandes analysées chez 120 régénérants de betterave. Au cours de notre étude, mettant en jeu plus de 380 amorces arbitraires sur 64 échantillons différents, on peut approximativement estimer à 0,04 % la fraction du génome analysée. On peut dès lors s'interroger sur la capacité de l'approche RAPD à détecter des variations génétiques infimes pouvant se produire au cours des protocoles de régénération.

Méthylation de l'ADN génomique

Le rôle de la méthylation de l'ADN génomique dans la régulation de l'expression du génome (Finnegan et al., 1993) et son implication dans le déterminisme de la variation somaclonale (Brown, 1989 ; Karp, 1991) ont fait l'objet de nombreux travaux. Des modifications significatives du degré de méthylation de l'ADN génomique au cours de la dédifférenciation (Durante et al., 1982) et de l'embryogenèse somatique (Lo Schiavo et al., 1989) ont pu être montrées chez les plantes supérieures. Il est donc possible que des modifications dans le taux ou la répartition de la méthylation de l'ADN génomique puissent être impliquées dans le déterminisme de la variation somaclonale chez le palmier à huile, comme on a pu le montrer chez le maïs (Kaeppler and Phillips, 1994).

Chez le palmier à huile, le taux de méthylation globale a été estimé après l'hydrolyse enzymatique de l'ADN génomique en nucléosides, leur séparation par chromatographie et la quantification de la 5-méthyl-Cytidine en adaptant les méthodes décrites par Palmgren et al. (1990) et Gehrke et al. (1984). Le taux de méthylation globale [(5mdC) / (5mdC+dC)] a été estimé chez les palmiers adultes, dans le but de comparer têtes de clones/régénérants et régénérants normaux/anormaux du même clone. Les taux de méthylation rencontrés sont d'environ 25 %, ce qui correspond au niveau moyen décrit chez d'autres végétaux supérieurs (Klaas & Amasino, 1989). La mesure du taux de méthylation globale n'a pas permis de discriminer les régénérants « mantled » à l'âge adulte. Néanmoins, cette approche sera poursuivie pour des études sur le rôle des régulateurs de croissances (appliqués au cours du protocole de régénération *in vitro*) sur la méthylation globale du génome (Lo Schiavo *et al.*, 1989).

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Suspensions embryogènes

Les recherches de notre groupe s'intéressent à l'application du concept de « semences artificielles » au palmier à huile, dans le but de réduire les coûts de production et d'améliorer la gestion, la conservation et la diffusion du matériel clonal issu de suspensions embryogènes.

Nos premiers résultats ont montré qu'à l'issue de son développement *in vitro*, l'embryon somatique issu de suspension embryogène ne présente pas les caractéristiques physiologiques de l'embryon zygotique mature. Il importe donc d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes d'accumulation des réserves et d'acquisition de la résistance à la dessication au cours du développement in vitro, en prenant l'embryon zygotique dans la graine comme modèle d'étude. Les travaux en cours dans notre équipe portent sur l'apport d'osmoticum (PEG, saccharose) et de régulateurs de croissance (ABA) destinés à améliorer la tolérance des embryons à la dessication. L'impact de ces traitements sur les paramètres tels que la teneur en protéines de réserve (Globuline 7S) et oligosaccharides est en cours. Le rôle de l'apport d'acides aminés majeurs, considérés comme précurseurs potentiels de la biosynthèse de ces protéines, tels que l'arginine ou la glutamine, est en cours d'étude.

Marqueurs moléculaires de l'anomalie « mantled »

Les études sur le polymorphisme de l'ADN génomique en relation avec l'anomalie seront poursuivies en abordant une étude par marqueurs AFLP (Vos et al., 1995), qui sont susceptibles de générer un polymorphisme plus important que les marqueurs RAPD précédemment employés.

Par ailleurs, les observations au champ conduites à la Station IDEFOR-DPO de La Mé (RCI) ont permis de montrer le caractère instable dans le temps de l'anomalie « mantled » (Konan et al., 1996). En effet, près de 50 % des palmiers gravement atteints présentent une réversion vers le phénotype normal après 7 ans au champ. Cette observation constitue un argument supplémentaire en faveur d'un déterminisme épigénétique de l'anomalie florale, susceptible d'affecter l'expression du génome au jeune âge.

Nos études sur la méthylation de l'ADN génomique se poursuivent, en suivant une approche par marqueurs RFLP. Ces études mettent en jeu des enzymes de restriction isoschisomères (MspI/HpaII), couplées à l'emploi de sondes génomiques récemment isolées chez le palmier à huile. Ces enzymes de restriction présentent des sensibilités différentes à la méthylation des dC, et sont donc susceptibles de générer des profils de restriction différents en fonction du taux de méthylation de l'échantillon. Ces données viendront compléter l'approche quantitative du phénomène réalisée par estimation du taux de méthylation globale.

Nous développons depuis peu, en collaboration avec l'IBP (Profs C. Hartmann & A. Rode), une approche nouvelle pour l'étude des variants somaclonaux, basée sur l'analyse différentielle de l'expression du génome chez les régénérants normaux/anormaux. Cette approche est basée sur les récentes techniques mises au point pour l'étude de l'abondance relative de populations spécifiques d'ARNm entre deux populations. Cette méthode, appelée ddRT-PCR (differential display - Reverse Transcript-Polymerase Chain Reaction ; Liang and Pardee, 1992) est employée dans le but de caractériser l'expression des gènes dans des population de cals et d'embryons somatiques générant des plants normaux et anormaux.

CONCLUSION

Le groupe ORSTOM-CIRAD/IDEFOR se situe aujourd'hui au centre d'un réseau de collaborations cohérent, reliant divers partenaires issus de la recherche académique en France (Universités et Instituts de Recherche) aux principaux acteurs de la filière « palmier à huile » dans les pays producteurs (sociétés privées, agences de développement, Instituts de recherche agronomique nationaux). Ce réseau, à l'interface entre recherche et développement, permet de répondre aux attentes immédiates de la filière en développant des approches novatrices, basées sur des outils de recherche modernes.

La mise en place d'un contrôle de qualité fiable à l'aide de marqueurs moléculaires permettra l'évolution de la micropropagation clonale du palmier à huile vers une exploitation commerciale durable. Cette stratégie fera appel à des techniques de micropropagation à hauts rendements de multiplication et à faible coût d'exploitation, telles que l'utilisation à grande échelle des suspensions embryogènes.

Remerciements

Les auteurs remercient chaleureusement Frédérique Richaud et Thierry Beulé (CIRAD-CP), ainsi que l'ensemble du personnel de la Station IDEFOR DPO de La Mé pour l'excellente qualité de leur collaboration.

Bibliographie

1. ABERLENC-BERTOSSI F., MORCILLO F., RIVAL A. and DUVAL Y. (1995), Oligosaccharides and dehydrin-like proteins during oil palm embryo development. In: Fifth International Workshop on Seeds, University of Reading (U.K.), 11-15/09/95, Abstract.
2. BAJAJ YPS. (ed.) (1991), Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 17. High Tech and Micropropagation I. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
3. BESSE I., VERDEIL. J.-L., DUVAL Y., SOTTA B., MALDINEY R., MIGINIAC E. (1992), Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal fidelity : endogenous cytokinins and indoleacetic acid in embryogenic callus cultures. *J. Exp. Bot.* 43:983-989.
4. BROWN P.T.H. (1989), DNA methylation in plants and its role in tissue culture. *Genome*. 31:717-729.
5. CHABRILLANGE N., ABERLENC-BERTOSSI F., ENGELMANN F. and Y. ÊDUVAL. (1996), Effect of oligosaccharide content during maturation on tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm zygotic embryos. In : Proc. Symposium « Analytical techniques in low temperature biology », University of Abertay, Dundee, Scotland, 3-6 september 1996. Poster.
6. CORLEY R.H.V., BARRETT J.N., JONES L.H. (1977), Vegetative propagation of oil palm *via* tissue culture - *Oil Palm News* 22, p. 2 - 8.
7. CORLEY R.H.V., LEE C.H., LAW L.H., WONG C.Y. (1986), Abnormal flower development in oil palm clones - *Planter*, Kuala Lumpur. 62, p. 233-240.
8. CROUCH M.L. (1982), Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. *Planta*, 156:520-524.
9. DUMET D., ENGELMANN F., CHABRILLANGE N., DUVAL Y. (1993), Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. Plant Cell Reports, 12:352-355.

10. DURANTE M., GERI C., and CIOMEI M. (1982), DNA methylation in dedifferenciating plant pith tissue. *Experientia* 38:451-452.
11. DUVAL Y., ENGELMANN F., DURAND-GASSELIN T. (1995), Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) -In : Somatic embryogenesis and Synthetic Seed I, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Y.P.S. Bajaj (ed.), Springer Verlag, vol 30:335-352.
12. DUVAL Y., AMBLARD P., RIVAL A., KONAN E., GOGOR S., DURAND-GASSELIN T. (1997), Progress in oil palm tissue culture and clonal performance in Indonesia and the Côte d'Ivoire. *Planters* (Kuala Lumpur) in press.
13. ENGELMANN F. (1991) *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review *Euphytica*, 57:227-243.
14. FINNEGAN E.J., BRETTELL R.I.S., DENNIS E.S. (1993), The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression. In Jost J.P. and H.P. Saluz (Eds) : *DNA Methylation · Molecular biology and biological significance*, ppÊ218-261.
15. FUJII J., SLADE D., AGUIRRE-RASCON J., REDENBAUGH K.(1992), Field planting of alfalfa artificial seed. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 28P, 73.
16. GEHRKE C.W., Mc CUNE R.A., GAMA-SOSA M., EHRLICH M., KUO K.C (1984), Quantitative reverse-phase high-performance liquid chromatography of major and modified nucleosides in DNA. *J. Chrom.* 301:199-219.
17. KAEPPLER S.M., PHILLIPS R.L. (1994), Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8773-8776.
18. KARP A. (1991), On the current understanding of somaclonal variation In Miflin B J. (ed) *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cellular Biology*, vol 7, pp 1-58.
19. KONAN, E.K., DURAND-GASSELIN T., DUVAL Y , KOUAMÉ B. (1996), Anomalie de la morphogenèse florale « anomalie manled » observée chez les plants de Palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq) obtenus par embryogenèse somatique. Étude de la réversion vers un phénotype normal des plants non conformes. Séminaire Biotechnologies Végétales, AUPELF, Dakar. 1996.
20. KLAAS M., AMASINO R.M. (1989). DNA methylation is reduced in Dnase-I sensitive regions of plant chromatin. *Plant Physiol.* 91:451-454.
21. LEPRINCE O., HENDRY G.A.F., Mc KERSIE B.D. (1993), The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research*, 3:231-246.
22. LIANG P., PARDEE A.B. (1992), Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257:967-971.
23. LOSCHIAVO F., PITTO L., GIULANOG., TORTI G., NUTI-RONCHI V., MARAZZITI D., VERGARA R., ORSELLI S., TERZI M. (1989), DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor. Appl. Genet.*, 77:325-331.
24. MARMEY Ph., BESSE I., VERDEIL J.L. (1991), Mise en évidence d'un marqueur protéique différenciant deux types de cals issus de même clones chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq). *C. R. Acad. Sci.* Paris, t 313, sérieÊIII:333-338.
25. Mc KERSIE B.D., VAN ACKER S., LAI F.M. (1995), Role of maturation and dessication of somatic embryos in the production of dry artificial seeds. In : Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 30, Somatic Embryogenesis, Springer-Verlag, Berlin, pp 152-167.
26. MEUNIER J., Baudouin L., NOUY B., NOIRET J.-M. (1988), Estimation de la valeur des clones de palmier à huile. *Oléagineux*, 46(10):347-359.
27. MORCILLO F., BERTOSSI-ABERLENC F., TROUSLOT P., DUVAL Y. (1997), Characterization of 2S and 7S storage proteins in embryos of oil palm. *Plant Science*, 122:141-151.
28. MUNTHALI M.T., NEWBURY H.J.,FORD-LLOYD B.V. (1996), The detection of somaclonal variants of beet using RAPD. *Plant Cell Rep.* 15:474-478.
29. PALMGREN G., MATTSSON O., OKKELS F.T. (1990). Employment of hydrolytic enzymes in the study of the level of DNA methylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1049:293-297.
30. PANNETIER C., ARTHUIS P. LIEVOUX D. (1981), Néoformation de jeunes plantes *d'Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro*. *Oléagineux* 36:119-122.
31. PARANJOTHY K. (1984), Oil Palm. In : Handbook of Plant Cell Culture, vol 3 : *Crop Species*, P.V. Ammirato, D.E. Evans, W.R. Sharp, Y Yamada (Eds). Macmillan, New York, 591-605.
32. REDENBAUGH K. (1993), Introduction. *In* : *Synseeds* : Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. K. Redenbaugh (ed), CRC Press, London. pp : 3-7.
33. REDENBAUGH K ., PAASCH B.D., NICHOL J .W., KOSSLER M.E., VISS P .R., WALKER K.A. (1986). Somatic seeds : encapsulation of asexual plant embryos, *Bio/tech.*, 4:797-781.

34. RIVAL A., NATO A., LAVERGNE D., DUVAL Y. (1994), Carboxylases (PEPc and RUBISCO) activities during *in vitro* development and acclimatization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In : Proc. VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, *IAPTC*, Firenze, Abstract n°S20-13, p.261.
35. RIVAL A., BEULE T., NATO A., LAVERGNE D. (1996), Immunoenzymatic study of RubisCO in oil palm and coconut. *Plantations, Research, Development*, 3(6):55-61.
36. RIVAL A., BEULE T., LAVERGNE D., NATO A., HAVAUX M, PUARD M. (1997a), Development of photosynthetic characteristics in oil palm during *in vitro* micropropagation. *J. Plant Physiol.*, 150(5):11-26.
37. RIVAL A., BERNARD F., MATHIEU Y. (1997b), Changes in peroxidase activity during *in vitro* rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal plantlets. *Scientia Horticulturae*, 71:103-112.
38. RIVAL A., BEULE T., BARRE P., DUVAL Y., HAMON S., NOIROT M. (1997c), Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in embryogenic calli and seed-derived oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Plant Cell Rep.*, 16:884-887.
39. RIVAL A., BERTRAND L., BEULE T., TROUSLOT P., LASHERMES P. (1998), Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Plant Breeding* 117(1):73-76.
40. RIVAL A., BEULE T., LAVERGNE D., NATO A. (1997e.), Growth and carboxylase activities in *in vitro* micropropagated oil palm plantlets during acclimatization : comparison with conventionally germinated seedlings. *Advances in Hort. Sci* (sous presse).
41. SOH A.C. (1986). Expected yield increase with selected palm clones from current D x P seedlings materials and its implications on clonal propagation, breeding and ortet selection. *Oléagineux*, 41, 2:51-56.
42. SONDAHL M. (1991), Tissue culture of cacao, coffee and oil palm. In : Proceedings of the fourth conference Int. Plant Biotechnology Network San José, Costa Rica, 14-18 Janvier 1991. p. 98 - 99.
43. TEIXEIRA J.B., SONDAHL M.R., KIRBY E.G. (1990), Establishment of embryogenic cell suspensions of oil palm and regeneration. In : VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Abstracts. Amsterdam, June 24-29. p. 137.
44. TOUCHET (de) B., DUVAL Y., PANNETIER C. (1991), Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Plant Cell Rep.* 10:529-532.
45. VERDEIL J.-L., BUFFARD-MOREL J. (1995), Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). In : *Somatic embryogenesis and Synthetic Seed I*, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Y.P.S. Bajaj (ed), Springer-Verlag, vol. 30:299-317.
46. VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES ÊM., FIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M. (1995). AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23 : 4407-4414.

A10 : Collaboration internationale pour la maîtrise de la multiplication végétative *in vitro* du Cocotier (*Cocos nucifera* L).

HOCHER V.[1*], VERDEIL J.-L.[1], GROSDEMANGE F.[1], HUET C.[1], BOURDEIX R.[2], N'CHO Y.P.[2], SANGARE A.[2], HORNUNG R.[3], JACOBSEN H.J.[4], RILLO E.[5], OROPEZA C.[6], HAMON S.[1]

* Auteur pour correspondance

[1] ORSTOM/CIRAD-CP - Laboratoire des Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales. BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, FRANCE;

e-mail : hocher@orstom.mpl.fr

[2] IDEFOR/DPO - Station Marc Delorme, Port Bouët. 07BP13, Abidjan 07. CÔTE D'IVOIRE.

[3] Université de Londres, Wye College, Wye, Ashford, TN25 5AH, ROYAUME-UNI.

[4] Université de Hanovre, Herrenhausser str; 2, Hannover D-3000, ALLEMAGNE.

[5] PCA. Albay Research Center, Banao, 4503 Guinobatan, Albay, PHILIPPINES.

[6] CICY 7 Antigua carretera A Progreso, Ex-Hacienda Xcumpich, 97310 Cordemex, Merida, MEXIQUE.

PRÉSENTATION DE LA PLANTE

Dans la zone intertropicale humide, où il est largement réparti, le cocotier est souvent surnommé « Arbre aux cent usages » ou « Arbre de vie ». Si toutes les parties de la plante peuvent être valorisées par l'homme en fournissant des éléments essentiels à sa vie (nourriture, boisson, habitat), le cocotier demeure avant tout une plante oléagineuse, dont l'huile est extraite du coprah (albumen déshydraté). Le cocotier s'insère parfaitement dans une économie villageoise en assurant un revenu régulier à des millions de petits producteurs. On estime en effet que la moitié de la production mondiale (environ 9,5 millions de tonnes en 1995, estimée en équivalent coprah) (Rapport Annuel CIRAD, 1995) est consommée localement (Bourdeix, 1989). Le cocotier a également une vocation de plante de grande culture. Son huile, riche en acide laurique est très recherchée par l'industrie des cosmétiques, elle n'est alors en concurrence qu'avec l'huile de palmiste. Jusque dans les années 50, le cocotier occupait la première place parmi les plantes oléagineuses; aujourd'hui il n'arrive qu'au septième rang mondial. On observe un déclin important de la productivité, lié au vieillissement des plantations. Il ne pourra être enrayé que grâce à des programmes de replantation, ce qui nécessite de disposer d'un matériel végétal très productif. Des schémas de sélection ont donc été mis en place dans différents pays producteurs (Côte d'Ivoire, Philippines, Sri Lanka, Inde, ...) et des hybrides ayant un potentiel de production double de celui des variétés traditionnelles ont été obtenus (Bourdeix, 1989). Cependant la sélection classique se heurte à un certain nombre de contraintes liées à la biologie particulière de cette plante : une forte hétérozygotie, un faible coefficient de multiplication, un cycle de sélection long et une graine récalcitrante ayant un volume important, ce qui rend difficile la conservation et la diffusion du matériel. De plus, le cocotier ne présente pas de multiplication végétative naturelle.

LE CHOIX DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE

Le cocotier n'est actuellement propagé que par voie sexuée. Les seuls espoirs de multiplication végétative reposent sur les techniques de culture *in vitro*. La présence d'un seul bourgeon végétatif assurant la croissance de l'appareil aérien et la nécessité de maintenir la plante mère au champ éliminent toute possibilité de micropropagation par culture du méristème végétatif. La réversion de méristèmes floraux vers un fonctionnement végétatif (Blake et Eeuwens, 1978 ; Davis, 1969) et la néoformation de méristèmes caulinaires par culture de fragments d'organes (Balaga, 1975) ont été envisagées ; elles sont abandonnées aujourd'hui en raison du peu de résultats obtenus.

Les différentes équipes qui travaillent sur le clonage du cocotier concentrent actuellement leur efforts sur l'embryogenèse somatique. La mise au point d'une telle méthode de propagation permettrait d'obtenir un matériel homogène par clonage d'individus hautement performants, ce qui conduirait à une amélioration sensible de la productivité et de l'homogénéité des plantations. Une valorisation plus rapide des résultats de la sélection serait obtenue avec la diffusion rapide de clones dans des programmes d'amélioration. En outre, cette méthode permettrait un clonage et donc une diffusion rapide et large d'individus sélectionnés pour leur résistance aux maladies et/ou à des conditions climatiques difficiles telle que la sécheresse.

POURQUOI UNE ASSOCIATION ?

Les premiers résultats sur l'embryogenèse somatique furent prometteurs, avec l'obtention dès 1982 de formation de type embryon (Pannetier et Buffard-Morel, 1982). Entre 1985 et 1990, plusieurs équipes ont pu obtenir la régénération de plantules à partir de tissus somatiques (Raju et al., 1984 ; Branton et Blake, 1984 ; Buffard-Morel et al., 1988), mais seul un nombre réduit de vitroplants fut obtenu et ce de manière erratique. L'embryogenèse somatique du cocotier demeure mal maîtrisée. En effet, si la famille des Arécacées est considérée comme peu réactive *in vitro* (elle cumulerait d'après Kovoor (1981), la difficulté de régénération des Monocotylédones et celle des plantes ligneuses), le cocotier est certainement le palmier le plus récalcitrant *in vitro* (Rillo, 1989). En outre, la compétition entre les différentes équipes, motivée par l'obtention des premiers plants régénérés, a longtemps constitué un obstacle à la diffusion des connaissances sur le comportement *in vitro* des tissus de cocotier. La prise de conscience de cette lacune majeure (Blake, 1990 ; Dublin *et al.*, 1991) a récemment conduit plusieurs laboratoires à envisager une association qui pourrait permettre de répondre à un tel défi.

VERS UNE COLLABORATION INTERNATIONALE

Trois équipes européennes, Wye College (Royaume Uni), l'Université de Hanovre (Allemagne) et l'ORSTOM/CIRAD-CP (France) en association avec trois partenaires du Sud, l'IDEFOR/DPO (Côte d'Ivoire), le PCA (Philippines) et le CICY (Mexique) ont proposé une collaboration. Ensemble, ils ont identifié les problèmes majeurs rencontrés en culture *in vitro* du cocotier et un programme de recherche a été soumis à la Communauté Européenne qui en a accepté le financement. Ce projet STD3 (Sciences et Technologies du Vivant pour les Pays en Développement) N°ERBTS3*CT940298 intitulé « Coconut : development of methods for the clonal propagation of élite, disease resistant palms by somatic embryogenesis » a débuté en 1995 pour 3 ans.

ASSOCIATION STD3 : STRATÉGIE DE RECHERCHE

La gestion de ce type de programme est bien réglementée par la CE, qui s'assure d'un bon fonctionnement au travers d'un des instituts participants désigné comme coordinateur du projet (ici, l'ORSTOM). Le rôle du coordinateur est multiple : il assure le lien entre les partenaires du projet et la CE, au travers des Rapports d'Activités (bisannuels), qu'il est chargé de collecter et de diffuser, et des Comptes Rendus qui suivent les réunions annuelles des partenaires ; il assure aussi le bon déroulement du projet ainsi que sa gestion financière. Il faut également signaler que chaque partenaire bénéficie d'une protection juridique grâce à un Contrat de Consortium, qui a été établi dès le début du projet (S. Hamon et J.-L. Verdeil, comm. pers.).

Lors de la première réunion STD3 (Montpellier, mars 1995), les différents partenaires ont présenté chacun un bilan de leurs travaux et ont défini clairement les difficultés rencontrées communément en culture *in vitro* du cocotier.

Parmi les difficultés majeures identifiées on peut citer :

- un brunissement intense des tissus maintenus *in vitro* ;
- une forte hétérogénéité dans le comportement de ces tissus ;
- un temps de réponse *in vitro* extrêmement long ;
- la difficulté d'obtention d'embryons somatiques capables de germer ;
- la faible vigueur des vitroplants.

L'identification de ces problèmes a ensuite permis aux partenaires d'élaborer de façon précise un programme de recherche pour chaque équipe. Un des points essentiels a été de planifier des échanges importants aussi bien en matière d'information que de compétence. Ainsi la création d'une « Coconut Newsletter » permet la diffusion d'idées et d'informations diverses (en dehors des réunions annuelles) et l'organisation de stages de formation dans chaque laboratoire a permis d'échanger et de comparer techniques et protocoles de culture, base essentielle d'une collaboration fructueuse.

PRINCIPAUX RÉSULTATS OBTENUS DANS LE CADRE DU PROGRAMME STD3

Amélioration du protocole de régénération

• *Culture* in vitro

Le procédé de culture *in vitro* développé par les différentes équipes comporte quatre phases : callogenèse, induction de l'embryogenèse, maturation et germination des embryons. Un des enjeux de ce projet était d'améliorer de façon sensible les pourcentages de callogenèse, d'embryogenèse et d'obtention d'embryons complets capables de germer. À cet effet, les nombreux échanges et notamment la publication interne au STD3 d'une « Compilation des Protocoles » a permis de tester en parallèle les protocoles des différentes équipes. Cette comparaison a permis l'identification des facteurs clés de la culture *in vitro* du cocotier pour chacune des étapes du protocole de régénération. L'utilisation d'explants immatures (feuilles, inflorescences ou tissus embryonnaires), formés en partie de cellules méristématiques indifférenciées, est essentielle, comme chez la plupart des Monocotylédones pour l'obtention de cals. Le second facteur qui conditionne le succès de la callogenèse est la présence d'un régulateur de croissance à forte activité auxinique : le 2,4-D en association avec le charbon actif. L'acquisition par les cals de la compétence à l'embryogenèse est dépendante du niveau de 2,4-D en présence de charbon actif. La maturation des

embryons somatiques est obtenue en réduisant progressivement la concentration en 2,4-D et par l'addition d'une cytokinine (2iP, TDZ ou BAP) qui est indispensable à la différenciation du méristème caulinaire au sein de l'axe embryonnaire. Enfin, les facteurs essentiels à la germination sont la suppression du 2,4-D et la présence de BAP.

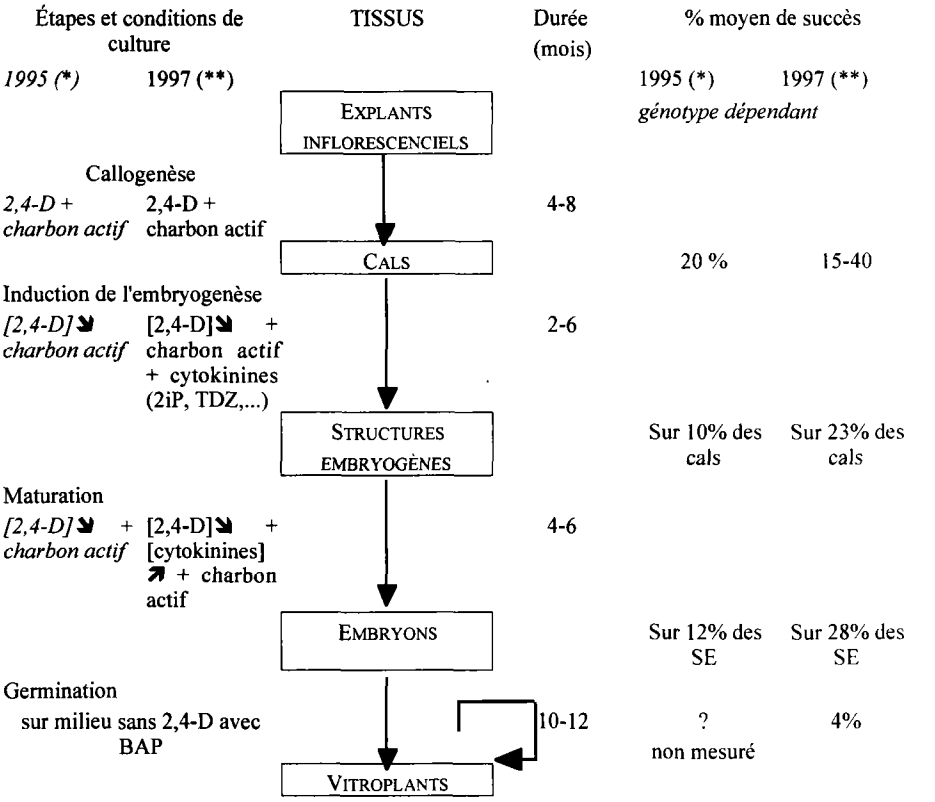
Grâce à la comparaison des différents protocoles, l'équipe ORSTOM/CIRAD-CP a sensiblement amélioré le protocole de régénération à partir d'inflorescences immatures (figure 1). Ainsi on peut remarquer que les pourcentages moyens de callogenèse, d'induction de l'embryogenèse et de maturation ont augmenté par rapport à ceux obtenus en 1995 (avant le début de la collaboration). Ce constat a été fait (avec des % comparables) chez nos autres partenaires et en particulier aux Philippines, où le PCA a su rapidement tirer parti de cette collaboration, puisque des vitroplants viennent d'être obtenus après maturation et germination des embryons en présence de cytokinines (BAP), ce qui valide en retour une des avancées du protocole mis au point à Montpellier (Verdeil et al., 1996b).

Un protocole de régénération à partir de plumule (méristème caulinaire de l'embryon zygotique entouré des ébauches foliaires) est actuellement en test sur la base des échanges avec l'équipe de Wye (Hornung, 1995). L'avantage est la rapidité de réaction du matériel (2 mois au lieu de 8 pour la phase de callogenèse) et l'homogénéité de cette réaction (90 % de callogenèse en moyenne). Ce procédé permettrait de pouvoir travailler rapidement les phases tardives (fin de maturation et germination) qui sont les limites actuelles du protocole. Le CICY et le PCA ont aussi développé cette approche.

• *Analyses phytohormonales*

Un des problèmes majeurs rencontrés en culture *in vitro* du cocotier est le brunissement intense des tissus dû à la production de polyphénols. Ce problème a été résolu de façon identique par les différentes équipes : l'ajout au milieu de culture de charbon actif permet de piéger ces polyphénols. Cependant, ce composé est aussi capable d'adsorber certains composés du milieu de culture, dont les hormones exogènes (2,4-D, BAP), ce qui rend difficile la maîtrise de la composition des milieux. Entre 1990 et 1993, l'équipe ORSTOM/CIRAD-CP a développé une méthode de dosage des hormones de type auxines et cytokinines par HPLC dans les milieux de culture (Verdeil, 1993). Les résultats ont révélé des taux d'adsorption importants et l'application de ces techniques sur des milieux provenant des différentes équipes a démontré un comportement variable selon les lots et la provenance des charbons actifs utilisés (tableau 1). Un contrôle fréquent des milieux permet donc actuellement un réajustement des teneurs en hormones. Dans le cadre d'échanges, d'autres équipes (PCA et CICY) ont pu bénéficier de cette approche. En parallèle, les équipes du CICY et de Wye College ont développé une technique par radiomarquage (utilisation de 2,4-D radioactif) (Ebert et Taylor, 1990 ; Oropeza et Taylor, 1994) pour suivre l'incorporation de cette molécule dans les cultures et essayer d'en caractériser le métabolisme.

Figure 1 : Schéma du protocole de régénération du cocotier mis au point par l'équipe mixte ORSTOM/CIRAD, à partir de tissus inflorescenciels.



(*) Pourcentages évalués à partir des 6 derniers arbres mis en culture (Mai 1993-Février 1994).

(**) Pourcentages évalués à partir des 6 derniers arbres mis en culture (Mai 1994-Février 1995)

Tableau 1 : Quantification* du 2,4-D libre par HPLC en présence de différents types de charbons actifs. La quantité initiale de 2,4-D ajoutée dans les milieux était de 22 mg/l. Les valeurs indiquées donnent la valeur mesurée la plus forte et la plus faible.**

	Teneurs en 2,4-D libre (mg/l) en présence de 2 g/l de charbon provenant de...					
Âge du milieu de culture	Mexico		Acidic Washed Sigma		Neutralized Sigma	
4 jours	3.05	0.42	0.12	0.02	0.09	0.02
8 jours	1.36	0.28	0.08	0.02	0.03	0.02

** 5 tubes différents on été utilisés pour les quantifications* *** non adsorbé par le charbon*

• *Histologie*

La lenteur des phénomènes en culture *in vitro* du cocotier a conduit au développement d'une approche histologique. Ainsi chaque étape du protocole a pu être décrite (Buffard-Morel et al., 1992 ; Verdeil, 1994). Les études réalisées à Montpellier ont permis de décrire et de caractériser les cellules embryogènes à l'origine des proembryons. Deux voies d'embryogenèse ont été mises en évidence (Verdeil et al., 1994) :

- Une voie pluricellulaire : En présence de faibles teneurs en 2,4-D (40 à 60 mg.l^{-1}), on observe la formation de structures complexes méristématiques et épidermisées. Cette voie peut conduire à l'obtention de structures embryonnaires souvent incomplètes ou déviées (haustorium seul présent avec ou sans pôle racinaire, embryons de type foliacé) si la concentration en auxine n'est pas suffisante.
- Une voie unicellulaire : Cette seconde voie est obtenue avec une forte concentration en 2,4-D (80 à 120 mg.l^{-1}). Elle conduit alors à l'apparition et à l'individualisation de cellules embryogènes se caractérisant par un cytoplasme dense, un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, la présence d'un nucléole unique et volumineux et la présence de réserves amylacées et protéiques. Elles s'individualisent du reste du cal par un épaississement de la paroi cellulaire.

De par leur structure et leur ultrastructure, les cellules embryogènes présentent de nombreuses convergences avec les cellules engagées dans la voie de l'embryogenèse sexuée. C'est ainsi qu'un dépôt de callose lors de l'individualisation des cellules embryogènes a pu être mis en évidence (J.-L. Verdeil, comm. pers.). Nous disposons donc actuellement de repères précis pour la caractérisation de l'évolution des cultures. Nous avons appliqué cette technique à du matériel provenant des différents laboratoires (Hanovre, PCA et CICY), et il est important de constater que quel que soit le type d'explant de départ et quel que soit le mode d'obtention des structures embryogènes, le même processus est observé.

Essais de régénération à partir d'une grande diversité de cultivars

Depuis plus de 20 ans, l'équipe ORSTOM/CIRAD-CP est associée avec la station Marc Delorme-IDEFOR, Côte d'Ivoire, sur le programme d'amélioration du cocotier. Cette station possède la collection au champ la plus importante au monde. Elle réunit, depuis sa création en 1952, 37 écotypes représentés chacun par plus de 70 individus. Cette étroite collaboration nous a permis d'identifier très tôt les besoins des sélectionneurs en matière de micropropagation. Du fait des programmes de sélection mis en place très tôt dans cette station, nous avons ainsi pu tester en culture *in vitro* du matériel hautement sélectionné. Nous travaillons notamment sur trois génotypes : deux hybrides, le PB121 et le PB111 et un Nain Jaune Malais. Le maintien des relations avec la station Marc Delorme est essentiel pour la poursuite de nos travaux pour tester les performances du protocole actuel à une échelle plus large. L'exemple du palmier à huile montre en effet que la production de vitroplants a progressé de façon sensible grâce à l'ouverture en 1981, de l'unité pilote de La Mé, Côte d'Ivoire (mise en culture d'un arbre tous les 10 jours sur au moins trois ans). Ce type d'infrastructure qui a permis, par des ajustements successifs du protocole mis au point en laboratoire, de faire progresser la production de vitroplants, manque aujourd'hui au cocotier. L'entrée dans le STD3 a permis de tester d'autres génotypes provenant d'Amérique Centrale et d'Asie du Sud-Est. Cela permet de valider le protocole. Un point important pour la vitroculture a été la rédaction par les sélectionneurs des trois pays producteurs d'une « Liste des Génotypes Utiles » identifiant précisément les génotypes les mieux adaptés à chaque pays. Ce document sert actuellement de base pour les essais de régénération.

Recherche de marqueurs précoces de l'embryogenèse (marqueurs protéiques)

Les phénomènes de régénération sont très lents chez le cocotier et la recherche de marqueurs précoces permettrait de détecter les premiers signes de l'orientation vers l'embryogenèse somatique, ce qui faciliterait le pilotage des cultures. Une perspective

intéressante est la recherche de marqueurs protéiques et moléculaires. Dans le cadre du projet STD3, cette approche est développée par l'équipe allemande, qui possède la technologie nécessaire à ce type d'approche. Les travaux sont actuellement en cours avec notamment l'utilisation d'anticorps spécifiques de marqueurs du processus d'induction de l'embryogenèse et de la division cellulaire. (Altherr et al. 1993, Paulus et al, 1993). Par ailleurs des résultats intéressants ont été obtenus par l'équipe du CICY sur la recherche de protéines phosphorylées au cours du développement embryonnaire. L'état de phosphorylation de certaines protéines pourrait varier au cours de l'embryogenèse et ainsi être utilisé comme marqueur des différents stades d'embryogenèse du cocotier.

Étude de la physiologie du vitroplant de cocotier

Au cours de la troisième réunion STD3 (Mai 1997, Hanovre), les différents partenaires ont confirmé que des études de la physiologie du vitroplant, issu de la germination des embryons somatiques, étaient nécessaires en raison des problèmes posés par leur croissance lente *in vitro* et leur acclimatation difficile aux conditions naturelles. Ces problèmes constituent actuellement le principal facteur limitant pour le développement des protocoles d'embryogenèse somatique. Ces difficultés sont aussi rencontrées en culture *in vitro* des embryons zygotiques de cocotier chez lesquels un développement très lent a aussi été observé (par référence à des plantules issues de semis). Dans la majorité des espèces végétales, la réussite de l'acclimatation et par conséquent le développement ultérieur des vitroplants, sont liés à la capacité du plant à photosynthétiser *in vitro* (Debergh, 1991). L'équipe ORSTOM/CIRAD-CP s'est intéressée aux mécanismes de mise en place de la photosynthèse *in vitro* et d'accès à la photo-autotrophie carbonée chez les vitroplants zygotiques de cocotier, qui constitue un modèle de choix pour des études physiologiques applicables directement aux protocoles d'embryogenèse somatique. Cette étude a mis en jeu diverses approches complémentaires : dosages et quantification des carboxylases, mesures *in situ* des échanges gazeux et de la transpiration, fluorescence des chlorophylles. L'ensemble de ces résultats suggère la mise en place précoce d'un métabolisme photosynthétique actif dans les plantules obtenues à partir de cultures *in vitro* d'embryons zygotiques chez le cocotier (Triques et al., 1997a et b), mais n'explique pas la lenteur du développement. L'observation des plantules issues de semis nous a permis de suggérer que le développement lent des plantules issues d'*in vitro* (zygotique et /ou somatique) pourrait être dû à une nutrition insuffisante et/ou mal adaptée. En effet, au cours de la germination de l'embryon zygotique de cocotier sur la noix, l'haustorium (partie distale du cotylédon) se développe de façon extraordinaire : il envahit peu à peu toute la cavité de la noix et assure l'assimilation (grâce à la sécrétion de diverses enzymes) des réserves et leur transfert à la plantule. Le dosage des principaux nutriments organiques (sucres simples, acides aminés, acides gras) transmis à la plantule apportera des informations essentielles à la compréhension de la physiologie de la germination de la graine de cocotier. Il permettra d'améliorer les milieux de culture et donc à terme d'optimiser la germination et le développement des plantules (zygotiques et somatiques), limite actuelle du protocole. En parallèle, des expérimentations au champ seront menées aux Philippines pour déterminer le stade exact où la plantule zygotique peut vivre sans la noix.

CONCLUSION

Après avoir analysé les résultats obtenus sur la micropropagation de plus de 1 000 espèces, George et Sherrington (1984) n'hésitaient pas à affirmer que le cocotier

faisait partie avec le cotonnier et le soja, de l'une des trois plantes les plus difficiles à régénérer et à propager *in vitro*. Ce constat est toujours valable même si aujourd'hui, grâce à ces trois années de collaboration, nous maîtrisons mieux la culture *in vitro* de cette espèce. En effet, cette association s'avère essentielle : elle a, d'une part, permis de constater que les problèmes rencontrés en culture *in vitro* du cocotier présentaient de nombreuses similitudes dans tous les laboratoires et, d'autre part, elle a su au travers d'échanges multiples (courrier, visites, réunions, stages....) mettre en commun toutes les « données » accumulées par chacun sur la culture *in vitro* du cocotier. Ce sont ces échanges qui ont permis d'avancer de façon sensible dans la connaissance des phénomènes menant à l'obtention d'embryons somatiques chez cette espèce particulièrement récalcitrante. Nous avons pu lever certaines des difficultés : maîtrise des phases de callogenèse, d'induction de l'embryogenèse, obtention régulière d'embryons complets. Toutefois, nous restons prudents car d'autres obstacles demeurent, en particulier la phase de germination, et la régénération du cocotier par embryogenèse somatique est loin d'être un pari gagné. Néanmoins la réussite de ce projet fait clairement apparaître les bénéfices de telles associations et l'importance des organismes tel que la CE pour leur financement. Dans le cadre de ce projet cocotier, nous envisageons de poursuivre l'association avec nos partenaires. Il semble évident que les recherches visant à maîtriser la micropropagation du cocotier doivent être poursuivies et que comme le soulignent Kullaya et Sangaré (1996), seul le regroupement des efforts de recherche-développement nationaux, régionaux et internationaux assurera un meilleur avenir aux petits planteurs du XXI^{e} siècle.

Bibliographie

1. ALTHERR S. STIRN S. et JACOBSEN H.J. (1993) Immunochemical analysis of nuclear protein marker for regeneration potential in higher plants *J. Plant Physiol.* 141: 415-422
2. BALAGA H.Y. (1975) - Induction of branching in coconut, *Kalikasan Philip. J. Biol.* 4 135-140.
3. BLAKE J. (1990) - Coconut (cocos nucifera L.) micropropagation. *Dans*: Biotechnology in Agriculture and forestry, vol 10, legumes and Oil Seed Crops, BAJAJ Y.P.S ed., 538-554
4. BLAKE J. et EEUWENS C.J. (1978) - Inflorescence tissue as source material for vegetative propagation of coconut palm. *Dans* : Proc. Intern.Conf. Cocoa/Coconuts, Kuala Lumpur. 549-556.
5. BOURDEIX R. (1989) - La sélection du cocotier (*Cocos nucifera* L.) Etude Théorique et Pratique Optimisation des Stratégies d'Amélioration Génétique. *Thèse d'Université* Paris XI Orsay, 194 p.
6. BRANTON R.L. et BLAKE J. (1984) - Clonal propogation of coconut palm - *Dans*: Proc. Int. Conf. Cocoa Coconuts, N° 46, p. 1 - 9.
7. BUFFARD-MOREL J., VERDEIL J.L. et PANNETIER C. (1988) - Vegetative propagation of coconut palm through somatic embryogenesis, obtention of plantlet from leaf explant. 8th Intl. Symp. Biotechnology, Paris. Abstract p117.
8. BUFFARD-MOREL J., VERDEIL J.L. et PANNETIER C. (1992) - Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir de tissus foliaires : étude histologique. *Can. J. Bot.* 70 735-741.
9. DAVIS T.A. (1969) - Prospects of clonal propagation of the coconut. *Ceylan Coconut Planters' Review* Vol. VI, 1.
10. DEBERGH P.C. (1991) - Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. *Acta Hort.* 289: 291-300.

11. DUBLIN P., ENJALRIC F., LARDET L., CARRON M.P., TROLINDER N. et PANNETIER C. (1991) - Estate crops - *Dans* : Micropropagation Technology and Application. P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (Eds), Kluwer Academic Publisher Dordrecht. p 337 - 361.
12. EBERT A, et TAYLOR H.F. (1990) - Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 20: 165 - 172.
13. GEORGE E.F. et SHERRINGTON P.D. (1984) - (Eds). *Dans* : Plant Propagation by Tissue Culture, Handbook of Directory and Commercial Laboratories. Exegetics Eversley Ltd., 709 p.
14. HORNUNG R. (1995) - Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissues exised from mature zygotic embryos. *Plantation, Recherche, Développement* 212 : 38-41.
15. KOVOOR A. (1981) - Palm tissue culture: state of the art and its application to the coconut. FAO Plant Production and Protaction Paper 30 FAO Rome.
16. KULLAYA A . et SANGARÉ A. (1996) - La filière cocotier en Afrique : situation actuelle et perspectives. OCL (3) **2** :130-135 ;
17. OROPEZA C. et TAYLOR H.F. (1994) - uptake of 2,4-D in coconut (cocos nucifera L.) explants. *Dans* : Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. Lumsden PJ, Nicholas JR et davies WJ eds. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands pp284-288.
18. PANNETIER C. et BUFFARD-MOREL J. (1982) - Premiers résultats concernant la production d'embryons somatiques à partir de tissus foliaires de cocotier, *Cocos nucifera*. *Oléagineux*, 37: 349-354.
19. PAULUS C., KÖLLNER B. et JACOBSEN H.J. (1993) - Physiological and biochemical characterisation of glyoxalase-I from soybean cell suspension, a general marker for cell proliferation. *Planta* 189 : 561-566
20. RAJU C.R., PRAKASH KUMAR P., CHANDRAMOHAN M. et IYER R.D. (1984) - Coconut plantlets from leaf tissue cultures - *Plantation Crops* 12: 75-81.
21. Rapport Annuel CIRAD (1995) - Département des cultures pérennes 55-80
22. RILLO E.P. (1989)a - A frame-work for co-ordination of application of tissue cultures techniques for a break through in vegetative propagation of coconut. COCOTECH, XXVIème Meeting, Bangkok, Thaïland.
23. TRIQUES K., RIVAL A., BEULÉ T., PUARD M., ROY J., NATO A., LAVERGNE D., HAVAUX M., VERDEIL J.L., SANGARE S. et HAMON S. (1997)a - Photosynthetic ability of *in vitro* grown coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets derived from zygotic embryos. *Plant Science* 127 39-5.
24. TRIQUES K., RIVAL A., BEULÉ T., DUSSERT S., HOCHER V., VERDEIL J.L. & HAMON S. (1997)b Developmental changes in carboxylase activities in *in vitro* cultured coconut zygotic embryos: comparison with corresponding activities in seedlings. *Plant Cell Tissue Org. Cult*. 49:227-231.
25. VERDEIL J-L, HOCHER V., HUET C., GROSDEMANGE F., SANGARE A., & HAMON S , (1996)b, Effect of thidiazuron and 2,4-D on the maturation of coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryos. 12-14 septembre 1996. Plant Embryogenesis Workshop Abstract SVI-28.
26. VERDEIL J.L. (1993) - Etude de la régénération du cocotier (*Cocos nucifera* L.) par embryogenèse somatique à partir d'explants inflorescentiels. Thèse de Doctorat de l'Université P. et M. Curie (Paris VI). Soutenue le 15 décembre 1993. 156p.
27. VERDEIL J.L., HUET C., GROSDEMANGE F. et BUFFARD-MOREL J. (1994) - Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 13:218-221.

A11 : Le réseau *Atriplex* ou comment allier biotechnologies et écologie pour une sécurité alimentaire accrue en régions semi-arides et arides

KINET J.-M.[1], BENREBIHA F.[2], BOUZID S.[3], LAILHACAR S.[4], DUTUIT P.[5]

[1] Laboratoire de Cytogénétique, Université catholique de Louvain, Croix du Sud 5 - boîte 13, B-1348 Louvain-la-Neuve, BELGIQUE ;

[2] Laboratoire d'Amélioration végétale, Institut d'Agronomie, Université de Blida, B.P. 270, 9000 Blida, ALGÉRIE ;

[3] Laboratoire de Biologie végétale, Faculté des Sciences, Université de Tunis, Campus universitaire, 1060 Tunis, TUNISIE ;

[4] Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, CHILI ;

[5] Equipe d'Écotechnologie, Faculté de Pharmacie, Université de Paris-Sud XI, Tour E1 2ème, F-92296 Châtenay-Malabry, FRANCE.

INTRODUCTION

La salinisation des sols constitue, à l'échelle planétaire, l'un des principaux problèmes auxquels l'agriculture est confrontée. Fréquemment associée à la contrainte hydrique, elle entraîne une réduction des surfaces cultivables et menace l'équilibre alimentaire mondial. Tous les continents sont affectés et, selon certaines estimations, la superficie souffrant d'un excès de sel dans le monde serait aujourd'hui d'environ 1 milliard d'hectares. Chaque année, 10 millions d'hectares de terres irriguées sont abandonnées en raison des effets néfastes du sel (Szabolcs, 1994).

Au Maghreb et au Moyen-Orient, 15 millions d'hectares de terres agricoles sont sujets à une salinisation croissante. L'introduction d'arbustes fourragers résistants à l'aridité est l'un des moyens utilisés pour la valorisation de ces sols marginaux.

Les plantes du genre *Atriplex* sont présentes dans la plupart des régions du globe. Elles appartiennent à la famille des *Chenopodiaceae* et se caractérisent par leur grande diversité. Certaines espèces sont herbacées, d'autres arbustives; elles peuvent être annuelles ou pérennes. Plusieurs d'entre elles possèdent une résistance élevée à la sécheresse et à la salinité. L'*A. halimus L.* est un arbuste natif d'Afrique du Nord où il pousse en abondance; il s'étend également aux zones littorales méditerranéennes du Proche-Orient et de l'Europe et aux terres intérieures gypso-salines d'Espagne. Il est présent dans des régions où le déséquilibre écologique s'accentue et où le phénomène de désertification prend des dimensions alarmantes. Il y constitue, en période de sécheresse et de soudure, un fourrage apprécié des Camélidés et particulièrement des ovins et des caprins. Cependant, le surpâturage, les contraintes climatiques et l'absence de gestion rationnelle des parcours des troupeaux ont conduit à une forte dégradation de leurs peuplements.

En raison de l'intérêt écologique et pastoral d'*A. halimus*, un projet de recherche a été élu par l'Union Européenne en 1994. Son objectif est de contribuer aux efforts d'amélioration de la production des steppes fourragères à base de cette espèce dans le but d'accroître la production animale des régions arides méditerranéennes. Ce projet vise également à protéger ces écosystèmes particulièrement fragiles. Des laboratoires de Tunisie, d'Algérie, du Chili, de France et de Belgique collaborent à ce programme intitulé « Étude de la diversité biologique de *l'Atriplex halimus* pour le repérage *in vitro* et *in vivo* d'individus résistant à des conditions extrêmes du milieu et constitution de clones ». Des chercheurs d'Espagne, du Maroc et de Syrie coopèrent également à l'entreprise. L'objectif poursuivi sera atteint par le repeuplement de zones dégradées à l'aide de populations homogènes résistantes obtenues par le clonage *in vitro* d'individus choisis au sein de la diversité biologique de populations naturelles ou créées.

RÉSULTATS

La diversité au sein de l'espèce *A. halimus*

Les travaux réalisés jusqu'à présent ont mis en évidence le remarquable polymorphisme d'*A. halimus* . Ce polymorphisme semble être une caractéristique des chénopodiacées. En effet, Ozenda (1983) signale que « Les chénopodiacées sont d'une étude délicate... Beaucoup d'espèces se ressemblent, même d'un genre à l'autre ; et surtout certaines d'entre elles présentent un polymorphisme étonnant qui fait que l'aspect de la plante varie d'un pied à l'autre, voire d'une branche à l'autre, suivant l'état de développement et la saison ». Ce polymorphisme se manifeste tant au niveau de la morphologie des structures végétatives qu'au niveau des systèmes reproducteurs. Ainsi, nous avons observé que la forme des feuilles d'*A. halimus* peut correspondre à celle d'autres espèces du même genre. Elle varie également avec la provenance de l'individu et, sur un même pied, elle est différente selon l'état physiologique de la plante ou la position de la feuille sur un axe. Ainsi, le rabattage d'un pied, qui stimule le développement de bourgeons adventifs, entraîne très souvent l'apparition de feuilles hastées-dentées, alors qu'auparavant la plante formait des feuilles simples, ovales ou lancéolées, qui correspondent à la forme typique attribuée à l'espèce *A. halimus*.

Une grande diversité de comportements en présence de la contrainte saline a également été observée. Des cultures de tissus, initiées à partir de plantules en germination, vont soit proliférer, à un rythme lent certes, soit dégénérer progressivement sur un milieu contenant une concentration de sel de 300 mM.

Cette diversité de comportement constitue a n'en pas douter un handicap pour une étude raffinée des réactions de l'espèce aux variations de son environnement car elle affecte la reproductibilité des résultats. Par contre, elle laisse entrevoir la possibilité de sélectionner en son sein des individus adaptés à des conditions difficiles, dans lesquelles ils sont toujours capables de prospérer.

La résistance à la salinité et à la sécheresse

Des études ont été menées parallèlement au niveau cellulaire et sur la plante entière. Le caractère halophile de l'espèce a tout d'abord été confirmé. En effet, la croissance de la partie aérienne de jeunes plantes est stimulée en présence de NaCl à 150 mM. Une croissance optimale d'*A. halimus* à des concentrations de sel comprises entre 50 et 200 mM a été signalée à diverses reprises (Blumenthal-Goldschmidt et Poljakoff-Mayber, 1968 ; Gale et Poljakoff-Mayber, 1970 ; Ben Ahmed et al., 1996). Des

concentrations plus élevées ont, au contraire, un effet inhibiteur sur toutes les parties de la plante.

Des études parallèles menées au niveau cellulaire, grâce à la culture *in vitro*, et au niveau de la plante entière ont fait apparaître l'importance des caractéristiques structurales de la plante dans les mécanismes de résistance à l'excès de sel. Ainsi, le potentiel osmotique du suc cellulaire extrait des feuilles, des racines et des cals diminue avec l'augmentation de la salinité dans le milieu de culture. Au niveau racinaire, le potentiel osmotique reste proche de celui de la solution nutritive. Par contre, au niveau des feuilles, il est toujours nettement plus négatif. Les cals, qu'ils soient issus de feuilles et de racines, se comportent toujours de la même manière avec des potentiels osmotiques toujours inférieurs à ceux du milieu externe.

L'accumulation du sodium au niveau des cals est proportionnelle à la diminution du potentiel osmotique cellulaire (rv = 0,997), ce qui suggère une participation directe du sodium dans les processus d'ajustement osmotique. Par contre, au niveau des racines et des feuilles, l'accumulation du sodium, évidente aux concentrations de sel les plus faibles dans le milieu, ne se poursuit pas au-delà de 300 mM pour la partie aérienne et de 450 mM pour la partie racinaire. L'accumulation de proline pourrait intervenir dans les processus d'osmorégulation au niveau de la partie aérienne, aux concentrations les plus élevées de NaCl.

Dans le cas du stress hydrique, la chute de potentiel osmotique enregistrée au niveau des feuilles de plantes soumises à des arrosages espacés pourrait également s'expliquer par une accumulation de proline. Par contre la teneur en proline n'augmente pas dans des cals dont le potentiel osmotique est réduit par la présence de polyéthylène glycol dans le milieu de culture.

Ces résultats mettent en évidence d'importantes différences de comportement entre cultures cellulaires et plantes entières en présence d'une contrainte saline ou hydrique. Il faut se souvenir également que la résistance d'*A. halimus* au sel est liée à sa capacité de l'éliminer en l'accumulant dans des trichomes couvrant les surfaces foliaires (Mozafar et Goodin, 1970), un phénomène que nous n'avons pas étudié jusqu'à présent.

Ces études doivent évidemment être poursuivies pour définir quels sont les mécanismes réellement impliqués dans les processus de résistance aux contraintes saline et hydrique. C'est alors seulement que des marqueurs fiables de résistance pourront être identifiés et aider à la sélection d'individus intéressants.

Les qualités fourragères - Étude de la production de biomasse et de la palatabilité

Des études de production de biomasse et d'appétence de génotypes différents sont également réalisées. La situation en Algérie a malheureusement freiné les progrès dans cette voie et c'est essentiellement au Chili que les qualités et la productivité d'*A. halimus* ont pu être étudiées et comparées à d'autres espèces du genre. Dans les régions désertiques et méditerranéennes pré-arides, arides et semi-arides du Chili, il existe de vastes formations arbustives dominées par différentes espèces natives d'*Atriplex*. Parmi ces espèces, *A. atacamensis*, *A. imbricata*, *A. clivicola* et *A. deserticola* sont les plus abondantes. C'est toutefois l'*A. nummularia*, originaire d'Australie, qui a la préférence des éleveurs de caprins et d'ovins et près de 50 000 ha de parcours ont déjà été plantés à l'aide de cette espèce. Afin d'opérer un choix des espèces, provenances et génotypes d'Atriplex les plus appropriés, choix basé sur des critères de résistance au stress hydrique, de rendements en phytomasse fourragère, de

qualité nutritive et de palatabilité pour les ovins et les caprins, une vaste étude a été entreprise par l'équipe de l'Université du Chili.

La palatabilité a été exprimée par les taux de consommation du fourrage de chaque espèce ou provenance, par des animaux sélectionnés et identifiés. La quantité consommée a été déterminée sur la base des diamètres des tiges au niveau de la coupe opérée par les animaux durant la période expérimentale. Les équations permettant d'établir la phytomasse fourragère disponible en fonction du diamètre de la section de coupe avaient été préalablement établies.

Les études ont montré que les espèces, provenances ou individus les plus intéressants ne sont pas nécessairement les plus palatables. En effet, une palatabilité excessive favorise le surpâturage. Les arbustes à palatabilité moyenne, ou moyenne à haute, sont préférables.

Les *Atriplex* sont également utilisés au Chili pour satisfaire les besoins des petits éleveurs et agriculteurs en combustible, une pratique qui contribue, elle aussi, à accélérer le processus de désertification de parcours déjà détériorés par le surpâturage et la céréaliculture. L'étude chilienne a également établi les rendements en bois et les capacités calorifiques du bois de chauffe provenant des arbustes d'*Atriplex*. Enfin, il a été montré que la phytomasse fourragère provenant des *Atriplex* est particulièrement riche en matières azotées mais pauvre en énergie. Ce déficit énergétique peut être comblé par les fourrages herbacés ce qui a justifié une étude des effets des *Atriplex*, sur les couches superficielles du sol et sur la strate herbacée associée dans le but de sélectionner les arbustes qui favorisent la productivité et la qualité nutritionnelle fourragère de la strate herbacée.

Le clonage *in vitro*

La recherche d'une stratégie de clonage *in vitro* de l'espèce a été entreprise dans le but de pouvoir multiplier sur une large échelle les génotypes qui se seront révélés les plus performants, en vue d'un repeuplement des Atriplexaies : l'embryogenèse somatique et le bourgeonnement axillaire sont les deux voies privilégiées.

Il est aisé de produire du cal à partir de différents explants, particulièrement à partir de l'hypocotyle, et des cultures cellulaires peuvent être réalisées et stabilisées de façon à conserver un taux de prolifération constant d'une subculture à l'autre, à condition que les paramètres de dilution de la culture au moment de son établissement soient adaptés au génotype étudié. Ces cultures de tissus et de cellules permettent évidemment le développement d'une approche fondamentale des mécanismes de résistance aux stress, au niveau cellulaire, mais force est de constater que, jusqu'à présent, les réussites en terme de clonage *in vitro* sont insignifiantes. De nombreuses tentatives ont été faites pour stimuler l'embryogenèse somatique mais n'ont pas abouti jusqu'à présent. En bourgeonnement axillaire, de meilleurs résultats ont été obtenus. En partant d'apex, des taux de multiplication d'environ 3 ont été enregistrés en présence de BAP 0,5 mM.

CONCLUSION

Les travaux réalisés jusqu'à présent ont mis en évidence une importante variabilité intraspécifique qui se manifeste tant au niveau morphologique qu'au niveau physiologique. Cette variabilité présente de nombreux avantages pour la sélection de génotypes performants en conditions extrêmes mais affecte la reproductibilité des résultats. Le caractère halophile de l'espèce a été confirmé et les mécanismes impliqués dans les processus de résistance *d'Atriplex halimus* aux contraintes saline et hydrique sont à l'étude en vue de faciliter la recherche de marqueurs de cette

résistance. Des analyses de valeur fourragère, d'appétence et de production de phytomasse précisent l'intérêt du genre *Atriplex*, en général, en régions arides et semi-arides de type méditerranéen. Une association équilibrée entre arbustes et strate herbacée est nécessaire pour assurer une bonne alimentation du cheptel. Plusieurs obstacles restent à franchir pour la mise au point d'une technique performante de clonage *in vitro*.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier tous les collaborateurs sans lesquels ce travail n'aurait pu exister. Ils sont nombreux et ne peuvent être nommément cités : personnel du cadre, doctorants, étudiants en DEA. Cette recherche est financée par l'Union européenne (Contrat *n° TS3*-CT94-0264).*

Bibliographie

1. BEN AHMED, H., ZID, E., EL GAZZAH, M. et GRIGNON, C. (1996) Croissance et accumulation ionique chez *Atriplex halimus* L. Cahiers Agricultures, 5: 367-372
2. BLUMENTHAL-GOLDSCHMIDT, S. et Poljakoff-Mayber A. (1968) Effect of substrate salinity on growth and on submicroscopic structure of leaf cells of *Atriplex halimus* L. Austr. J. Bot., 16: 469-478
3. GALE, J. et POLJAKOFF-MAYBER A. (1970) Interrelations between growth and photosynthesis of salt bush (*Atriplex halimus* L.) grown in saline media. Aust. J. Biol Sci., 23: 937-945.
4. MOZAFAR, A. et GOODIN J.R. (1970) Vesiculated hairs: a mechanism for salt tolerance in *Atriplex halimus* L. Plant Physiol., 45: 62-65.
5. OZENDA P. (1983) Flore du Sahara, Ed. C.N.R.S., Paris
6. SZABOLCS I. (1994) Soils and salinization. *In*: M. Pessarakli (éd.) Handbook of Plant and Crop Stress, Marcel Dekker Inc. New York-Basel-Hong Kong, pp. 3-11.

A12 : Présentation d'un programme international d'amélioration du Blé dur pour le bassin méditerranéen

NACHIT M.M.[1]*, PICARD E.[2], MONNEVEUX P.[3], LABHILILI M.[1], BAUM M.[1], RIVOAL R.[4].

[1] CIMMYT/ICARDA Durum wheat program POBox 5466 Aleppo (Syrie) e mail : M.Nachit@CGNET.COM

* *Adresse pour le courrier concernant cette communication*

[2] Université de Paris-Sud XI,. Labo MVE, bât 360, F-91405 Orsay Cedex

[3] ENSAM INRA 2 Place Viala F-34060 MONTPELLIER Cedex 1

[4] INRA Rennes Unité Nématologie BP29 F-35650 Le RHEU.

PRÉSENTATION GÉNÉRALE DU PROGRAMME ET DU RÉSEAU DE RECHERCHE INTÉGRÉE

Origine du programme

La nécessité de ce réseau est née des activités mises en place depuis 1984 dans le cadre de collaborations bilatérales ou multilatérales entre certains partenaires du Nord et du Sud. Parmi celles-ci on trouve pour ce qui concerne la France, les actions du Ministère des Affaires Étrangères dans le domaine de la collaboration technique et scientifique (INRA, Universités) et les GRAM (Groupes de Recherches Agronomiques Méditerranéennes). Les chercheurs du programme blé dur CIMMYT/ICARDA entretiennent depuis 1977 avec les programmes nationaux des pays du sud du pourtour Meditérranéen et depuis 1986 avec la France des relations scientifiques dans le cadre de plusieurs programmes : a) programme tolérance à la sécheresse chez le blé dur, b) programme biotechnologies *in vitro* Université Paris Sud/ICARDA/MAE France, puis c) programme MAE-France/UNDP/ICARDA et d) l'évaluation des ressources génétiques (programme ICARDA/INRA France). On pourrait faire le même constat pour les autres équipes européennes (italiennes, belges et espagnoles), américaines (Canada et États-Unis) ou australiennes.

Ce réseau international «Durum wheat *SEWANA* » ou « Blé dur SEOUANA» (SE : Sud Europe ; OUA : Ouest Asie ; NA : Nord Afrique ou *SEWANA* en anglais avec *WA pour West Asia*) auquels se rattachent plusieurs institutions francophones du pourtour méditerranéen est donc le fruit de toutes les collaborations initiées et citées ci-dessus. Le réseau SEOUANA a été créé en Décembre 1993 à l'initiative plus particulièrement du programme blé dur CIMMYT/ICARDA (M. Nachit), de l'INRA-ENSAM Montpellier (P. Monneveux), et des membres français du comité de pilotage des biotechnologies à l'ICARDA (A. Deshayes pour l'INRA ; E. Picard pour l'Université Paris-Sud XI).

Objectif général

L'objectif du programme blé dur SEOUANA est de promouvoir une approche globale de l'amélioration génétique de cette céréale pour la tolérance aux stress biotiques et abiotiques ainsi que pour ses qualités pastière et semoulière, qui intègre en les combinant à la fois le marquage moléculaire de son génome nucléaire, les approches morphophysiologiques et biotechnologiques pour une meilleure utilisation des

ressources génétiques de cette espèce et de celles qui lui sont apparentées. La mise en œuvre de ce programme est sur le point d'aboutir à l'établissement de cartes de marqueurs moléculaires. Ces cartes doivent permettre de localiser des loci contrôlant la tolérance aux principaux stress abiotiques et biotiques ainsi que ceux qui contrôlent la qualité du grain, ce qui devra par conséquence améliorer l'efficacité de la sélection de cette céréale, très importante de point vue agricole et industriel pour tous les pays du pourtour méditerranéen.

La contrainte «sécheresse» est une des causes annuelles de pertes importantes en rendement des plantes cultivées dans les régions concernées. Chez le blé dur, ces pertes peuvent représenter de 10 à 80 % de la récolte. D'autres stress, comme les températures extrêmes (le froid et la chaleur terminale), liés à la sécheresse, ou bien des attaques parasitaires comme celles causées par les maladies racinaires (*root rot*), la cécidomie (mouche de Hesse), les nématodes, et les virus, viennent intensifier les dommages causés par la sécheresse. La sélection de la résistance/tolérance à ces contraintes est difficile à cause de leur nature complexe, de leur contrôle polygénique et des fortes interactions génotype x milieu observées dans leur expression.

Les variétés de pays (*landraces*) et les espèces apparentées sauvages (*wild relatives*) possédant des caractères nouveaux et intéressants sont évaluées et utilisées pour améliorer les variétés cultivées de blé dur.

Le réseau SEOUANA regroupe 40 Institutions (centres internationaux CIMMYT/ ICARDA, instituts nationaux agronomiques, universités) situées dans 16 pays dans le bassin méditerranéen, USA, Australie, et Canada) représentées par environ 80 chercheurs. La **figure 1** donne la composition du réseau : centres de recherche agronomiques, universités, instituts nationaux agronomiques, centres internationaux tel que l'ICARDA et le CIMMYT. Trois réunions du réseau -Montpellier, Alep, Rabat- ont déjà eu lieu. Les équipes francophones présentes et actives au sein du programme « Blé dur SEOUANA » sont nombreuses. Une partie du réseau SEOUANA prend part activement aux réseaux WANADDIN (CIMMYT/ICARDA/IFAD) et « Interdrought » (CEE-AIR). Ces équipes, aux spécialités et compétences complémentaires ont ainsi, comme on l'a vu, entre elles et avec le programme de blé dur CIMMYT/ICARDA, une longue expérience de collaboration (programmes bâtis autour de modèles génétiques communs, co-encadrements de thèses, stages et visites fréquents, échanges d'étudiants...).

L'existence de ce réseau a déjà servi de substrat à plusieurs projets. Les équipes françaises ont reçu un financement de soutien au réseau de la part de l'INRA de 1993 à 1998. Il a conduit également à la constitution d'une Action de Recherche Concertée (ARC) financée par l'AUPELF UREF pour la période allant de décembre 1995 à décembre 1999, dans le domaine des biotechnologies cellulaires.

LE PROJET SCIENTIFIQUE DU RÉSEAU SEOUANA

Le blé dur (*Triticum turgidum* L. *var durum*) est cultivé principalement dans les pays du bassin méditerranéen. Le blé dur représente environ 8% des superficies de blé dans le monde ; sa culture est principalement pratiquée sous des climats de type méditerranéen, caractérisés par des sécheresses : celles-ci seraient responsables des pertes représentant 10 à 50 % de la collecte suivant les années. Le blé dur occupe, dans les pays du pourtour méditerranéen, une place importante dans l'alimentation humaine, et elle est à l'origine de nombreux aliments traditionnels (couscous, taboulé, frikey, pâtes alimentaires, pains et galettes de semoule,...). Les pays méditerranéens sont des gros consommateurs de blé dur. Dans le cadre international, la collaboration

méditerranéenne et francophone joue un rôle important dans la recherche sur l'amélioration génétique chez le blé dur.

Le projet scientifique du réseau SEOUANA s'organise ainsi autour des axes suivants :

1. *L'étude des caractères morphophysiologiques de tolérance aux stress hydrique et thermique :* variations au sein de l'espèce blé dur et des espèces apparentées, étude du déterminisme génétique, recherche de critères prédictifs de la stabilité de rendement et de l'efficience d'utilisation de l'eau.
2. *L'établissement de la carte des marqueurs moléculaires du blé dur.*
3. *L'établissement des cartes génétiques de croisements intra et interspécifiques, en vue de l'identification par approche QTL,* « *quantitative trait loci* », de marqueurs de résistance aux stress abiotiques (stress hydrique) et biotiques (principalement mouche de Hesse et nématodes à kystes) ou de marqueurs de la qualité.
4. *L'amélioration de la qualité, (objectif de sélection incontournable chez le blé dur).*
5. *Le développement des biotechnologies* in vitro, *en particulier* : l'haplodiploïdisation, la culture de cellules isolées embryogènes, la culture de microspores isolées et le sauvetage d'embryons immatures.
6. *L'utilisation plus efficiente des ressources génétiques.*

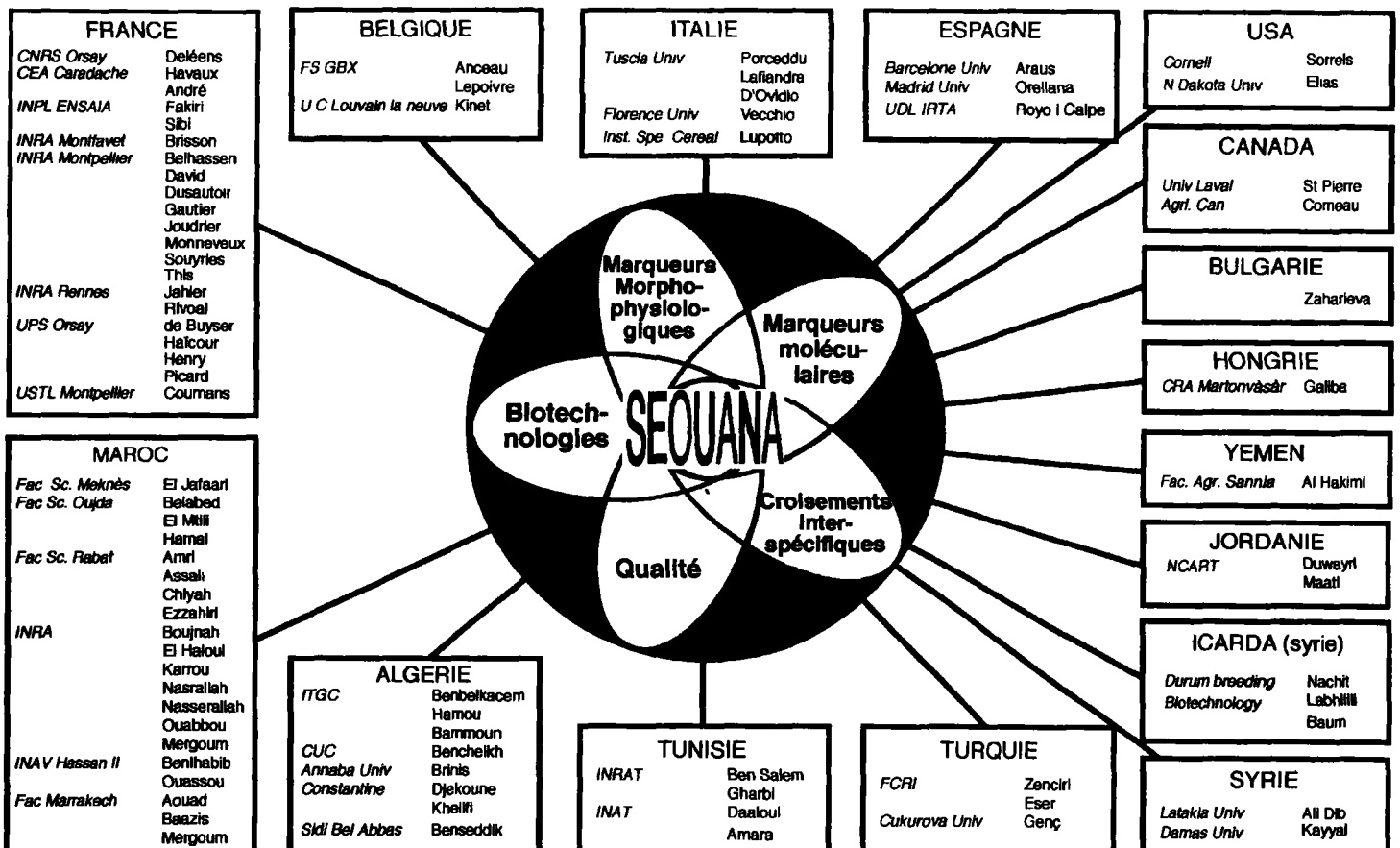
Les programmes menés au sein du réseau ont la particularité :

- de combiner étroitement ces différents outils (outils physiologiques, marquage moléculaire, biotechnologies) et différentes équipes ;
- de porter sur des « modèles génétiques » (variétés-témoins, collections de référence, populations de SSD issues des mêmes croisements ou plus tard d'haploïdes doublés) communs à plusieurs partenaires de réseau. Afin de ne pas disperser les efforts et de pouvoir comparer les résultats et les exploiter sur une base commune, il a été décidé pour l'instant de travailler le plus possible sur une collection commune de lignées et à partir d'un seul croisement cible (Cham 1 x Jennah Khetifa) pour la cartographie génomique. De même, pour les croisements éloignés une collection de Triticum 2n et 4n a été choisie après évaluation. On trouvera ci-après quelques uns des aspects de ce programme.

Analyse et introgression des caractères morphophysiologiques de tolérance à la sécheresse des espèces sauvages apparentées chez le Blé dur

L'amélioration génétique de la tolérance à la sécheresse d'une espèce cultivée passe par une sélection pour des caractères morphophysiologiques liés au rendement en conditions de sécheresse. Cette sélection « indirecte » exige préalablement :

- une identification et une étude génétique (héritabilité, mode de transmission) des caractères retenus ; une telle étude doit être menée sur des populations en ségrégation (populations F2 et BC1, lignées issues de SSD ou d'haplodiploïdisation), obtenues à partir de géniteurs connus (« matériel de référence»), et qui peuvent également servir à la recherche de marqueurs moléculaires de la tolérance ;
- une validation du choix des caractères retenus, à partir de schémas de sélection divergente pour ces caractères incluant une évaluation du matériel produit dans des environnements contrastés.
- une recherche de certains caractères de tolérance chez les espèces apparentées, et leur introgression chez le blé dur.


FRANCE
CNRS Orsay Deléens
CEA Caradache Havaux
André
INPL ENSAIA Fakiri
Sibi
INRA Montfavet Brisson
INRA Montpellier Belhassen
David
Dusautoir
Gautier
Joudrier
Monneveux
Souyries
This
INRA Rennes Jahier
Rivoal
UPS Orsay de Buyser
Haïcour
Henry
Picard
USTL Montpellier Coumans
BELGIQUE
FS GBX Anceau
Lepoivre
U C Louvain la neuve Kinet
ITALIE
Tuscia Univ Porceddu
Lafiandra
D'Ovidio
Florence Univ Vecchio
Inst. Spe Cereal Lupotto
ESPAGNE
Barcelone Univ Araus
Madrid Univ Orellana
UDL IRTA Royo i Calpe
USA
Cornell Sorrels
N Dakota Univ Elias
CANADA
Univ Laval St Pierre
Agri. Can Corneau
BULGARIE
Zaharieva
HONGRIE
CRA Martonvàsàr Galiba
YEMEN
Fac. Agr. Sannia Al Hakimi
JORDANIE
NCART Duweyri
Maatl
ICARDA (syrie)
Durum breeding Nachit
Biotechnology Lebhilili
Baum
SYRIE
Latakia Univ Ali Dib
Damas Univ Kayyal
TURQUIE
FCRI Zenciri
Eser
Cukurova Univ Genç
TUNISIE
INRAT Ben Salem
Gharbi
INAT Daaloul
Amara
ALGERIE
ITGC Benbelkacem
Hamou
Bammoun
CUC Benchelkh
Annaba Univ Brinis
Constantine Djekoune
Khelifi
Sidi Bel Abbas Benseddik
MAROC
Fac Sc. Meknès El Jafaari
Fac Sc. Oujda Belabed
El Mtili
Hamal
Fac Sc. Rabat Amri
Assali
Chlyah
Ezzahiri
INRA Boujnah
El Haloui
Karrou
Nasrallah
Nasserallah
Ouabbou
Mergoum
INAV Hassan II Benlhabib
Ouassou
Fac Marrakech Aouad
Baazis
Mergoum
Marqueurs Morpho-physiologiques
Marqueurs moléculaires
Biotechnologies
SEQUANA
Croisements inter-spécifiques
Qualité

Plusieurs génotypes de blé dur sont générés à partir des croisements avec des espèces sauvages dont certains cumulent la productivité et la tolérance aux stress biotiques et abiotiques tels que la résistance aux rouilles, septoriose, virus russe de blé, sécheresse, froid, et chaleur. Ces résultats sont encourageants et prometteurs pour l'utilisation à grande échelle des espèces sauvages dans l'amélioration génétique chez le blé dur.

Les caractères morphophysiologiques au sein des populations de référence en cours de marquage

L'intégration des études physiologiques, génétiques, et moléculaires, passe par le choix d'un matériel de référence unique servant de base à l'ensemble de ces études. Le choix doit être effectué en tenant compte du comportement agronomique des variétés, de leurs caractéristiques physiologiques (caractères racinaires, ajustement osmotique, photosynthèse,...) et de leur capacité androgénétique (l'obtention d'haploïdes doublés facilitant les études génétiques et moléculaires ultérieures).

Divers caractères morphophysiologiques de tolérance à la sécheresse seront étudiés sur des populations de lignées SSD, puis d'haploïdes doublés, obtenus à partir du croisement ciblé Cham1 x Jennah Khetifa (variétés contrastées pour un ensemble de caractères morphophysiologiques, –en particulier pour leur capacité d'ajustement osmotique–, qualité du grain, résistance aux maladies, et possédant une bonne capacité androgénétique). Ce matériel de référence permettra une étude génétique de divers caractères morphophysiologiques liés à l'ajustement osmotique et à la photosynthèse ; il servira également de base à une recherche de marqueurs moléculaires de ces caractères.

Les caractères morphophysiologiques observés chez les lignées au cours d'une sélection divergente

La mise en évidence de relations entre le rendement en conditions de sécheresse et certains caractères morphophysiologiques ne permet pas à elle seule de conclure un rôle effectif de ces caractères dans les mécanismes de tolérance. La sélection pour ces caractères, suivie d'une évaluation agronomique du matériel issu de la sélection, est une voie possible de validation. Une telle procédure, qui conduit à travailler sur des populations en ségrégation, est par ailleurs susceptible d'apporter des informations utiles sur la génétique (héritabilité, mode de transmission) des caractères concernés.

L'objectif des travaux entrepris est d'évaluer les effets d'une sélection pour certains caractères morphophysiologiques tels que le volume racinaire, la teneur relative en eau, l'accumulation de proline, la fluorescence chlorophyllienne, et le rapport isotopique du grain (13C/12C) ; et pour la qualité de grain tels que le contenu de protéine, les caroténoïdes, et la force de gluten. Le calcul de l'héritabilité de ces caractères permettra par ailleurs de préciser les conditions de leur utilisation en sélection.

Cette recherche est conduite de plus sur du matériel issu de croisements interspécifiques entre espèces tétraploïdes. Ceci devrait compléter nos informations sur l'intérêt potentiel de ces espèces pour l'amélioration du blé dur.

Un programme de sélection récurrente, dont l'objectif serait de « cumuler » ces différents caractères et mécanismes d'adaptation à la sécheresse a été initié; il viendrait compléter une étude comparative de différents schémas de sélection (généalogique, bulk, F2 progeny) déjà appliqués sur ce matériel.

Les travaux précédents élaborés sur l'utilisation des variétés locales et les caractères morphophysiologiques ont abouti au développement de plusieurs variétés de blé dur

adaptées aux conditions climatiques à déficit hydriques. La première génération de ces variétés telles que Cham1 et Cham3, qui ont remplacé les variétés locales pour la première fois dans les zones arides, sont cultivées maintenant sur des larges superficies qui dépassent déjà des millions d'hectares dans le bassin méditerranéen. Quant à la deuxième génération de variétés de blé dur telles que Omrabi et Awalbit, qui démontre un niveau plus haut de tolérance à la sécheresse, elle est d'ores et déjà lancée par plusieurs pays pour la production commerciale. Ces variétés montrent aussi une productivité plus stable, elles sont moins sensibles aux variations climatiques. Les orientations actuelles du programme ciblent une tolérance combinée aux stress abiotiques multiples (sécheresse, froid, et chaleur).

Mise en évidence de gènes candidats impliqués dans la tolérance à la sécheresse chez le blé dur et cartographie moléculaire des caractères associés aux stress biotiques et abiotiques.

• *Cartographie d'une population de Blé dur de référence*

Un croisement modèle (le croisement Jennah Khetifa x Cham 1) a été réalisé en 1992 et vers la fin de l'année 1995, les lignées ont été multipliées et les graines sont distribuées à tous les instituts collaborant au projet. De même, une accession de l'espèce sauvage *Triticum dicoccoides* a été croisée puis recroisée avec Korifla et Omrabi5 en 1992. Par sélection SSD, les populations sont conduites jusqu'au stade F_6 et multipliées à la génération F_7. Des analyses de linkage notamment pour l'établissement de QTL sont faites en utilisant les marqueurs RFLPs, RAPDs, microsatellites, et AFLPs. Le marquage moléculaire par des marqueurs RFLPs est fait en collaboration avec l'Université Cornell, Ithaca, USA. Les populations de lignées obtenues sont testées dans des sites et au travers du réseau multilocal d'essai coordonné par le programme blé dur de CIMMYT/ICARDA. Les informations obtenues a partir de ce réseau d'essai sur les performances aux champs, laboratoires, et les résistances des caractères morphophysiologiques et physiologiques seront utilisés pour l'étude et l'analyse des QTL. Les lignées bien contrastées pour des caractères à hérédité simple seront sélectionnées. Une carte de marqueurs est d'ores et déjà construite et une carte de QTL est en cours de construction.

• *Polymorphisme des gènes candidats impliqués dans la tolérance à la sécheresse chez le blé dur. Marqueurs moléculaires liés à des loci contrôlant la tolérance à la sécheresse*

Dans le but d'identifier des marqueurs moléculaires de l'adaptation à la sécheresse, l'étude des gènes inductibles par un stress hydrique a été entreprise. L'intérêt a été porté sur les gènes qui codent pour les LEA (*late embryogenesis abundant*) protéines, qui sont synthétisées spécifiquement pendant la phase de dessication du grain et pourraient faire partie du système de tolérance au stress hydrique. C'est en fin de développement, juste avant la dessication finale de l'embryon, que les ARNm et les LEA protéines sont les plus abondants. Cette recherche devrait permettre d'améliorer nos connaissances des bases moléculaires de la tolérance à la sécheresse des blés durs, et du comportement de cultivars tolérants et sensibles.

La définition de marqueurs moléculaires stables liés aux loci contrôlant la tolérance à la sécheresse permet d'envisager une sélection assistée par marqueurs pour l'amélioration de ce caractère chez le blé dur, facilitant ainsi le choix du sélectionneur.

Par ailleurs l'approche QTL (*quantitative trait loci*) menée actuellement sur l'orge considérée comme modèle doit être progressivement transférée au blé dur et aux

espèces apparentées, en favorisant le positionnement, sur les cartes génétiques, des mécanismes considérés et analysés.

• *Développement de marqueurs moléculaires pour la caractérisation des biotypes de Mouche de Hesse et Nématodes*

Plusieurs stress biotiques interagissent avec le déficit hydrique pour réduire de manière drastique les rendements du blé dur en zones méditerranéennes : c'est le cas pour les maladies des racines, mouche de Hesse et nématodes. L'amélioration de la production du blé dur passe donc dans ces zones par un meilleur contrôle de ces parasites largement distribués. La lutte contre la mouche de Hesse et les nématodes des céréales ne peut, pour des raisons techniques, économiques, et environnementales, être envisagée que par l'amélioration génétique de la résistance. Les connaissances réunies sur la mouche de Hesse et les nématodes à kystes des céréales montrent toutefois que cette lutte contre ces parasites par la résistance variétale ne peut réussir que si l'on utilise des gènes de résistance efficaces à l'encontre de la virulence des biotypes visés.

Le projet a pour but d'étudier dans un premier temps la variabilité des mouches de Hesse et des nématodes quant à leur virulence, pour réaliser dans un second temps des études sur le marquage de la résistance et la sélection de variétés. Il offre l'opportunité d'approfondir la connaissance de la variabilité dans ces deux taxons dont la richesse résulte vraisemblablement de la co-évolution plante-parasite obligatoire.

Amélioration de la qualité du grain chez le blé dur

Chez le blé dur, la qualité est primordiale. En l'absence de cette qualité, c'est le blé tendre, plus productif, plus polymorphe, qui sera cultivé. La qualité fait donc partie intégrante de la spécificité du blé dur, céréale avant tout méditerranéenne. Les espèces sauvages, les variétés locales et les populations de pays représentent une source très riche de variabilité pour les caractères de qualité. Le *Triticum dicoccoides* est utilisé intensivement dans l'amélioration génétique pour améliorer la valeur nutritionnelle et technologique de blé dur.

Le rôle des gliadines et des sous-unités communes de gluténines est déjà bien connu. Par contre, on peut envisager d'étudier par exemple le rôle des sous-unités rares et les petites protéines riches en cystéine qui n'ont pas encore fait l'objet d'études systématiques en ce qui concerne la variabilité et les effets sur la qualité.

À partir de la variabilité intraspécifique de base étudiée au sein du programme SEOUANA (144 accessions et lignées fixées issues des croisements de référence), le polymorphisme pour les protéines de réserve (gluténines, gliadines) et pour les petites protéines riches en cystéine (Lipid Transfer Proteins, CM protéines inhibitrices d'alpha-amylase, impliquées dans l'état de surface des pâtes) est étudié. La relation avec les prédicteurs simples de la qualité des semoules (dureté) et des pâtes (test de sédimentation, farinographe de Brabender) sera établie.

La sélection assistée par marqueurs (SAM) ouvre dans ce champ de nouvelles possibilités. Les gliadines de type gamma-45 et gamma-42 et les gluténines de faible poids moléculaire (LMW) de type 1 et 2, ont été associées à la force de gluten chez le blé dur. L'amplification par PCR, technique rapide et simple, des différents allèles de gamma gliadines et LMW gluténines de type 1 et 2, a été développée en collaboration avec l'université de Tuscia, Viterbo, Italie. L'identification de quelques marqueurs moléculaires associés à la qualité est utilisée, d'autres marqueurs moléculaires et la carte génomique du blé dur sont en cours de développement.

Biotechnologies cellulaires

L'un des objectifs importants du programme Blé dur SEOUANA est de promouvoir l'utilisation combinée des outils biotechnologiques et ceux de la sélection plus classique. Notamment, il est désormais acquis que l'haplodiploïdisation est un outil efficace tant en sélection qu'en marquage moléculaire. De même, il est probable que les cultures cellulaires *in vitro* (suspensions cellulaires, cultures de microspores isolées) permettront de tester *in vitro* la variabilité génétique de réponse aux stress et de classer les génotypes suivant ce critère. Enfin, la mise au point de modèles cellulaires hautement performants, facilitant la régénération, rendra plus probable la réussite de la transformation génétique chez le blé dur.

• *Production de populations de référence d'haploïdes doublés (HDs) pour la cartographie. Amélioration des méthodes de production d'HD*

La construction de cartes de marqueurs moléculaires est grandement facilitée quand on utilise des populations d'HDs issues des croisements étudiés. Ces lignées que l'on peut considérer comme «éternelles», permettent de mieux étudier leur valeur génétique d'une part, et d'autre part donne accès à toute la variabilité génétique sans ambigüité (dominance, co-dominance).

Le premier objectif est d'obtenir à partir du croisement de référence (Cham1 x Jennah Khetifa) un nombre suffisant de lignées HDs (200 HDs environ) pour constituer une population de référence pour la cartographie. Pour ce faire, nous sommes en train d'utiliser principalement le croisement intergénérique avec le maïs, qui est la seule méthode efficace aujourd'hui chez le blé dur pour l'obtention d'haploïdes doublés, en tentant d'améliorer cette méthode notamment en ce qui concerne la régénération de plantes.

La méthode de culture de microspores isolées est également expérimentée.

• *Étude de deux modèles cellulaires pour la recherche de critères d'évaluation au niveau cellulaire de l'adaptation aux stress et pour la sélection* in vitro.

• *Le modèle culture de cellules isolées embryogènes.*

On cherchera à savoir si les cultures de suspensions cellulaires obtenues à partir des tissus somatiques d'embryons haploïdes ou diploïdes des lignées de blé dur étudiées dans le programme SEOUANA ont un comportement corrélé à celui du comportement de ces lignées aux champs. Peut-on utiliser un tel système pour évaluer au niveau cellulaire les ressources génétiques?

Le but est de caractériser les paramètres métaboliques des suspensions cellulaires soumises aux stress étudiés par rapport à un témoin *in vitro* non stressé. Un autre objectif poursuivi est d'établir des cultures en suspension cellulaires haploïdes et diploïdes très embryogènes afin de permettre les premières tentatives de transformation génétique.

• *Le modèle de culture de microspores isolées*

Le thème général de cette recherche est l'étude de la variabilité génétique de la réponse aux stress thermique ou salin des microspores isolées de blé tendre et de blé dur cultivées *in vitro*. Le modèle blé tendre devra dans ce cas servir à établir un modèle de culture de microspores isolées chez le blé dur. Peut-on déterminer au niveau mono-cellulaire haploïde (microspores isolées cultivées *in vitro* sous stress) la sensibilité ou la tolérance aux stress des lignées de blé tendre ou de blé dur ? Y a-t-il une corrélation positive entre le comportement de ces microspores *in vitro* et celui des plantes

adultes ? Enfin, peut-on sélectionner au cours de la culture des microspores pour la tolérance aux stress hydrique ou salin?

L'objectif est de définir les paramètres cellulaires discriminants qui caractérisent la réponse précoce des microspores isolées *in vitro* aux stress hydrique ou salin. D'autre part, on cherchera à appliquer la méthode de culture de microspores isolées chez le blé dur afin d'améliorer la production de plantes haploïdes chlorophylliennes chez cette espèce et plus tard de transformer génétiquement cette espèce en se servant des microspores embryogènes comme cibles dans des expériences de biolistique.

L'utilisation des espèces apparentées sauvages dans l'amélioration génétique de Blé dur

De nombreux caractères d'intérêt pour la tolérance aux stress abiotiques (déficit hydrique, salinité, hautes et basses températures) sont présents chez les espèces sauvages de blé domestiquées du genre *Triticum*, chez les espèces du genre *Aegilops* ou chez les variétés locales de blé dur. Si ces espèces ont été largement utilisées pour l'amélioration de la résistance aux maladies, il n'en est pas de même dans le cas des tolérances aux stress abiotiques (multigéniques, et plus délicates à manipuler en sélection. Cette étude passe par une amélioration de la gestion de ces ressources (analyse de la diversité génétique, constitution de collection de référence), de leur évaluation (vis-à-vis des stress abiotiques et biotiques), et de l'introgression des caractères favorables.

Les différentes étapes de cette recherche sont les suivantes :

- criblage de populations des espèces sauvages et particulièrement d'*Aegilops* de différentes espèces et origines, pour la tolérance au stress hydrique, à partir de critères simples (teneur relative en eau, rapport isotopique) ; cette évaluation est complétée par une évaluation « en réseau » pour d'autres caractères (résistance aux nématodes, résistance aux maladies foliaires et tolérance au froid, résistance à la mouche de Hesse, résistance au virus de la jaunisse nanisante), ainsi que par des études de structuration de la diversité des *Aegilops* méditerranéens ;
- criblage spécifique pour la tolérance aux hautes températures, et comparaison du blé dur et des *Aegilops* pour différents mécanismes intervenant dans la tolérance aux stress combinés déficit hydrique x hautes températures x hautes intensités lumineuses ;
- réalisation de croisements interspécifiques: création d'amphiploïdes et lignées recombinantes ;
- sélection des lignées selon une stratégie à deux « voies » : voie « analytique » (suivi des introgressions par marqueurs et évaluation physiologique des recombinants) d'une part et voie « globale » (gestion dynamique des populations dans différents environnements).

Les résultats préliminaires montrent que l'utilisation des espèces apparentées sauvages est prometteuse pour l'amélioration des tolérances aux contraintes abiotiques.

CONCLUSION

Au cours des dernières années, et pour mieux répondre aux enjeux que représente pour les zones méditerranéennes l'amélioration génétique de cette espèce, les collaborations entre scientifiques travaillant sur le blé dur se sont considérablement développées. Le programme « Blé dur SEOUANA » s'est donné pour objectifs de développer et de rendre plus efficaces ces collaborations, en les structurant autour de thématiques ou d'outils jugés prioritaires pour l'amélioration génétique du blé dur et en promouvant la

prise en compte de plusieurs niveaux d'intégration. Cela a déjà conduit au développement de variétés tolérantes aux stress biotiques et abiotiques incluant la sécheresse. Ces nouvelles variétés recombinant productivité et tolérance à la sécheresse commencent à être cultivées sur des grandes superficies.

Cette approche globale combine non seulement la sélection conventionnelle, mais également les méthodes de cultures *in vitro*, les outils morphophysiologiques et les marqueurs moléculaires, pour l'obtention d'un germoplasme qui peut être utilisé immédiatement par les sélectionneurs dans le but d'augmenter la durabilité de l'agriculture dans l'environnement méditerranéen.

Bibliographie

1. AL HAKIMI A., MONNEVEUX P. 1993. Variation of some morphophysiological traits of drought tolerance in tetraploid wheats. In; Biodiversity and Wheat Improvement, Damania A.B. ed., 199-216.
2. AL HAKIMI A., MONNEVEUX P., Deléens E. 1995a. Selection response for carbon isotope discrimination in a *Triticum polonicum* x *Triticum durum* cross: potential interest for improvement of water efficiency in durum wheat. Plant Breeding (sous presse).
3. AL HAKIMI A., MONNEVEUX P., Galiba G. 1995b. Soluble sugars, proline, and relative water content (RWC) as traits for improving drought tolerance and divergent selection for RWC from *T. polonicum* into *T. durum*. J. Genet. and Breeding, 49, 237-244.
4. AL HAKIMI, A., MONNEVEUX P., NACHIT M.M.. 1996. Direct and indirect selection for drought tolerance in alien tetraploid wheat x durum wheat crosses. 5th International Wheat Conference, June 10-14, 1996, Ankara. Abstracts,p.172.
5. ALI DIB T. , MONNEVEUX P., ACEVEDO E., NACHIT M. 1991. Evaluation of proline analysis and chlorophyll fluorescence quenching measurements as drought tolearnce indicators in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*), Euphytica, 79, 65-73.
6. ALI DIB T., MONNEVEUX P. 1992. Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. I. Caractères morphologiques d'enracinement. Agronomie, 12, 371-379.
7. AMARA. H, DAALOUL A. 1993. Comparaison de milieux pour la production d'haploides chez le blé dur (*Triticum durum*) In: Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditéranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale. Montpellier. Eds INRA Paris.
8. AMRANI N., SARRAFI A., ALIBERT G. 1993. Genetic variability for haploid production in crosses between tetraploid and hexaploid wheats with maize. Plant Breeding , 110: 123-128.
9. ARAUS J.L. ALEGRE L., ALI DIB T., BENLARIBI M., MONNEVEUX P. 1991. Epidermal and stomatal conductance in seedlings of durum wheat landraces and varieties. *In* Acevedo E., Conesa A.P., Monneveux P., Srivastava J.P., Physiology-Breeding of Winter cereals for stressed mediterranean environments. INRA ed. Les Colloques n° 55, 225-242.
10. ARNAU G., MONNEVEUX P., ALEGRE L., ARAUS J.-L. Osmotic adjustment and effects on water deficit on photosynthetic capacity in barley. (accepté, Photosynthetica)
11. AUTRIQUE E., NACHIT M.M., MONNEVEUX P., TANKSLEY S.D., SORRELS M.E. 1996. Genetic diversity in durum wheat based on restriction fragment length polymorphism, morphophysiological traits and coefficient of parentage. Crop Sci., 36, 735-742.
12. BELHASSEN E., THIS D., MONNEVEUX P. 1995. l'adaptation génétique face aux contraintes de sécheresse. Cahiers de l'Agriculture, 4, 251-261.
13. COMEAU A., PLOURDE A., ST PIERRE C.A., NADEAU P. Production of doubled haploid wheat lines by wheat x maize hybridization. Genome, 1988, 30 , Suppl 1: 482 (Résumé).
14. COUMANS M.P., BOUTOUCHENT B., DUSAUTOIR J.C., KAAN F. Obtention d'embryons par croisements interspécifiques entre le blé dur et d'autres céréales. In: Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditéranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale. Montpellier. Eds INRA Paris 1993: 375-381.
15. DE BUYSER J, PICARD E. 1996 Poster Abstracts. Plant Embryogenesis Workshop. From Single Cell to Plant. HAMBURG Inst of General Botany. Sept 12-14 1996.

16. EL BOUHSSINI M., LHALOUI S., AMRI A., JLIBENE M., HATCHETT J.H., NSSARELLAH N., NACHIT M.M.. 1996. Wheat genetic control of Hessian fly (Diptera: Cecidomyiidae) in Morocco. Field Crop Research. 45: 111-114.
17. EL HADDOURY J., CHLYAH H., PICARD E., 1993. Etude de l'effet de quelques facteurs génotypiques et environnementaux de l'androgennèse in vitro chez des variété de blé tendre adaptées au Maroc. Dans : "Le progrès génétique passe-t-il par le repérage des gènes ?". Editeurs : Y. Demarly, H. Chlyah. Eds AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext Paris 1993 : 221-232.
18. EL HADDOURY J., CHLYAH H., PICARD E., 1993. Étude de l'effet de quelques facteurs génotypiques et environnementaux de l'androgenèse *in vitro* chez des variété de blé tendre adaptées au Maroc. Dans : "Le progrès génétique passe-t-il par le repérage des gènes ?". Editeurs : Y. Demarly, H. Chlyah. Eds AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris 1993 : 221-232.
19. GHAEMI M., SARRAFI A., ALIBERT G. Influence of genotype and culture conditions on the production of embryos from anthers of tetraploid wheat (Triticum turgidum). Euphytica, 1993, 65: 81-85.
20. HAVAUX M. 1993. La fluorescence de la chlorophylle *in vivo*: quelques concepts appliqués à l'étude de la résistance de la photosynthèse aux contraintes de l'environnement. In: Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale. Colloque INRA-ENSA-AGROPOLIS, Montpellier (France), INRA ed. n°64, 19-30.
21. IMPIGLIA A., NACHIT M.M., SALEH A., LAFIANDRA D., and PORCEDDU E. 1996. Occurrence of unusual storage proteins electrophoretic patterns in durum wheat and their effect on gluten strength. 5th International Wheat Conference, June 10-14, 1996, Ankara. Abstracts, p.68.
22. KAYYAL H., ABU HAMZE H., JARRAH M., NACHIT M.M. 1995. Durum wheat production and quality in Syria. In: Durum Wheat Quality in the Mediterranean Region. Options Mediterranéennes, serie A, No.22, CHEAM. Edits: Di Fonzo, F. Kaan, M.Nachit. Region, Zaragoza, Spain, 17-19 Nov., 1993. p. 127-32
23. LASHERMES P. Screening for stress tolerant genotypes via microspore in vitro culture. In: Physiology and breeding of winter cereals for stressed meditarranean environments., Montpellier, France, July 3-6, 1989, Eds: Acevedo E., Conesa A. P, Monneveux Ph, Srivastava J. P, INRA/ICARDA, Paris, 1991, Colloques n°55: 461-474.
24. MERGOUM M., NACHIT M.M., and NASRELLAH N. 1993. Screening durum wheat for dryland root rot resistance in Morocco. Agr. Abs., American Society of Agronomy, Cincinnati, Ohio, USA.
25. MIHAMOU-ZIYYAT A., IBRIZ M., MONNEVEUX P. et PICARD E., 1993, Sélection gamétique *in vitro* au cours de l'androgenèse pour la tolérance au choc thermique : application au blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Le progrès génétique passe-t-il par le repérage des gènes ? Editeurs : Y. Demarly, H. Chlyah.Eds AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris 1993 : 207-220.
26. MONNEVEUX P. 1991. Quelles stratégies pour l'amélioration génétique de la tolérance au déficit hydrique des céréales ? In: L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides, Demarly Y. et Chalbi N. eds., AUPELF-UREF, 165-186.
27. MONNEVEUX P., BELHASSEN E. 1996. The diversity of drought adaptation in the wide. Plant Growth Regulation, 20, 85-92.
28. NACHIT M., BAUM M., AUTRIQUE E., SORRELLS M.E., ALI DIB T., MONNEVEUX P. 1992. Association of morphophysiological traits with RFLP markers in durum wheat. *In*: Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale. Colloque INRA-ENSA-AGROPOLIS, Montpellier (France), INRA ed. n°64, 429-434.
29. NACHIT M.M. 1996. Durum integrated research network for Mediterranean dryland. 5th International Wheat Conference, June 10-14, 1996, Ankara, Turkey. Book of abstracts, p. 458.
30. NACHIT M.M., BAUM M., IMPIGLIA A., KETATA H. 1995. Studies on some grain quality traits in durum wheat grown in the Mediterraean environments. In: Durum Wheat Quality in the Mediterranean Region. Options Mediterranéennes, serie A, No.22, CIHEAM. Edits: Di Fonzo, F. Kaan, M.Nachit. Region, Zaragoza, Spain, 17-19 Nov., 1993. p. 181-188.
31. NSARELLAH N., NACHIT M.M., EL BOUHSSINI M., AMRI A. 1996. Introgression of Hessian Fly reistance into durum wheat5th International Wheat Conference, June 10-14, 1996, Ankara, Turkey. Book of abstracts, *in press*.

32. PAGNOTTA M.A, IMPIGLIA A., TANZARELLA O.A., M.M. NACHIT M.M., PORCEDDU E.. 1996. Variability present in durum wheat landrace Haurani. 5th International Wheat Conference, June 10-14, Ankara. Bookofabstracts,p.67.
33. PICARD E., CRAMBES E., MIHAMOU-ZIYYAT A., 1994 L'haplodiploïdisation : un outil multi-usage pour la génétique et l'amélioration des céréales. Dans: Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Ed. AUPELF.UREF John Libbey Eurotext, Paris. PP 347-361
34. PICARD E., CRAMBES E., LIU G.S., MIHAMOU-ZIYYAT A., 1995. Evolution des méthodes d'haplodiploïdisation et perspectives pour l'amélioration des plantes. Comptes-Rendus de la Société de Biologie. C.R. Soc. Biol., 1994, 188, 107-139.
35. PICARD E., RODE A., DOUSSINAULT G., ROUSSET M., RIVES M. 1990. Wheat (*Triticum aestivum*): *in vitro* production and utilization of doubled haploïds. *In* Bajaj Y.P.S. (ed), Biotechnology in Agriculture and forestery, Springer-Verlag, Berlin, 101-124.
36. RYAN J., ABDEL MONEM M., SCHROYER J.P., EL BOUHSSINI M., NACHIT M.M. 1996 Potential for nitrogen fertilization and Hessian fly resistance to improve Morocco's sryland wheat yields. European Journal of Agronomy. *in press.*
37. THIS D., THIS P. 1993. Les principaux types de marqueurs moléculaires applicables à la sélection pour la tolérance à la sécheresse. Avantages et limites. In: Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale. Colloque INRA-ENSA-AGROPOLIS, Montpellier (France), Colloque INRA n°64, 405-422.
38. XU X., MONNEVEUX P., DAMANIA A.B., ZAHARIEVA M. 1994. Variation of salt tolerance related traits in wheat and Aegilops.IPBGR Plant Genetic Newsletter.

A13 : Les pôles régionaux et la recherche partagée en réseau : une stratégie pour intégrer les biotechnologies végétales dans l'amélioration des systèmes de culture au Maroc

EL JAAFARI S.[1], FAGROUD M.[2], EL HADRAMI I.[3], PICARD E.[4]

[1] Laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismaïl, BP 4010 Béni M'hamed, 50000-Meknès, MAROC.

[2] Centre de Calcul, École Nationale d'Agriculture, BP S/40, 50000-Meknès,MAROC.

[3] Laboratoire de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, BP S/15, 40000-Marrakech, MAROC.

[4] Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât. 360, Université de Paris Sud XI, 91405 Orsay, Cedex, FRANCE.

INTRODUCTION

Les biotechnologies présentent des potentialités immenses comme facteur d'amélioration de la production végétale. Les biotechnologies végétales classiques (micropropagation conforme, assainissement viral via la vitroculture de méristèmes) sont déjà riches en réalisations au Maroc. Les biotechnologies liées à la sélection requièrent des infrastructures plus complexes et une formation plus poussée des personnels et enfin, une intégration dans des approches privilégiant l'interdisciplinarité, seule garante d'un décloisonnement nécessaire pour favoriser l'application de ces biotechnologies aux besoins prioritaires du pays. En effet, les systèmes de production agricole font partie intégrante du tissu social, économique, politique et technologique ; on ne peut donc analyser la problématique de l'application des biotechnologies à l'agriculture sans considérer l'ensemble des filières de production.

L'intégration des biotechnologies dans la recherche agronomique passe d'abord par le renforcement de la structure de cette recherche, par la création de pôles performants de recherche à vocation régionale, par l'institution de réseaux thématiques de « recherche partagée », par la maîtrise de certains outils essentiels (techniques moléculaires et cellulaires, techniques de culture *in vitro*, technologies de l'information scientifique), par la formation à la recherche et la mobilité des chercheurs.

LA STRUCTURATION EN PÔLES RÉGIONAUX

Les pôles régionaux présentent l'avantage de répondre aux spécificités éco-régionales (Doulou, 1994). Lorsque l'on étudie les problèmes de l'environnement par exemple, on peut répartir le Maroc en différentes zones écologiques en fonction de certains critères : zones côtières, zones montagnardes, zones arides, oasis, etc. Dès lors, il est possible de construire des stratégies de recherche éco-régionales autour de projets scientifiques bien identifiés répondant aux particularités de chaque zone. Les pôles régionaux, par le fait qu'ils s'intéressent à des priorités bien définies et d'intérêt

communautaire, sont un atout considérable pour réaliser une synergie d'intervention des institutions de recherche et des agences de financement.

Pour être érigé en pôle régional d'excellence, la structure concernée doit remplir les conditions suivantes :

- Abriter une équipe de chercheurs nationaux confirmés, éventuellement renforcée par des non-nationaux de haut niveau accueillis dans le cadre de la coopération bilatérale (cas du projet CIERSACO Gembloux-Meknès) ou multilatérale.
- Posséder des infrastructures et équipements adaptés.
- Être en mesure d'accueillir des chercheurs ou stagiaires, disposer de facilités de communications ; être situé dans un environnement culturel, social et économique approprié (Jlibene et al., 1997).
- Poursuivre des programmes de recherche d'intérêt commun, qui visent l'amélioration des systèmes de culture, la constitution de bases de données (Fagroud et al., 1997) et la contribution à la formation et à l'information des chercheurs (Ouahbi et El Jaafari, 1997).

Pour le développement et l'intégration des biotechnologies dans l'amélioration des systèmes de culture, le pôle régional devrait rassembler sur un même site les trois composantes essentielles que sont l'appareil de formation, l'appareil de recherche et l'appareil de production. Même si l'autonomie des structures de formation et/ou de recherche semble indispensable et s'il « ne suffit pas que des organismes se trouvent au même endroit pour qu'ils travaillent nécessairement ensemble », le rapprochement physique des structures d'enseignement/recherche et de production (agricole et agro-alimentaire) est l'une des conditions du développement des biotechnologies. Il ne s'agit pas de faire des recherches en biotechnologies pour ensuite, à posteriori, chercher les partenaires, mais de coordonner recherche et développement dès la planification de la politique générale de recherche au niveau du pôle. La coordination doit aussi intervenir entre recherche, formation et diffusion (vulgarisation). D'où l'importance des organismes d'interface (exemples : Centre National des Études et Recherches pour la Vulgarisation CNERV-Meknès, Service Recherche-Développement SRD de l'INRA-Meknès).

LA RECHERCHE PARTAGÉE EN RÉSEAU

L'analyse des difficultés qui ont présidé au développement des réseaux thématiques de recherche partagée sont souvent les mêmes, à savoir : l'isolement des chercheurs, insuffisance des moyens humains et matériels, aptitude à la recherche faible pour rivaliser avec les équipes ayant une notoriété internationale, mauvaise circulation de l'information,... Le réseau thématique a été la réponse nécessaire et adéquate que les chercheurs ont inventée pour coopérer (Mbaye, 1994).

La structuration en réseau de recherche/formation constitue une avenue à exploiter au niveau marocain pour bon nombre de raisons :

- Favoriser les échanges entre chercheurs et renforcer les équipes nationales et leur donner une dimension internationale.
- Promouvoir l'acquisition de connaissances scientifiques (dont les biotechnologies) et l'utilisation des résultats.
- Répondre aux spécificités éco-régionales et favoriser l'évolution des travaux dans différentes conditions agro-climatiques et socio-économiques.
- Créer une synergie des institutions de recherche et des agences de financement et favoriser la concertation avec les institutions du Nord et du Sud.

La coopération dans le cadre d'une recherche partagée en réseau doit servir les intérêts de chacun des partenaires. Pour qu'il y ait recherche partagée, il faut que chaque laboratoire participant à une action soit informé et associé intellectuellement à toutes les phases opératoires, tout en participant matériellement à certaines étapes de leur déroulement. Le partenariat doit être privilégié non seulement au moment de la conception de programmes, mais également lors du traitement des données et de la publication des résultats.

Dans ce sens, l'organisation des Systèmes d'Information permettent de mettre en valeur les ressources du pôle ou du réseau thématique de recherche en répertoriant les productions des recherches scientifiques dans le domaine concerné, en facilitant une meilleure circulation de l'information (résultats, approches, thèmes de recherches partagées, partenaires potentiels de projets,...), en rendant accessibles les productions du réseau et permettant ainsi leur reconnaissance dans l'espace scientifique.

Pour cela, un Système d'Information devrait développer deux composantes essentielles et complémentaires (Fagroud et al., 1997) : 1) Un Service Documentaire assurant ses services aux chercheurs et fournissant les services de recherche auprès des grandes bases de données internationales et l'accès aux documents primaires, et créant une base de données bibliographiques continuellement actualisée sur les différents thèmes et disciplines se rapportant aux programmes de recherche concernés. 2) Une Base de Données sur les projets et sur les organisations de recherche ou de financement en rapport avec les sujets traités et le renforcement de son rôle en tant que point local du Système d'Information sur l'agriculture.

QUELQUES CAS DE FIGURES

La vision de pôle régional est partagée et déjà mise en œuvre par les institutions d'enseignement et de recherche de la région de Meknès. Nous citerons ainsi, comme exemple, l'initiative propre de mise en place d'un pôle régional de recherche et de formation à Meknès et ses liens de collaboration dans le cadre de réseaux thématiques internationaux (Méditerranéens, Francophones), et enfin les thèmes de recherche/formation de ces actions et la part de la composante biotechnologies dans ces programmes.

AGROPOLE - Meknès

La création d'un pôle régional d'excellence à Meknès (AGROPOLE - Meknès) pour la recherche-développement des régions du bour et de la montagne est justifiée par la position géographique de cette ville et les institutions qui y sont représentées. En effet, Meknès se situe au centre de la zone à pluviométrie favorable (> 450 mm) à haut potentiel de productivité, entre les chaînes du Moyen-Atlas et du Rif. Elle abrite des institutions d'enseignement (Université Moulay Ismaïl UMI, École Nationale d'Agriculture ENA, École Supérieure d'Horticulture ESH) de recherche (INRA, UMI, ENA) et de vulgarisation (Directions Provinciales d'Agriculture DPAs) agricoles. Le secteur de l'agro-alimentaire représente l'une des principales composantes de l'activité industrielle à Meknès (63 entreprises, 54 % de la production locale, 45 % des exportations locales). Toutes les composantes de la chaîne de développement agricole sont disponibles et opérationnelles : la formation et la recherche de base à l'amont, la recherche appliquée de nouvelles techniques au centre, et leur transfert à l'aval. l'UMI et l'ENA, en plus de la formation académique des universitaires et des ingénieurs agronomes, contribuent à la formation professionnelle dans le domaine de la biotechnologie par des programmes régionaux et à la recherche appliquée dans le

cadre d'une collaboration avec l'INRA. Un service Recherche-Développement (SRD) à l'INRA se charge des relations avec les organismes de développement (Jlibene et al., 1997).

Les objectifs de ce pôle sont :

1. Constituer une cellule de réflexion et d'analyse de la problématique de l'agriculture en Bour et en Montagne.
2. Définir des axes prioritaires de recherche s'appuyant sur des choix méthodologiques, des cultures modèles et développer une politique de relations extérieures vis-à-vis des institutions internationales. Ces programmes de recherche basés sur des approches intégrées devront s'inscrire dans le cadre de thèmes mobilisateurs : gestion de l'espace, des systèmes de production, protection de l'environnement... Les projets qui seront présentés au nom de la nouvelle entité auprès des bailleurs de fond devraient bénéficier d'une masse critique plus grande et d'une crédibilité accrue grâce à la réunion des 3 institutions : UMI, INRA et ENA de Meknès. Cette politique commune veillera cependant à sauvegarder une indispensable autonomie d'initiative des 3 institutions qui continueront à développer des projets plus spécifiques en fonction de leur expertise propre et des opportunités.
3. Privilégier une utilisation commune et rationnelle des infrastructures existantes. Le pôle définira également une politique coordonnée d'investissement et d'équipement de recherche qui devrait conduire à des économies.
4. Constituer une structure ouverte à d'autres institutions marocaines en permettant une utilisation des équipements et de l'expertise développée.

Projet CIERSACO - AGCD

Le projet est né d'une volonté de coopération régionale en vue de créer une synergie entre les différentes institutions de recherche et d'enseignement de la région de Meknès (AGROPOLE-Meknès). Ce projet vise la création d'un « Centre Interdisciplinaire d'Études de la Résistance aux Stress Abiotiques chez les Céréales et les Oléagineuses (CIERSACO) » dans la région de Meknès. Ce projet, financé par l'Agence Gouvernementale de la Coopération et du Développement (AGCD) Belge, implique la Faculté des Sciences de Meknès (FSM, Université Moulay Ismaïl) en interuniversitaire avec l'Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès (ENAM), du côté marocain et, la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (FUSAGx) en interuniversitaire avec la Fondation Universitaire Luxembourgeoise (FUL), du côté belge. Le CIERSACO a comme programme la réalisation d'une approche intégrée d'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques chez les céréales (blé dur, blé tendre, espèces apparentées) et les oléagineuses (tournesol, colza) qui intègre les approches morpho-physiologiques, les biotechnologies, le marquage moléculaire, l'agro-météorologie et les caractéristiques agronomiques au champ ainsi que la création d'une base de données pour une meilleure utilisation des ressources génétiques de ces espèces.

Programme AVICENNE

La politique de recherche-développement adoptée dans le cadre des programmes européens (ex. AVICENNE puis INCO-DC de la DGXII) privilégie deux notions clés : l'intégration et l'ouverture, ce qui permet à de nombreux chercheurs du Sud de participer aux réseaux mis en place avec le soutien de la Communauté Européenne. Nous citons comme exemple notre réseau Maghreb-Belgique de recherche sur le

thème « amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'eau par le blé en conditions de sécheresse et de salinité (Programme AVI-CT93-0007). Ce projet implique l'Université Moulay Ismaïl de Meknès (Maroc), l'Université de Constantine (Algérie), INRA-Tunis (Tunisie) et la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).

Réseau MED-EMMA - Programme MED-CAMPUS

L'espace méditerranéen est un espace de diversité et de complexité, mais en même temps, espace commun à l'image de la Francophonie. Le réseau Méditerranéen « EMMA » a été créé pour répondre à un besoin d'une composante formation à caractère multidisciplinaire et multi-institutionnel complémentaire aux activités de recherche abordées par notre laboratoire et les laboratoires partenaires des autres réseaux. Ce réseau soutenu financièrement par la Commission Européenne (DG1B) a pour objectif spécifique l'intégration des biotechnologies et leurs apports aux autres outils de gestion de l'environnement des zones fragiles méditerranéennes. Il implique différentes institutions du Sud et du Nord de la Méditerranée : Algérie, Belgique, Egypte, France, Maroc, Palestine, Syrie, Tunisie

Réseau SEWANA

Le réseau SEWANA (Afrique du Nord, Asie Mineure, Europe du Sud) constitué en 1994, a développé un programme de recherche intégré sur le blé dur visant l'amélioration génétique de la tolérance aux stress abiotiques et biotiques et de la qualité du grain. Les recherches menées au sein de ce réseau font appel aux outils les plus récents dans les domaines de la physiologie végétale et des biotechnologies en visant leur intégration au sein des programmes d'amélioration. Le réseau regroupe aujourd'hui près de 70 chercheurs appartenant à des institutions diverses (ICARDA, Universités, INRA,...) de 15 pays différents (Picard, 1997).

PERSPECTIVES

La mise en commun des potentiels dans le domaine de l'enseignement supérieur et de la recherche est déjà une pratique expérimentée à Meknès. Il reste à consolider et à optimaliser les projets communs allant dans ce sens. Pour vaincre l'isolement des chercheurs et afin de viser la performance dans la recherche, la production et la circulation des informations scientifiques et techniques s'avèrent nécessaires pour la région. À cet égard, la réalisation de projets de recherche partagée, au sein des réseaux thématiques, devrait répondre à cette attente. La réalisation de ces divers projets d'intérêt commun nécessite la mise en place d'un partenariat approprié et un financement diversifié. À cet effet, il convient de créer une synergie entre les soutiens déployés par le gouvernement, les organismes internationaux, à caractère bilatéral ou multilatéral, ainsi que les opérateurs privés ; et cela en vue de susciter une masse critique en ressources humaines et en matériels techniques, condition indispensable pour tendre vers l'excellence dans les entreprises de recherche.

Bibliographie

1. DOULOU V. (1994). Les pôles régionaux africains : une réponse adaptée. In « Assises francophones de la recherche », 1 et 2 décembre 1993, Abidjan. AUPELF-UREF ed , pp : 141-147.
2. FAGROUD M., EL BACHIRI A. & EL JAAFARI S. (1997). Apports des Systèmes d'Information à la recherche partagée dans les domaines de l'agriculture et de la gestion de l'environnement : cas du pôle régional de Meknès. VIèmes Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Végétales - Génie Génétique des Plantes de l'AUPELF-UREF sur le thème « Biotechnologies végétales, amélioration des plantes et sécurité alimentaire », du 30 juin au 4 juillet 1997, Orsay, France.
3. JLIBENE M., EL JAAFARI S. & EL MEKKAOUI M. (1997). Un pôle régional d'excellence pour la recherche - développement de l'agriculture du Bour et de Montagne. VIèmes Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Végétales - Génie Génétique des Plantes de l'AUPELF-UREF sur le thème « Biotechnologies végétales, amélioration des plantes et sécurité alimentaire», du 30 juin au 4 juillet 1997, Orsay, France.
4. MBAYE N. (1994). L'agronomie en réseaux : une réponse pour la recherche pour le développement. In « Assises francophones de la recherche » 1 et 2 décembre 1993, Abidjan. AUPELF-UREF ed., pp : 81-84.
5. OUAHBI A. & EL JAAFARI S (1997). Intégration des Biotechnologies dans la gestion des écosystèmes fragiles Méditerranéens : un exemple de formation en réseau. VIèmes Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Végétales - Génie Génétique des Plantes de l'AUPELF-UREF sur le thème « Biotechnologies végétales, amélioration des plantes et sécurité alimentaire», du 30 juin au 4 juillet 1997, Orsay, France.
6. PICARD E. (1997). Rapport d'activités et prospectives du réseau thématique de recherche partagée « Biotechnologie : Génie génétique des plantes » de l'AUPELF-UREF, Paris, 1997.

A14 : Contribution des biotechnologies végétales à la sécurité alimentaire en zones sahéliennes

SIDIKOU DJERMAKOYE SEYNI R.
Enseignant Chercheur à la Faculté des Sciences de l'Université A. M. de Niamey

INTRODUCTION

Le développement et l'avenir de tout pays passe par sa sécurité alimentaire, donc par l'amélioration et le développement de ses productions végétales. Cette sécurité alimentaire, dans nos pays en voie de développement, en particulier ceux de la zone sahélienne, repose d'une part sur le développement de notre production végétale, d'autre part sur la conservation et la sauvegarde de nos ressources génétiques.

Les biotechnologies végétales peuvent apporter leur contribution à tous les niveaux de cette production végétale, de même qu'au niveau de la conservation des ressources phytogénétiques.

Nous avons entrepris quelques recherches dans certains domaines pour voir dans quelles mesures on peut intégrer ces méthodes biotechnologiques à l'amélioration et à la conservation de nos productions végétales.

AU NIVEAU DES CULTURES IRRIGUÉES

En zone sahélienne, plus particulièrement au Niger, la productivité agricole rencontre d'énormes problèmes climatiques (insuffisance des précipitations, érosion, désertification), sanitaires (attaques parasitaires de tous ordres : entomologiques, mycosiques, microbiennes, bactériennes, virales, etc.), économiques, rendant ainsi aléatoire la sécurité alimentaire.

Pour combler le déficit alimentaire issu des cultures pluviales, un accent est mis sur le développement des cultures irriguées dont les cultures maraîchères (dites de contre-saison).

Or, grâce aux méthodes biotechnologiques, on peut procéder à un meilleur développement de ces cultures irriguées par une amélioration aussi bien qualitative (assainissement des plants par la culture de méristèmes), que quantitative (multiplication végétative, micropropagation).

Les cultures maraîchères

• *Intégration des biotechnologies au développement de la culture de pomme de terre (Solanum tuberosum) en zones sahéliennes*

- Pourquoi la pomme de terre?

Dans l'objectif de la recherche d'une plus grande diversité alimentaire possible, la consommation de la pomme de terre vient en appui à celles d'autres tubercules comme le manioc (*Mannihot esculentus*), la patate douce (*Ipomea batatas*), les ignames (*Dioscorea sp.*), etc.

Au Niger, le manioc et la patate douce sont déjà bien cultivés et à la portée de toutes les couches de la population. Les ignames, bien que beaucoup consommées, ne

peuvent pas être cultivées dans ces régions sahéliennes faute d'un climat humide de type équatorial nécessaire à leur développement.

La culture de la pomme de terre, déjà pratiquée au Niger, a besoin d'être développée. Le développement de cette culture permettrait d'améliorer les rendements, de baisser les coûts de production et de vente et par conséquent, de pouvoir mettre cet aliment à la portée de toute la population nigérienne.

- Situation actuelle de la culture de pomme de terre au Niger

La culture de la pomme de terre est pratiquée depuis longtemps à échelle réduite dans l'Aïr et dans les vallées de la zone Sud humide du pays. Il s'agit d'une culture essentiellement maraîchère commercialisée dans les villes.

Les superficies cultivées et les rendements augmentent tant bien que mal au cours des années. C'est ainsi que les surfaces cultivées sont passées de 55 ha (en 1981) à environ 1000 ha ces dernières années, avec un rendement moyen de 12 tonnes à l'hectare. Cependant, la production de pomme de terre reste en dessous de celle du manioc (200 000 tonnes/an) et de celle de la patate douce (50 000 tonnes/an).

Toutes les variétés cultivées sont importées même si certaines, en raison de leur ancienneté d'implantation, sont considérées comme locales (la variété de Tabelot dans l'Aïr est une Bintje bien adaptée à la localité). Les semences proviennent de France, des Pays-Bas, du Nigeria, et d'autres pays voisins. Les variétés cultivées sont la Bintje, la Désirée, la Claustar, principalement.

En dehors de la zone de l'Aïr qui peut produire la pomme de terre pratiquement toute l'année, les autres zones de production (vallées du Sud) démarrent les cultures avec la saison fraiche (novembre, décembre) pour récolter en février ou mars. L'exigence de l'eau à toutes les phases du cycle de la pomme de terre (surtout pendant la tubérisation) fait que la culture est nécessairement irriguée.

La culture de la pomme de terre réussit davantage en sol meuble, sablonneux, bien drainé et dont le pH se situe entre 5 et 6,5. Les sols trop acides favorisent la formation de gales. Ce qui nous amène aux pathologies et pathogènes rencontrés en conditions nigériennes, se résumant en :

- maladies fongiques (alternariose, fusariose) ;
- maladies bactériennes (bactériose vasculaire) ;
- maladies virales (virus Y) ;
- attaques de nématodes à galle (*Méloïdogynae*) ;
- attaques d'insectes (pucerons, chenilles).

Cependant, le principal problème de la production de pomme de terre au Niger réside dans la conservation des tubercules. En effet, les fortes chaleurs associées à des conditions de stockage rudimentaires et inadaptées occasionnent des pourritures et des pertes très élevées, forçant les producteurs à brader leur récolte dans un minimum de temps, quitte à racheter de nouvelles semences en début de chaque saison.

- Nécessité d'intégration des biotechnologies

Compte tenu de l'importance de la pomme de terre et des problèmes que rencontre sa production en zones sahéliennes, un accent particulier est en train de se mettre en place, en vue du développement de cette culture dans ces régions sahéliennes. En effet, la pomme de terre peut y constituer une production de diversification très intéressante en raison de son cycle végétatif court et de son potentiel de production important.

Actuellement, les pays du Sahel dépendent de l'extérieur pour leur approvisionnement en semences (plants de qualité) qui, compte tenu du coût du produit, surtout du transport, arrivent à des prix difficilement abordables.

Cependant, avec l'évolution des biotechnologies végétales et notamment la maîtrise de la multiplication *in vitro* (microboutures, microtubercules), il paraît possible de concevoir la mise sur pieds d'une production locale autonome de semences, de manière à organiser, adapter et maîtriser un système de production allant du laboratoire (multiplication *in vitro*) au champ.

Les cultures fruitières

Dans le cadre du projet d'amélioration et de valorisation de nos fruitiers, aussi bien cultivés que spontanés, nous envisageons **l'intégration des méthodes biotechnologiques**, en complément des méthodes classiques ou traditionnelles.

Pour un début d'investigations, nous nous sommes limités, pour le moment, à deux espèces, à savoir :

- *Phoenix dactylifera* (Palmier dattier), une espèce connue et déjà cultivée en plantation ;
- *Parinari macrophylla,* syn. *Neocarya macrophylla* (Gamsa ou Gawassa), une espèce spontanée et consommée en cueillette par nos populations.

• *Méthode de travail*

La méthode de travail que nous avons adoptée est la suivante :

- Étude bibliographique, pour mieux connaître le matériel, voir ce qui a déjà été réalisé et ce qui peut encore se faire.
- Étude biogéographique pour connaître la répartition des espèces dans le milieu régional et sous-régional.
- Sélection agronomique des variétés les plus intéressantes, en collaboration avec les services de vulgarisation.
- Échantillonnage et prélèvement d'organes et/ou d'explants sur les pieds sélectionnés.
- Travaux de pépinières (germinations, bouturages, greffages).
- Travaux de laboratoires (cultures de tissus, micropropagation).
- Adaptation sur le terrain.
- Vulgarisation.

• *Intégration des biotechnologies au développement de la phoeniciculture*

- Quelques caractéristiques biologiques et économiques du Palmier dattier.

Le palmier dattier, *Phoenix dactylifera*, est une Monocotylédone appartenant à la famille des *Palmaceae.*

Originaire d'Afrique du Nord, c'est une espèce d'oasis et de quelques zones agricoles. Au Niger, elle se rencontre surtout dans les oasis du Nord (Aïr, Djado) et de l'Est (Kawar, Manga), ainsi que dans les vallées du Sud (Dallols, Goulbi). Le palmier dattier est spécifique des cuvettes ensablées à nappe phréatique peu profonde.

La plante a un port ligneux, monocaule, à feuillage persistant. La tige, de même que les feuilles ou palmes, très grandes, a également un intérêt économique fort appréciable pour les populations (construction des habitats, lutte contre l'ensablement).

Espèce dioïque, les pieds mâle et femelle sont souvent très éloignés l'un de l'autre. La fécondation, anémophile, est aléatoire dans les conditions naturelles.

Les fruits ou dattes, des drupes dont la chair est sucrée, représentent la partie la plus importante de la plante.

En plus de son intérêt économique, le palmier dattier contribue à améliorer l'environnement par sa présence embellissante.

- La phoeniciculture au Niger

La multiplication du palmier dattier est, jusqu'à aujourd'hui, effectuée selon deux modalités :

- la multiplication par semis de noyaux ;
- la multiplication végétative par rejets.

La multiplication par semis et germination de noyaux, en plus de sa lenteur (l'obtention du sujet productif nécessite une dizaine d'années), donne naissance à des peuplements très hétérogènes en densité et en qualité. En effet, non seulement il est impossible de déterminer le sexe du pied avant sa première floraison (au bout de 10 ans), mais encore l'hétérogénéité des plants originaux provoque une forte hétérogénéité de la descendance. La reproduction des caractéristiques du pied-mère devient alors aléatoire.

La multiplication végétative par rejets est la plus utilisée. Le rejet, qui se développe le plus souvent à la base du tronc ou quelquefois à la partie supérieure, une fois prélevé et transplanté, reproduit exactement les caractéristiques du pied-mère. Ce qui constitue un avantage supplémentaire par rapport à la multiplication par semis car conduit à une population identifiée et homogène. D'autre part, la reprise est beaucoup moins longue.

La nutrition du palmier dattier nécessite beaucoup d'eau (irrigation permanente aux stades jeunes des plants) et de fumure azotée.

- Nécessité d'intégration des biotechnologies à la phoeniciculture

Bien que connu et cultivé depuis fort longtemps dans certaines régions du Niger (le Manga à l'Est, l'Aïr au Nord, certaines vallées du Sud), le palmier dattier pose d'énormes problèmes sur le plan cultural.

Au Niger, les dernières recherches d'ordre agronomique menées par le projet Palmeraie - Diffa (Jahiel, 1989) ont conduit à l'une des conclusions suivantes :

" La problématique liée à la multiplication du palmier dattier ne peut trouver d'issues favorables que par l'introduction d'une technique nouvelle, la culture *in vitro*, en association avec l'étude menée sur les cultivars locaux. »

En effet, l'introduction puis la multiplication du palmier dattier ont toujours été réalisées de façon anarchique ou presque, en utilisant les noyaux et les rejets comme uniques organes de reproduction. Ces techniques ont donné naissance à des peuplements très hétérogènes, de densité et de qualité incompatibles avec une pratique correcte de la phoeniciculture.

La réorganisation et la rénovation des palmeraies doivent nécessairement passer par l'introduction de techniques de multiplication faisant intervenir la notion de sélection des sujets (sexe, qualité). La multiplication par culture *in vitro* ou micropropagation répond parfaitement à ces préoccupations, aussi bien sur le plan qualitatif que quantitatif.

Le projet d'intégration des méthodes biotechnologiques au développement de la phoeniciculture au Niger consistera surtout à la micropropagation et à l'adaptation de cultivars sélectionnés de palmier dattier.

- Travaux biotechnologiques déjà effectués dans le domaine de la phoeniciculture

Beaucoup de travaux ont été réalisés (et continuent de l'être) dans les pays d'Afrique du Nord, notamment en ce qui concerne la production de vitroplants par plusieurs voies dont :

- la régénération des plantes par culture de tissus avec bourgeonnement ;
- la régénération des plantes par embryogenèse somatique à partir de cals ou de suspensions cellulaires.

Dans la plupart des cas, ces cultures *in vitro* partent de méristèmes pour deux raisons principales :

- la capacité de multiplication rapide des cellules méristématiques ;
- l'assainissement des plantes.

Ces micropropagations sont déjà appliquées à une échelle industrielle dans les pays d'Afrique du Nord, donnant naissance à des palmeraies hautement performantes.

- Résultats attendus

Les résultats attendus consistent en une adaptation des microplants au Niger pour une meilleure exploitation de nos palmeraies.

En effet, une fois qu'on dispose de plants sélectionnés et identifiés, on peut aisément mettre en place, et d'une façon bien rationnelle (par exemple un pied mâle entouré de plusieurs pieds femelles), des palmeraies parfaitement structurées, saines, homogènes et par conséquent hautement productives. Ceci en plus de la multiplication végétative par rejets, moins coûteuse et pratiquée actuellement, mais qui rencontre des problèmes de pathologies et d'insuffisance de pieds.

• *Intégration des biotechnologies à l'amélioration et à la valorisation de nos fruitiers spontanés : cas du parinari macrophylla*

- Caractéristiques biologiques de la plante

Parinari macrophylla est une Dicotylédone de la famille des *Rosaceae.*

Son aire de répartition biogéographique en Afrique s'étend de la région guinéo-congolaise à la région soudano-zambézienne. Au Niger, cette espèce se cantonne dans les cuvettes du Sud-Ouest, les Dallols, vallées ensablées de la zone soudanienne, à nappe phréatique peu profonde.

C'est une espèce ligneuse dichotomique se présentant sous la forme de petit arbre à feuillage persistant et restant vert toute l'année, même en saison sèche. Les feuilles possèdent un pétiole court et un limbe ovale à base largement arrondie et subcordée. La pubescence, d'un roux ferrugineux, recouvre toutes les parties jeunes de la plante, y compris les jeunes fruits. Sur le plan de la biologie florale, l'espèce est hermaphrodite à fécondation autogame ou/et allogame.

Les fruits sont des drupes de 5 à 8 cm de hauteur, dont la pulpe est riche en glucides et les amandes (au nombre de 2 par noyau) très oléagineuses.

- Intérêt économique et nécessité d'intégration des biotechnologies végétales

Plante spontanée à usage alimentaire, *Parinari macrophylla* présente de multiples intérêts dont :

- un apport alimentaire et nutritif appréciable grâce à une pulpe riche en glucides et des amandes oléagineuses ;

- un apport fourrager permanent grâce à un feuillage persistant, abondant et consommable par les animaux ;
- une préservation de l'environnement et un moyen de lutte contre la désertification grâce à son feuillage persistant et touffu et vert toute l'année, d'où une contribution à l'agroforesterie.

Cependant, *Parinari macrophylla* reste une plante dont :

- les fruits sont de cueillette,
- la régénération (par germination naturelle) est très lente, pratiquement empêchée au cours de ces dernières années marquées par un déficit hydrique de plus en plus accentué,
- la propagation est fort limitée.

En effet, le noyau du fruit, très dur et indéhiscent, ne permet pas une germination aisée des graines. La coque du noyau ne se dégrade et ne se décompose, par pourrissement, que dans un sol humide.

Pour remédier à cette difficulté de germination, on peut :

- procéder à une germination directe des graines en pépinières, après les avoir débarrassées de leur coque ;
- procéder à une micropropagation des variétés sélectionnées, en association avec les méthodes précédentes ;

et peut-être aboutir ainsi à une augmentation de la densité des pieds et des fructifications.

Les méthodes biotechnologiques appliquées aux plantes alimentaires en général et aux plantes alimentaires spontanées (dont *Parinari macrophylla*) en particulier, permettraient une régénération beaucoup plus rapide de celles-ci et une plus large diffusion grâce à la micropropagation.

À long terme, on pourrait également envisager un programme d'amélioration et de valorisation de ces fruitiers spontanés, ce qui pourrait contribuer aussi bien à la sécurité alimentaire qu'au développement de l'agroforesterie.

AU NIVEAU DE LA CONSERVATION ET DE LA SAUVEGARDE DES RESSOURCES PHYTOGÉNÉTIQUES

Nos ressources phytogénétiques, qu'elles soient forestières, fourragères, médicinales, alimentaires spontanées ou alimentaires cultivées, ont besoin d'être conservées et sauvegardées le plus possible et par tous les moyens adéquats.

Les problèmes rencontrés pour leurs conservations, aussi bien *in situ*, sur le terrain, qu'en stockage sous des formes variées, sont multiples et importants.

En complément des méthodes traditionnelles de conservation, insuffisantes, les méthodes biotechnologiques peuvent apporter une contribution appréciable à la conservation et à la sauvegarde de nos ressources phytogénétiques.

Problèmes rencontrés

Les problèmes rencontrés se situent surtout à deux niveaux :

- **la conservation des récoltes issues des cultures maraîchères,**
- **la disparition progressive de nos réservoirs de gènes que sont nos plantes sauvages, spontanées.**

• *Les problèmes à moyen terme*

Ils concernent le premier niveau. Compte tenu d'une part, du caractère " frais " (organes pleins d'eau) des produits maraîchers (légumes, tubercules), d'autre part de nos conditions climatiques et de nos moyens économiques limités, ces problèmes peuvent se résumer ainsi qui suit.

- Les températures sont très élevées la plus grande partie de l'année (de mars à novembre, période sèche et chaude faisant suite à celle sèche mais froide, de décembre à février, des cultures maraîchères).
- Les attaques parasitaires sont de tous ordres : attaques de rongeurs, d'insectes, de champignons, de bactéries, de virus, etc.
- Les locaux de stockage sont inadaptés, insuffisants, voire inexistants.
- L'énergie électrique nécessaire au fonctionnement de chambres froides n'est pas à la portée des producteurs.

Tous ces problèmes, seuls ou en association, entraînent à moyen terme des dégradations des réserves alimentaires aboutissant à des pertes de rendement énormes.

• *Les problèmes à long terme*

Ils se situent au second niveau et leurs conséquences sont à plus ou moins long terme. En effet :

- l'insuffisance des précipitations entraînant le dessèchement des plantes ;
- l'érosion hydrique due à une mauvaise répartition des pluies (la saison des pluies, très courte, ne dure que trois à quatre mois au cours desquels il tombe trop d'eau en si peu de temps. Le ruissellement, intense, emporte tout sur son passage) ;
- l'érosion éolienne, dénudant certains sols, ensablant d'autres, accentuant ainsi l'avancée du désert.

Tout ceci tend à réduire les populations forestières, à entraîner une disparition progressive des espèces sauvages, spontanées, qui constituent notre richesse naturelle.

Tous les moyens doivent donc être mis en œuvre afin de conserver cette richesse naturelle. Plusieurs contributions sont nécessaires, parmi lesquelles celles, importantes et très appréciables, des biotechnologies végétales.

Contribution des méthodes biotechnologiques

• *À moyen terme*

La conservation à moyen terme des plantules *in vitro* consiste à diminuer la vitesse de croissance des cultures de manière à pouvoir réduire la fréquence des repiquages. Ce ralentissement de croissance des tissus végétaux est possible grâce à plusieurs techniques telles que :

- les cultures à basses températures (20°C en moyenne) pour toutes les espèces en général ;
- la diminution du potentiel hydrique par adjonction d'hydrates de carbone (saccharose, mannitol) au milieu de culture, pour les espèces maraîchères (manioc, patate douce, pomme de terre, etc.) ;
- l'emploi d'inhibiteurs de croissance tels que l'acide abscissique utilisé à faible dose (5mg/l pour la pomme de terre par exemple).

Grâce à ces méthodes de conservation à moyen terme, on pourrait tenir en permanence à la disposition des agriculteurs, des plants sains et prêts à l'emploi.

Dans le cas de la phoeniciculture par exemple, la micropropagation et la conservation de plantules *in vitro* permettent de produire et de stocker des plants bien identifiés, sélectionnés et indemnes de maladies, en vue de la mise en place de plantations homogènes, bien structurées, générant par conséquent des productions hautement améliorées aussi bien en quantité qu'en qualité.

Au niveau des cultures maraîchères, la micropropagation et la conservation à moyen terme des plantules apporteraient une contribution encore plus immédiate et plus permanente car les besoins en plants sont plus importants en nombre et en fréquence. En effet, les souches saines sorties de l'*in vitro* seraient multipliées en serres sur deux ou trois cycles avant d'être livrées aux producteurs de produits de consommation. Cette disponibilité permanente de plants pourrait en outre « allonger » la saison maraîchère au moins pour les espèces qui ne sont pas très sensibles au froid.

Enfin, cette conservation à moyen terme pourrait également être utilisée pour la sauvegarde de nos plantes spontanées et la reconstitution de nos aires forestières.

- A long terme

La conservation à long terme s'effectue à très basse température (-196°C) dans l'azote liquide : c'est la cryoconservation. Elle est utilisée pour la conservation des cals, des ovules, des embryons zygotiques, ou somatiques, des suspensions cellulaires, des protoplastes.

Le principe de la cryoconservation repose sur la congélation du matériel végétal sans léser les cellules. Cette congélation est progressive et s'effectue en deux étapes :

- refroidissement progressif jusqu'à -40°C, pour permettre aux cellules de résister ultérieurement à une congélation encore plus forte (celle dans l'azote liquide) ;
- congélation directe à -196°C dans l'azote liquide, en présence de substances protectrices comme le diméthylsulfoxide (DMSO), le glycérol, les sucres tels que le sorbitol, la proline, le polyéthylèneglycol (PEG).

Malgré son coût encore plus élevé que celui de la conservation à moyen terme, la cryoconservation pourrait également apporter sa contribution pour les cas dont c'est nécessaire. Par exemple pour la sauvegarde et la conservation à long terme des espèces sauvages ne produisant pas de graines viables au stockage aisé, ou des espèces dont les graines ont une durée de vie limitée (*Phoenix dactylifera, Parinari macrophylla*).

Nous pourrons également sauvegarder nos ressources phytogénétiques spontanées qui constituent de véritables réserves de gènes porteurs de résistance ou de caractères ne faisant pas encore l'objet d'une sélection. La sauvegarde de cette richesse naturelle (malheureusement en voie de disparition) est d'une nécessité primordiale et doit faire partie de nos préoccupations les plus urgentes car la biomasse se dégrade de plus en plus (à une vitesse inquiétante) dans nos régions sahéliennes.

CONCLUSION

Malgré un coût d'investissement certainement élevé au départ mais progressivement amorti, nous espérons, par l'intégration des biotechnologies végétales à nos méthodes classiques de cultures et de conservations des ressources phytogénétiques, aboutir à :

- un meilleur développement de nos cultures ;
- une régénération plus rapide et une valorisation de nos plantes spontanées ;
- une amélioration de notre potentiel alimentaire et nutritif ;
- une autosuffisance alimentaire et au-delà, une sécurité alimentaire.

Nous espérons également que l'évolution future des recherches au sein des réseaux de biotechnologies végétales aboutirait à la création de centres spécialisés dans ces domaines.

C'est une nécessité indispensable pour les pays en voie de développement comme le Niger de disposer au plus tôt d'un maximum de technologies de micropropagation nécessaires au développement de leur agriculture. Dans cet objectif, la mise en place d'un laboratoire de culture *in vitro* paraît plus que nécessaire. Au Niger, une telle structure répond à des besoins pressants, entre autres : l'accès à l'autosuffisance alimentaire, un renforcement de la couverture sanitaire, l'étude des problèmes posés par la désertification, etc.

L'impact des biotechnologies sur les productions végétales dans nos pays sahéliens en voie de développement est donc important, nécessaire et indispensable. Il doit aller de l'avant dans le but de contribuer à assurer une meilleure sécurité alimentaire, et par delà, un meilleur développement.

Compte tenu des coûts d'investissements relativement élevés, un soutien et un appui des structures compétentes est souhaitable pour l'intégration de ces biotechnologies végétales au développement de nos productions, dans le but d'asseoir une meilleure sécurité alimentaire.

Bibliographie

1. BERHAULT J. - 1967 - Flore du Sénégal - Ed. Clairafrique - Dakar.
2. BERNUS E., SIDIKOU A. H. & al. - 1980 - Les Atlas Jeune Afrique - Niger - Ed. J.A.
3. HERVE Y. & al. - 1995 - Intégration chez les plantes légumières, fruitières et ornementales - Biotechnologies végétales BV 9A - ENSA, Rennes - CNED / AUPELF-UREF - UNISAT.
4. HERVE Y. - 1987 - Biotechnologies et productions végétales - Techniques agricoles 2350.
5. IFAC - 1974 - Les recherches sur le Palmier dattier - Principaux résultats acquis.
6. JAHIEL M. - 1989 - Projet Palmeraie Diffa, Inst. Nat. de la Rech. Agro. du Niger (INRAN).
7. JOUAN B., TIVOLI B., SAMSON R. 1980 - Les principales maladies de conservation de la pomme de terre - La Pomme de Terre Française, 399, 207-214.
8. LE CORRE P., GRAVOUEILLE J.M., MARTIN M. - 1995 - La culture de la pomme de terre de conservation - Pomme de Terre - Collection ITCF - ITPT.
9. PEYRE de FABREGUES B. & LEBRUN J. P. - 1976 - Catalogue des plantes vasculaires du Niger - Etude botanique - I.E.M.V.T. - France.
10. PEYRE de FABREGUES B. - 1979 - Lexique des plantes du Niger - Inst. Nat. de la Rech. Agro. du Niger (INRAN) Niamey.
11. RADTKE W., RIECKMANN W. - 1991 - Maladies et ravageurs de la pomme de terre - Ed.Th. Mann Gelsenkirchen Buer.
12. ROUSSELLE P., ROBERT Y., CROSNIER J. C., éd., & al. - 1996 - La Pomme de Terre INRA Edition.
13. SIDIKOU A. H. & CHAMARD P.C. - 1976 - Géographie du Niger - Nouvelles Editions Africaines.
14. SIDIKOU SEYNI R., RAMBAUD C., DUBOIS J. & VASSEUR J. - 1992 - Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts - Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29: 83-91 Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
15. SIDIKOU SEYNI R. - 1992 - La Biotechnologie végétale au service de l'Alimentation et de la Nutrition - (Séminaire sur une Politique Nationale d'Alimentation et de Nutrition - Niamey (Niger).

16. SIDIKOU SEYNI R. -1995 - Contribution des méthodes biotechnologiques à la conservation des ressources phytogénétiques - Premières Journées Biologiques de l'INRAN à Niamey - PNRA, Laboratoires associés INRAN / UAM.
17. SIDIKOU SEYNI R. - 1996 - Projet d'Amélioration et de Valorisation de deux fruitiers (un cultivé - un spontané) au Niger - PNRA , Laboratoires associés INRAN / UAM.
18. SOLTNER D. - 1996 - Les bases de la production végétale - Tome III: La plante et son amélioration - Collection Sciences et Techniques Agricoles.
19. TIVOLI B., JOUAN B., L'HOSTIS A., SANSON M.T., LEMARCHAND E. - 1979 - Influence de l'aménagement des locaux de conservation des tubercules de pomme de terre sur leur niveau de contamination et sur l'efficacité de la désinfection - INRA Le Rheu - Sciences Agronomiques - Rennes.
20. ZRYD J.P. - 1988 - Culture de cellules, tissus et organes végétaux: fondements théoriques et utilisations pratiques - Presses Polytechniques Romandes, Suisse.

A15 : Les biotechnologies végétales et la sécurité alimentaire en Afrique : Cas des ignames

ZOUNDJIHÉKPON J.[1] ; HAMON P.[2] ; BOCCON-GIBOD J.[3], TIO-TOURÉ B.[4]

[1] WWF - 08 BP 1776 - Abidjan 08 - Côte d'Ivoire

[2] Université Montpellier III- BP 5043 - 34 032 - Montpellier Cedex- France

[3] Institut National de l'Horticulture - 2, Rue le Nôtre - F-49045, Angers Cedex 01 - France

[4] UNESCO - 1, Rue Miollis - 75 015, Paris - France

INTRODUCTION

Les ignames sont des plantes alimentaires tropicales à tubercules dont plusieurs espèces sont d'origine africaine. L'Afrique de l'Ouest fournit plus de 95 % de la production mondiale des ignames, avec le Nigeria en tête, suivi de la Côte d'Ivoire et du Bénin. Les ignames revêtent des intérêts alimentaires, socioculturels et économiques considérables pour les africains. Même si l'igname figure au premier rang des cultures vivrières dans plusieurs pays africains, leur production ne suffit pas encore à assurer la sécurité alimentaire, qui constitue l'une des préoccupations majeures des autorités politiques de ces pays. Selon Okigbo (1991), certains pays s'endettent régulièrement avec l'importation de céréales pour nourrir leurs populations, tandis que d'autres comptent sur l'aide alimentaire internationale pour satisfaire leurs besoins internes.

L'igname est une plante à multiplication végétative. Sa culture au champ est confrontée à différentes contraintes telles que le faible taux de multiplication, des contraintes phytosanitaires comme l'anthracnose causée par *Colletotrichum gloeosporioïdes,* la mosaïque des ignames, les nématodes et en particulier *Scutellonema bradys*. De plus, une part importante de la récolte (environ 25 %) est utilisée comme semence pour l'année suivante. À ce jour, les variétés cultivées sont traditionnelles et ont été sélectionnées durant des millénaires par les paysans. Les méthodes classiques d'amélioration des plantes n'ont pas encore permis d'obtenir des variétés améliorées largement diffusées à l'image des autres cultures vivrières. Il faut rappeler que la recherche scientifique a longtemps négligé les ignames au profit des cultures d'exportation comme le cacaoyer, le caféier, le palmier à huile, le coton, et les céréales.

Pour lever certaines des contraintes liées à la culture de l'igname, et pour la description de la diversité génétique du matériel végétal, diverses méthodes biotechnologiques telles que le microbouturage, la culture du méristème ou de protoplastes sont utilisées par les chercheurs, permettant ainsi de résoudre les problèmes de gestion des ressources génétiques, de viroses ou d'amélioration des plantes.

LA GESTION DES RESSOURCES GÉNÉTIQUES D'IGNAMES

La caractérisation du matériel végétal

Les isozymes révélés par électrophorèse sur gel d'amidon ont permis de caractériser des variétés traditionnelles d'ignames appartenant au complexe *D. cayenensis-D. rotundata* et les espèces sauvages apparentées (Hamon, 1987 ; Sèniou, 1993 ; Zoundjihékpon, 1993 et Dansi, 1995). Trois des systèmes enzymatiques étudiés, la phosphogluconate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase et la shikimate déshydrogénase permettent de différencier les ignames d'origine annuelle avec des bandes à migration rapide de celles des ignames pérennes avec des bandes lentes (Hamon, 1987). Grâce à l'analyse des descendances contrôlées, le déterminisme génétique des systèmes enzymatiques a été proposé et huit locus avec quatorze allèles ont été mis en évidence (Zoundjihékpon, 1993).

L'étude de la variation intraspécifique de l'ADN chloroplastique de *D. bulbifera* a permis de montrer que les génomes chloroplastiques d'Afrique et d'Asie ont divergé à une période ancienne et que le génome chloroplastique de type E qui est obtenu dans le Sud-Est asiatique apparaît être le plus ancien (Terauchi et al., 1989). De plus, ces travaux indiquent que quatre génomes chloroplastiques, trouvés dans les régions insulaires d'Asie, ont probablement dérivé indépendamment du génome de type E.

Les travaux par RFLP sur l'ADN chloroplastique et de l'ADN ribosomal pour quatorze cultivars du complexe *D. cayenensis-D. rotundata* et douze formes sauvages appartenant à sept espèces différentes a révélé cinq génomes A à E. Le génome A est commun au complexe *D. cayenensis-D. rotundata* et aux espèces sauvages *D. praehensilis, D. abyssinica* et *D. liebrechtsiana* tandis que les génomes B, C, D et E caractérisent respectivement *D. minutiflora, D. burkilliana, D. smilacifolia* et *D. togoensis* (Terauchi *et al.*, 1992). Conlan *et al.* (1995) ont essayé d'isoler et de caractériser des clones d'ADNc complémentaire des gènes codant pour la protéine de réserve principale, la dioscorine du tubercule de *D. cayenensis.*

Asemota et al (1996) ont montré que les analyses en RAPD permettent de décrire le polymorphisme intravariétal et interspécifique de cinq espèces d'ignames cultivées de la Jamaïque : *D. alata, D. cayenensis, D. esculenta, D. rotundata et D. trifida.* L'étude de *D. bulbifera* de différentes origines par des marqueurs RAPD a montré que les accessions d'origine africaine formaient un groupe distinct et isolé des groupes des accessions asiatiques et polynésiens qui étaient plus hétérogènes (Ramser et al., 1996). Les techniques de RAPD et de microsatellites ont permis à Ramser et al. (à paraître) de différencier *D. cayenensis* de *D. rotundata.*

L'étude des index d'ADN de plusieurs espèces sauvages et cultivées, grâce à la cytométrie en flux, confirme l'existence de séries polyploïdes au sein des formes cultivées. Chez *D. alata,* les index d'ADN varient d'un facteur 1 à 3, chez *D. bulbifera,* la variation est de 1 à 2,25 et de 1 à 2 chez *D. cayenensis-D. rotundata.* De plus, le génome commun à *D. abyssinica, D. cayenensis-D. rotundata, D. praehensilis* et *D. mangenotiana* est différent du génome de *D. togoensis* (Hamon et al., 1992).

Actuellement, la conservation au champ est la méthode la plus utilisée pour la conservation des ressources génétiques d'ignames. Mais, depuis plus d'une vingtaine d'années, une autre alternative est proposée avec la culture *in vitro.*

Le microbouturage et la conservation des ressources génétiques d'ignames

Le microbouturage nodal permet d'élever le taux de multiplication chez l'igname. Les conditions de culture (milieu de culture, température, lumière) peuvent varier d'une

espèce à une autre. *D. alata* est l'espèce alimentaire ayant fait l'objet de micropropagation dès les années 1970 (Ammirato, 1976 ; Mantell et Haque, 1977 ; Arnolin, 1980). Plusieurs autres espèces ont par la suite été multipliées par cette voie. Il s'agit de *D. rotundata* (Mantell et al., 1978), *D. esculenta* (Belarmino et del Rosario, 1971), *D. trifida* (Balagne, 1985) et *Dioscorea* sp (Peters, 1986). La culture de méristèmes est utilisée pour la micropropagation chez *D. opposita* (Niwata et al., 1983) et des régénérations des pousses feuillées à partir de bourgeons axillaires de 2 à 3 primordiums chez *D. alata* et *D. esculenta.* Cette dernière technique n'est pas adaptée à *D. rotundata* (Belarmino et del Rosario, 1991).

Avec le microbouturage de l'igname, on observe la tubérisation sous forme de microtubercules ou de microbulbilles (Ng, 1988). Mais plusieurs facteurs peuvent affecter ce phénomène physiologique ; la présence ou l'absence de régulateurs de croissance, la composition en saccharose ou en éléments minéraux du milieu de culture, la photopériode et la thermothérapie (Malaurie et Trouslot, 1995). L'effet de quelques régulateurs de croissance sur la tubérisation de *D. alata* et de *D. abyssinica in vitro* a été étudié par Jean et Cappadocia (1992).

Les plantules issues de micropropagation peuvent être utilisées pour la conservation des ressources génétiques d'ignames. Ainsi, plusieurs milliers d'échantillons sont conservés *in vitro,* à la fois en Afrique, en Europe et en Guadeloupe. Mais il existe des contraintes liées à l'utilisation de cette voie, comme l'obtention d'une bonne asepsie, la présence de composés phénoliques dans le milieu, la période de mise en culture (Malaurie et al., 1993 ; Zoundjihékpon et al., 1995). Pour éviter de nombreux repiquages associés à une croissance rapide de la plante, la température est abaissée à 16-20°C (Ng et Hahn, 1985). Actuellement, les principales vitrothèques d'ignames cultivées et sauvages existent au Nigeria, en Côte d'Ivoire, en France (ORSTOM-Montpellier) et en Guadeloupe.

La cryoconservation a été initiée il y a une quinzaine d'années chez l'espèce médicinale, *D. deltoïdea* (Butenko et al., 1984) et vient d'être appliquée avec succès aux espèces comestibles *D. alata* et *D. bulbifera* (Malaurie et Trouslot, 1996).

Les ressources génétiques d'ignames étant le plus souvent conservées avec des viroses, il faut prendre des dispositions pour se débarrasser de ce fléau, si l'on veut échanger ou transporter du matériel végétal.

L'élimination des viroses

La baisse du rendement due à la présence du virus de la mosaïque de l'igname a été estimée à 20 % en Côte d'Ivoire (Thouvenel et Dumont, 1990). Chez de nombreuses espèces, la culture de méristèmes ou d'apex permet de se débarasser de cette contrainte majeure pour la culture des ignames (Malaurie et Trouslot, 1995). Chez *D. Trifida,* la thermothérapie sur des microboutures a été utilisée pour éliminer le virus (Balagne, 1985). Après culture de méristèmes, et contrôle des plantes régénérées par immunoenzymologie, inoculation mécanique sur plantes-hôtes et observation en microscopie électronique, le matériel cultivé *in vitro* peut circuler entre laboratoires ou entre différents pays (Ng et Hahn, 1985 ; Malaurie et Trouslot, 1995).

En dehors de l'accroissement du taux de multiplication, par microbouturage, de la gestion des ressources génétiques d'ignames, de l'éradication des viroses et de l'utilisation des marqueurs moléculaires, d'autres axes d'amélioration des ignames font appel aux biotechnologies.

LES AUTRES AXES D'AMÉLIORATION DES IGNAMES PAR VOIES BIOTECHNOLOGIQUES

La culture de protoplastes, utilisée pour l'amélioration génétique des plantes cultivées depuis une vingtaine d'années, a été exploitée chez les ignames. Les travaux de Tardieu (1987) et Okito et al. (1993) chez plusieurs espèces d'ignames ont conduit à un rendement moyen de 2.10^6 à 15.10^6 protoplastes par gramme de feuilles et à un taux de 85 % de protoplastes viables mais sans aucune division. Des microcals de forme globulaire et à structure homogène ont été obtenus à partir de protoplastes chez deux cultivars de *D. alata* : *oriental Lisbon* et *yellow Lisbon*, et certains d'entre eux ont pu évoluer jusqu'à la régénération de plantes avec le *cv oriental Lisbon* (Funes et Boccon-Gibod, 1988 ; Kanoasamy, 1996 ; Mantell et Boccon-Gibod, 1997). Chez quatre génotypes de *D. cayenensis-rotundata,* des colonies de 20 à 50 cellules issues de protoplastes ont été observées et seules quelques divisions ont été obtenues chez les protoplastes de *D. bulbifera* (Mantell et Boccon-Gibod, 1997).

La culture d'embryons zygotiques matures ou immatures (Tableau I), est également exploitée chez l'igname dans le but de développer un programme d'amélioration de la plante chez *D. opposita* (Yakuwa *et al.*, 1981), *D. composita, D. cayenensis* (Viana et Mantell, 1989), *D. alata* et *D. cayenensis-D. rotundata* (Arnolin *et al.*, 1991). Chez *D opposita,* l'embryogenèse somatique a permis de régénérer des plantules à partir de suspensions cellulaires (Nagasawa et Finer, 1989). Chez *D. alata,* grâce aux cultures d'explants et de protoplastes, on a observé les premiers stades d'embryogenèse somatique (Twyford et Mantell, 1990). Parfois, une proportion d'embryons somatiques atteignant 80 % a pu régénérer des plantules de *D. alata.*

Les quelques essais de transformation génétique de l'igname ont utilisé des souches sauvages d'*Agrobacterium* avec *D. bulbifera* (Schäfer *et al.*, 1987), ou l'électroporation avec incorporation d'ADN étranger et vérification par « southern blot » (Tor et al., 1996).

Tableau 1 : Les méthodes biotechnologiques utilisées chez les principales ignames alimentaires en Afrique (Hanson, 1986 modifié).

Espèces	Zone d'origine	Principales aires de culture ou consommation sauvages	Outils biotechnologiques utilisés pour leur étude
D. abyssinica (S)	Afrique	Afrique	M
D. alata (C)	Asie du Sud-Est Asie du Sud-Est	Afrique de l'Ouest	CA ; CP ; CEZ ; ES ; M; TG
D. bulbifera (S et C)	Asie du Sud-Est Asie du Sud-Est	Asie et Afrique	ES ; M ; TG ; CP
D. cayenensis- *D. rotundata* (C)	Afrique de l'Ouest	Afrique de l'Ouest	CA ; CP ; CEZ ; ES ; M
D. dumetorum (S et C)	Afrique	Afrique	M
D. esculenta (C)	Asie du Sud-Est Asie du Sud-Est	Asie et Pacifique	CA ; M
D. praehensilis (S)	Afrique	Afrique	M
D. mangenotiana (S)	Afrique	Afrique	M

Espèces . C Cultivé , S Sauvage ;

Méthodes biotechnologiques . CA . Culture d'Apex , CEZ . Culture d'embryons zygotiques ,
ES Embryogenèse somatique ; M Microbouturage , TG Transformation génétique ,
CP . Culture de protoplastes

Si les biotechnologies sont utilisées pour l'étude et l'amélioration des ignames et des plantes d'une façon générale, cela ne se fait pas sans risques.

LE TRANSFERT DE BIOTECHNOLOGIES, LA BIOSÉCURITÉ ET LA CONVENTION SUR LA DIVERSITÉ BIOLOGIQUE

L'igname est "une plante séculaire et une culture d'avenir" pour les Africains, et les biotechnologies ont déjà fait leur entrée dans plusieurs instituts de recherche et universités d'Afrique. Il faut toutefois reconnaître que certains travaux utilisant les voies biotechnologiques ne se font que dans les pays du Nord. En Afrique de l'Ouest, seul l'IITA (l'Institut International de recherche en Agriculture Tropicale) va au-delà du microbouturage, en faisant de la culture de méristème pour l'éradication des viroses, en utilisant des techniques de biologie moléculaire (RFLP, RAPD-PCR,...) ou de cytométrie en flux pour la caractérisation des ressources génétiques d'ignames.

Or, la Convention sur la diversité biologique, ouverte à la signature avec le sommet de Rio, et actuellement ratifiée par 165 pays dont la plupart des pays africains, stipule en son article 16, alinéa 1 que « *chaque partie contractante, reconnaissant que la technologie inclut la biotechnologie, et que l'accès à la technologie et le transfert de celle-ci entre parties contractantes sont des éléments essentiels à la réalisation des objectifs de la Convention, s'engage... à assurer et/ou à faciliter à d'autres parties contractantes l'accès aux technologies nécessaires à la conservation et à l'utilisation durable de la diversité biologique...* » et en son article 19, alinéa 2 que « *chaque partie contractante prend toutes les mesures possibles pour encourager et favoriser l'accès prioritaire, sur une base juste et équitable, des parties contractantes, en particulier des pays en développement, aux résultats et aux avantages découlant des biotechnologies fondées sur les ressources génétiques fournies par ces Parties...* ». Ainsi, les pays du Nord et du Sud devraient conjuguer leurs efforts pour que le transfert des biotechnologies appliquées à l'igname soit effectif en Afrique.

Par ailleurs, la Convention sur la diversité biologique en son article 8 - g exige de chaque partie contractante, qu'elle « *mette en place ou maintienne des moyens pour réglementer, gérer ou maîtriser les risques associés à l'utilisation et à la libération d'organismes vivants et modifiés résultant de la biotechnologie qui risquent d'avoir sur l'environnement des impacts défavorables qui pourraient influer sur la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique...* ». C'est dans ce cadre qu'un protocole international est en cours d'élaboration et que la proposition du groupe Afrique rédigée par l'Éthiopie, à la suite de la réunion des experts à Aarhus a été traduite en français par le WWF (World Wide Fund for Nature)-Afrique de l'Ouest. La Côte d'Ivoire, conformément aux engagements internationaux pris, rédige sa réglementation nationale sur la biosécurité, avec l'appui de l'ADRAO et du WWF.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

Les méthodes biotechnologiques appliquées aux ignames, devraient contribuer directement ou indirectement à la sécurité alimentaire en Afrique, en augmentant le taux de multiplication (microbouturage), en permettant une meilleure caractérisation des ressources génétiques et une meilleure compréhension de la phylogénie des ignames cultivées par les marqueurs moléculaires, ou en fournissant des plantes indemnes de virus par culture d'apex. D'autres voies peuvent également être exploitées. C'est le cas de la fourniture de semences sous forme de vitroplants ou de la réalisation de pollinisation *in vitro* ou de sauvetage d'embryons *in vitro* pour augmenter le taux de fécondation des ignames cultivées.

La plupart des résultats obtenus dans le domaine des biotechnologies étant surtout l'œuvre des chercheurs du Nord, pour aider au transfert de technologies, la communauté internationale a organisé deux séminaires internationaux sur i) "l'utilisation des biotechnologies dans l'amélioration du manioc, de l'igname et du plantain en Afrique" (IITA, Ibadan - Nigeria, 1988) et ii) "l'Afrique face au défi des biotechnologies : cas de l'igname" (IIRSDA, Abidjan - Côte d'Ivoire, 1993). Mais, aucun de ces séminaires n'a abouti à une action d'envergure sur les biotechnologies en Afrique. Il convient donc de revoir l'approche utilisée. La mise en œuvre de la Convention sur la diversité biologique constitue un cadre idéal de réalisation du transfert de biotechnologies vers les pays du Sud, avec la coopération bilatérale intégrée dans une approche sous-régionale.

Par ailleurs, des espèces sauvages et des variétés cultivées d'ignames africaines restent encore non décrites (Hladik *et al.*, 1984 ; Hamon *et al.*, 1995), tout comme la plupart des constituants de la diversité biologique (WWF, 1993). Ainsi, l'exploitation durable et rationnelle des ressources biologiques offertes par la nature, devrait constituer la priorité en amélioration des plantes.

De ce fait, le travail en cours dans le cadre d'une bourse AUPELF donne la priorité à la collecte des variétés traditionnelles d'ignames cultivées au Bénin, au Burkina Faso, en Guinée, au Mali et au Togo, avant l'utilisation des biotechnologies pour l'amélioration des ignames (pollinisation *in vitro* et sauvetage d'embryons), à partir des résultats déjà obtenus en Côte d'Ivoire. Un groupe a alors été constitué (IGAD : Igname - Gène - Agriculture - Développement) à la faveur du séminaire international sur les ressources génétiques en Afrique des savanes (Bamako, février 1997), pour permettre aux chercheurs de travailler en réseau. En effet, les ignames ne connaissent ni de frontières géographiques, ni de frontières disciplinaires et c'est en travaillant en synergie que les chercheurs africains pourront utiliser efficacement les biotechnologies et permettre aux ignames de contribuer à la sécurité alimentaire dans chacun de leurs pays.

Bibliographie

1. AMMIRATO P.V., 1976. Hormonal control of tuber formation incultured axillary buds of *D. bulbifera* and *D. alata*. Plant Physiology, 57-5 suppl. : 66 p.
2. ARNOLIN R., 1980. Culture *in vitro* et amélioration de l'igname *(Dioscorea* L.). L'igname, Séminaire international, Pointe-à-Pitre, INRA : 255 - 268.
3. ARNOLIN R., Gamiette F., Degras L., 1991. Obtention de plantules d'ignames *(D. alata* et *D. cayenensis-rotundata)* par culture d'embryons *in vitro*. In Annual meeting of Caribbean Food Crops Society, Guadeloupe, Gosier, 1-6 july 1989. INRA (Ed) 25 : 646 - 659.
4. ASEMOTA H. N., RAMSER J., LOPEZ PERALTA C., WEISING K., KAHL G., 1996. Genetic variation and cultivar identification of Jamaican yam germplasm by random amplified polymorphic DNA analysis. Euphytica (1996) 92 : 341 - 351.
5. BALAGNE M., 1985. Le microbouturage *in vitro* de l'igname cousse couche *D. trifida* en vue de son application pour la guérison des variétés atteintes de viroses. Thèse de 3ème cycle. USTL, Montpellier, 144 p.
6. BELARMINO M., DEL ROSARIO A.G., 1991. Callus induction and organogenesis in *Dioscorea* Species. Japan J. Breed., 41 : 561 - 569.
7. BUTENKO R. G., LIPSKY A.K., CHERNYAK N.D., ARYA H.C., 1984. Changes in culture medium pH by cell suspension cultures of *D. deltoidea*. Plant Science Letters, 35 : 207 - 212.

8. CONLAN R. S., Griffiths L.A., Napier J. A., Shewry P. R, Mantell S.H., AINSWORTH C., 1995. Isolation and characterisation of cDNA clones representing the genes encoding the major tuber storage protein (dioscorin) of yam *(D. cayenensis* Lam.). Plant Molecular Biology. Vol. 28, N° 3: 369-380.
9. DANSI A.A., 1995. Caractérisation des principaux cultivars d'ignames du complexe *D. cayenensis-rotundata* du Nord-Est du Bénin. Mémoire de DEA. Université Nationale de Côte d'Ivoire : 41 p.
10. FAUTRET A. 1985. Callogenèse et néoformation chez deux espèces d'ignames comestibles, *D. alata* et *D. trifida*. Thèse de Docteur Ingénieur, USTL, Montpellier, 163 p.
11. FUNES I., BOCCON-GIBOD J., 1988. Isolation, culture and microcolony formation of yam leaf mesophyll protoplasts. IAPTC colloque "Applications des cultures de cellules végétales à la production de plantes et à l'amélioration génétique". Résumé : 1 p.
12. HAMON P., 1987. Structure, origine génétique des ignames cultivées du complexe *D. cayenensis-rotundata* et domestication des ignames en Afrique de l'Ouest. Thèse de Doctorat d'Etat. Université Paris Sud : 247 p.
13. HAMON P., BRIZARD J.P, ZOUNDJIHÉKPON J., DUPERRAY C. et BORGEL A., 1992. Etude des index d'ADN de huit espèces d'ignames *(Dioscorea* sp) par cytométrie en flux. Canad. J. of Bot., 70 (5) : 996 - 1000.
14. HAMON P., DUMONT R, ZOUNDJIHÉKPON J., TIO-TOURÉ B., HAMON S., 1995. Les ignames sauvages d'Afrique de l'Ouest. ORSTOM Editions et IPGRI. ISSN 1142-2581 - ISBN 2-7099-1288-0 : 84 p.
15. HANSON J. 1986. Methods of storing tropical root crop germplasm with special reference to yam. FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter, 64 : 24 - 32.
16. HLADIK A., BAHUCHET S., DUCATILLON C., HLADIK C.M., 1984. Les plantes à tubercules de la forêt dense d'Afrique centrale. Rev. Ecol. (Terre Vie), 39 : 249 - 290.
17. JEAN M., CAPPADOCIA M., 1991. *In vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. *Brazo Fuerté* and *Florido* and *D. abyssinica* Hoch., Plant cell, tissue and organ culture, 26 : 147 - 152
18. JEAN M., CAPPADOCIA M., 1992. Effects of some growth regulators on *in vitro* tuberization in *D. alata* L. *Brazo Fuerte* and *D. abyssinica* Hoch. Plant Cell Reports, 11 : 34 - 38.
19. KANDASAMY K., 1996. Tissue culture studies and interaction between the yam anthracnosis pathogen and *Dioscorea alata*. PhD thesis, Wye college, University of London, 281 pp
20. MALAURIE B., PUNGU O., DUMONT R., TROUSLOT M.-F., 1993. The creation of an *in vitro* germplasm collection of yam *(Dioscorea* spp) for genetic resources preservation. Euphytica, 65 : 113 - 122.
21. MALAURIE B., TROUSLOT M.-F., 1995. Les ignames. *in* Teisson, C., 1995. Biotechnologies végétales. Intégration chez les plantes tropicales 2. CNED - AUPELF - UREF, BV 9D : 49 - 77.
22. MALAURIE B., PUNGU O., TROUSLOT M.-F., 1995. Effect of growth regulators concentrations on morphological development of meristem-tips in *D. cayenensis-D. rotundata* complex and *D. praehensilis*. A paraître dans Plant, Cell, Tissue and Organ Culture.
23. MALAURIE B., TROUSLOT M.-F., 1996. Cryopreservation of *in vitro* yam *(Dioscorea* sp) apices by the encapsulation-dehydratation technique. Eucarpia meeting on Tropical plants. 11 - 15 march 1996, Montpellier, France. Abstract book : 252.
24. MANTELL S. H., HAQUE S. Q., 1977. Three techniques for rapid clonal propagation of white Lisbon yam *(D. alata,* L.). Nouv. Agro. Antille-Guyane, 3 (3/4) : 413 - 427.
25. MANTELL S.H., HAQUE S.Q., WHITEHALL A.P., 1978. Clonal multiplication of *D. alata* L. and *D. rotundata* Poir. yams by tissue culture. J. Hort. Sci., 53 (2) : 95 - 98.
26. MANTELL S.H., BOCCON-GIBOD J., 1997. Vers la mise au point d'outils biotechnologiques pour l'amélioration génétique de l'Igname *(Dioscorea* spp). Séminaire international « L'igname, plante séculaire : culture d'avenir ». Montpellier, 3-6 juin 1997. CORAF - CIRAD.
27. NAGASAWA A., FINER J.J., 1989. Plant regeneration from embryonic suspension cultures of chinese yam *(D. opposita* Thumb). Plant Science, 60 : 263 - 271.
28. NG S.Y.C., 1988. *In vitro* tuberization in white yam *(D. rotundata* Poir.). Plant Cell, Tissue and Organ culture. 14 : 121 - 128.
29. NG S.Y.C. and HAHN, S.K., 1985. Application of tissue culture to tuber crops at IITA. In Biotechnology in international Research, IRRI, Manila : 29 - 40.
30. NIWATA E., MATSUNAKA K., FUKUSHI K., 1983. Clonal propagation of chinese yam *(Dioscorea opposita)* from shoot meristem tips. Tohoku Agricultural research, 33 . 255 - 256.

31. OKIGBO B.N., 1991. Le rôle des plantes-racines et des tubercules dans la crise alimentaire en Afrique. In Compte-rendu du 3ème Symp. Trien. de la Soc. Intern. pour les plantes-racines tropicales du 17 au 23 août 1986, Nigéria : 10 - 15.
32. OKITO P., AHOUSSOU N., MULONGOY K., 1993. Production et culture de protoplastes de *Dioscorea* sp. Poster. Séminaire régional : "L'Afrique face au défi des biotechnologies végétales : cas de l'igname". IIRSDA, Abidjan - Côte d'Ivoire : 1 p.
33. PETERS A., 1986. Quelques aspects de la morphogenèse des ignames cultivées *in vitro*. Rapport de stage. ORSTOM, Mémoire de fin d'Etudes ISTOM (74ème promotion) : 39 p.
34. RAMSER J., LOPEZ-PERALTA, WETZEL R., WEISING K., KAHL G , 1996. Genomic variation and relationships in aerial yam (*D. bulbifera* L.) detected by random amplified polymorphic DNA. Genome, 39 : 17 - 25.
35. RAMSER J., WEISING K., LOPEZ-PERALTA C., TERHALLE W., TERAUCHI R., KAHL G A paraître. Molecular marker-based taxonomy and phylogeny of guinea yam (*D. rotundata - D. cayenensis*).
36. SÈNIOU D., 1993. Contribution à la caractérisation par électrophorèse enzymatique des cultivars du complexe *D. cayenensis-rotundata*. Thèse de Docteur Ingénieur. Ecole Supérieure d'Agronomie, Lomé - Togo : 103 p.
37. SHAFER W., GORTZ A., GAHL G., 1987. T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium*. Nature, 327 : 529 - 532.
38. TERAUCHI R., TERACHI T., TSUNEWAKI K., 1989. Intraspecific variation of chloroplast DNA in *Dioscorea bulbifera* L. Theo. Appl. Genet., 81 (4) : 461 - 470.
39. TERAUCHI R., CHIKALEKE V.A., THOTTAPPILLY G., HAHN S.K. Origin and phylogeny of Guinea yams as revealed by RFLP analysis of chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA. Theo. and Appl. Genet. 83 (6-7) : 743 - 751.
40. TARDIEU F., 1987. Contribution à l'étude des techniques de culture *in vitro* de tissus et d'obtention de culture de protoplastes d'igname (*Dioscorea* spp). Mémoire de fin d'étude ENSH et rapport de VSNA. ORSTOM : 69 p.
41. THOUVENEL J.C., DUMONT R., 1990. Perte de rendement de l'igname infecté par le virus de la mosaïque en Côte d'Ivoire. Agron. Trop., 45 (2) : 125 - 129.
42. TOR M., TWYFORD C. T., FUNES I., BOCCON-GIBOD J., AINSWORTH C.C., MANTELL S.H., 1996. Isolation and culture of protoplasts from immature leaves and embryogenic cell suspensions of *Dioscorea* : tools for transient gene expression studies. Plant Cell Tissue and Organ Culture (Soumis).
43. TWYFORD C., MANTELL S.H., 1990. Cultural conditions required for cell division, callus induction and early stages of somatic embryogenesis in protoplast and tissue explants of *D. alata* L. cv. Oriental. Proc 8th Symp. ISTRC, Bangkok, Thailand, November 1988 · 624.
44. VIANA A.M., MANTELL S.H., 1989. Callus induction and plant regeneration from exised zygotic embryos of the seed-propagated yams *D. composita* Hemsc. and *D. cayenensis* Lam.. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 16 : 113 - 122.
45. WWF, 1993. La diversité de la vie. WWF - International : 24 p.
46. YAKUWA T., HARADA T., KASA N., ARAKI H., 1981. Studies on the botanical characteristics of genus *Dioscorea*, 2 : On the formation and germination of the seed in Chinese yam (cv Nagaimo). Journal of the Faculty of Agriculture. Hokkaido University. 60 (3) : 220 - 226.
47. ZOUNDJIHÉKPON J., 1993. Biologie de la reproduction et génétique des ignames cultivées de l'Afrique de l'Ouest, *D. cayenensis-rotundata*. Thèse de Doctorat d'Etat. Université Nationale de Côte d'Ivoire. : 306 p.
48. ZOUNDJIHÉKPON J., HAMON P., AHOUSSOU N., DOUKOURÉ S., TIO-TOURÉ B., HAMON S , 1995. Biotechnologies et gestion des ressources génétiques des ignames africaines. Cinquièmes Journées scientifiques de l'AUPELF-UREF, Dakar - Sénégal : 18 p.

A16 : Les biotechnologies, source de sécurité alimentaire pour demain ?

BONNY S., chercheur INRA - Économie et Sociologie Rurales
BP01, 78850 Grignon, France
E-mail : bonny@grignon.inra.fr

La sécurité alimentaire désigne au niveau mondial l'accès de tout individu à tout moment à une nourriture suffisante et équilibrée nécessaire pour mener une vie saine et active. Elle repose sur diverses conditions :

- Une offre de nourriture suffisante tout au long de l'année.
- L'accès de tous à la nourriture, ce qui suppose de produire soi-même suffisamment et/ou d'avoir les ressources nécessaires pour acheter les aliments indispensables pour une ration équilibrée.
- Une distribution équitable de la nourriture au sein de la famille.
- Un équilibre de la ration alimentaire en termes de qualité, composition, teneur en micronutriments et une nourriture saine, non contaminée.
- Un état sanitaire favorable permettant l'assimilation des aliments.

Dans les pays européens, les préoccupations se portent aujourd'hui notamment sur la qualité de l'alimentation, car un mouvement de suspicion s'est développé, certains consommateurs craignant diverses contaminations possibles (pesticides, prions, etc.). Mais avec l'apparition de la nouvelle pauvreté, une fraction de la population y manque aussi de ressources pour se procurer une alimentation suffisante et variée. Dans les pays du Sud ce sont surtout les aspects de disponibilité et d'accès à la nourriture qui posent problème pour beaucoup, mais aussi ceux d'équilibre nutritionnel (Delpeuch, Maire 1996). Le terme de sécurité alimentaire renvoie ainsi à deux acceptions : en France il correspond le plus souvent à des aliments sains, à la sécurité en termes de santé publique (food safety). Dans les pays en développement l'accent porte surtout sur l'accès à une nourriture suffisante (food security), mais les problèmes de contamination des aliments ne doivent pas être négligés. Enfin le modèle de consommation alimentaire joue partout un rôle notable car divers déséquilibres proviennent d'un excès ou d'un déficit de certaines catégories d'aliments en raison des habitudes et des choix des consommateurs.

La sécurité alimentaire suppose un équilibre entre l'offre et la demande qui puisse durer. Compte tenu de la croissance de la population mondiale, l'accent est souvent mis aujourd'hui sur la nécessité d'accroître la production et les rendements sans dégrader l'environnement et les capacités productives, d'où l'importance accordée depuis quelques années à la notion de développement durable. Par ailleurs comme les situations agricoles des pays et des régions sont très diverses, un certain développement des échanges est considéré comme nécessaire.

Dans cette optique de sécurité alimentaire, les biotechnologies, notamment le génie génétique, font l'objet d'une controverse quant à leurs apports possibles. Ses promoteurs, notamment les firmes qui ont investi dans ce domaine, les présentent systématiquement comme « indispensables pour nourrir l'humanité au XXI^{e} siècle » en raison de leurs nombreux intérêts (limitation des pertes dans la production agricole, introduction d'intéressantes caractéristiques agronomiques ou nutritionnelles, etc.). À

l'opposé, un mouvement de méfiance s'est développé, notamment en Europe mais aussi à l'échelle internationale, mettant en avant certains risques d'ordre écologique, toxique, agro-économique, socio-économique, etc. et s'interrogeant sur la nécessité d'y recourir.

L'objectif de cet article est d'apporter quelques éléments de réflexion sur les enjeux des biotechnologies en matière de sécurité alimentaire :

- Sont-elles susceptibles d'accroître la suffisance et la qualité de la nourriture pour tous ?
- Peuvent-elles contribuer à une plus grande durabilité sous l'angle environnemental, condition pour une sécurité alimentaire de long terme ?
- Peuvent-elles être un facteur d'amélioration de la situation économique et des conditions de vie des populations démunies, notamment dans les pays en développement (PVD) ?

Il sera ici surtout fait référence au génie génétique sur lequel se focalise la controverse même si d'autres biotechnologies sont plus largement utilisées en amélioration des plantes (Demarly, Sibi 1996). On présentera de façon schématique les différents points de vue : d'une part les effets bénéfiques mis en avant par les promoteurs des biotechnologies, d'autre part les risques potentiels craints par d'autres. On cherchera ainsi à mieux appréhender l'origine des divergences dans les appréciations et divers enjeux des biotechnologies en matière de sécurité alimentaire.

LES BIOTECHNOLOGIES SONT-ELLES SUSCEPTIBLES D'ACCROÎTRE LA SUFFISANCE ET LA QUALITÉ DE L'ALIMENTATION POUR TOUS ?

Les promoteurs des biotechnologies insistent souvent sur leurs potentialités en ce domaine

• *Les biotechnologies pourraient permettre d'accroître la production agricole en quantité*

– En **diminuant les pertes dues à certains ravageurs des cultures**, notamment par l'introduction de gènes de résistances aux herbicides, aux insectes, aux nématodes, aux virus, aux champignons. Un certain nombre de résultats ont déjà été obtenus dans ces domaines et ont abouti à la mise sur le marché de diverses nouvelles variétés résistantes à des herbicides, des insectes ou des virus ; de nombreux travaux sont en cours. L'ILTAB (International Laboratory for Tropical Agricultural Biotechnology, laboratoire commun de l'ORSTOM et du Scripps Research Institute des USA) a réussi une avancée dans la mise au point d'un riz transgénique résistant à la bactériose. En matière de lutte contre les champignons ou les virus, la multiplication végétative *in vitro* a permis de régénérer des variétés virosées et d'obtenir des cultivars sains (eg. pomme de terre, dahlia, fraisier, etc.) ; diverses recherches sont menées aussi sur les transferts de gènes en ces domaines. Une meilleure conservation après récolte est également un facteur clé, faisant l'objet de travaux : la première plante transgénique commercialisée aux USA en 1994 était ainsi une tomate à durée de conservation prolongée.

– **En permettant d'améliorer la tolérance des plantes au sel, à la sécheresse ou à certains métaux**. L'irrigation entraîne souvent un accroissement de la salinité des sols ; par ailleurs les déficits pluviométriques sont un facteur fréquent de limitation des rendements dans de nombreuses régions du monde. Les biotechnologies pourraient permettre des apports sensibles, en particulier par transfert de gènes de plantes

halophytes, utilisation de marqueurs génétiques ou par une meilleure adaptation des plantes à la sécheresse (Monneveux, This 1997).

– **En favorisant la production de nouveaux types d'aliments ou de compléments nutritionnels**, par exemple la mise au point de POU (protéines d'organismes unicellulaires), la culture des spirulines, le développement de l'aquaculture, une diffusion peut-être plus large de certaines cultures intéressantes (quinoa, amarante, etc.).

Si l'amélioration du rendement des plantes lui-même paraît pour l'instant difficile car de nombreux gènes sont en jeu, on pense pouvoir intervenir sur divers facteurs qui agissent sur celui-ci : par exemple, l'accroissement de l'indice de récolte, l'efficacité de certaines phases de la photosynthèse. Mais, compte tenu de leur importance, la diminution des pertes devrait en elle-même permettre une augmentation de la production : Oerke (1992, dans une étude commanditée par l'European Crop Protection Association) estimait que pour la période 1988-90, les pertes dues aux ravageurs du riz s'élevaient à 55 % de la production possible sans celles-ci, pour le blé à 36 %, pour le maïs à 62 %. Ainsi, l'introduction de nouvelles résistances aux ravageurs grâce aux biotechnologies paraît intéressante (à condition que la régression d'un ravageur ne favorise pas le développement d'autres).

• *Les biotechnologies pourraient contribuer à une amélioration de la qualité des productions*

Le concept de qualité est particulièrement polysémique, mais différents aspects que recouvre cette notion peuvent être modifiés par les biotechnologies et la transgenèse, par exemple :

- qualité organoleptique permettant une meilleure acceptabilité de certains aliments ;
- modification de la teneur en certains acides gras chez les oléagineux en fonction de leur utilisation finale requérant la présence de certains d'entre eux ;
- augmentation de la teneur en certaines vitamines ;
- amélioration de la capacité des productions à subir certains processus de transformation après la récolte ;
- augmentation du taux de lactoferrine dans le lait, ce qui est bénéfique pour les très jeunes enfants.

Les firmes et la recherche publique ont déjà obtenu divers résultats en ce domaine et des colzas enrichis en certains acides gras sont déjà commercialisés aux USA.

Mais d'autres acteurs craignent que les biotechnologies n'améliorent guère la situation alimentaire d'une partie de la population mondiale, notamment de certains qui en auraient fortement besoin

• *Sur le plan quantitatif*

Les recherches en matière de biotechnologies et de génie génétique sont effectuées principalement par de grandes firmes privées qui visent les marchés solvables. Ainsi les essais aux champs de plantes transgéniques sur la période 1986-1995 ont été réalisés pour 92 % d'entre eux dans les pays développés et pour 8 % seulement dans les PVD (notamment en Argentine et Chine) (James, Krattiger, 1996). La part des essais effectués en Afrique n'était que de 0,7 % et en Asie en développement (Chine inclue) de 1,7 % pour la même période.

Certes, des travaux sur les biotechnologies et le génie génétique sont aussi menés dans les Centres Internationaux de Recherche Agronomique (CGIAR), par des organismes

de recherche de certains pays en développement[1], par ceux des pays développés axés vers la coopération (comme en France l'ORSTOM ou le CIRAD[2] et par ailleurs l'Organisation des Nations-Unies pour le Développement Industriel (ONUDI) a créé un centre international pour le génie génétique et la biotechnologie (l'ICGEB). Autrement dit certaines recherches en ce domaine sont tournées vers les pays en développement, mais elles souffrent assez souvent d'un manque de ressources. Anderson, Pardey et Roseboom (1994) ont ainsi établi que sur la période 1981-1985 les dépenses en recherche agricole par actif de l'agriculture étaient de 3,1$ 1980 (PPA) en Afrique subsaharienne (37 pays) contre 213,5 $ 1980 (PPA) dans les 18 pays les plus développés du monde [3]; de plus les ressources affectées à la recherche agronomique dans les pays les plus pauvres ont souvent régressé ces dernières années (Pardey, Alston 1995). Ainsi, **l'un des risques majeurs des biotechnologies est qu'elles ne soient pas suffisamment orientées vers la demande de ceux qui en auraient le plus besoin.**

La sécurité alimentaire suppose par ailleurs des revenus suffisants pour acheter la nourriture. Or, comme on le verra, certaines populations pourraient perdre des sources de revenus avec le développement des biotechnologies dans les pays du Nord, y permettant des productions qui concurrenceraient leurs exportations.

• *Sur le plan de la qualité*

Pour certains, le génie génétique peut comporter des risques toxiques, alimentaires et sanitaires. On évoque notamment :

- Les risques toxiques liés :

- à la nature du produit dont la synthèse est commandée par le nouveau gène,
- à la modification du métabolisme de la plante due au transgène,
- au métabolisme modifié d'herbicides auxquels la plante a été rendue tolérante.

- Les risques alimentaires (autres que toxiques) :

- risques liés aux nouveaux composés présents éventuellement dans la plante transgénique,
- risques allergiques dus au produit synthétisé par le gène transféré.

- Autres risques pour la santé :

- possibilité de développement de résistances à des antibiotiques à partir de gènes marqueurs [4]. Ainsi le maïs transgénique de CIBA possède un gène de résistance à l'ampicilline, antibiotique couramment utilisé. Certains craignent que, si ces gènes se diffusent, le phénomène de résistance aux antibiotiques (i.e. ils perdent leur efficacité

[1] La Chine cultivait déjà en 1994-95 près d'un million d'ha de plantes transgéniques, en particulier du tabac (cette plante est une des plus faciles à transformer) (James, Krattiger, 1996).

[2] ORSTOM : Institut de recherche scientifique pour le développement en coopération.
CIRAD : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

[3] Les PPA (parités de pouvoir d'achat) sont un taux de conversion égalisant le pouvoir d'achat des différentes monnaies : 1 $ PPA permet d'acheter le même panier de biens et services dans différents pays.

[4] Les gènes marqueurs de résistance à un antibiotique servent à identifier si la plante a incorporé les nouveaux gènes, donc est bien transgénique. Ils peuvent être utiles quand il n'existe pas d'autre test simple pour distinguer les plantes portant le transgène. Ils sont aussi employés pour le procédé de transgenèse lui-même, mais de moins en moins.

car les bactéries deviennent résistantes) – déjà préoccupant – devienne encore plus fréquent. À cela les scientifiques qui ont étudié le dossier répondent que le gène de résistance à l'ampicilline est déjà très fréquent dans la nature et que les vaches susceptibles de consommer le maïs en ont déjà ingéré. Autrement dit il n'y aurait pas de nouveau risque avec les plantes transgéniques qui le possèdent (le problème serait plutôt qu'on utilise déjà beaucoup d'antibiotiques dans l'alimentation animale).

Dans la mesure où les risques toxiques et alimentaires font l'objet d'évaluations approfondies avant toute autorisation de commercialisation (Kahn, 1996 ; CNRS 1997 ; OCL 1997) en raison notamment de la sensibilisation des consommateurs occidentaux en ce domaine, ils devraient pouvoir être contrôlés, mais cela paraît plus difficile pour certains autres risques.

LES BIOTECHNOLOGIES PEUVENT-ELLES PERMETTRE UNE PLUS GRANDE DURABILITÉ SOUS L'ANGLE ENVIRONNEMENTAL ?

L'un des facteurs importants de sécurité alimentaire est la préservation du potentiel productif agricole. Aussi paraît-il nécessaire de s'interroger sur l'apport des biotechnologies en la matière, d'autant plus que les techniques agricoles mises en œuvre durant les trois dernières décennies sont assez souvent accusées de dégrader certaines ressources naturelles (Bonny, 1996b).

Les bénéfices possibles

Pour les promoteurs des biotechnologies on peut en attendre beaucoup. Par exemple :

- Elles reposent sur une utilisation et une valorisation des processus du vivant et devraient ainsi conduire à un moindre recours à des produits chimiques souvent polluants.
- Avec les plantes résistantes à certains insectes, champignons ou nématodes, l'utilisation de pesticides chimiques devrait diminuer, et avec les plantes tolérantes à un herbicide on pourrait en utiliser de peu toxiques à la place des désherbants controversés.
- La croissance de la production agricole (permise par une réduction de certaines pertes) pourrait éviter d'étendre les surfaces cultivées et de mettre en culture des sols fragiles ou des forêts.
- Elles peuvent contribuer à la diversité génétique. D'une part celle-ci est mieux connue grâce à la cartographie du génome : on peut ainsi évaluer la distance entre diverses races ou espèces et juger celles à conserver en priorité en fonction de leurs caractères intéressants. D'autre part la transgénèse peut être vue comme une nouvelle façon d'augmenter la biodiversité au sein des espèces modifiées.
- Les biotechnologies peuvent par ailleurs être utilisées pour la dépollution (bioremédiation), ce qui est un important facteur de sécurité alimentaire.

Les risques craints

D'un autre côté les écologistes, une partie des consommateurs, mais aussi certains scientifiques s'inquiètent de divers risques, paraissant parfois difficiles à contrôler. Les préoccupations portent notamment sur :

- Une artificialisation trop poussée de la nature avec en particulier la transgression des barrières d'espèces et surtout la possibilité d'effets inattendus de l'insertion de nouveaux gènes dans le génome d'un organisme (il existe en

effet beaucoup d'inconnues en matière de fonctionnement du génome et on connaît mal l'endroit où s'insèrent les nouveaux gènes introduits).

- Le passage incontrôlé des gènes transférés chez les plantes sauvages de la même famille qui se croisent avec la plante transgénique. On craint par exemple les repousses de plantes transgéniques résistant à un herbicide pouvant s'avérer difficiles à éliminer ou à contrôler dans certaines rotations. Des travaux sont menés en France dans le cas du colza, de la betterave, de la chicorée, mais ce phénomène pourrait concerner ultérieurement bien d'autres plantes (blé, luzerne, pois, fruits, légumes).
- L'emploi accru de certains herbicides comme le glyphosate avec la création de diverses cultures tolérantes à celui-ci (soja, coton, colza, haricots, etc.) peut favoriser le risque d'apparition de résistance à cet herbicide alors que pour l'instant il n'en existe quasiment pas. Cela paraît regrettable car cet herbicide total est considéré comme l'un des moins toxiques : il serait donc intéressant de préserver son efficacité.
- L'utilisation à grande échelle des protéines Bt avec la création de diverses plantes transgéniques résistantes aux insectes qui l'expriment risque également de favoriser la sélection d'insectes résistants, ce qui conduirait à ne plus pouvoir utiliser ces protéines alors qu'elles sont peu toxiques et peuvent être employées sous diverses formes (en lutte biologique, par exemple).
- On peut également s'interroger sur les effets des plantes transgéniques sur la faune auxiliaire comme les abeilles.
- Certaines biotechnologies comme la multiplication végétative in vitro peuvent entraîner une réduction de la biodiversité et une plus grande sensibilité aux maladies si leur gestion n'est pas suffisamment rigoureuse. Par ailleurs, on peut craindre que le génie génétique accentue le mouvement actuel de réduction du nombre de variétés proposées aux agriculteurs car les plantes transformées et sélectionnées vont être utilisées pour toutes les variétés ultérieures. Enfin, se préoccupera-t-on suffisamment d'améliorer les variétés locales (petites céréales sèches, etc.) ?
- L'introduction de plantes transgéniques est quelquefois comparée à celles de nouvelles espèces dans certains milieux : cela a parfois conduit à des fléaux par manque d'antagonistes naturels aux espèces introduites susceptibles alors de proliférer (Paoletti, Pimentel, 1996).

Last but not least, l'accroissement des connaissances en ce domaine peut être utilisé de multiples façons, y compris même parfois pour développer des guerres bactériologiques. Certes des guerres fort meurtrières ont pu être menées sans armes sophistiquées, mais la question des utilisations dangereuses possibles de certaines nouvelles techniques doit être posée pour tenter de les contrôler et prévenir, tâche fort difficile.

LES BIOTECHNOLOGIES PEUVENT-ELLES CONTRIBUER À AMÉLIORER LES CONDITIONS DE VIE ET LA SITUATION ÉCONOMIQUE DES POPULATIONS DÉMUNIES, NOTAMMENT DANS LES PAYS EN DÉVELOPPEMENT ?

Des potentialités prometteuses

Outre l'accroissement de production agricole, diverses applications des biotechnologies peuvent être des facteurs d'amélioration de la sécurité alimentaire, de façon directe ou indirecte :

- **En pouvant contribuer à un meilleur état de santé des populations.** Par exemple, avec la mise au point de vaccins et de médicaments moins coûteux contre certaines maladies. Des chercheurs du Boyce Thompson Institute for Plant Research ont ainsi obtenu des bananes transgéniques produisant un antigène du virus de l'hépatite B et travaillent sur un vaccin contre la diarrhée qui serait exprimé dans des pommes de terre transgéniques (Johnson, 1996). Un nombre croissant de médicaments et produits pharmaceutiques sont obtenus par des procédés biotechnologiques et représentent déjà une part notable du marché. Si certains d'entre eux sont coûteux, une baisse des prix est envisageable à plus long terme, les rendant plus accessibles. Des travaux sont également menés pour obtenir des vaccins contre certaines maladies animales comme la trypanosomiase et la peste bovine qui affectent la productivité du bétail (Gbewonyo, 1997).

Des expérimentations sont par ailleurs en cours sur des épandages de biopesticides à base de Bt pour lutter contre divers insectes vecteurs de maladies graves. L'efficacité des bio-insecticides, qui actuellement ne représentent que 2 à 3 % des insecticides vendus dans le monde, devrait pouvoir être sensiblement améliorée grâce à l'utilisation de bactéries transgéniques plus actives contre les insectes ravageurs que les bactéries naturellement pathogènes pour ceux-ci (comme Bacillus thuringiensis). Ces souches génétiquement modifiées exprimeraient plusieurs toxines différentes, ce qui réduit le risque d'apparition de résistance chez les insectes (Institut Pasteur 1997). L'un des intérêts des biopesticides de Bt est leur toxicité bien moindre que celle des insecticides chimiques.

- **Par la mise au point de techniques améliorées de dépollution.** La biodépollution (ou bioremédation) permet d'éliminer, de dégrader ou de détoxifier des polluants de l'eau, de l'air et du sol. Elle est utilisée depuis longtemps de façon empirique, mais l'évolution des connaissances en ce domaine rend possible une plus grande efficacité (OCDE 1996). La dépollution peut contribuer à améliorer l'état de santé des populations, et certains procédés peuvent favoriser la transformation de divers résidus en matières premières pour l'alimentation animale.

- **En permettant des voies technologiques moins énergivores et moins polluantes pour certains processus.** Un exemple inattendu est sans doute celui de biolixiviation des minerais, où on utilise des procédés d'oxydation biologique pour le raffinage (cela serait déjà pratiqué dans les mines d'or du Ghana) (Gbewonya 1997).

- **Sur le plan économique les répercussions de la mise en œuvre des biotechnologies paraissent plus mitigées.** Les exportations agricoles des pays développés et en particulier des USA augmenteront probablement. Cela devrait être un facteur de baisse des prix agricoles mondiaux, ou du moins un frein à leur hausse. Les populations urbaines, particulièrement les commerçants, les intermédiaires et les négociants, pourraient en bénéficier dans les PVD. Mais qu'en serait-il pour les producteurs locaux et notamment les petits paysans ? La concurrence des produits importés, souvent à bas prix, risque de décourager la production locale et donc d'appauvrir les paysans des PVD, ce qui n'est pas un facteur de sécurité alimentaire. Certes les pays émergents qui s'industrialisent pourraient avoir demain les moyens de recourir à des importations agricoles importantes, mais en général, il ne paraît pas souhaitable de dépendre entièrement des importations en matière alimentaire. La sécurité alimentaire requiert en effet une certaine part d'autosuffisance, à côté de diverses possibilités d'échange d'origine et de destination variées.

DES EFFETS NÉGATIFS ET DES RISQUES POTENTIELS

Il serait erroné, voire dangereux, de considérer les biotechnologies comme la technologie miracle susceptible de résoudre demain partout tous les problèmes alimentaires et médicaux. Elles peuvent en effet avoir des répercussions négatives pour les pays en développement ou les populations démunies :

- **Une concurrence accrue de la part des importations agricoles des pays développés** décourageant la production locale comme on vient de le voir.

- **Des pertes de débouchés et de sources de revenu** si les pays du Nord produisent par voie biotechnologique diverses substances qu'actuellement ils extraient de produits achetés dans les PVD. Ainsi la production de divers types d'acides gras dans du colza transgénique pourrait presque anéantir les exportations d'huile de palme ou de coprah de certains pays. La production par génie génétique de thaumatine ou d'arômes de vanille naturelle risque de ruiner leur production ou leur cueillette dans certains pays du Sud (Leisinger 1995, Galhardi 1996). L'impact des biotechnologies dépend en ce domaine de divers facteurs, en particulier des possibilités de diversification de la production dans les pays du Sud et de leur situation : sont-ils importateurs ou exportateurs nets de produits agricoles ? Leur potentiel technologique est-il bas ou élevé ? Pourront-ils exporter d'autres types de produits ?

- **Un « piratage » des ressources génétiques des pays du Sud**. La biodiversité, notamment spécifique et génétique, est nettement plus grande dans les pays du Sud. À partir de plantes médicinales traditionnelles des pharmacopées locales, des firmes extraient des principes actifs intéressants qu'ils protègent par brevet, puis commercialisent sous forme de médicaments. De même, des plantes locales intéressantes comme le quinoa ont été transformées génétiquement dans des pays développés avec protection par brevet. Cela peut empêcher d'autres travaux utilisant le même matériel génétique au départ, et priver aussi de débouchés les agriculteurs andins qui en produisaient pour l'exportation. Diverses ONG dénoncent par ailleurs le fait que rien ne revient aux pays du Sud qui ont découvert les intérêts de la plante (évitant aux firmes pharmaceutiques ou agrochimiques des screenings coûteux de milliers de molécules) et qui l'ont améliorée génétiquement avec des méthodes traditionnelles durant des millénaires dans le cas des plantes cultivées qui ont bénéficié de sélection de la part des populations locales. Certes, l'article 19 de la Convention de Rio sur la Diversité biologique de 1992 stipule qu'une rémunération est due aux PVD pour leur matériel génétique, mais son acceptation et son application effectives rencontrent des obstacles (Ilbert, 1997 ; Sauvain 1997).

- **Une dépendance des agriculteurs et de l'agriculture à l'égard des grandes firmes**. Les grandes firmes de l'agrochimie, de la transformation et de la distribution jouent un rôle croissant dans la production agricole : elles contrôlent et orientent de plus en plus l'évolution de ce secteur. Or cela risque de se faire davantage en fonction de leurs intérêts qu'en fonction de celui des petits agriculteurs, notamment dans les pays où ces derniers ont fort peu de pouvoir politique et sont mal représentés.

- **Un désintérêt à l'égard d'autres facteurs essentiels pour améliorer la sécurité alimentaire**. Comme les biotechnologies offrent un instrument remarquable de connaissance du fonctionnement intime du vivant et que beaucoup d'espoirs sont placés en elles, elles risquent d'absorber la majeure partie des investissements et des ressources (au sens le plus large de ces termes), ce qui conduirait à négliger d'autres facteurs tout à fait essentiels pour améliorer la sécurité alimentaire. Parmi ceux-ci on peut citer :

. **la nécessité de partir des besoins des populations**, d'adopter des démarches de développement « bottom up » (ascendantes) et non pas seulement « top down » (descendantes). C'est notamment sur cette démarche qu'insiste le concept de « Révolution doublement verte » (Griffon, Weber 1996). En outre la diversité des situations locales rend nécessaire d'identifier dans chaque cas les causes d'insécurité alimentaire pour chercher à mettre en œuvre des solutions adaptées ;

. **d'autres types de connaissances ou techniques essentiels**, en particulier tout ce qui concerne le fonctionnement des agrosystèmes et des sociosystèmes locaux, les techniques de production intégrées, etc. Les biotechnologies sont certes un instrument remarquable de connaissance et de transformation, mais au niveau moléculaire et cellulaire. Il est nécessaire de connaître aussi les organismes entiers, les systèmes de production agricoles, les écosystèmes, les sociétés et même l'état global de la planète du point de vue de leur fonctionnement et de leurs modalités d'évolution possible. Des approches plus globales que celle de la biologie moléculaire ne doivent pas être abandonnées au profit d'une seule approche puissante, mais réductionniste ;

. **d'autres aspects essentiels du développement**, notamment la nécessité de sécurité, d'absence de guerre ; le rôle crucial des infrastructures de recherche, de formation, de vulgarisation, de transport, etc. ; enfin l'imbrication des aspects sociaux, culturels, économiques.

Ces diverses répercussions potentielles négatives des biotechnologies qu'on vient d'évoquer risquent *in fine* d'accroître les disparités au détriment des populations les plus démunies qui pourraient ne guère tirer de bénéfice des biotechnologies, soit en n'y ayant pas accès (les biotechnologies visent principalement les marchés solvables, non les besoins des zones où elles seraient les plus utiles), soit si celles-ci contribuent de manière indirecte à leur appauvrissement (par perte de débouchés pour leurs productions par exemple).

CONCLUSION

Les promoteurs des biotechnologies les présentent souvent comme indispensables pour nourrir l'humanité au XXI^{e} siècle. Cet argument est fréquemment utilisé pour les légitimer face à des mouvements de suspicion apparus notamment en Europe en 1996 avec l'autorisation de commercialisation du maïs transgénique provenant des USA. On entend souvent dire que les populations des pays développés, bien nourries voire surnourries, ont en quelque sorte des réactions d'« enfants gâtés dont l'assiette est bien remplie », mais que pour les PVD les biotechnologies s'avéreront comme la panacée aux problèmes de sécurité alimentaire du XXI^{e} siècle.

Incontestablement les biotechnologies offrent des potentialités notables, en premier lieu en tant qu'instrument de connaissance du fonctionnement du vivant, ce qui donne des indications pour savoir comment intervenir ; de la sorte, elles ont des perspectives d'applications notables en de nombreux domaines (cf. par exemple OCDE 1996; Bonny 1996a). Dans cet article, on a cherché à examiner leurs effets possibles sur trois éléments clés de la sécurité alimentaire : (a) la suffisance et la qualité de l'alimentationÊ; (b) la durabilité sous l'angle environnemental des techniques agricoles utilisées et le maintien des capacités productives ; (c) enfin, l'amélioration des conditions de vie et de la situation économique des populations démunies et des PVD.

Pour cela, on a notamment présenté leurs apports et leurs risques potentiels en ces divers domaines. Les biotechnologies peuvent incontestablement contribuer par divers aspects à une croissance des disponibilités alimentaires globales, à une amélioration de l'environnement et des conditions de vie. Mais le risque serait que leurs promoteurs laissent sous-entendre que la solution aux problèmes de sécurité alimentaire est seulement technique et qu'il suffirait essentiellement de produire plus et d'accroître les rendements. Or, dès maintenant en l'état des techniques et des connaissances du milieu des années 1990, il est techniquement possible de nourrir les huit milliards d'hommes prévus pour 2025 (Bonny 1996b ; Bender, Smith 1997). Les causes profondes de l'insécurité alimentaire sont en effet notamment les guerres, l'inégalité de la répartition des terres et des richesses, la désorganisation de certaines structures politico-économiques, et des modèles de consommation alimentaire mal équilibrés. D'ailleurs, pour pouvoir exprimer leur potentiel, les biotechnologies doivent s'enraciner dans les divers pays et s'intégrer dans leurs systèmes de recherche-développement-formation et dans les systèmes productifs locaux (Brenner 1996).

Par contre, il y a risque si une technologie considérée ou présentée comme miraculeuse et thaumaturge amène à négliger certains problèmes essentiels en les esquivant, et si les biotechnologies accroissent l'exclusion de certaines populations. Les inquiétudes envers divers progrès techniques que l'on rencontre dans les pays développés expriment peut-être ainsi parfois indirectement, la crainte des processus d'exclusion : si certaines peuvent en bénéficier grandement, d'autres risquent de voir leur situation s'aggraver[1]. Pourtant, le véritable enjeu et intérêt des biotechnologies en agriculture ne serait-il pas non seulement qu'elles ne comportent pas de risques environnementaux particuliers, mais surtout qu'**elles soient mieux orientées vers la satisfaction des besoins des plus pauvres et des mal nourris** ? C'est là un des défis qu'elles posent et qu'il serait souhaitable que puissent prendre en compte les divers acteurs impliqués en ce domaine s'ils veulent pour demain un monde plus sûr et plus durable.

Remerciements

L'auteur remercie bien sincèrement tous les collègues qui lui ont fait part de leurs remarques sur les premières versions de ce texte.

Bibliographie

1. ANDERSON J.R., PARDEY P.G., ROSEBOOM J. 1994 - Sustaining growth in agriculture: a quantitative review of agricultural research investments. *Agricultural Economics* (10), pp. 107-123.
2. BENDER W., SMITH M. 1997 - Population, Food and Nutrition. *Population Bulletin* (51), 4, Feb 1997, 48 p.
3. BONNY S. 1996a - Les biotechnologies en agriculture: perspectives et enjeux. *Futuribles* (211), juillet-août, pp. 51-76.

[1] La nourriture est par ailleurs un domaine fortement chargé de symboles dans toutes les cultures. L'idée que l'"on est ce que l'on mange" est un des ressorts fondamentaux du rapport à l'alimentation, expliquant la méfiance envers certains aliments quand on ne sait pas ce que l'on consomme, ou si la nourriture vient à cristalliser certaines inquiétudes ou angoisses (Fischler 1997).

4. BONNY S. 1996b - *L'évolution technologique en agriculture: destructrice ou durable? Les nouvelles technologies sont-elles une menace pour l'environnement ou le moyen de nourrir l'humanité au 21ème siècle?* Communication au colloque international « quel environnement au 21ème siècle ? » septembre 1996 18 p. Publié in : Ingénieries eau-agriculture-teritoires. Numéro spécial 1997 « Prospective pour l'environnement », pp. 51-70.
5. BRENNER C. 1996 - *Introduire la biotechnologie dans l'agriculture. Incitations, obstacles, expériences.* Paris, OCDE, 1996, 107 p.
6. CNRS 1997 - Les plantes transgéniques. Enjeux et risques. *Bio La Lettre des Sciences de la Vie du CNRS.* (70), avril 1997, 44 p.
7. DELPEUCH F., MAIRE B. 1996 - Situation nutritionnelle dans le monde: changements et enjeux. *Cahiers Agriculture* (5), pp. 415-422.
8. DEMARLY Y., SIBI M. 1996 - *Amélioration des plantes et biotechnologies.* Paris, John Libbey Eurotext, 151 p.
9. FISCHLER C. 1997 - Le rôle du culturel dans les comportements alimentaires. In: Loos F « *Les visions du futur: l'alimentation* ». Actes du colloque. Paris MM Conseil, pp. 109-118
10. GALHARDI R. 1996 - Trade implications of biotechnology in developing countries: a quantitative assessment. *Technology in Society* (18), 1, pp. 17-40.
11. GBEWONYO F. 1997 - The case for commercial biotechnology in sub-Saharan Africa *Nature Biotechnology* (15), April 1997, pp. 325-327.
12. GRIFFON M., WEBER J., 1996 - La « Révolution doublement verte »: économie et institutions. *Cahiers Agricultures* (5), pp. 239-242.
13. ILBERT H. 1997 - Communication personnelle (cf. le site Internet http://www.rio.net/insitu-mali/).
14. Institut Pasteur 1997 - Les bactéries pathogènes d'insectes et leurs applications *Annales de l'Institut Pasteur Actualités* vol 7 n° 4, avril 1997, pp. 207-296.
15. JAMES C., KRATTIGER A.F. 1996 - Global review of the field testing and commercialization of transgenic plants, 1986 to 1995: the first decade of crop biotechnology. *ISAAA Briefs* n°1, ISAAA (International Service for the Acquisition os Agri-Biotech Applications), Ithaca, new York, 31 p.
16. JOHNSON E. 1996 - Edible plant vaccines. *Nature Biotechnology* (14), Nov. 1996 pp. 1532-1533.
17. KAHN A. (éd.) 1996 - *Les plantes transgéniques en agriculture. Dix ans d'expérience de la Commission du Génie Biomoléculaire.* Paris, John Libbey Eurotext, 165 p.
18. LEISINGER K.M. 1995 - *Sociopolitical effects of new biotechnologies in developing countries* IFPRI, Discussion Paper, 14p.
19. MONNEVEUX P., THIS D. 1997 - La génétique face aux problèmes de la tolérance des plantes cultivées à la sécheresse: espoirs et difficultés. *Sécheresse* 8 (1), mars 1997, pp. 29-37.
20. OCDE 1996. Numéro spécial: biotechnologie - *Science Technologie Industrie Revue* (19), 181 p.
21. OCL 1997. Dossier: génie génétique et oléagineux. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* (4)2, mars-avril 1997, pp. 100-134
22. OERKE E. C. 1992 - Summary of the cereal chapters from the book: *Protecting the world's harvest : food needs, crop losses and plant protection.* European Crop Protection Association, Bruxelles, 1992, 9 p.
23. PAOLETTI M., PIMENTEL D. 1996 - Genetic Engineering in Agriculture and the Environment. *BioScience* 46 (9), oct. 1996, pp. 665-673.
24. PARDEY P.G., ALSTON J. 1995 - Rewamping agicultural R&D. *2020 Brief* (IFPRI), n° 24, juin 1995.
25. SAUVAIN M. 1997 - L'accès à la biodiversité. *Biofutur* (168), juin 1997, pp. 21-24.

A17 : La sécurité alimentaire de l'homme par le végétal et les technologies du vivant

DUTUIT P.[1], DUTUIT J.-M., DEMARLY Y.

[1] Equipe d'Ecotechnologie, Université de Paris - Sud, Tour E1-2ème, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, (France).

INTRODUCTION

La sécurité alimentaire de l'homme, base incontournable de toute conception du bonheur, passe par la connaissance du végétal. Les plantes chlorophylliennes stockent l'énergie solaire sous une forme organique et utilisable par tous les êtres vivants. Tout l'édifice vivant repose donc sur le règne végétal, et c'est la plante photosynthétique qui capte l'énergie solaire pour le compte du règne animal. Et l'on ne conçoit pas un écosystème, à la surface de la terre, d'où le végétal serait absent, mis à part certains écosystèmes extrêmes (forts intéressants) où les producteurs primaires sont des bactéries chimiosynthétiques (écosystèmes de la Grotte de Movilé ou périphériques aux cheminées sulfureuses des fonds abyssaux).

Cela explique qu'il y a 40 000 ans l'homme jusque là cueilleur et chasseur, chercha à maîtriser, par l'élevage, son alimentation d'origine animale. Il se déplaça avec les troupeaux, là où la nature végétale était prolifique. Plus tard (vers -10 000 ans), il chercha la maîtrise de son alimentation céréalière par la culture. D'une façon générale, disons que l'homme a cherché, dès ces époques, à *maîtriser la biomasse* au travers de la domestication de l'animal et du végétal. Au début de cette aventure, les tribus recherchaient l'autosuffisance alimentaire. Toutefois, il est évident que très rapidement, une surproduction spatiale par la croissance des rendements ou temporelle par le stokage, a permis un certain commerce.

LA RECHERCHE DE LA PRODUCTIVITÉ PAR LA RECHERCHE DE L'HOMOGÉNÉITÉ

Aujourd'hui, maîtriser cette biomasse c'est : « Comment produire plus et mieux ? » Cela passe par l'amélioration des espèces cultivées sur les plans de la qualité et de la quantité. Au plan de la qualité, les caractères qui ont attiré les hommes sont par exemple, les caractères organoleptiques, de résistance (aux pathogènes, à la sécheresse, à la chaleur), et les caractères de valeur nutritive. Au plan de la quantité, il s'agit de la recherche de l'intensification de la production. Là encore l'amélioration des performances va être obtenue par des actions à plusieurs niveaux. Il est certain que l'amendement des sols, l'irrigation, les techniques de culture en milieux artificiels, vont apporter beaucoup. Mais c'est aussi en intervenant sur le végétal lui-même, que des progrès considérables ont été faits dans le domaine de la productivité. Ce sont, par exemple, les caractères de productivité par plante (nombre, poids moyen et total des fruits, production fourragère). L'homme y est parvenu par des opérations de sélection. On peut donner l'exemple des céréales (maïs ou blé), chez lesquelles les épis, perdant leur caducité, se sont chargés de grains eux-mêmes plus gros.

Le problème majeur était que, dans les populations de descendances, on ne retrouvait pas les qualités choisies. D'où la phase suivante de l'agriculture, basée d'une part sur l'utilisation de la possibilité qu'on a de multiplier un individu au travers de la

reproduction sexuée et d'autre part, sur le brassage des caractères qui résulte du croisement de cellules sexuelles de caractères différents. Partant de populations composées d'individus aux qualités très variées, le sélectionneur a eu pour tâche de faire ressortir, par le jeu des croisements, un nombre important d'individus, une population en fait, possédant tous les caractères recherchés.

Le bouturage, le greffage et toutes les formes de multiplication végétative ont été des solutions, mais la domestication a franchi une nouvelle étape il y a une cinquantaine d'années, avec les diverses techniques de clonage. Le clonage, quand il porte sur un individu, c'est le repérage d'un individu aux qualités remarquables et sa multiplication conforme en quantité importante. À ce stade, le pourcentage d'homogénéïté est pratiquement de 100 %, et le pourcentage résiduel pose problème. Cette technique court-circuite la reproduction sexuée qui fait, dans la majorité des cas, ressortir des caractères inattendus. Ce savoir-faire utilise les biotechnologies.

EN QUOI LA RECHERCHE D'HOMOGÉNÉITÉ PEUT-ELLE SE RETOURNER CONTRE SON OBJECTIF DE MAÎTRISE DE LA BIOMASSE ET NUIRE À LA SÉCURITÉ ALIMENTAIRE ?

Notions d'individualité et d'espèces

La possibilité du clonage grâce aux biotechnologies remet en cause la notion d'individualité puisque les champs pourraient être couverts de copies d'un seul individu (ce qui est le cas dans un champ de pommes de terre, par exemple). C'est assez récemment qu'au lieu de rechercher à cloner des individus particuliers, on s'est intéressé au clonage de caractères très pointus. Chaque caractère est alors pris isolément. L'individu n'a objectivement plus d'importance. À ce stade, c'est l'espèce elle-même que l'on cherche à court-circuiter. Le déterminisme génétique d'un caractère intéressant, repéré chez une espèce, va être extrait de celle-ci par les techniques dites de biologie moléculaire. Par les mêmes techniques il va être multiplié et introduit dans les individus d'une autre espèce ne possédant pas ce caractère et pouvant appartenir à un autre règne. Cette autre espèce est alors dite « porteuse » et est choisie pour la valorisation du caractère qu'elle permet. Ceci conduit à une interrogation fondamentale. Le fait d'être capable de déplacer, par le génie génétique, des gènes d'une espèce vers une autre et donc de s'affranchir des barrières entre espèces, tend à créer une sorte de banque de gènes, voire même un continuum d'ADN unique dans la biosphère. À certains égards la notion d'espèce s'estompe alors. Il n'y aurait plus de barrières spécifiques. Cette vue théorique, ou cette fiction, rappelle une chose que l'histoire des sciences a maintes fois démontré : une découverte scientifique n'est ni bonne ni mauvaise en soi, elle n'a que les qualités que l'homme lui confère dans son action de transformation de la biosphère. Dans ce cas précis, si l'on n'en reste qu'à la première appréciation, il est clair que l'homme conduirait, par sa technologie, à l'émergence d'un super-génôme, éventuellement enjolivé de quelques séquences artificielles et, allons jusqu'au bout, d'une espèce unique ! À cette vue négative du processus on peut opposer un contre argument (optimiste) qui est de dire que si ces techniques de découpage et de collage, en l'absence de processus de régulation, font tendre vers l'homogénéité, elles peuvent, si elle sont utilisées de façon pertinente, permettre au contraire, d'accroître ou de maintenir une certaine hétérogénéité. En tout état de cause, il n'est certes pas souhaitable de nier le danger d'une dérive, même faible. Plus généralement encore, ces tendances technologiques montrent que l'homme sera conduit, c'est probable, à prendre de plus en plus souvent la direction du processus évolutif sur terre.

Effets sur l'environnement

Sans évoquer le problème fondamental au niveau des mécanismes adaptatifs que peut représenter la perte de biodiversité, l'homogénéité recherchée aujourd'hui chez les plantes cultivées a des conséquences très immédiates sur l'environnement et donc, en retour, sur le vivant. Avec les variétés nouvelles (animales comme végétales) les environnements permettant les gains de productivité doivent répondre à des normes toujours plus précises. Le paysage végétal subi une structuration avec perte d'entropie, et une fragilité accrue des systèmes agraires, la diversité étant au contraire le garant d'une bonne adaptabilité. L'homme, au fil des millénaires, est donc intervenu toujours plus sur l'environnement, pour préparer les sols. À la limite, il a fabriqué des environnements artificiels tels que les serres. Il est d'ailleurs curieux, que le concept de « hors-sol » s'applique aussi bien à la culture qu'à l'élevage. Surprenant aussi, est le fait qu'une des nuisances majeures de ces cultures ou élevages modernes soit la pollution par les nitrates. Cette pollution est générée en début de la chaîne de fabrication de la biomasse par les excès d'engrais, et en fin de chaîne par les déchets (comme les lisiers) résultant de l'élevage intensif en batterie. On connaît aussi les autres sources de dérégulation de l'environnement que sont les pesticides et les désherbants.

Aspects planétaires et plurifactoriels de la sécurité alimentaire

La désertification est un autre thème qui permet de situer l'impact des biotechnologies sur la sécurité alimentaire. Prenons l'exemple bien connu du bayoud qui est une maladie du palmier dattier et qui se caractérise par un dessèchement, provoqué par un champignon qui progresse dans le système vasculaire de l'arbre, et qui conduit l'individu atteint à la mort. La disparition des palmiers entraîne un cortège de déséquilibres écosystémiques, économiques et humains. C'est la structure même de l'oasis qui est bouleversée puisqu'à l'ombre des palmeraies, traditionnellement, les hommes entretiennent des cultures vivrières. Un oasis en équilibre est un foyer de vie. Il existe donc dans ces régions des programmes de lutte contre la désertification qui ne peuvent faire appel qu'à des moyens d'importance tout à fait considérable, car réhabiliter un seul oasis n'a guère de sens et n'entraînera pas d'effet écosystémique durable. Peut-être qu'économiquement, en terme de profits financiers, ce type d'action est-il rentable. Mais l'histoire, déjà longue, des biotechnologies face au Bayoud, nous permet de mesurer l'impact sur la désertification des aides déjà injectées au niveau mondial sur ce seul point. C'est donc à une vision planétaire des ressources agricoles que nous sommes conduits, et, une fois encore, à l'obligation d'agir sur le processus évolutif planétaire.

Le vaste problème des zones arides et de la désertification nous donne un exemple capital de l'importance du végétal dans la vie politique des nations, au sens le plus large du terme. On constate qu'il existe une importante plurifactorialité du processus de désertification, sur un fond de surcharge par rapport aux ressources naturelles. L'appauvrissement en ressources agricoles d'un territoire entraîne un appauvrissement économique général de ce territoire, d'où par exemple des flux migratoires qui ne sont peut-être pas souhaités par les pays cibles de ces flux. D'où aussi des demandes d'aide économique. La désertification est dans beaucoup de cas réversible mais avec des moyens considérables. Pour une part, c'est certes question de vouloir, mais c'est aussi une question de pouvoir. Qui prendra en charge la réhabilitation des territoires atteints tout en laissant à chaque nation la liberté de ses choix économiques ?

La gestion des écosystèmes devra de plus en plus répondre à des exigences multiformes : scientifiques et techniques bien sûr, mais aussi juridiques, éthiques,

stratégiques peut-être, dans la mesure où les avenirs planétaire, continentaux ou nationaux, devront de plus en plus en tenir compte. Le drame du brûlage en forêt amazonienne, semblent nous le montrer.

Le rôle de l'homme

Comment l'homme peut-il intervenir ? Chaque individu (animal ou végétal) présente un complexe d'interfaces avec son écosystème qui s'organise chez l'homme autour de trois aspects conjoints, indissociables, mais de nature et fonctions complémentaires. Nous dirons que cette interface présente trois feuillets :

- **la société**, collectivité réunissant des entités biologiques individuelles consentantes ;
- **la culture**, patrimoine intellectuel de cette société ;
- **la technologie**, mise en œuvre par la société pour organiser l'espace-temps.

Une telle fragmentation en trois feuillets de l'interface entre l'homme-individu et la biosphère avec des feuillets où les fonctions sont différentes et s'amplifient l'une l'autre, permet de résoudre le paradoxe des relations de l'individu et de l'ensemble biosphérique. Quand l'interface à trois feuillets fonctionne correctement, chaque individu peut considérer qu'il est en prise avec toute la destinée planétaire. Nous restons alors en accord avec la biologie, tout en faisant pont avec l'ensemble des sciences humaines.

L'histoire des sciences intervient au niveau culturel et nous apprend, nous l'avons vu, qu'il existe très souvent deux facettes à une avancée technologique, l'une positive, l'autre négative. La prudence s'impose. Il n'y a bien sûr pas d'unité de mesure de la prudence et donc de seuil, mais au minimum, trois propositions peuvent être faites. Elles représentent une sorte de prise de conscience :

- **L'homme-espèce** est le régulateur actif de l'environnement.
- **L'homme-individu** est le niveau où la régulation d'un environnement est pensée, objet de science.
- **La société** est la forme sous laquelle l'homme peut exercer cette régulation, en enrichissant sa connaissance (feuillet culturel), et en se servant de l'outil (feuillet technologique et donc aussi biotechnologique).

Est-il possible de ne se poser aucune question sur la façon dont sont prises les décisions au niveau national ou international pour ne prendre que l'histoire européenne du colza transgénique pendant l'année 1996 ? Ces faits sont là mais aussi bien d'autres. On peut évoquer, en ce qui concerne la responsabilité des scientifiques, la difficulté qu'ils ont de résister à la pression des pourvoyeurs de fonds impliqués dans de grands enjeux économiques mais également leur impuissance, par manque de moyens, à faire comprendre au public où commencent les risques dans une opération de recherche. À chacun d'apprécier *a posteriori* les certitudes des uns qui ont conduit aux prises de décisions engageant l'équilibre biosphérique et les craintes des autres qui sont la marque, selon les premiers, de ceux qui appartiendraient au passé. C'est là, où l'homme-individu a un rôle sur l'environnement, en particulier quand il donne son opinion. Qui peut avoir des certitudes sur les choix des individus par rapport à ceux des nations et des nations du Sud par rapport à celles du Nord ? Les sociétés des pays du Sud ont, ou devraient avoir, leur propre appréciation sur les démarches des pays du Nord. Par exemple, est-on bien sûr que les programmes biotechnologiques du Nord, y compris ceux sur la sécheresse, appliqués à un problème comme celui de la désertification, vont convenir au Sud ?

CONCLUSION

Face au développement démographique de l'espèce humaine, l'accès à la sécurité alimentaire peut devenir un objectif stratégique de première importance pour ceux qui ne bénéficient pas de cette sécurité. Peut-être ce problème est-il actuellement masqué en Occident : le demi-siècle passé a fait croître de façon considérable les rendements agricoles dans ces pays déjà doués d'une longue tradition agronomique, au climat tolérant pour la plante et aux terres amendées de longue date. L'autosuffisance alimentaire de l'Europe a été atteinte au début des années 80 puis dépassée en 1986. De là ont découlé toute une série de tensions sur les marchés mondiaux.

Si on énumère les dysfonctionnements qui découlent de cette surproduction on peut se demander si la recherche d'autosuffisance a été, dans une période récente, le moteur des progrès techniques ou scientifiques dans le domaine de la production végétale.

- Pollutions diverses, problèmes économiques, injustice flagrante etc.

Quelle peut être la place des progrès biotechnologiques dans ce contexte ? Par les biotechnologies, au travers de la limitation recherchée des effets polluants des pesticides ou des engrais, n'est-on pas en train d'amorcer une course bien plus grave que celle liée à la productivité, qui serait une sorte de pollution du vivant par le vivant, plus rapidement fatale que la pollution du vivant par le chimique (nitrate par exemple) ou le physique (rayonnements par exemple). Plus rapidement fatale parce que, en autre, elle risquerait de toucher directement les structures génétiques intervenant dans les mécanismes de régulation au stress (résistance aux agressions diverses) ? Pourquoi la course à la performance de l'outil, utilisant des plantes modèles, devrait-elle être prioritaire par rapport aux efforts d'intégration des résultats des recherches analytiques ? L'effort d'intégration, de synthèse, nécessite lui-même une véritable recherche, mais sur des systèmes plus complexes, aux implications pluridisciplinaires, impliquant entre autre, les moyens, aujourd'hui puissants, de l'informatique. Il est vrai que les résultats en sont plus aléatoires, et de ce fait, d'un certain point de vue, moins gratifiants.

Il se pourrait qu'à ce niveau, l'analyse du rapport coûts/résultats, imprime une orientation nouvelle aux politiques scientifiques et que le tout moléculaire soit remplacé par une politique plus nuancée, en particulier dans ce domaine de la sécurité alimentaire. Il est clair que le concept de la « Deuxième révolution verte » est né de l'observation des dysfonctionnements d'ordre écosystémiques et de la volonté d'harmoniser le développement technologique avec les connaissances écologiques actuelles. L'objectif de sécurité alimentaire est partie intégrante de ce nouveau concept.

Ces quelques réflexions jetées sur le thème de la sécurité alimentaire, mettent au moins en évidence le potentiel stratégique recélé par le Nord d'une façon générale, potentiel probablement sous-estimé. La possibilité de former les pays les plus démunis de la planète aux méthodes de gestion de l'environnement, au sein de réseaux de recherche partagée et de transfert de technologies, c'est pouvoir agir efficacement sur l'espace et le temps planétaire. Ceci constitue probablement, pour les décennies qui viennent, un enjeu stratégique majeur.

A18 : Recherche agronomique et chercheur-agronome : quelles réponses face à l'insécurité alimentaire ?

MONNEVEUX P.
ENSA-INRA, 2 place Viala 34060 Montpellier Cedex

La recherche agronomique a, incontestablement, eu des effets spectaculaires sur la production agricole. Ceci est en particulier net dans le domaine de l'amélioration génétique des espèces cultivées. L'un des exemples les plus marquants (et les plus fréquemment cités !) est sans doute celui de l'augmentation des rendements du blé en Europe (+1 quintal par ha et par an dans certains cas) : cette augmentation du rendement s'explique en effet fondamentalement par une amélioration simultanée des variétés et des itinéraires techniques, résultats directs d'efforts importants consentis en matière de recherche.

Les progrès de la recherche agronomique ne doivent toutefois pas être uniquement envisagés dans le cadre d'une logique « maximaliste » ne prenant en compte que les records, souvent obtenus d'ailleurs dans des situations particulières. Analysés dans le contexte plus global du développement économique et social, de la lutte contre l'insécurité alimentaire et de la malnutrition, ces progrès apparaissent immédiatement plus modestes. On est bien loin, malgré les résultats obtenus, des prédictions (par trop optimistes !) formulées dans l'immédiat après-guerre par M. Boerma (Directeur général de la FAO), qui annonçait pour l'an 2000 des rendements potentiels de 26 tonnes de blé et de 43 tonnes de maïs, susceptibles de résoudre les problèmes de sous-alimentation ... D'importantes limitations de l'impact agricole des innovations en matière de recherche agronomique résident par ailleurs dans la diffusion des nouvelles techniques et matériels végétaux auprès des agriculteurs, l'efficacité de cette diffusion étant déterminée par de nombreux facteurs socio-économiques et culturels très fréquemment sous-estimés. Force est de constater que la diffusion a été effective, et le progrès technique sensible, en conditions de sol et de climat favorables, et dans des systèmes de culture intensifs : dans le cas de l'amélioration génétique des céréales par exemple, on peut constater que les nouvelles variétés issues de la recherche n'ont pas pu dans certains cas se substituer aux populations locales cultivées depuis des siècles (le blé dur « Oued Zenati » en Algérie, et l'orge « Albacete » en Espagne par exemple)...

Sur le plan scientifique, il s'agit également de relativiser les succès enregistrés par la recherche agronomique en termes de modification profonde du vivant et des lois de son fonctionnement : pour reprendre l'exemple du blé, on sait par exemple que les gains de rendement ont été essentiellement obtenus grâce à une simple modification de l'architecture de la plante et de l'allocation des ressources, consécutive à l'introduction de gènes de nanisme, et que la génétique n'a pu, jusqu'ici, augmenter significativement la photosynthèse nette, et la production de biomasse totale (Slafer et Andrade, 1989)...

BILAN SOMBRE, ILLUSIONS TENACES...

Le bilan en matière de développement, d'alimentation, et de conservation des ressources naturelles, malgré les progrès de la recherche, n'est guère satisfaisant à l'aube de ce « troisième millénaire » ...

Sur le plan alimentaire, et malgré les résultats spectaculaires enregistrés par la « révolution verte » dans quelques pays (Thaïlande, Mexique, Inde, Philippines), l'agriculture de la plupart des pays en développement n'a toujours pas « décollé » et l'on considère que près de 800 millions de personnes sont sous-alimentées à travers le monde (Tucquoi, 1995). En réalité, comme l'ont montré de nombreux travaux (Landy, 1996), les effets positifs de la révolution verte n'ont concerné que certaines régions bénéficiant de conditions favorables ; par ailleurs, même dans des états concernés par la « révolution verte », la malnutrition a gagné du terrain : entre 1973 et 1983, le nombre de personnes consommant moins de 2250 cal par jour a augmenté de 11 à 33 % dans le Punjab et de 11 à 44 % dans l'Haryana (Dayal et Gulati, 1993). On enregistre depuis quelques années une réduction, en raison certes de causes diverses (gel des terres, crise agricole) de la production mondiale de blé (564 000 000 t en 1994, 529 000 000 t en 1996, avec - 18 % en Argentine, - 12,5 % pour la Russie, - 6 % aux USA). Le niveau des stocks est au plus bas depuis 20 ans et atteint désormais le palier de sécurité (92 000 000 t) : on constate bien entendu une augmentation concomitante des prix (+ 28,6 % entre 1994 et 1995) (Sasson, 1996).

Des effets indirects sur l'alimentation des populations urbaines et rurales des pays dits « en développement » doivent être également attendus de la détérioration constante des termes de l'échange : en Afrique, l'augmentation plus rapide des importations que des exportations conduit à une augmentation du déficit de la balance commerciale, qui pourrait atteindre 500 millions de dollars en l'an 2000.

Sur le plan du développement, on peut faire le même constat d'« ambiguïté » : tout en acceptant des stratégies de développement très largement (et parfois exclusivement) basées sur une poursuite de la croissance, on est aujourd'hui pourtant plus sensible :

- aux limites de certaines ressources alimentaires : on assiste de fait à un plafonnement des tonnages péchés à 80 000 000 t, et à un épuisement des réserves halieutiquesÊ;
- aux limitations des ressources en sols : 3 300 000 000 ha, soit 22 % des terres émergées, sont disponibles pour la culture (Buringh, 1982) ; près de la moitié cependant est gravement affectée par des problèmes d'acidité et de toxicité aluminique (Sanchez, 1994), de salinité (Miller et Wali, 1994), et d'érosion : le seul phénomène de salinisation concerne 10 000 000 ha de plus chaque année (Szabolcs, 1994)Ê;
- aux limitations des ressources en eau : il est prévu qu'en 2025, 12 pays représentant 450 000 d'habitants vont épuiser leurs réserves et que 26 pays soit 345 000 d'habitants auront moins de 500 m^3/an/habitant (seuil de pénurie) (Gadelle, 1995).

Il y a tout lieu de penser que les biotechnologies et le génie génétique réaliseront dans les quelques années à venir des progrès considérables, qui se traduiront par de grandes avancées dans le domaine de l'amélioration génétique des plantes cultivées : la maîtrise de l'haplodiploïdisation (y compris sur des espèces aujourd'hui encore récalcitrantes) et son utilisation courante en sélection, la sélection *in vitro* pour l'amélioration de la résistance à des stress biotiques ou abiotiques, l'utilisation des marqueurs moléculaires pour le suivi d'introgressions ou le repérage de gènes contrôlant des caractères d'intérêt, la transformation génétique enfin sont à l'ordre du jour. Mais qui peut prédire aujourd'hui les retombées concrètes de ces nouvelles technologies en matière de production agricole, quand celles-ci dépendront essentiellement de la capacité de nos sociétés à assurer leur diffusion, leur utilisation

au bénéfice du plus grand nombre, et à en maîtriser les effets pervers ? Qui peut assurer qu'elles ne seront pas, ne serait-ce qu'en raison de leur coût, monopolisées par un petit groupe de pays ou d'entreprises? On peut appeler de ses voeux une « *autre révolution verte* », ou une « double révolution verte » (!) (rapport Conway, Griffon et Weber, 1996) mais qui peut nous assurer qu'elle saura, mieux que la première, prendre en compte les contraintes socio-économiques, les spécificités climatiques ou culturelles, qu'elle saura partir des demandes, des attentes, et des possibilités réelles des agriculteurs, qu'elle saura s'inscrire dans les habitudes alimentaires et les cultures populaires, au lieu de chercher à les modifier ? Les taux d'augmentation de la production alimentaire nécessaire au maintien de l'état de nutrition qui prévalaient dans les années 80 sont évalués à + 1,9% par an (3 % en Afrique) : ces objectifs sont-ils réalistes et compatibles avec l'équilibre écologique de la planète s'ils sont recherchés par la seule stratégie de l'intensification ? Cette intensification est elle même possible alors que, dans de nombreux pays, la suppression des subventions aux engrais a fait chuter leur consommation et stoppé la fertilisation ? Entre 1987 et 1990 au Ghana, le doublement du prix de l'engrais a eu pour conséquence la non-vente de 70 000 t qui auraient pu produire 200 000 tonnes supplémentaires d'aliments! (Courade, 1996). Une manière de dépasser cette contradiction consisterait à poser le problème non plus seulement en termes de croissance, mais également de redistribution : or, une telle alternative est aujourd'hui curieusement absente des discours et des politiques économiques. La faillite du communisme bureaucratique, qui prétendait incarner une idéologie égalitaire et redistributive, n'est sans doute pas, certes, étrangère à ce « silence ». Mais manquons-nous tant d'imagination qu'il faille pour cela accepter comme un destin, un *fatum*, le règne d'une pensée unique prônant, pour reprendre les termes de Semal (1996), la « *dictature du profitariat* »?

Quant à la capacité qu'auraient nos sociétés (y compris celles qui se disent « industrialisées », « avancées »,...) à maîtriser les effets pervers des nouvelles technologies, on peut éprouver certains doutes : la « vache folle » (dernier avatar en date) n'est pas la production d'un apprenti sorcier enfermé dans son laboratoire, elle n'est pas seulement le résultat du manque de rigueur ou de vigilance de fonctionnaires « bruxellois » : elle est surtout le résultat de pratiques, motivées par le seul profit, et autorisées par des législations ayant fait fi de la santé de l'individu.

Dans les pays industrialisés, il est de plus en plus fréquent d'entendre dire que « nos sociétés ont dépassé le stade de l'agriculture », et que le XXI^{e} siècle va nous faire entrer « dans une ère post-industrielle, ère des services et de la communication » : on peut certes déjà s'interroger sur la nature et la qualité de la « communication » dont il est question, à un moment où les sociétés dites « avancées » souffrent cruellement d'un déficit de communication humaine. Mais au-delà, un devoir élémentaire de solidarité internationale, un sentiment d'appartenance à un groupe humain devrait nous interdire de minimiser, d'effacer ainsi le rôle d'un secteur qui continue à faire vivre et à nourrir des millions d'hommes. Cette vision est elle-même valable dans le long terme pour les pays industrialisés? Crises et conflits sont trop intimement liés à notre histoire récente pour que nous puissions exclure la possibilité de leur retour et la nécessité alors de redonner priorité aux secteurs et activités économiques qui assurent en de telles périodes la vie ou la survie de la population (voir par exemple l'importance de l'approvisionnement des villes en produits agricoles de base pendant la seconde guerre mondiale, les pénuries en certains produits alimentaires lors de troubles politiques ou de grèves des transports...). Mais ne nous y trompons pas, de telles déclarations expriment bien une réalité : une infime minorité des recherches menées dans le monde aujourd'hui concerne l'amélioration qualitative et quantitative

des aliments et, comme l'a montré Semal (1996), « *l'accès à la nourriture ne figure pas parmi les droits humains fondamentaux proclamés dans les chartes et déclarations des organismes internationaux* ». Que dire par exemple des incitations (y compris financières) de La Communauté Économique Européenne à développer prioritairement les « utilisations non-alimentaires » des produits agricoles ? Que dire encore de la disproportion entre recherches concernant la qualité nutritionnelle des aliments, et celles n'intéressant que leur aspect visuel, extérieur (forme et coloration de fruits, couleur jaune des pâtes alimentaires ...) ? Que dire de la part accordée dans les financements de recherche, au développement, et celle consacrées aux efforts d'homogénéisation des produits quand la recherche-développement ne concerne que 2 % du PNB dans les pays riches, contre 6 % pour la métrologie et la standardisation (Latour, 1995) ?

QUI DÉCIDE EN MATIÈRE DE RECHERCHE AGRONOMIQUE, OU LE CHERCHEUR DÉPOSSÉDÉ

Une part importante de la définition des objectifs et des programmes de recherche échappe aujourd'hui aux organismes nationaux de recherche publique, et *a fortiori* aux chercheurs, ceci étant particulièrement flagrant dans les pays du tiers-monde ; dotés à l'époque coloniale de structures de recherche ayant pour objectifs prépondérants de répondre aux exigences économiques de la métropole, ces pays ont dû rapidement, au lendemain des « indépendances », mettre en place des instituts et concevoir des programmes. Or il faut bien admettre que la définition des structures et des modes de fonctionnement, plutôt que de partir des réalités locales (atouts et contraintes), s'est le plus souvent par trop inspiré des modèles déjà existants (ceux des ex-colonisateurs en particulier). Bureaucratie, formalisme, verticalisme administratif, lourdeurs de fonctionnement inhibant l'esprit d'autonomie et stérilisant à terme l'esprit d'initiative, font partie du lot des récriminations silencieuses de la plupart des chercheurs du tiers-monde ; la pénurie de moyens, consécutive aux politiques d'« ajustement structurel » et aux réductions des budgets publics, est venue accentuer ces dysfonctionnements. Il s'ensuit une démoralisation, et parfois une démotivation et une démobilisation de ces chercheurs. Les centres internationaux qui, à partir des années 60, ont voulu renforcer la recherche agricole et alimentaire, et pallier les insuffisances des programmes nationaux de recherche ont peut-être à leur tour, en se substituant à eux pour de nombreuses activités et responsabilités, développé de nouvelles dépendances : pour prendre un exemple très technique, la sélection par les programmes nationaux de lignées « adaptées » au sein de pépinières internationales standard revient moins cher (et est mieux valorisée par un chercheur dans son rapport d'activités!) que la réalisation de quelques croisements bien ciblés...

La définition des objectifs et des programmes de recherche échappe également de plus en plus au chercheur lui-même ; cette tendance est largement susceptible de se renforcer avec la multiplication des contrats entre recherche publique et entreprises privées, contrats comportant pour la plupart des clauses de confidentialité et d'exclusivité, sorte de confiscation « par l'argent » des résultats de la recherche, qui échappent à la fois à leur véritable producteur (le chercheur) et à la grande masse de leurs utilisateurs potentiels.

Face à ces évolutions, on aurait pu s'attendre chez les chercheurs, tant dans les pays du tiers-monde que dans les pays « développés », à l'émergence de prises de positions sur les enjeux, à un développement du débat, et à une remise en cause des politiques. Or, la recherche (et la recherche agronomique en particulier) donne parfois l'impression

d'être devenue une « Grande Muette » : les grandes décisions prises en matière de diffusion des OGM par exemple ont-elles fait l'objet de débats parmi les chercheurs « de base », ceux-ci ont-ils même été très largement consultés ?

Ces phénomènes de domination, d'appropriation, d'aliénation, qui concernent les sphères de la recherche et du développement comme elles concernent toute sphère d'activité productive, sont particulièrement nets et descriptibles dans le domaine de l'amélioration des plantes. On assiste déjà à une véritable lutte pour le contrôle des ressources génétiques, matière première de l'amélioration des plantes, et dans certains cas de l'industrie (extraction de composés pour l'industrie pharmaceutique) : le contrôle des banques de gènes des pays d'Europe de l'est, dans le contexte de leurs difficultés économiques et des perspectives de leur privatisation, constitue par exemple un enjeu considérable. Le secteur « secondaire » de la filière, qui regroupe les activités de transformation (sélection conventionnelle et biotechnologies), fait quant à lui l'objet d'une concentration économique extrême et vers 2010, les biotechnologies utilisant le génie génétique devraient représenter un marché de 110 à 120 milliards de $ (Kahn, 1996) ; l'exclusivité pour l'exploitation commerciale de tous les produits dérivés du gène dont une partie (une « étiquette ») aura été brevetée consacrera le contrôle que les grandes entreprises de ce secteur exerceront sur la biodiversité, transformée en simple marchandise...

LA DIFFICILE « CULTURE SCIENTIFIQUE » OU LA RESPONSABILITÉ DU CHERCHEUR

Dans de nombreux cas, comme nous venons de le voir, le chercheur ne dispose pas du pouvoir, ou même de la marge d'autonomie qui lui permettrait de peser sur une décision, ou d'intervenir dans l'utilisation des résultats de sa recherche. Pourtant, parfois cette possibilité existe et s'offre à lui : encore faut-il que celui-ci se sente interpelé, qu'il se reconnaisse suffisamment comme « citoyen du monde » et qu'il possède une vision suffisamment large de la problématique concernée pour saisir cette opportunité. Or, il semble que l'on assiste globalement aujourd'hui à une réserve marquée des scientifiques vis-à-vis du fait politique, à un désintéressement croissant de tout ce qui s'agite hors les murs du laboratoire ou de l'institution, à un retrait dans les salons feutrés de la tour d'ivoire : présence timide des chercheurs (hormis bien sûr ceux intronisés porte-parole officiels par les médias) sur les questions qui concernent les utilisations du génie génétique (clonage, OGM,...), refus de s'impliquer dans les débats autour du racisme (ne serait-ce qu'en rappelant l'absence de toute base scientifique à l' « inégalité des races »!) n'en sont que quelques exemples ponctuels... « *Les scientifiques ne sont pas innocents*, écrivait récemment Spire, *et certains d'entre eux ont une part de responsabilité dans l'utilisation de leurs recherches, soit par imprévoyance, soit par un refus d'analyse des conséquences éventuelles de leurs travaux* ». Cette attitude est peut-être en partie due à une spécialisation croissante des chercheurs et à une restriction croissante du champ de leurs compétences, qui les conduit à une inaptitude intellectuelle, culturelle, à voir les problèmes, à saisir les enjeux, et à se déterminer eux-mêmes vis-à-vis de questions, qui –même si elles sont fondamentales pour la communauté humaine– sont du domaine devenu immense de leur « hors-champ ». Mais il y va semble-t-il également d'une attitude éthique et philosophique : maint chercheur justifie son « désengagement », sa « neutralité » par une volonté de mieux répondre aux critères d'efficacité et de compétitivité effrénée qui lui sont imposés (en période de crise, il s'agit selon cette logique, de ne pas avoir d'« états d'âme », pour « rester dans la course », une course qui, on le sait laissera

beaucoup de monde sur le chemin...) ; cette attitude philosophique est aujourd'hui dominante, avec la triple hégémonie (Feyerabend, 1979) :

- d'un « réductionnisme scientifique », basé sur une organisation de la science selon des règles fixes et universelles ;
- d'un prétendu « objectivisme de la science » (or, est il totalement exclu –pour reprendre un exemple très prosaïque de Chalmers, 1982– qu'un important changement dans les perspectives de sa carrière puisse parfois avoir un effet plus décisif sur des orientations de recherche qu'un argument rationnel ?) ;
- d'une prétendue « sagesse scientifique fondamentale », selon laquelle la science serait supérieure à toute autre forme de connaissance.

Cette attitude va de pair avec une réduction (inhibition ?) de l'imaginaire et de la créativité : paradoxe, alors que tout mouvement scientifique, toute avancée des recherches ne peut être que transgression des dogmes et remise en cause des paradigmes. Perte de créativité, développement des recherches descriptives au détriment des recherches explicatives, perte de la notion de risque, primauté de l'outil-en-soi (dont l'exercice donne toujours des résultats publiables) sur son application à la résolution de questions concrètes, préférence du facile nouveau à l'original difficile, attrait de la conclusion rapide (quand, comme l'écrivait déjà Flaubert, « *la rage de vouloir conclure est une des manies les plus funestes* »)... En contrepartie, et pour compenser en quelque sorte, on investit dans la recherche de « *plus-value informationnelle* » (Latour, 1996) - car il s'agit d'être au courant de ce qui se fait de plus nouveau -, on attache une importance démesurée, illusoire, quasi-infantile, au nombre et à l'ordre des auteurs d'une publication, à la place de la revue dans laquelle on a publié... Attitude de thésaurisation plus que de création : on est là bien loin du « *perdre, mais vraiment perdre, pour laisser place à la trouvaille* » d'Apollinaire...

Les sentiments, l'émotionnel eux-mêmes sont devenus, dans nos sociétés modernes, et comme effet direct de la trinité productivité-efficacité-compétitivité, choses « tabou ». Ceci se traduit en particulier dans le domaine de la recherche, par une sous-estimation parfois dramatique des facteurs subjectifs (affinités entre personnes, affinité des personnes vis-à-vis de diverses activités, dynamique de groupe,...). Le chercheur est un être rationnel, qui ne se laisse pas distraire par ses sentiments, ses impressions, sa sensibilité ; du moins cherche-t-il souvent à donner cette image de lui-même : prétendu objectivisme de la science dont il était question plus haut. Raison sans intuition, science sans conscience. « *Si l'acte de penser*, écrivait Lesgards (*in* Spire, 1995), *consiste à conjuguer l'usage de la raison, l'exercice de la sensibilité, et l'activité de l'imaginaire, alors c'est bien la capacité même de création de nos sociétés qui se trouve mise en cause* »...

Mais si, après tout, le petit monde de la recherche scientifique n'était qu'un microcosme fait à l'image de la société qui l'entoure, et fonctionnant sur le mode du « capitalisme scientifique » (Latour, 1995), avec ses différentes formes de « crédit » (le crédit scientifique, la crédibilité, les crédits...) et de pouvoir (hiérarchie, mandarinat, exploitation des cerveaux doctoraux ou post-doctoraux)?

Dans un ouvrage récent, Axel Kahn (1996) rappelait les deux principes de l'éthique kantienne censés guider la science tel un phare dans la tempête :

« *La personne humaine ne doit jamais être considérée seulement comme un moyen, et doit toujours être considérée comme une fin* » et « *une conception, une action, une analyse, ne peuvent être considérée conformes à la morale que si les principes qui l'inspirent et les conséquences qui en découlent peuvent être appliqués sans contradiction à l'univers entier* »

Il en tirait des enseignements sur la « quadruple responsabilité » du chercheur : responsabilité de la qualité de son travail, devoir de vigilance sur les conséquences des travaux, devoir de responsabilité vis-à-vis de l'utilisation des travaux, et enfin « responsabilité citoyenne » : mais celle-ci peut-elle aujourd'hui, compte tenu des enjeux, des menaces et des espoirs, rester défensive ou doit-elle au contraire impliquer un engagement plus politique et plus actif du chercheur dans ce monde qui l'entoure et conditionne son activité et sa production scientifique propres ?

Bibliographie

1. BURINGH P. 1982. Potential of world soils for agricultural production. In: Managing soil ressources. 12th International Congress of Soil Science, New Delhi, Inde, 33-41
2. CHALMERS A.F. 1987. Qu'est-ce que la science? Popper, Kuhn, Lakatos, Feyerabend. Livre de Poche, Biblio essais ed., Paris, 286 p.
3. COURADE G.1996. Entre libéralisation et ajustement structurel : la sécurité alimentaire dans un éteau. Cahiers Agriculture, 5, 221-227.
4. DALAY E., Gulati C. 1993. Regional changes in food poverty in India. Geojournal, 30, 117-125.
5. FEYERABEND P.K. 1979. Contre la méthode, Esquisse d'une théorie anarchiste de la connaissance. Seuil ed., Paris.
6. GADELLE F. 1995. Le monde manquera-t-il bientôt d'eau? Sécheresse, 6, 9-14.
7. GRIFFON M., WEBER J. 1996. La « Révolution doublement verte » : économie et institutions.Cahiers Agricultures, 5, 239-242.
8. KAHN A. 1996. Société et révolution biologique. Pour une éthique de la responsabilité. INRA ed., « Sciences en question », 94 p.
9. LANDY F. 1996. Inde. Réforme agraire et révolution verte : l'impossible synthèse indienne. Cahiers Agricultures, 5, 271-281.
10. LATOUR B. 1995. Le métier de chercheur. Regard d'un anthropologue. INRA ed. « Sciences en question », 95 p.
11. MILLER F.P., WALI M.K. 1994. Land use issues and sustainability of agriculture. 15th World Congress of Soil Science, Acapulco, Mexico, 1-16.
12. SANCHEZ P. 1994. A tropical soil fertility research : toward the second paradigm. 15th World Congress of Soil Science, Acapulco, Mexico, 65-88.
13. SASSON A. 1996. Sécurité alimentaire mondiale : les défis. Cahiers Agricultures, 5, 215-219.
14. SEMAL J. 1996. L'agro-révolution arc-en-ciel. Cahiers Agricultures, 5, 213-214.
15. SLAFER G.A., Andrade F.H. 1989. Genetic improvement in bread wheat (Triticum aestivum L.) yield. Field Crops Research, 21, 289-296.
16. SPIRE D. 1995. Difficile partage de la connaissance. Cahiers Agricultures, 4, 326-327.
17. SZABOLCS I. 1994. Prospects of soil salinity for the 21st century. 15th World Congress of Soil Science, Acapulco, Mexico, 123-141.
18. TUCQUOI J.P.1995. Huit cents millions d'affamés. Le Monde, 17oct. 1995, 1et 15.

SECTION A

Textes et résumés des Affiches

de A19 à A38

A19 : Caractéristiques de production des vitroplants de palmier à huile plantés en Côte d'Ivoire en conditions agro-industrielles

KONAN E.K.[1], DURAND-GASSELIN T.[2], COCHARD B.[2], RIVAL A.[3], KOUAME B.[1]
[1] IDEFOR-DPO, Station de la Mé, 13 BP 989, Abidjan 13, CÔTE-D'IVOIRE
[2] CIRAD-CP, IDEFOR-DPO, Station de la Mé, 13 BP 989, Abidjan 13, CÔTE-D'IVOIRE
[3] ICIRAD-CP/ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier cedex 1, FRANCE

INTRODUCTION

Les essais clonaux plantés en Côte d'Ivoire par l'IDEFOR ont permis d'estimer la fidélité génétique et les performances au champ du matériel végétal issu d'embryogenèse somatique [1]. Ainsi, les palmiers issus de cette technique ont montré une conformité phénotypique d'environ 95 % [2, 3] et les gains de production en huile ont atteint 20 à 25 % pour les meilleurs clones, par rapport au croisement témoin de référence LM2T x DA10D [4, 5].

Ces résultats significatifs et prometteurs ont été obtenus à partir d'essais plantés le plus souvent en dispositif statistique mettant en jeu des parcelles élémentaires de petite taille. Or, pour le palmier à huile, plante pérenne naturellement allogame, le comportement au champ sur des surfaces nettement plus importantes doit être connu avant toute diffusion commerciale.

Ainsi, des parcelles semi-industrielles de 5 hectares par clone ont été plantées à Palmindustrie (Société de développement du Palmier à huile) en Côte d'Ivoire, dans le but d'observer divers paramètres tels que : la conformité du matériel planté, les caractéristiques de production, la précocité et la synchronisation de la floraison et la fertilité, les phénomènes de compétition, la nutrition minérale et enfin la sensibilité aux maladies.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel Végétal

Les clones utilisés pour cette étude sont issus de palmiers à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) d'origine *tenera* sélectionnés pour leurs performances agronomiques parmi les meilleurs croisements Deli x Afrique du 1er cycle de sélection récurrente réciproque (SRR).

Dispositif expérimental

En Station de Recherche (La Mé), les essais clonaux sont plantés en dispositifs statistiques avec 6 répétitions de 4 à 16 arbres par parcelle élémentaire (soit 24 à 96 arbres par clone). En conditions semi-industrielles, les clones sont plantés en bloc de lignes (soit 5 ha par clone environ, ou 715 palmiers). Le tableau 1 présente les clones utilisés et les surfaces moyennes consacrées à ces essais à Palmindustrie.

Tableau 1 : Clones et surfaces moyennes occupées en plantation semi-industrielle à Palmindustrie (Côte d'Ivoire).

	ETHANIA					BLIDOUBA				
Année de plantation	Nbre de clones	clones plantés (LMC)	surface totale (ha)	surface par clone	surface L2Tx D10D	Nbre de clones	clones plantés (LMC)	surface totale (ha)	surface par clone	surface L2Tx D10D
1987	4	9, 51, 74, 88	24,9	4,5	6,5	4	9, 51 79, 88	21.6	5.4	5 2
1988	4	22, 26, 43, 52	21,6	5,4	3,8	4	9, 22, 43, 63	22.8	5.7	5.7
1989	4	44, 63, 73, 79	20,8	5,2	5,5	3	26, 44, 56	15.0	5,0	9 3
1991	10	26, 44, 51, 54, 56, 61, 65, 74, 95, 108	42,0	4.2	5,2	7	10, 107, 159, 161, 165, 167, 169	35.0	5.0	8.6
1992	8	107, 129, 152, 159, 161, 165, 167, 169	40,0	5,0	9,1	9	26, 44, 80, 96, 106, 152, 165, 173, 174	46.8	5.2	10.1
1993	12	44, 56, 61, 77, 79, 80, 129, 152, 166, 167, 170, 190	55,6	4,6	9,1	9	107, 144, 148, 165, 174, 184, 187, 190	46.8	5.2	10.1
TOTAL	31		204,9		45,1	29		188		48.9

	IBOKE					Total Palmindustrie		
Année de plantation	Nbre de clones	clones plantés (LMC)	surface totale (ha)	surface par clone	surface L2Tx D10D	Nbre de clones	surface totale (ha)	surface L2Tx D10D
1987	4	9, 51, 74, 88	20,0	5,0	7,4	5	66,5	19,1
1988	4	22, 43, 63, 79	15,2	3,8	4,8	7	59.6	14,3
1989	3	26, 44, 52	14,7	4,9	1,7	7	50,5	16,5
1991	-	-	-	-	-	17	77,0	13,7
1992	-	-	-	-	-	16	86,8	19,2
1993	-	-	-	-	-	20	102,4	19,2
TOTAL	11		49,9	-	13,9	40	442.8	102

Données de production

La production de régimes est enregistrée dès la mise en récole des palmiers, soit trois ans après la plantation. En Station de Recherche, les données sont collectées arbre par arbre et sont exprimées par arbre producteur. En plantation industrielle, la production est regroupée par ligne, puis par clone. Les données ainsi recueillies sont rapportées à l'hectare (135 individus/ha) et peuvent être regroupées sur plusieurs campagnes. La présente étude concerne les données de production au jeune âge (3 à 5 ans après la plantation). Le taux d'extraction industriel (Hpi) est calculé comme suit : Hpi = (% fruits/régime) x (% pulpe/fruit) x (% huile/pulpe) x 0,855. Le rendement en huile/hectare s'exprime par : Hpi x poids de régime/ha (PT).

RÉSULTATS

Conformité du matériel clonal

Les observations en pépinière permettent d'éliminer efficacement les individus présentant des anomalies végétatives. Cependant, l'anomalie florale "mantled" [2] est observée chez des clones plantés en conditions semi-industrielles, bien que ces clones aient fait l'objet de tests de

comportement préalables en Station de Recherche (tableau 2). Dans ces conditions, l'anomalie florale affecte gravement 3 % des plants.

Tableau 2 : Bilan d'observation de l'anomalie "mantled" sur les clones plantés à la Mé et à Palmindustrie.

	Nbre de clones	Palmiers fleuris	Palmiers normaux	Palmiers anormaux légers	Palmier anormaux graves
Station de la Mé	127	29 415	26 571 (90 %)	1 092 (4 %)	1 752 (6%)
Palmindustrie	40	42 385	40 521 (96 %)	731 (2 %)	1 133 (3 %)

Données de production

La valeur des clones en plantations semi-industrielles n'est pas différente de celle enregistrée en Station de Recherche (Tableau 3). Les meilleurs clones présentent au jeune âge un progrès moyen de 15 % pour la production de régimes et de 14 % pour le Hpi, en référence au croisement témoin. Les progrès en termes de production d'huile atteignent alors 32 %.

Tableau 3 : Production de régimes et d'huile au jeune âge de 12 clones plantés à la Mé et à Palmindustrie en % du croisement témoin LM2T x DA10D.

	Matériel clonal		Croisement témoin		**Pourcentage du croisement témoin**	
	La Mé	Palmindustrie	La Mé	Palmindustrie	**La Mé**	**Palmindustrie**
Poids de régimes*	10,67 ± 1,17	12,16 ± 1,77	9,84 ± 1,02	11,22 ± 0,15	**108 %**	**108 %**
Taux d'extraction**	21,58 ± 1,68	23,23 ± 1,53	19,98 ± 0,62	20,52 ± 0,61	**114 %**	**112 %**
Huile*	2,30 ± 0,31	2,82 ± 0,41	1,86 ± 0,15	2,32 ± 0,02	**123 %**	**121 %**

* Rendement (T ha^{-1} an^{-1} , ** Hpi (%)

Le potentiel de production de ces clones à l'âge adulte n'est pas encore connu, mais il importe de remarquer que les progrès réalisés sur le taux d'extraction resteront acquis, car ce caractère évolue peu après 5 ans de plantation (Tableau 4).

Tableau 4 : Caractéristiques de production des meilleurs clones sélectionnés en % du croisement témoin.

	Jeune âge (3-5ans)			Âge adulte (6-9 ans)		
Clones sélecionnés dans les 2 localités*	Rdt régimes	HPi	Rdt huile	Rdt régimes	Hpi	Rdt huile
Palmindustrie	**122 %**	**113 %**	**138 %**	n.d	n.d	n.d
La Mé	**116 %**	**114 %**	**132 %**	n.d	n.d	n.d
Potentiel des meilleurs clones à la Mé	Sélection (6 clones sur 28)**			Sélection (4 clones sur 28)***		
sur l'ensemble des essais	**121 %**	**112 %**	**136 %**	**114 %**	**112 %**	**128 %**

* clones LMC 22, 63, 74, 8 , ** Clones BC 68, 156, LMC 54, 63, 74, 88 ,*** Clones BC 68, 156, LMC 44, 79

Données économiques

Selon que le progrès obtenu est lié à une augmentation du poids de régime (PT) ou du taux d'extraction (Hpi), le gain financier est différent. Pour la Côte d'Ivoire, en utilisant les coûts de production des plantations industrielles, on a pu calculer le taux de rentabilité interne (TRI) de l'investissement supplémentaire dû à la plantation de clones plutôt que de semences améliorées (Tableau 5).

Tableau 5 : Taux de rentabilité interne (TRI) de l'investissement supplémentaire consenti pour un hectare de vitroplants par rapport aux semences.

	Gain en taux d'extraction (Hpi)								
Gain en poids de régimes	+ 0 %	+ 2,5 %	+ 5,0 %	+ 7,5 %	+ 10,0 %	+ 12,5 %	+ 15,0 %	+ 17.5 %	+ 20.0 %
+ 0 %	-	-	7,11	11,43	14,89	18,22	20,76	23,36	25,42
+ 2,5 %	-	2,66	8,21	12,80	16,04	19,20	21,97	24,15	26,43
+ 5,0 %	-	4,15	9,85	14,07	17,52	20,14	22,80	25,20	27,13
+ 7,5 %	-	6,26	11,34	15,26	18,54	21,38	23,61	25,94	28,08
+ 10,0 %	-	8,10	12,71	15,97	19,50	22,24	24,69	26,93	29,23
+ 12,5 %	3,09	9,14	13,51	17,46	20,08	23,06	25,44	27.88	29.87
+ 15,0 %	4,53	10,69	14,74	18,47	21,32	23,86	26,45	28,45	30,72
+ 17,5 %	5,83	11,58	15,89	19,08	22,18	24,93	27,15	29,44	31.55
+ 20 %	7,32	12,64	16,33	19,81	22,83	25,51	27,94	30,17	32,01

CONCLUSION

Les essais réalisés en conditions de plantation industrielle ont montré qu'il est possible de réduire l'impact de la variation somaclonale "*mantled*" en ne sélectionnant que les clones préalablement observés en Station de Recherche. Le pourcentage d'individus gravement atteints passe alors de 6 % en Station de Recherche à 3 % en plantation industrielle.

L'exploitation industrielle des palmiers clonaux sur les surfaces relativement importantes n'a pas rencontré de problème particulier.

Au jeune âge, les gains de productivité assurés par les clones, si on les compare au croisement témoin, sont comparables dans les deux types d'essais étudiés. Ces résultats prometteurs devront être confirmés par l'étude du comportement de ces clones à l'âge adulte.

Bibliographie

1. PANNETIER C., ARTHUIS P., et LIEVOUX D. (1981) Néoformation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro*. Oléagineux 36, p 119-122.
2. KONAN E.K. et al. (1995) Variations somaclonales observées en Côte d'Ivoire chez les plants de palmier à huiles obtenus par embryogenèse somatique. Proc Journées Scientifiques AUPEL-UREF, 14-15 DÉC., DAKAR.
3. DURAND-GASSELIN T., LE GUEN V., KONAN K. et DUVAL Y. (1990) Plantation en Côte d'Ivoire de palmiers à huile (*Elaeis guineensis* Jacq) obtenus par culture *in vitro* : Premiers résultats. Oléagineux 45, p 1-11.
4. LE GUEN V., SAMARITAAN G., ZARIN OTHMAN A., CHIN C.W., KONAN K. et DURAND-GASSELIN T. (1991). Production d'huile au jeune âge de clones de palmier à huile. Oléagineux, 46, 10 : 347-359.
5. DURAND-GASSELIN T. et al (1995). Performance of oil palm clones. Proc. ISOPB Conf. 5-6 June 1995, Baranquilla, Colombie.

A20 : Quelques aspects de la culture du bananier *in vitro* au Vietnam

LE THI A.H., DAO THANH B., NGUYEN HANG P., LE KIM H., NGUEN THUY A.
Institut de génétique agronomique (I.G.A.), Laboratoire de pathologie végétale (Laboratoire Associé Francophone 312), CO NHUE-TU LIEM, Hanoï, Vietnam.

PRÉAMBULE

Inclus dans la zone intertropicale, le climat du Vietnam est propice à la culture du bananier. Celle-ci s'est développée empiriquement, depuis de nombreuses années. La banane constitue une marchandise habituelle des marchés locaux, tant dans les campagnes que dans les zones urbaines.

L'exportation n'est pas encore pratiquée.

En 1993, la situation de la culture de la banane, au Vietnam était la suivante :

- Surface cultivée : 83 000 ha.
- Production annuelle : 1,2 millions de tonnes, dont 3000 seulement pour l'exportation.

Le gouvernement vietnamien s'attache donc à développer le potentiel de production de ce produit, en favorisant la recherche d'un matériel végétal de qualité, plus productif et sanitairement correct, tant pour le marché national qu'international.

La culture *in vitro* est un des moyens étudiés par les laboratoires du pays, pour atteindre cet objectif.

CULTURE *IN VITRO* DU BANANIER

Le présent article analyse quelques aspects expérimentaux de la culture *in vitro* de quatre phénotypes de bananier « vietnamien » dans les conditions de notre laboratoire d'essais à Hanoï.

1. La sélection du matériel végétal.
2. Le développement des bourgeons (stade de prolifération).
3. L'enracinement des jeunes pousses (régénération).

Sélection du matériel végétal de base

Quatre variétés locales, introduites ou naturalisées, de longue date, au Vietnam, ont été utilisées pour cette étude :

- Bananier dessert (sweet) « VINHPHU » de type cavendish, cultivé pour le fruit.
- Bananier sauvage (wild) « CHOOI HOT » de type plantain, cultivé comme légume.
- Bananier ornemental « CHOOI CANH » cultivé pour la fleur.
- Bananier nain «(dwarf) « CHOOI LUN » cultivé comme plante ornementale.

Les méristèmes apicaux (1cm de diamètre) ont été prélevés sur de jeunes plants sélectionnés, de hauteur inférieure à 80 cm et placés, après désinfection, sur un milieu de culture Murashige et skoog (MS), solidifié et additionné de différents régulateurs de croissance 6-benzylaminopurine (BAP), vitamines, acide indol-3 acétique (AIA), acide α-naphtaline acétique (αANA), lait de coco).

Le pH final du milieu est de 5,8.

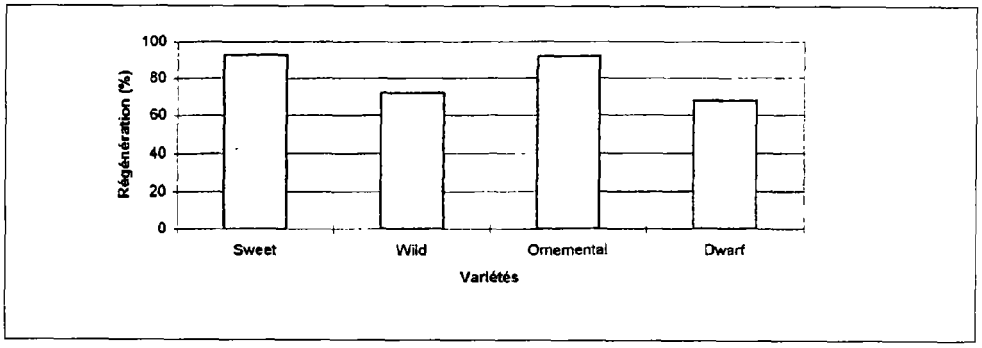
Les conditions de culture sont fixées comme suit :

- Lumière fluorescente (2400 lux) durant 10 heures/jour.
- Température de 20 à 22 °C.

Nous avons étudié le taux de plants obtenus par variété et l'influence de la hauteur (en relation avec l'âge) de la plante mère.

• *Comparaison des pourcentages de régénération pour les variétés testées.*

Figure 1 : Comparaison des pourcentages de régénération pour les variétés testées.



Les variations du taux de régénération, dans des conditions de culture identiques, mettent en évidence la variabilité du potentiel de régénération de chaque variété, déjà détectée par de nombreux auteurs.

• *Effets de la hauteur et de l'âge sur le pourcentage de régénération*

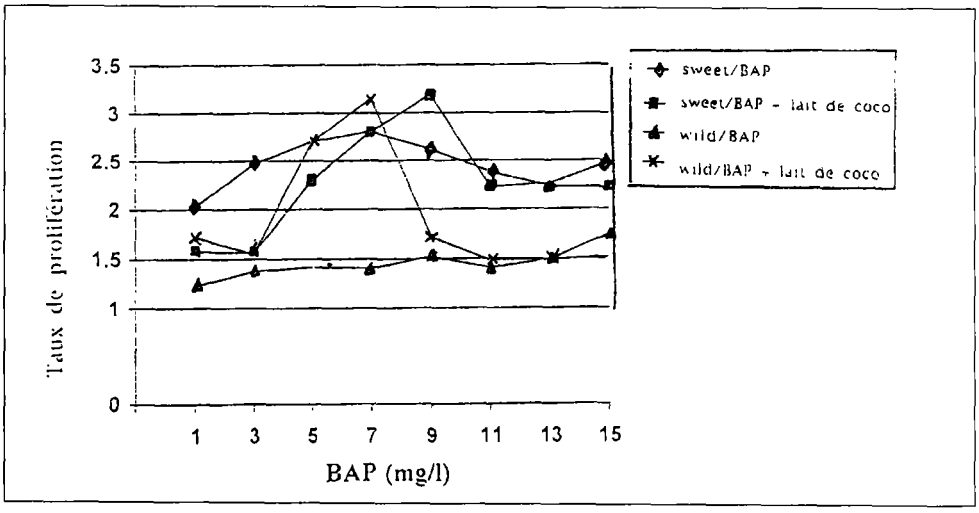
Nous n'avons pas constaté de différences significatives entre les pourcentages de régénération obtenus de jeunes plantes mère de tailles et d'âges différents.

Effets de quelques facteurs et régulateurs de croissance sur le développement des cals et la formation des bourgeons

• *Effets du BAP et du lait de coco*

- Matériel : bananiers « sweet » et « wild ».
- Milieu : MS + 2 mg/l de thiamine + 2 mg/l d'acide ascorbique (vit. C) +
  a) des concentrations de BAP de 1 à 15 mg/l sans jus de coco ;
  b) des concentrations de BAP de 1 à 15 mg/l + 10 % de jus de coco.
- Protocole : comptage des bourgeons (0,5 cm) après 4 semaines.

Figure 2 : Effet du BAP et du lait de coco sur le taux de prolifération.



Les deux variétés étudiées réagissent différemment.

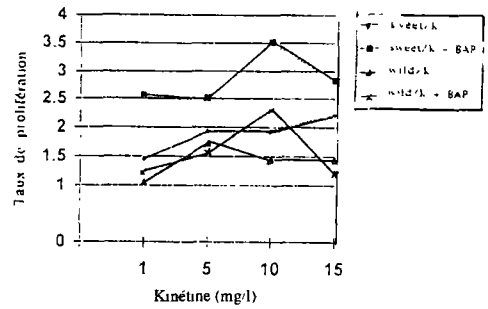
La variété « sweet » réagit positivement au BAP (optimum 9 mg/l) mais pas au lait de coco. La variété « wild » affiche un comportement inverse avec un optimum de 7 mg/l pour la concentration en lait de coco.

Dans nos conditions expérimentales, nous trouvons au moins un cas de réaction positive à l'addition de lait de coco (wild) contrairement à quelques auteurs, tels que BERG et BUSTAMANTE (1974), DORE SWANY et al. (1983), KRIKONIAN et CRONAUER (1984).

• *Effet de la kinétine sur la formation des bourgeons*

- Matériel : variétés « sweet » et « wild ».
- Milieu MS + 2 mg/l de thiamine + 2,5 mg/l d'acide ascorbique + des concentrations de 1 à 1,5 mg/l de kinétine, seule ou avec 5 mg/l de BAP.
- Protocole : comptage des bourgeons après 4 semaines.

Figure 3 : effets du BAP + kinétine sur le taux de prolifération.



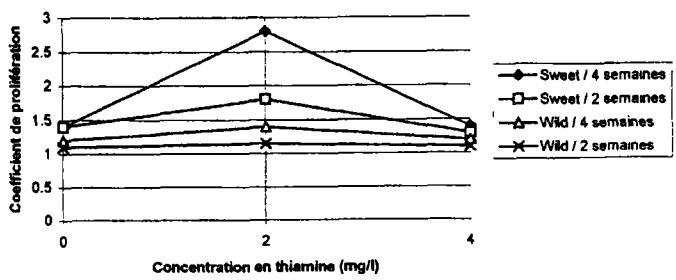
En présence de 5 mg/l de BAP, l'ajout de kinétine (optimum 10 mg/l), augmente la prolifération des bourgeons. Seule (sans BAP), son effet est peu marqué.

Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par ZAMORA et al. (1986), qui montre aussi l'effet favorable de la kinétine sur la synthèse chlorophyllienne du bananier.

• *Influence de la thiamine (vitamine B1) sur la prolifération*

- Matériel : « sweet » et « wild ».
- Milieu MS + 7 mg/l de BAP + des concentrations en thiamine de 0 à 4 mg/l.

Figure 4 : effet de la thiamine sur la prolifération.



Les deux variétés testées réagissent différemment.

La variété « sweet » réagit positivement (optimum 2 mg/l) tandis que sur la variété « wild », aucun résultat significatif n'est enregistré.

N.B. : Une expérimentation similaire avec la riboflavine (vitamine B2) n'a donné aucun résultat significatif.

• *Influence de la durée de culture sur la prolifération*

Les bourgeons des variétés « sweet » et « wild » cultivées sur le milieu MS + 9 mg/l de BAP + 10 mg/l de kinétine d'une part, sur le milieu MS + 9 mg/l d'autre part, ont été comptés après 2, 4, 6 et 8 semaines.

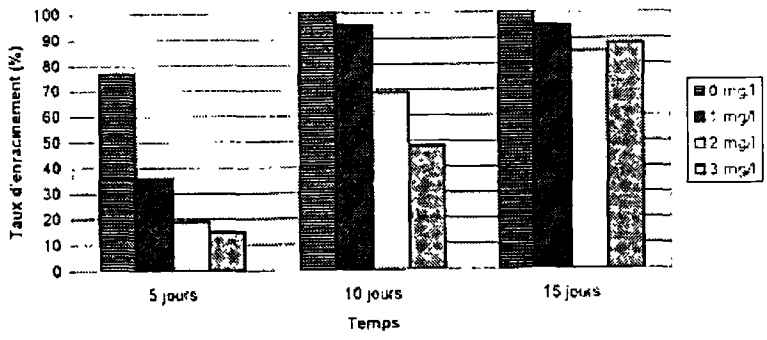
La durée optimale de culture se situe vers la quatrième ou cinquième semaine.

Effet de quelques auxines sur le taux de régénération (enracinement).

Les pousse issues du stade de prolifération des bananiers « sweet » et « wild » sont placées sur un milieu MS + 9 mg/l de BAP, additionné de diverses concentrations d'auxines d'enracinement (αANA et AIA) utilisées seules ou combinées.

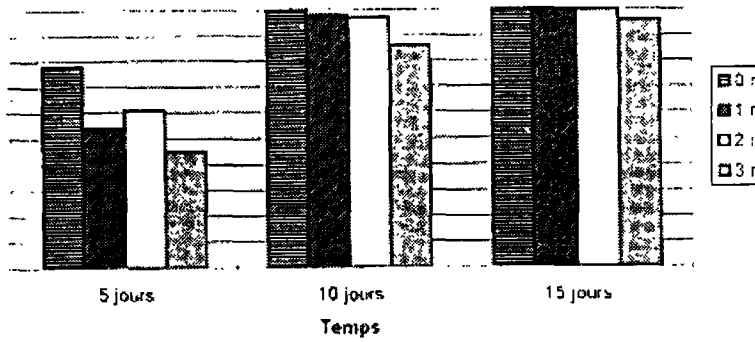
• *Effets de l'αANA (naphtalène acetic acid) pour des concentrations de 0 à 3 mg/l*

Figure 5 : Effet de l'αANA sur le taux d'enracinement (Sweet).



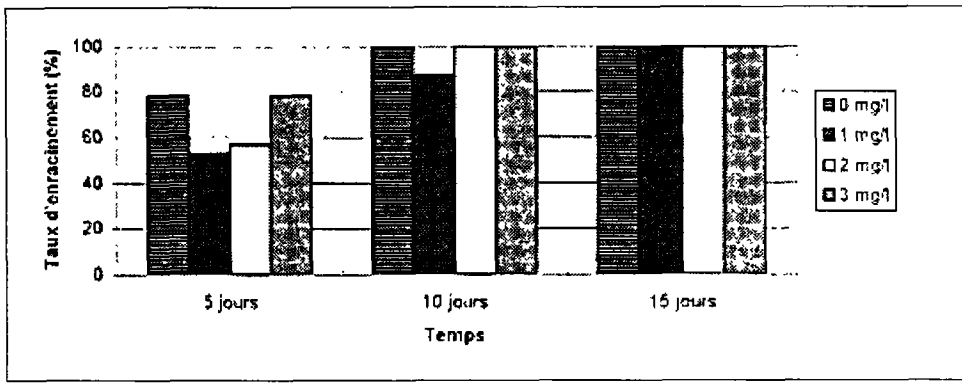
• *Effets de l'AIA pour des concentrations de 0 à 3 ml/l*

Figure 6 : Effet de l'AIA sur le taux d'enracinement (variété *Sweet*).



• *Effets de l'AIA et de l'αANA combinés pour des proportions en AIA/ANA de 0/0, 1/1, 1/2, 1/3.*

Figure 7 : Effet conjugué de l'AIA + de l'αANA sur le taux d'enracinement (variété *Sweet*).



Utilisés seuls ou combinés, l'AIA et l'αANA retardent la formation de racines de la variété « sweet » au début du stade de régénération (5 premiers jours). L'utilisation de ces auxines n'est utile, dans les conditions de notre expérimentation, que si l'on souhaite retarder le processus de régénération.

La variété « *wild* » (non illustrée, réagit dans le même sens, avec des taux de régénération différents.

Selon CRONAUER et KRIKORIAN (1984), une concentration de 1 mg/l de AIA ou de αANA ou de IBA induirait la formation de racines pour certains types de bananier.

D'autres auteurs déconseillent, par contre, l'utilisation de ces auxines, particulièrement pour les bananiers de type « *sweet* ».

CONCLUSION

A. La hauteur et l'âge des jeunes plantes mère sur lesquelles les apex sont prélevés, sont sans effet sur les stades ultérieurs de la culture *in vitro*.

B. Le lait de coco frais, dans les régions qui en disposent facilement, peut remplacer économiquement, dans certains cas, des hormones de prolifération plus coûteuses.

C. Dans nos expérimentations, les variétés testées se sont comportées différemment, parfois même contradictoirement.

Il est dès lors utile de tester chaque variété que l'on désire multiplier à grande échelle, afin de fixer, au mieux, les divers paramètres des milieux de culture.

Bibliographie

1. AMORZA A.B., BARBA R.C. DAMASCO O.P. (1986) Status and prospects of tissue culture research on bananas. Proceedings of an international workshop held at Davao, Philippines, feb. 1985, PCARRD book series n°41, 78-88.
2. BERG L.A, BUSTAMANTE M. (1974) Heat treatment and meristem culture for the production of virus free bananas. Phytopathol., 64, 320-322.
3. DORE SWAMY R. et al. (1983) Tissue culture propagation of banana. Sci. Hort. 18. 247-252.
4. KRIKORIAN A. (1989) In vitro culture of bananas and plantains : background and call for information. Tropical agriculture : 66(3):194-200.
5. KRIKORIAN A. CRONAUER S. (1984) Aceptic culture techniques for banana and plantain improvement. Econ. bot. 38 : 322-331.
6. MURASHIGE T. SKOOG A. (1962) A revised medium for rapid growth and bioasays with tabacco tissue culture. Physiol. plant. 473-497.

A21 : Sélection et valorisation des microalgues à intérêt alimentaire et industriel

BELKOURA M.[1], BENIDER A.[1], TAHIRI M.[1], BOUTERFAS R.[1], DAUTA A.[2]

[1] Équipe Biotechnologie Algale, Laboratoire de Physiologie Végétale. Faculté des Sciences Semlalia. Ave. Prince My Abdellah, B.P. S15, Marrakech, Maroc.

[2] Centre d'Écologie des Systèmes Aquatiques Continentaux. Université Paul Sabatier, 118, route de Narbonne. 31062 Toulouse Cedex, France.

Avec plus de 20 000 espèces répertoriées à ce jour, les microalgues constituent un groupe d'organismes autotrophes très diversifié aussi bien sur le plan biologique qu'au niveau métabolique et biochimique. À ce titre, les possibilités de valorisation de cette richesse naturelle apparaissent donc très importantes. Dans les années 1940-50, un intérêt particulier a été accordé aux microalgues en tant que source d'hydrocarbures et de protéines. Cependant, leur exploitation commerciale n'a commencé à prendre de l'ampleur qu'avec la découverte d'une algue verte halophile *Dunaliella salina* productrice de β-carotène. Dès les années 1960 sont alors apparues les premières unités de production de cette espèce en URSS, aux USA et en Australie. Depuis, d'autres algues ont connu le même essor, en particulier les espèces des genres *Chlorelle*, *Scenedesmus*, *Spirulina* et *Porphyridium*.

L'utilisation des microalgues est actuellement présentée comme une solution à de nombreux problèmes. Leur composition biochimique, particulièrement intéressante (teneur élevée en protéines, bonne composition en acides gras et acides aminés), en fait une source alimentaire de bonne qualité, tant pour les animaux que pour les humains. Par ailleurs, une multitude de produits intéressant les industries chimiques, agro-alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et autres peuvent être extraits de biomasses d'algues : vitamines, polysaccharides, agents gélifiants, biofloculants, osmorégulateurs, pigments, acides aminés, etc. Certaines espèces sont également capables d'excréter des substances bactéricides, bactériostatiques ou antifongiques, ou de posséder des vertus thérapeutiques, notamment des activités anticancéreuses.

L'intérêt des microalgues ne se limite pas à la production de substances à haute valeur ajoutée. Les algues fixatrices d'azote (*Anabaena*, *Nostoc*,...) sont utilisées notamment comme fertilisants dans de nombreux pays asiatiques avec une efficacité remarquable.

Un autre avantage des microalgues est que l'on peut les produire sur des milieux peu onéreux, tels qu'eaux usées, effluents agricoles : à la production de biomasse s'ajoute alors un rôle de dépollution fort efficace et important. En effet, les substances dites polluantes (NH_4^+, NO_3^-, PO_4^{3-}) sont en fait des nutriments pour les algues. Certaines espèces peuvent être des agents de dépollution encore plus précieux grâce à leur capacité de lier les métaux lourds.

Un dernier attrait des microalgues est celui de la production d'énergie. En effet, la biomasse produite sur un substrat peu onéreux (lors du biotraitement des effluents par exemple) peut être destinée à la méthanisation. Plus prometteuse encore est la production d'hydrocarbures à longue chaîne (C27 à C31) par certaines espèces (*Botryococcus braunii*, notamment). À long terme, les mircroalgues pourraient servir de source renouvelable de carburants liquides et se substituer, en partie, au pétrole. Cette perspective mènera probablement à une algoculture énergétique importante.

Les acquis de la recherche scientifique et l'évolution des techniques de la biologie (génie génétique, fusion cellulaire,...) ouvrent des perspectives remarquables pour la biotechnologie algale. Outre les possibilités déjà mentionnées, une des démarches intéressantes semble être le transfert du ou des gènes codant pour la synthèse d'un produit désiré dans une espèce de microalgues. Celle-ci serait alors capable de produire à grande échelle cette substance qui pourrait être extraite par la suite. Les microalgues d'eaux douces recèlent un pool génétique qui est encore presque totalement inconnu et qui offre des possibilités encore insoupçonnées pour

la production d'aliments, de produits pharmaceutiques, de produits chimiques et de combustibles. Les techniques du génie génétique, développées depuis des dizaines d'années déjà pour les bactéries, sont actuellement en plein essor dans le cas des microalgues.

Avec ses nombreux écosystèmes aquatiques naturels et artificiels, le Maroc dispose d'une flore algale constituée de plus de 1500 espèces dont certaines sont autochtones. Or, à l'exception de quelques macroalgues marines qui sont actuellement exploitées pour la production de phycocolloïde, la culture de microalgues d'eaux douces, pour des besoins alimentaires ou pour la production de substances à haute valeur ajoutée, est à ce jour inexistante. C'est dans ce contexte particulier qu'a été élaboré un programme de recherche visant à sélectionner des microalgues susceptibles d'avoir un intérêt sur le plan alimentaire ou industriel. Les premiers résultats de ce programme, relatifs à une étude réalisée sur l'algue verte *Chlorella sokiniana* seront présentés. De par ses teneurs élevées en protéines, sa composition en acides gras et son taux de croissance exceptionnel, cette microalgue est potentiellement intéressante sur le plan industriel. En outre, son adaptation à des conditions de culture extrêmes (température élevée, fort ensoleillement), en fait une espèce susceptible d'être cultivée en masse sous des conditions climatiques qui règnent dans des régions à climat semi-aride telles que la région de Marrakech.

A22 : Biotechnologie et sécurité alimentaire. Cas de l'*Atriplex halimus* dans la production de viande de camelins et caprins dans la vallée du Drâa (Maroc)

BENCHAABANE A.

Laboratoire d'Écologie Végétale, Faculté des Sciences. SEMLALIA B.P. S 15 - 40 000 Marrakech. MAROC

Le dromadaire est l'animal le plus adapté aux conditions écologiques des régions désertiques. Il constitue, avec les caprins, une importante source en protéines animales pour l'alimentation des populations de la vallée du Drâa dans le Sud marocain. Les conditions climatiques des régions désertiques se caractérisent par une forte évaporation et de faibles précipitations. Il en résulte une végétation clairsemée. Sa biomasse et sa valeur nutritive sont faibles. Cependant *Atriplex halimus*, espèce très appréciée par le dromadaire, comme les caprins, supporte mieux les conditions climatiques et pédologiques des régions désertiques mais son aire de répartition se réduit de plus en plus, suite au surpâturage et au manque de stratégie de gestion de ces parcours. L'aménagement de ces régions en vue d'une amélioration de la production fourragère des parcours passe d'abord par une meilleure connaissance de la biologie et de l'écologie de l'*Atriplex halimus*. L'auteur expose aussi, dans une approche pluridisciplinaire, l'apport possible des biotechnologies, pour l'amélioration des parcours à base *Atriplex halimus*. Cette démarche, qui cherche à prendre en compte l'état de l'écosystème, homme compris, permettrait de mieux assurer la sécurité alimentaire du cheptel en zone désertique et par là même garantir un apport important de protéines pour la population.

A23 : Activités de recherche en biotechnologies pour l'amélioration des céréales

BENLHABIB O.
Dépt. Agronomie et Amélioration des Plantes, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. BP 6202 Rabat-Instituts, Maroc

Au Maroc, la limitation de la biodiversité du pool génétique des blés cultivés entrave souvent l'amélioration variétale et donc la possibilité d'une augmentation significative de la production. Les rendements céréaliers au niveau national sont en effet très bas et fluctuants (une moyenne de 17 qx/ha en 1996, année pluvieuse). En plus de l'insuffisance des précipitations, les maladies et les ravageurs constituent souvent des cause inévitables. La résistance génétique à la plupart des agents est pratiquement absente chez la majorité des variétés locales. La recherche de sources de résistance est indispensable. D'autre part, la disparition des anciennes variétés adaptées est alarmante surtout depuis les dernières années de sécheresse, causant une érosion génétique sans doute irrémédiable. La protection du pool génétique de blés cultivés et son élargissement sont nécessaires. Les espèces apparentées de blés conservent une bonne partie de leurs facteurs adaptatifs et de leur richesse génétique. Le transfert d'une partie de cette diversité aux variétés cultivées et plus spécifiquement l'introgression de gènes particuliers a constitué l'objectif principal de ce travail. Ainsi, les hybridations interspécifiques et certains outils biotechnologiques sont employés depuis le début du programme.

Collecte et évaluation de germoplasme

À l'amont de ce travail, la collecte et l'évaluation d'espèces apparentées ont été entreprises. Plusieurs collections ont été reçues de collaborateurs (ICARDA, Purdue University) ou constituées par la prospection au niveau national. La résistance à la Cécidomyie des céréales a été testée en premier, vu l'urgence de trouver de nouveaux gènes contre ce ravageur très répandu dans les régions céréalières. Près de quatre cent cinquante accessions appartenant aux espèces des genres *Aegilops*, *Agropyron* et *Triticum* ont été évaluées et plus d'une cinquantaine s'est révélée totalement résistante. Celles-ci sont principalement de génome D (*Aegilops squarrosa*) et de génomes UM ou Dun (*Aegilops ovata* et *Aegilops ventricosa*). Certaines accessions ont présenté des réactions différentielles suivant les conditions de test et ont été classées sensibles sous serre, mais totalement résistantes en plein champ. Cette différence de réaction est sans doute liée aux types de virulence de la population d'insectes en constante évolution. D'autres accessions ont présenté en plus de la résistance à la cécidomyie, la résistance à d'autres maladies comme la rouille, l'oïdium... L'évaluation de la collection locale a porté sur les caractères morphologiques, phénologiques et de résistance. Le polymorphisme moléculaire analysé par RFLP est en cours de mise au point.

Hybridations interspécifiques

Dans le cadre de cette activité, les espèces croisées au blé dur et au blé tendre concernent des espèces diploïdes (*Triticum monococcum*, *Aegilops squarosa*) et des espèces tétraploïdes, (*Aegilops ovata*, *Aegilops triuncialis*, *Aegilops triaristata* et *Aegilops ventricosa*). Avec les monococcum, 61 embryons immatures ont été isolés *in vitro* mais seulement quelques-uns (30 %) ont pu atteindre le stade d'épiaison. La fertilité a été variable et faible. Les épis formés ont été soit rétrocroisés ou laissés en autofécondation. Une descendance de deuxième génération a été produite. Des premiers croisements datant de 1993, une lignée prometteuse actuellement de quatrième génération est en multiplication. Des croisements avec les *Aegilops*, plus d'une soixantaine d'hybrides ont

été produits. Les différentes variétés de blé n'ont pas affecté significativement les paramètres de nouaison et de régénération quand celles-ci ont été croisées aux accessions sauvages. Les différences ont été plus significatives et importantes entre les espèces d'*Aegilops* et les accessions. *Aegilops triaristata* et *Aegilops ovata* ont présenté des taux de nouaison meilleurs que ceux d'*Aegilops squarosa* et d'*Aegilops ventricosa*. D'autre part, en croisements indirects, les taux de nouaison ont été toujours meilleurs qu'en croisements directs. Cet outil nous permet d'obtenir des plantes difficiles ou impossibles à produire par les méthodes classiques de croisements. Les hybrides produits après sauvetage des embryons ont été transférés au champs. Une large variabilité phénotypique, chromosomique et du comportement méiotique a été constatée chez les F1. La diversité génétique régénérée chez les descendants interspécifiques est importante, mais souvent instable, nécessitant une étape de fixation et de sélection indispensable au préalable à toute utilisation.

La culture *in vitro*

La culture de tissus haploïdes (anthères) et diploïdes (embryons immatures) est employée chez les trois espèces de céréales, blé dur, blé tendre et orge. L'influence de certaines substances (sucre, acides aminés, hormones, glutamines...) a été testée dans le but d'adapter mieux le milieu de culture et d'améliorer les réponses du matériel végétal local. Les aptitudes androgénétiques et embryogénétiques des différentes variétés locales de céréales ont été déterminées sous nos conditions environnementales. En culture d'anthères, les réponses étaient variables et fortement liées au génotype et à l'espèce. Le blé dur s'est révélé le plus récalcitrant. Plusieurs plantules ont été produites mais la plupart étaient non chlorophylliennes. Chez le blé dur uniquement la variété Sabli1 a formé des plantes vertes. Quatre variétés de blé tendre parmi 9 ont régénéré des plantes chlorophylliennes et parmi celles-ci la variété Saâda n'a pas formé d'albinos. Une interaction entre le génotype et la composition du milieu de culture a été constatée (PE, N6, C17, MS modifié). Cependant, le milieu C17 s'est révélé le plus favorable à la régénération de plantes haploïdes. En culture d'embryons, l'adaptation des conditions et du milieu de culture a permis de dépasser certaines difficultés rencontrées au départ comme l'inhibition, la germination précoce des embryons (hydrolysât de caséine), l'amélioration du taux d'embryogenèse aux dépends de l'organogenèse et l'augmentation du taux de prolifération cellulaire (nitrate d'argent, glutamine, concentration hormonale) et l'acclimatation des plantules régénérées avant leur transfert *in vivo* (concentration en sels minéraux et milieu liquide). Le facteur génotypique est aussi très marquant en culture de tissus diploïdes. Une gamme étendue de réponses des variétés a été mise en évidence pour les trois céréales étudiées ; des plus récalcitrantes (Cocorite, Saâda,, Rabat 077) à celles le plus embryogéniques (Anouar, Nesma, Asni). Plusieurs plantules ont été produites et transférées au champ. Les variations phénotypiques notées chez les plantes régénérées portent souvent sur le port et la taille de la plante, et sur la forme et la taille de l'épi.

Analyse chromosomique

Les techniques cytogénétiques de comptage et d'analyse de l'appariement chromosomique ont été adaptées et sont actuellement souvent employées pour caractériser les descendants intergénériques et ceux issus de culture *in vitro*. Les résultats d'analyse chromosomique de trois générations de descendants issus des croisements entre blé tendre et *Agropyron intermedium*, *Agropyron longissima* et *Agropyron trichophorum* ont montré que le nombre de chromosomes est significativement différent entre les familles de descendants. L'élimination des chromosomes sauvages d'une génération à l'autre est dépendante de l'espèce sauvage employée. La caractérisation de chromosome individuel par uniquement leur forme ne nous permet pas l'identification de l'ensemble des chromosomes du génome. Les techniques de banding nécessaires pour dépasser cette limitation sont actuellement en cours d'essai. Parmi nos objectifs futurs, nous envisageons d'introduire la technique d'hybridation *in situ* (FISH par exemple) pour aider à l'analyse précise du matériel développé.

A24 : Connaissance, caractérisation et amélioration du palmier dattier

BENNACEUR M.[1], BOUGUEDOURA N.[2], BOUHIRED L.[2], BENKHALIFA A.[2], BOUNAGA N.[2]

[1] Université d'Es-Sénia, Institut des Sciences de la Nature, B.P. 1524, Oran, Algérie.

[2] Unité de Recherche sur les Zones Arides, B.P. 44 Alger-gare, Algérie.

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre d'un programme de recherches portant sur la mise en valeur des ressources végétales des régions arides. L'un des projets s'intéresse à la sauvegarde et au développement de la phoeniciculture. Divers travaux menés sur le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), depuis plusieurs années par notre équipe ont rencontré plusieurs problèmes liés à la complexité de l'arbre, sa dioécie, son hétérozygotie, la lenteur de son cycle biologique et la méconnaissance de son organisation génétique.

Les résultats que nous présentons sont issus de travaux et concernent les thèmes suivants :

- Connaissance fondamentale de la biologie de l'arbre, multiplication par embryogenèse somatique et amélioration génétique par androgenèse et gynogenèse.
- Étude de la variabilité génétique des palmeraies algériennes à différents niveaux d'organisation.

L'inventaire exhaustif des palmeraies algériennes est en voie d'être finalisé. Un catalogue d'une centaine de cultivars de palmier dattier est sur le point d'être publié ainsi que la mise en place d'une base de données des différents cultivars prospectés à partir des caractéristiques éthnobotaniques et morphologiques.

- Analyse de la diversité génétique du palmier dattier à partir des caractères biochimiques (Polyphénols et Isoenzymes) et plus récemment à partir des marqueurs moléculaires : les résultats ont montré une large diversité dans la palmeraie traditionnelle, une forte hétérozygotie et une variabilité intra et interspécifique.
- Étude des mycorhizes du palmier dattier : les résultats des travaux effectués en Algérie et à l'INRA de Dijon ont montré la nécessité d'endomycorhization à vésicules et arbuscules dans la reprise de plantules de palmier issues de graines, après leur repiquage dans le sol et sur leur croissance. Par ailleurs, d'autres études sur la morphologie et l'histologie du système racinaire de ces plantules ont confirmé de façon évidente l'importance de cette association symbiotique pour la plante. Aussi est-il nécessaire d'appliquer ces résultats à des vitroplants de palmier dattier afin de les acclimater et d'augmenter leur reprise et leur vigueur dans le milieu naturel.

A25 : Biotechnologies et gestion des ressources génétiques des Ignames Africaines

BILOA ADZEGUE P.

SOS Environnement ONG, B.P. 26257 Parcelles Assainies, Dakar, Sénégal

L'affiche a présenté la synthèse des recherches partagées sur les variétés de l'espèce Igname cultivée en principe au Centre et au Sud du Cameroun Afrique Centrale.

Le genre *Dioscorea* contient à peu près 600 espèces dont seules quelques-unes ont une importance comme source de nourriture. Les espèces les plus importantes économiquement sont :

1 - *Dioscorea rotundata* x
2 - *Dioscorea alata* x
3 - *Dioscorea cayenensis* x
4 - *Dioscorea esculenta*
5 - *Dioscorea dumetorum* x
6 - *Dioscorea bulbifera* x
7 - *Dioscorea trifida*
8 - *Dioscorea opposita* (chinese yam)
9 - *Dioscorea japonica*
10 - *Dioscorea hispada* (Asiatic bitter yam)

Les apports pour les ignames africaines : l'ensemble des techniques liées à la culture *in vitro* est bien maîtrisé même si des limitations subsistent pour certains génotypes ou espèces.

- Le microbouturage, la culture de meristèmes, la cryoconservation permettent d'envisager plus sereinement une conservation à long terme et un échange de ressources génétiques saines.
- Les marqueurs enzymatiques et moléculaires ont permis de mieux appréhender l'organisation de la diversité génétique, enfin la cytométrie en flux, fiable et facile d'emploi peut utilement remplacer la détermination du niveau de ploïdie par dénombrement chromosomique.

A26 : Apports des Systèmes d'Information à la recherche partagée dans les domaines de l'agriculture et de la gestion de l'environnement : cas du pôle régional de Meknès

FAGROUD M. [1], EL BACHIRI A. [2], EL JAAFARI S. [3]

[1] Responsable Centre de Calcul et Biométrie, École Nationale d'Agriculture, Meknès, MAROC
[2] Responsable du Service Documentaire, [3] Laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismaïl, Meknès, MAROC.

Les recherches dans les domaines de l'agriculture et de la gestion de l'environnement concernent et intègrent les structures et les dynamiques des trois composantes fondamentales du milieu : physiques, biologiques et humaines. Par ailleurs, ces recherches doivent être réalisées à toutes les échelles d'organisation et de fonctionnement du monde, dans les contextes climatiques et anthropiques les plus divers possibles. Ceci veut dire que, pour réussir, ces recherches doivent être, le plus souvent possible, interdisciplinaires, interinstitutionnelles et internationales. La mise en commun de potentiels régionaux et la recherche partagée en réseau doivent être priviligiées non seulement au moment de la conception des programmes, mais également lors du traitement des données et de la publication de résultats : Pour qu'il y ait recherche partagée, il faut que chaque laboratoire participant à une action soit informé et associé intellectuellement à toutes les phases opératoires, tout en participant matériellement à certaines étapes de leur déroulement.

Dans ce sens, l'organisation des Systèmes d'Information permet de mettre en valeur les ressources du pôle ou du réseau thématique de recherche en répertoriant les productions des recherches scientifiques dans le domaine concerné, en facilitant une meilleure circulation de l'information (résultats, approches, thèmes de recherches partagées, partenaires potentiels de projets,...), en rendant accessibles les productions du réseau et permettant ainsi leur reconnaissance dans l'espace scientifique. Pour cela, un Système d'Information devrait

développer deux composantes essentielles et complémentaires : 1) Un Service Documentaire assurant ses services aux chercheurs et fournissant les services de recherche auprès des grandes bases de données internationales et l'accès aux documents primaires, et créant une base de données bibliographiques continuellement actualisée sur les différents thèmes et disciplines se rapportant au programmes de recherche concernés. 2) Une Base de Données sur les projets et sur les organisations de recherche ou de financement en rapport avec les sujets traités et le renforcement de son rôle en tant que point local du Système d'Information sur l'agriculture et l'environnement.

En fonction de ces considérations, nous développerons, dans un premier temps, certains aspects théoriques des Systèmes d'Information et leurs applications dans les recherches en agriculture et gestion de l'environnement. La deuxième partie de cette communication sera consacrée à la présentation d'un cas de mise à pied à Meknès, dans le cadre de deux programmes de recherche et formation partagées*, d'un Système d'Information avec un Service Documentaire et une Base de Données.

---

* Responsable de la gestion de la base de données du Centre Interdisciplinaire d'Étude de la Résistance aux Stress Abiotiques chez les Céréales et les Oléagineuses CIERSACO à Meknès (Projet Initiative Propre, soutien financier AGCD-Belgique 1997-2000, coordonnateur local : Samir EL JAAFARI). Responsable de la gestion de la base de données du Programme de formation des formateurs Med-Campus « Intégration des biotechnologies dans une gestion multidisciplinaire de l'environnement des zones fragiles Méditerranéeennes » (PD/mb-DG13) 1996-1999, financé par la Communauté Européenne (DGIB/A/1), coordonnateur : Samir EL JAAFARI.

A27 : Bilan des 25 dernières années de recherche sur la culture *in vitro* du palmier dattier. Applications et tendances

FERRY M., NAVARRO J., RUIPEREZ E.

Estación Phoenix. Station de recherche sur le palmier dattier et les systèmes de production en zones arides. 03201 Elche. Espagne.

Les premières publications scientifiques témoignant d'un certain contrôle de la multiplication *in vitro* du palmier dattier remontent à la fin des années 1970. L'analyse des publications pourtant nombreuses produites depuis cette époque révèle un relatif piétinement des recherches. Bien qu'aucune étude scientifique n'ait été publiée sur la conformité des vitroplants obtenus par embryogenèse somatique, plusieurs sociétés proposent à la vente des palmiers dattiers obtenus selon cette technique. Alors que cette question essentielle n'a toujours pas été clarifiée et que la multiplication par organogenèse pose encore de sérieux problèmes en phase industrielle, une partie importante des programme de recherche semble s'orienter actuellement vers le marquage moléculaire variétal et, même, la transformation.

A28 : Biotechnologies et amélioration génétique des conifères

FOURRÉ J.-L.
Unité des Eaux et Forêts, Université catholique de Louvain, Place Croix du Sud 2, bte 9, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique

Les biotechnologies constituent un domaine de recherche dans lequel des avancées spectaculaires ont été enregistrées ces dernières années, notamment dans le domaine médical avec la procréation médicalement assistée ou la thérapie génique. En agronomie, les biotechnologies ont permis d'améliorer les procédés agro-industriels et jouent un rôle majeur dans l'amélioration des espèces animales et végétales.

Cette communication a pour objectif d'illustrer ce que peuvent être les applications des biotechnologies dans le cadre de l'amélioration des essences forestières. Signalons d'abord que ces biotechnologies s'appliquent en priorité aux espèces les plus importantes pour lesquelles les programmes d'amélioration sont les plus avancés. Inutile de cloner, cryoconserver, transformer ou identifier du matériel génétique de qualité quelconque.

En région wallonne, dans le sud de la Belgique, l'effort d'amélioration s'est focalisé essentiellement sur les espèces résineuses : l'épicéa, le douglas et le mélèze hybride. C'est sur ce modèle « conifère » que nous allons tenter de montrer les applications possibles des biotechnologies. Celles-ci recouvrent les techniques de multiplication végétative *in vitro* (clonage) et leurs éventuelles variations somaclonales, les techniques de transformation génétique, de cryoconservation ainsi que les méthodes d'identification par marqueurs moléculaires génétiques.

A29 : Évolution des terres de parcours et bilan fourrager dans les zones arides algériennes

HOUMANI M.
Institut d'Agronomie, Blida, Algérie

Il existe peu ou pas d'études sur l'évolution de la production fourragère, de l'effectif animal, et de la satisfaction des besoins alimentaires du bétail par la production fourragère locale. Cette étude se propose de traiter ces aspects et leurs conséquences. Les données brutes traitées sont tirées des Statistiques Agricoles (Publication du Ministère de l'Agriculture Algérienne), de diverses études réalisées dans les structures de formation, de recherche et de développement. La période d'étude porte sur les années allant de 1978 à 1986. Les zones concernées se situent dans l'isohyète égale ou inférieure à 400 mm, correspondant aux zones arides.

La production fourragère dans les zones arides traditionnellement à vocation pastorale, diminue de façon continue depuis une vingtaine d'années : de 1978 à 1966, la baisse fourragère a atteint une moyenne annuelle de 66 millions d'unités fourragères lait (UFL). Cette forte baisse dans l'apport fourrager n'est pas suivie par une diminution dans l'effectif des animaux domestiques. Parallèlement, les cultures végétales (céréaliculture, arboriculture, vigne, maraîchage, cultures fourragères) se développent sur les meilleures terres pastorales. Ces pratiques ont conduit à l'augmentation de la charge animale dans un milieu éprouvé par les effets répétés de la sécheresse. Le taux de satisfaction des besoins alimentaires du bétail par la production

fourragère locale est passé de 70 % en 1978 à 40 % en 1986 et se maintient jusqu'en 1996. L'emploi des aliments concentrés (essentiellement d'importation) dans la ration alimentaire des animaux atteint des taux de 60 % et est de plus en plus demandé. Les parcours sont de plus en plus labourés et dénudés par un surpâturage plus intense. La remise en cause de la vocation pastorale des zones arides est amorcée et peut devenir irréversible. L'introduction d'arbustes fourragers (*Atriplex halimus, Atriplex canescens, Acacia...*) dans les opérations de reboisement initiées ces dernières années, est d'un important apport fourrager dans des périodes où la végétation herbacées et complètement épuisée ; ces plantations d'arbustes fourragers méritent d'être plus étendues.

A30 : Expérience tunisienne en biodiversité, biotechnologie et bioéthique

JEMMALI A.[1], BEN BRAHIM N.[2]

[1] Laboratoire des Cultures Maraîchères ; [2] Laboratoire de Botanique, Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, Rue Hédi Karray - 2049 Ariana (Tunisie).

La diversité biologique ou « biodiversité » est un terme qui englobe la variabilité au sein et entre toutes les espèces végétales et animales ainsi que les écosystèmes qui les supportent. La diversité génétique chez les plantes constitue indéniablement la plaque tournante de cette biodiversité, si bien qu'elle joue un rôle primordial dans la vie des peuples à travers ce que les plantes leur fournissent en aliments, logis, médicaments, etc. Les ressources phytogénétiques constituent donc la clé de la sécurité alimentaire et du développement agricole durable. Paradoxalement, cette diversité végétale se trouve confrontée à des risques de plus en plus graves d'érosions naturelle ou intentionnelle qui sont à l'origine de l'extinction, hélas irréversible de bon nombre d'espèces ou de variétés autochtones. Cinquante mille autres espèces végétales, soit environ 20 % de l'effectif total sont, selon des évaluations récentes, menacées d'extinction. Les menaces de dégradation ou de dilapidation des ressources végétales constituent de plus un sérieux danger qui guette la sécurité alimentaire des générations successives. Ses signes se font sentir dans certaines régions du Sud en particulier et peuvent également toucher les pays du Nord si un effort collectif n'est pas rapidement entrepris afin de préserver le patrimoine restant, d'en faire bon usage et d'assurer sa durabilité. La biotechnologie offre une gamme considérable d'outils qui peuvent servir à l'amélioration des méthodes de conservation et d'utilisation des ressources phytogénétiques. Elle peut augmenter l'efficacité de la sécurité à chaque étape du processus dynamique qui commence avec la collecte et aboutit à l'exploitation de ces ressources par les sélectionneurs et autres spécialistes. Tout ceci ne se passe pas sans générer des controverses et des conflits d'intérêt entre les différents partenaires du processus. L'une des questions les plus complexes qui a toujours été au centre de presque tous les efforts déployés pour mettre en place une politique internationale sur les ressources génétiques est « la propriété intellectuelle ». D'autres problèmes non moins importants sont posés sous le slogan de la « bioéthique ». Où en est donc la Tunisie par rapport à toute cette métamorphose ? En signant l'accord de Rio sur la biodiversité en juin 92 et en le ratifiant en mai 93, la Tunisie a implicitement choisi de s'aligner rapidement sur le processus international et de prendre part à toutes les négociations ainsi qu'à l'élaboration des textes régissant la convention générale sur la biodiversité et leur application. Bien avant cela, la Tunisie s'est mise à mener quelques actions visant la protection de certains écosystémes qui se trouvent fortement endommagés. C'est ainsi par exemple que fût révisée, en 1988, le code forestier de 1959 qui arrête les dispositions de gestion des forêts et de la végétation

naturelle. Au niveau des ressources phytogénétiques, un inventaire floristique a déjà été fait depuis quelques décennies et réactualisé plusieurs fois. Des investigations récentes révèlent l'existence de 119 familles et un total de 2991 taxons toutes subdivisions spécifiques confondues. On y trouve 1423 espèces utiles et 458 espèces rares. En matière de collecte et de conservation, les techniques préconisées sont connues de tous, mais notre pays n'est pas encore suffisamment doté des moyens techniques et logistiques pour ainsi parler d'une réelle opération de conservation. L'expérience tunisienne en biotechnologie (culture *in vitro*, marqueurs biochimiques et moléculaires, modifications génétiques) n'a pas, non plus, enregistré des progrès considérables. Le manque de moyens généralement coûteux est à l'origine de ces défaillances. Que l'on veuille ou non, nous sommes contraints, du fait même de notre engagement au sein de ce nouvel environnement international, d'accepter les produits des nouvelles technologies. Mais, faut-il pour autant accepter de subir impuissamment les faits sans nous pourvoir des moyens qui nous préserveront de la dépendance et de la concurrence déloyale actuellement imposée par la politique du meilleur et du moins cher? C'est ce que la Tunisie devra éviter grâce à une politique consciente et déterminée en commençant d'abord par se munir des outils technologiques nécessaires et de promulguer les lois qui fixent, dans le contexte local, les modalités d'utilisation de ces produits et prévoient les dispositions à prendre en cas de dérive.

A31 : Pôle régional de recherche et développement agricole pour le bour et la montagne

JLIBENE M.[1], EL JAAFARI S.[2], EL MEKKAOUI M.[3]

[1] Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Meknès. [2] Université Moulay Ismaïl, Faculté des Sciences (UMI), Meknès. [3] École Nationale d'Agriculture (ENA), Meknès.

La création d'un pôle régional d'excellence à Meknès pour la recherche et le développement des régions du bour et de la montagne est justifiée par la position géographique de cette ville et les institutions qui y sont représentées. En effet, Meknès se situe au centre de la zone à pluviométrie favorable (> 450 mm) à haut potentiel de productivité, entre les chaînes du Moyen-Atlas et du Rif. Elle abrite des institutions d'enseignement (UMI, ENA, ESH), de recherche (INRA, UMI, ENA), et de vulgarisation (DPAs) agricoles. Toutes les composantes de la chaîne du développement agricole sont disponibles et opérationnelles : la formation et recherche de base à l'amont, la recherche appliquée de nouvelles techniques, au centre et leur transfert à l'aval. Les agriculteurs sont généralement performants et plus réceptifs que leurs homologues d'autres régions. Les atouts de Meknès ont incité le pouvoir public à investir dans le domaine de la recherche appliquée à l'INRA, par la construction des laboratoires, le recrutement du personnel scientifique, la programmation de la recherche et l'établissement des liaisons avec les organismes nationaux de recherche et de développement. Quatre programmes de recherche siègent à l'INRA de Meknès : Bour Favorable, Oléagineux Annuels, Légumineuses Alimentaires et Arboriculture Fruitière, en plus des antennes Fourrages, Olivier et Viandes Rouges. Un programme est une unité de recherche composée d'un ensemble de projets cohérents de recherche, d'une équipe multidisciplinaire et des laboratoires spécialisés, qui visent la réalisation d'un commun objectif, le développement d'un secteur agricole donné qui peut être un groupe de cultures ou un écosystème. Les programmes à long terme ont été établis avec la participation de tous les organismes impliqués. L'UMI et l'ENA, en plus de la formation académique des universitaires pour la première et des ingénieurs agricoles pour la deuxième, contribuent à la formation professionnelle dans le domaine de la biotechnologie par

des programmes régionaux et à la recherche appliquée dans le cadre d'une collaboration avec l'INRA. Un service recherche-développement (SRD) à l'INRA se charge des relations avec les organismes de développement. Un exemple de collaboration entre les différentes institutions est donné pour le secteur blé tendre qui constitue la composante principale du système bour favorable et montagne. L'INRA dispose d'un programme de sélection efficace où les chercheurs de l'ENA et de l'Université contribuent par des études en amont des mécanismes physiologiques et génétiques régissant les stress biotiques et abiotiques. Les DPAs sont impliquées dans le transfert de la variété dans le milieu réel, en identifiant les agriculteurs cibles et apportant la logistique nécessaire.

A32 : Contribution de la biotechnologie a l'amélioration du blé au Maroc

JLIBENE M.
Institut National de la Recherche Agronomique, BP 578, Meknès, 50000, Maroc.

La biotechnologie au sens large est l'ensemble des techniques utilisées dans les travaux sur le vivant. Au Maroc, la manipulation génétique du blé par voie de méthodes classiques de sélection (hybridation et sélection) a permis des bonds spectaculaires au niveau du potentiel de production qui est passé du simple au triple en un demi-siècle, faisant de la sélection variétale la voie d'amélioration la plus privilégiée. La stabilité de la production a aussi été améliorée, en améliorant aussi bien la faculté d'adaptation que la capacité de résister aux maladies. La résistance variétale assure également à l'agriculteur un autre avantage économique et écologique en limitant l'emploi des pesticides. L'introduction de nouvelles techniques dont l'hybridation interspécifique et intergénérique et la culture *in vitro* a permis une nette amélioration de l'efficacité des travaux de sélection. Les techniques de culture *in vitro*, embryon et anthère, ont permis de gagner du temps. C'est ainsi que des variétés résistantes à la cécidomyie, l'insecte le plus endommageant au Maroc, ont été mises au point. L'hybridation interspécifique et intergénérique a été utilisée pour introduire dans le blé cultivé la résistance aux maladies prédominantes : la septoriose (*Septoria tritici*), les rouilles (*Puccinia recondita, P. striiformis*, et *P. graminis*) et la cécidomyie (*Mayetiola destructor*). La résistance provient le plus souvent du seigle (*Secale cereale*) ou *Aegilops squarrosa*. L'intégration des techniques moléculaires dans le programme de sélection est envisagée dans le cadre de collaboration avec les Universités et écoles professionnelles.

A33 : L'Institut de Formation de l'Industrie Meunière de Casablanca

LARHISSI Z.
Ancienne Route Principale de Rabat, km 11,5, Sida Bemoussi, Casablanca, Maroc.

L'IFIM est un établissement d'enseignement supérieur créé dans un cadre de partenariat entre l'Association Professionnelle de la Minoterie du Maroc (APM), l'Association Américaine des Producteurs de Blé (U.S. Wheat Associate), et l'Office de la Formation professionnelle (OFPPT), en vue de répondre aux besoins de la profession en personnel qualifié dans le

domaine de l'Industrie des céréales et produits dérivés. Il forme en deux années des techniciens spécialisés en meunerie, et assure le perfectionnement du personnel des entreprises par le biais de stages en s'adaptant à l'évolution technologique.

Le développement de la formation continue, et la mise en place de cycle de formation d'ingénieurs en Agro-Industrie, constituent les projets à venir les plus ciblés de l'IFIM pour assurer l'adéquation entre la formation au service des particuliers, et l'évolution du secteur céréalier en général.

La filière céréalière constitue au Maroc, un domaine de choix et à fort potentiel, elle est appelée à connaître dans l'avenir un développement continu et une croissance significative pour satisfaire d'abord les besoins, sans cesse croissants, de la population marocaine et ensuite ouvrir ses portes vers l'extérieur.

Le secteur de la minoterie, principale branche de la filière céréalière représente au Maroc un effectif de 92 minoteries industrielles pour un effectif de 10 000 travailleurs. La main d'œuvre qui exerce dans ce secteur est en majorité formée sur le tas.

Vu l'évolution technologique et la libération de la filière céréalière, des mesures d'accompagnement en matière de formation s'imposent.

C'est dans ce contexte que l'IFIM a été créé dans un cadre de partenariat entre, d'une part, l'Association Professionnelle de la Minoterie du Maroc (APM) et l'Association Américaine des Producteurs de Blé (U.S. Wheat Associate), et d'autre part l'A.P.M. et l'Office de la Formation Professionnelle et la Promotion du Travail (O.F.P.P.T.) pour répondre aux besoins nécessaires des Minoteries Marocaines en main-d'œuvre qualifiée.

Les objectifs de l'IFIM

- Rapprocher le dispositif de formation de ses utilisateurs.
- Renforcer et diversifier les formations dans ce secteur.
- Introduire l'apprentissage et la formation continue dans tous les domaines des industries des céréales.
- Familiariser les futurs meuniers avec la réalité du secteur productif.
- Permettre l'adaptation rapide aux évolution du secteur.
- Apporter conseil et assistance aux entreprises.
- Proposer des formations (stages, sessions de perfectionnement) au profit des techniciens meuniers d'Afrique et du Moyen-Orient.

Les équipements techniques

- Un moulin pilote d'une capacité de 15T/jour ;
- Un laboratoire d'analyse chimique et rhéologique des céréales ;
- Un laboratoire d'analyse physique des céréales ;
- Un laboratoire de boulangerie.

Projets en cours

La formation continue

- Organisation de séminaires animés par des experts marocains et étrangers destinés aux différents niveaux dans les entreprises des industries des céréales et axés sur les divers domaines de la spécialité.

La diversification de l'offre de formation

- Création de nouvelles formations spécialisées répondant aux besoins spécifiques du secteur (comme la boulangerie, ou la production d'aliments pour le bétail, etc.).
- Mise en place de cycles de formation d'ingénieurs en meunerie et dans d'autres filières en Agro-industrie.

L'assistance-conseil

- Développement d'un service de conseil et d'assistance au profit des entreprises du secteur des industries des céréales.

A34 : L'inoculation du soja : une arme contre la faim pour les pays en développement

MANDIMBA G.R.
Laboratoire de Biotechnologie. Institut de Développement Rural I.D.R. km 17, Université. B.P. 13346 Brazzaville, Congo

Le soja *Glycine max* (L.) Merill est une plante riche en protéines (40 %) et utilisée au Congo dans les rations alimentaires en aviculture, ainsi que dans la récupération nutritionnelle des enfants souffrant de malnutrition. Sa culture dans les conditions naturelles a révélé une faible nodulation, le nombre de nodosités ne dépassant pas 12 par plant. L'inoculation par des souches efficientes de *Bradyrhizobium japonicum* FA3, 3-40, SA1, G3S, TAL 377 et TAL 379 augmente de façon significative la nodulation dont le nombre varie entre 27 et 60 nodosités par plant, et une masse de nodosités variant entre 138 et 522 mg par plant. La quantité d'azote accumulée dans les plantes inoculées est similaire à celle des plantes fertilisées avec 100 kg/ha. Il en est de même des rendements en gousses qui ne présentent aucune différence significative entre les plants inoculés (1,18-3,33 t/ha) et ceux fertilisés avec de l'azote à 100 U (1,89-2,11 t/ha). Les plants non inoculés et non fertilisés (témoin) donnent les rendements les plus faibles. L'inoculation permet des économies en engrais azotés estimées entre 84 et 94 kg N/ha et varient selon la variété et la souche utilisée. Nos résultats montrent le succès de l'inoculation du soja par des souches efficientes de *B. japonicum*. C'est une pratique agricole facile d'emploi, à condition que l'on dispose d'inoculum performant et à bon marché. C'est la voie dans laquelle s'orientent les travaux de recherche sur la fixation d'azote dans les systèmes de culture à l'Institut de Développement Rural.

A35 : Contribution de la culture *in vitro* dans l'amélioration de la production de bananes au Sénégal

MBODJI O.
Laboratoire de civ URCI ISRA/ORSTOM BP : 1386 Dakar Sénégal.

Le Sénégal connaît une demande intérieure en bananes tellement importante que la production nationale, environ 7000t/an paraît tout à fait insignifiante. Les besoins en bananes sont donc couverts en grande partie par l'importation. Face à ce constat, il demeure urgent de procéder à des actions concrètes de promotion de la production bananier, par une extension significative des surfaces cultivées. Cela nécessite la disponibilité de matériel de plantation en quantité suffisante et présentant un meilleur état physiologique, morphologique et phytosanitaire. Ce projet est financé par l'ONG Vredes Eilanden de Belgique. L'objectif principal consiste à définir dans les conditions de notre laboratoire URCI, les meilleures techniques adaptées à la culture *in vitro* de méristèmes de bananier. Il convient donc, pour le récent laboratoire de l'URCI de déterminer les procédures et produits adaptés et facilement retrouvables sur le marché national. Le projet de recherche permettra également de produire 40 000 vitroplants de bananiers *Robusta*, pour les périmètres bananiers de Médina Yéro Foula (région de Kolda) encadrés par l'ONG belge.

1) Mise au point de techniques de désinfection des cubes méristématiques de *Musa* : Le plus faible taux de contamination, donc la meilleure désinfection des explants a été obtenue avec la combinaison : trempage des cubes de méristèmes de *Musa* dans de l'éthanol 95°

pendant 5 minutes, suivi d'une immersion dans NaOCl 2,7 % ou Ca(OCl)2 14 % pour une même durée de 60 minutes. On obtient ainsi plus de 90 % de cubes méristématiques totalement désinfectés.

2) Mise au point des milieux de culture : Les meilleures proliférations sont obtenues avec le milieu de Murashige et Skoog (1962) supplémenté avec de la BAP 20 µM/l et de l'AIA 1 µM/l par comparaison au même milieu supplémenté avec de la BAP 10 µM/l et de l'AIA 1 µM/l.

3) Milieu de régénération : La présence d'ANA dans le premier milieu de culture : Murashige et Skoog (1962) supplémenté avec de la BAP 1 µm/l et de l'ANA 1 µm/l entraîne un développement d'une trop importante masse racinaire au détriment de la croissance en hauteur des plantules régénérées. Par contre, le milieu de Murashige et Skoog (1962) additionné de BAP 1 µM/l et d'AIA 1 µM/l permettant une régénération de plantules vigoureuses, longues, avec un bon système racinaire solide et hautement ramifié a été retenu.

4) Milieu d'enracinement : Le milieu de régénération retenu précédemment (cf. § 3) a été comparé au milieu suivant supposé être apte à un bon enracinement : Murashige et Skoog (1962) dilué de moitié en absence de tout régulateur de croissance. Ce milieu a donné des plantules chétives avec des racines cassantes. Ceci nous a permis du même coup de gagner du temps dans cette phase de multiplication car la croissance sur le milieu d'enracinement durait au moins un mois.

5) Mise au point de techniques d'acclimatation : Un mélange de 3 produits a été utilisé pour la désinfection du substrat en vue du sevrage des vitroplants en serre : cryptonol, alliette, furadan.

6) Qualité et quantité de vitroplants de bananiers produits : La mise au point et le développement de techniques de culture *in vitro* des *Musa* adaptées aux conditions du laboratoire de l'URCI, ont conduit à l'obtention des premiers vitroplants de bananiers cv. *Robusta* (AAA « Cavendish ») en fin avril 1996, soit 6 mois après le démarrage du Programme. Actuellement, plus de 14 000 vitroplants de bananiers issus du laboratoire sont déjà transférés au champ où ils manifestent à la grande satisfaction des planteurs une très rapide croissance accompagnée d'un excellent état végétatif.

A36 : Intégration de l'haplodiploïdisation dans les programmes de sélection du blé et de l'orge à l'EMBRAPA/CNPT

MORAES-FERNANDES M.I.
EMBRAPA CNPT Passo Fundo, Rio Grande Do Sul, Brazil.

CHERCHEURS ET TECHNICIENS AYANT PARTICIPÉ À CE PROGRAMME

Coordination Biotechnologique : M.Irene B. de Moraes-Fernandes, Généticienne.
Sélectionneurs : Arias, G.; Caetano, V.; Scheeren, P.; Silva, S.; Só e Silva,M.
Pathologistes : Prestes,A.M. ; Barcelos, A. Physiologistes : Stival,A. L. ; Haas, J. C.
Biologie cellulaire et moléculaire : Brammer, S. P. ; Angra D.; Bonato, A. L.
Techniciens : Galon, G. ; Schleder, M. ; Müller, G. ; Rodrigues da Silva, V. ; Jorge, N.

INTRODUCTION

Depuis la création du Marché Commun du Sud (MERCOSUL), les cultures de blé et d'orge du Brésil subissent une grande pression pour s'adapter à la concurrence dans la région. Le blé, spécialement, a besoin d'une meilleure valeur d'utilisation. Les cultures des céréales dans le Sud du Brésil, souffrent de grandes contraintes biotiques et abiotiques.

Les principales contraintes biotiques sont:

A. Les maladies biotrophiques occasionnées par *Puccinia tritici repentis* et *Puccinia graminis.*

B. Les maladies nécrotrophiques occasionnées par *Helminthosporium sativum et H. tritici-repentis, Septoria nodorum, S. tritici, et Fusarium graminearum.*

Les principales contraintes abiotiques sont:

A. La présence d'aluminium et de manganèse toxiques dans le sol, qui diminuent le développement des racines en profondeur, spécialement dans les cultures d'orge qui sont les plus sensibles à la toxicité de l'aluminium.

B. Les pluies prolongées et l'abondance de nuages entraînent des excès d'eau dans le sol et le manque de radiations solaires favorisant les maladies cryptogamiques.

C. Les forts vents au printemps.

D. Les grandes fluctuations de température à la floraison, avec des chutes de température de 20°C en moins de 24 heures, suivies de gelées provoquant la stérilité totale ou partielle des épis, spécialement dans les cultures de blé.

Il n'y a pas de résistance génétique ou de tolérance suffisante aux maladies nécrotrophiques et aux contraintes abiotiques chez les variétés cultivées qui permettent d'éviter les lourdes pertes de récolte durant les mauvaises années. Les biotechnologies apportent l'opportunité d'intégrer dans les programmes d'amélioration végétale de nouvelles disciplines biologiques telles que la culture *in vitro* ou le marquage moléculaire. Ces techniques entraînent un progrès en terme d'amélioration génétique plus important pour les pays moins développés parce que les rendements actuels y sont bien plus bas que ceux des pays développés et les contraintes d'adaptation agroécologique sont différentes et difficiles à surmonter. Ainsi au CNPT EMBRAPA, au début des années 80, on a commencé des croisements entre le blé et les espèces sauvages. L'haplodiploïdisation et l'electrophorèse des gluténines, ainsi que les marqueurs ADN moléculaire ont été introduits par la suite comme outils pour appuyer les programmes d'amélioration du blé et de l'orge.

HAPLODIPLOÏDISATION

Androgenèse *in vitro* du blé

En 1980, le Dr. E. Picard de l'Université Paris-Sud d'Orsay (France), invité comme consultant dans le cadre d'un Projet FAO coordonné par le Dr B. Bouglé (Food and Agriculture Organisation), a transféré les méthodes d'androgenèse *in vitro* au CNPT de Passo Fundo, (Moraes-Fernandes & Picard, 1983). Un projet spécial pour l'adaptation du blé aux climats humides avait produit en 1982 des lignées possédant une grande capacité androgénétique et représentant en même temps une avancée du point de vue de leur type agronomique. Les meilleurs haploïdes doublées (DH) ont été choisis pour participer comme parents dans de nouveaux blocs de croisement basés sur des différences pour l'architecture des plantes (hauteur de la paille), la couleur, la longueur et la pilosité des feuilles, la couleur, la hauteur et la forme des épis, la couleur et la forme du grain, la résistance aux septorioses et aux rouilles, la tolérance à l'aluminium et à l'excès d'eau dans le sol. La combinaison de tous ces caractères dans les populations F1, double, triple, ou rétrocroisements, a conduit à l'obtention en 1986 de lignées de bonne capacité androgénétique et présentant un meilleur niveau agronomique que les lignées de 1982. De 1980 à 1993, des cultures d'anthères de 1295 génotypes (F1s, ségrégations et variétés de divers programmes d'amélioration) ont été réalisées; 46 % ont produit des structures embryonnaires et 17 % ont régénéré conduisant ainsi à l'obtention de

1182 lignées haploïdes doublées. Finalement 152 lignées ont été sélectionnées pour les essais préliminaires, 8 pour les régionaux et 3 pour les essais dans le sud brésilien.

Pour enregistrer une nouvelle variété, le Comité Sud-Brésilien pour la Recherche du Blé, n'accepte seulement que les lignées que présentent des rendements supérieurs de 5 % au moins au rendement de la meilleure de trois variétés témoins, pendant trois ans d'essais, en 20 lieux différents sur le plan agroécologique. La variété blé *BR 43* enregistrée en 1991 présentait un rendement de 16 % supérieur à celui du meilleur blé témoin. La lignée haploïde doublée PF 853031 qui est devenue la variété de blé *« BR 43 »* , est la première lignée haploïde doublée de blé à avoir été enregistrée en Amérique. L'augmentation de revenus des agriculteurs pour les meilleurs rendements obtenues sur 100.000 Ha a été estimée à 121.000 Salaires Minimum ou 8,4 Million de Dollars par an.

Androgenèse pour transférer les gènes de résistance d'*Aegilops squarrosa*

En 1987 on a croisé des lignées haploïdes doublées androgénétiques avec des lignées synthétiques qui possédaient des gènes de résistance d'*Aegilops squarrosa*. On a accéléré considérablement le travail de sélection par la culture d'anthères des F1 récroisés sur le parent blé. 30 lignées haploïdes doublées ont ainsi été obtenues dans ces expériences.

Gynogenèse du blé pour la transfert des gènes de résistance à maladies d'*Agropyron elongatum*

On a fait aussi l'haplodiploïdisation par gynogenèse pour transférer les gènes d' *Agropyron*. On a pollinisé avec du pollen du maïs les descendances sélectionnées des rétrocroisements entre blés brésiliens susceptibles et *Agropyron elongatum*. Cela a donné en 1996 15 lignées haploïdes doublées d'origine *Triticum aestivum/A. elongatum* qui sont en ce moment en phase d'évaluation.

Gynogenèse du blé par croisement intergénérique blé x maïs pour l'amélioration de la qualité boulangère

A partir de 1995, la gynogenèse du blé par croisement intergénérique blé x maïs a remplacé la culture d'anthères dans le programme d'amélioration du blé et 3600 génotypes haploïdes doublés ont été obtenus par cette méthode. La sélection sur les profils de gluténines a été faite avant la multiplication. De 568 lignées produites en 1995, 51 avait la meilleur combinaison de bandes pour la qualité boulangère.

L'haplodiploïdisation par la pollinisation avec maïs a été aussi utilisée pour obtenir rapidement des lignées homozygotes à partir de croisements (*Triticum* x *Agropyron*), sélectionnés pour la résistance aux maladies cryptogamiques; 15 lignées DHM ont été évaluées.

Lignées hexaploïdes synthétiques

La production de lignées hexaploïdes synthétiques pour transférer les gènes des espèces sauvages chez le blé, a commencé en 1978, avec l'aide de la CIDA (The Canadian International Development Agency) qui a permis la consultation du Dr. E. Kerber de la Station Expérimentale de Winnipeg, Canada. On a fait des croisements entre *Triticum durum* (AABB, 2n=28) et *Aegilops squarrosa* (DD, 2n=14), suivis de la cultures des embryons et du doublement des chromosomes par le traitement avec colchicine des hybrides (ABD, 2n=21). Onze lignées synthétiques hexaploïdes homozygotes (AABBDD, 2n=42) ont été produites en 1980-1984, une méthode rapide et facile de transférer des gènes. En 12 mois, les caractères favorables des deux espèces progéniteurs ont été réunis au niveau hexaploïde. Huit lignées ont une résistance à la rouille noire meilleure que celle conférée par Sr33, une source de résistance dérivée aussi *d'Aegilops squarrosa*. De bons niveaux de résistance à l'oïdium, à la rouille de la feuille et à la fusariose ont été obtenus aussi.

Androgenèse de l'orge

La culture de l'orge dans le Sud du Brésil a besoin d'une meilleure tolérance à l'aluminium toxique du sol, à la chaleur, la sécheresse, et les maladies cryptogamiques. C'est en 1993 qu'on a commencé l'haplodiploïdisation androgénétique. Depuis 1993, la culture d'anthères a été utilisée dans le programme d'amélioration de l'orge, produisant 600 lignées haploïdes doublées d'orge. On a sélectionné 65 lignées haploïdes doublées (DH) possédant une bonne résistance à l'oïdium et une bonne qualité industrielle. Il sera possible d'accélérer l'amélioration de ces caractères de l'orge, avec les mêmes stratégies utilisées avec le blé, au commencement de la décade, tout en cherchant de conserver la capacité androgénétique.

Marqueurs moléculaires pour la résistance à la rouille des feuilles en plantes adultes

Les anciennes variétés Frontana et Toropi ont des gènes de résistance dans la plante adulte. Depuis 1996, on a produit des lignées haploïdes doublées à partir de croisements avec des variétés résistantes et on les a utilisées pour obtenir des marqueurs moléculaires associés aux gènes de résistance. Dans un travail en collaboration avec le Dr. A. Worland, du John Innes Centre (Angleterre) on a utilisé des lignées monosomiques pour la localisation de ces gènes.

CONCLUSION

La combinaison de toutes ces stratégies permettra d'accélérer le progrès génétique pour le rendement et l'adaptation dans les environnements variables des cultures du blé et de l'orge dans le Sud du Brésil. L'haplodiploïdisation est un outil important pour accélérer le progrès génétique face au défi de la production d'aliments. L'interaction interdisciplinaire est l'une des conditions les plus importantes pour une utilisation optimale des biotechnologies dans la recherche agricole et a été décisive pour les résultats décrits ci-dessus.

Bibliographie

1 MORAES FERNANDES M I B , PICARD E , 1983 Variability of haploid production by anther culture using brasilian wheat genotypes Rev Brasil. Genet. VI, 2, 261-277

A37 : Intégration des biotechnologies dans la gestion des écosystèmes fragiles méditerranéens : un exemple de formation en réseau*

[1] [2]
OUAHBI A. , EL JAAFARI S.
UFR de Biotechnologies et Environnement, Faculté des Sciences,Université Moulay Ismaïl, BP 4010, Béni M'hamed, 50000 Meknès, MAROC.

Une grande partie de la superficie des pays de la Méditerranée du Sud appartient aux zones à écosystèmes fragiles (zones arides et semi-arides, montagnes, oasis...). Des conditions naturelles et socio-économiques difficiles caractérisent ces zones. Actuellement, les formations universitaires dans le domaine de l'environnement ont plus un aspect sectoriel et souffrent de

l'absence d'approches globales appropriées favorisant la création d'équipes pluridisciplinaires capables d'intégrer différents outils dans leurs analyses des problèmes de l'environnement. Un réseau méditerranéen MED-EMMA est créé pour répondre à un besoin d'une composante formation à caractère multidisciplinaire et multi-institutionnel complémentaire aux autres activités (recherche, gestion, développement,...) réalisées par les partenaires de ce réseau. Le programme de formation des formateurs MED-CAMPUS présenté par le réseau MED-EMMA concerne l'intégration des biotechnologies dans une gestion multidisciplinaire de l'environnement des zones fragiles méditerranéennes. Cette formation devrait susciter chez les participants la nécessité d'approches multidisciplinaires leurs permettant d'être les animateurs capables d'initier des schémas favorisant la gestion des ressources (eau, sol, végétation, biodiversité). L'apport des biotechnologies et leurs intégration aux autres outils est en conséquence. Les bénéficiaires de cette formation doivent constituer le médiateur de changements dans les critères de gestion de l'environnement au niveau des institutions publiques (universités, instituts de recherche, administrations) et des entreprises. Dans ce sens une communication interinstitutionnelle doit continuer à être développée afin d'harmoniser les points de vue des différents interlocuteurs concernés. Les avantages attendus de cette formation et leur durabilité est conditionnée par le développement de cette collaboration transméditérranéenne entre les différents partenaires du réseau MED-EMMA (Algérie, Maroc, Tunisie, Syrie, Palestine, France, Belgique,...) et au sein des autres réseaux dont les institutions partenaires de ce projet sont membres (réseaux SEWANA, GRAM-Sécheresse, PRELUDE, AUPELF-UREF).

La formation théorique est organisée en 3 modules : 1- Les Biotechnologies appliquées à l'environnement, 2- La dynamique des zones rurales à fortes contraintes climatiques et gestion durable de leurs ressources , 3- La gestion multidisciplinaire de l'environnement. En plus de la formation prévue, les sessions de cours-séminaires seront l'occasion d'élaborer des projets d'intégration des différents outils disponibles (dont les biotechnologies) dans la gestion de l'environnement des zones fragiles méditerranéennes. Ces projets seront proposés à des organismes internationaux et auprès des instances nationales pour leur mise en application. L'application de ces propositions sera une occasion d'évaluer leur impact, la participation directe ou indirecte des formateurs cibles (enseignants-chercheurs, agents de développement local, population locale,...) à ces projets permettrait d'évaluer les acquis attendus.

* Programme de formation des formateurs Med-Campus « Intégration des biotechnologies dans une gestion multidisciplinaire de l'environnement des zones fragiles Méditerranéeennes » (PD/mb-DO13) 1996-1999, financé par la Communautée Européenne (DGIB/A/1).

(1) Coordinateur-adjoint du projet Med-Campus et du réseau Med-EMMA

(2) Coordinateur du projet Med-Campus et du réseau Med-EMMA

A38 : L'aspect public de la privatisation des semences

ST-PIERRE C.A.

Département de Phytologie Université Laval Ste-Foy, Québec, Canada G1K 7P4 E-mail : castpierre@plg.ulaval.ca Tél: 418-656-7939 Fax : 418-656-7856

Au cours des siècles, l'homme a progressivement mis au point des semences à partir de la riche diversité génétique des espèces présentes dans la nature. Depuis le début du vingtième siècle, une véritable industrialisation des semences a remplacé le travail artisanal de sélection des cultures, traditionnellement fait par les agriculteurs de tous les pays du monde. La diversité *in situ* des ressources génétiques de la nature a ainsi été complétée par des collections *ex situ* de

semences et plants qui s'enrichirent grâce à la sagesse, à l'ingéniosité et à l'expérience de l'homme. La diversité génétique *in situ* des espèces se reproduisant dans des écosystèmes variés et les collections *ex situ* de semences et plants forment ce qu'il est maintenant convenu d'appeler la "biodiversité végétale". Les pouvoirs du savoir, de la politique, de l'économique et de la culture de nos sociétés modernes ont ainsi modifié dramatiquement le rôle et les fonctions des paysans du monde. La traditionnelle relation directe visant un équilibre entre l'Homme et la Nature se trouve ainsi confrontée et interpellée par une relation beaucoup plus complexe de l'Homme avec la Nature par l'intermédiaire de nombreuses fonctions économiques, politiques, de recherche et d'éducation qui sont maintenant dévolues à la Société.

SECTION B

Transgenèse :

son impact et estimation des risques

Communications orales B1 à B8

B1 : Impact de la transformation génétique du colza

CHÈVRE A.M.[1], EBER F.[1], VALLÉE P.[1], PIERRE J.[2], RENARD M.[1]
[1] INRA, Station d'Amélioration des Plantes, BP29 35653 Le Rheu
[2] INRA, Laboratoire de Zoologie, BP29 35653 Le Rheu

Les nombreux travaux de recherche engagés depuis une quinzaine d'années sur la transgenèse appliquée à l'amélioration génétique du colza ont porté principalement sur la mise au point d'un système d'hybridation (système Seedlink® de Plant Genetic Systems), la résistance aux parasites, aux insectes et à certains herbicides (glyphosate, glufosinate, oxynils) ainsi que la qualité de la graine (composition en acides gras d'huiles de colza à usages alimentaires ou non alimentaires, protéines de réserve du tourteau, peptides d'intérêt pharmaceutique). Ces travaux ont abouti aux premières commercialisations en Amérique du Nord en 1995. La production aux U.S.A. de colza riche en acide laurique serait ainsi réalisée sur environ 50.000 ha en 1997. Les surfaces en colzas résistants aux herbicides cultivés au Canada en 1997 seraient de plus de 700 000 ha. Par contre, les premières mises sur le marché en Europe sont en cours d'instruction. La société Plant Genetic Systems a obtenu une autorisation partielle pour un colza hybride résistant au glufosinate.

Dès l'obtention des premières lignées transgéniques de colza, des études portant sur les risques ou les inconvénients liés aux caractères introduits ont été engagées en ce qui concerne aussi bien la qualité alimentaire de la graine et de ses produits que l'impact potentiel sur l'environnement ou les conséquences au niveau agronomique. Une telle démarche avait été antérieurement développée sur les nouvelles variétés de colza sans acide érucique (qualité alimentaire de la nouvelle huile de colza) ou double-zéro (effet de ces variétés plus appétentes sur la faune sauvage par exemple) obtenues par sélection classique.

Du fait du caractère mellifère du colza, l'étude de l'impact de différents transgènes sur la faune a été réalisée sur le modèle abeille (J. Pierre Zoologie, Rennes et M.H. Pham-Delegue, Zoologie, Bures sur Yvette). Notre équipe, en collaboration avec H. Darmency, X. Reboud, J.Gasquez (Malherbologie, INRA Dijon), C. Lavigne et P.H. Gouyon (Université Orsay), s'est intéressée aux risques de flux de gènes et plus particulièrement aux aspects concernant d'une part la dispersion du pollen et d'autre part l'introgression de transgènes dans le génome d'espèces adventices par hybridation interspécifique.

DISPERSION DU POLLEN

Le colza est une plante hermaphrodite dont le système de reproduction est mixte (20 à 30 % de fécondation croisée). De par sa forme, sa densité et son caractère collant, le pollen de colza est peu susceptible d'être transporté par le vent sur de longues distances. Cependant, des piégeages utilisant différents types de capteur placés à quelques mètres de hauteur permettent de retrouver du pollen viable jusqu'à au moins 1,5 km de distance de la source de pollen (Timmons et al, 1995). Il est donc tout à fait

possible que le pollen desséché de colza puisse être ainsi transporté par le vent sur de grandes distances quand les conditions climatiques sont favorables. Le colza très attractif est fréquenté par de nombreuses espèces d'insectes pollinisateurs appartenant à des ordres différents. Les inventaires pratiqués dans différentes conditions signalent principalement la présence d'Hyménoptères, de Diptères et plus rarement de Lépidoptères. Les Hyménoptères sont de très loin les plus représentés et plus particulièrement les abeilles domestiques qui constituent de 53 à 95 % des insectes pollinisateurs totaux. Ces insectes jouent un rôle important dans le transport du pollen de colza même si leur capacité à disséminer le pollen sur plusieurs kilomètres reste à démontrer.

L'action de ces différents vecteurs de pollen sur la dispersion du pollen de colza a été estimée à partir de dispositifs discontinus (parcelles pièges situées à différentes distances de la parcelle source) ou continus (parcelle piège entourant la parcelle source). Dans un dispositif discontinu constitué d'une parcelle source de 20 x 20 m située à 200 m ou 400 m de parcelles sources de même surface, Scheffler et al (1995) ont ainsi estimé le taux de fécondation croisée à 0,0156 % à 200 m et à 0,0038 % à 400 m. Dans un dispositif continu circulaire, Scheffler et al (1993) ont estimé le taux de fécondation croisée à 0.00033% à 47 m de distance.

Afin de préciser la courbe de dispersion du pollen de colza, nous avons mis en place à Rennes différents dispositifs :

- un dispositif circulaire composé d'une parcelle source de 3 m ou de 9 m de diamètre de colza résistant au glufosinate entourée d'une parcelle piège de colza mâle-fertile ou mâle-stérile sensible au glufosinate d'environ 100 m de diamètre ;
- un dispositif carré comprenant une parcelle source de colza résistant aux oxynils de 10 m de côté entourée d'une parcelle piège sensible aux oxynils de 90 m de côté.

Les résultats obtenus sont en cours d'analyse selon une approche discrète (dispositif circulaire) ou selon la méthode de déconvolution préconisée par Lavigne et al (1996). Le taux de fécondation croisée décroit très rapidement en fonction de la distance. Mais il apparaît clairement qu'il n'y a pas de discontinuité dans la dispersion du pollen de colza. Dans ces conditions, il n'y a pas de limite au-delà de laquelle on peut espérer obtenir un isolement complet de toute source de pollen de colza.

FLUX DE GÈNES ENTRE CRUCIFÈRES

Au départ, les travaux d'hybridation interspécifique ont été développés par les sélectionneurs de colza pour tenter d'augmenter la variabilité du colza lorsque certains caractères agronomiques étaient absents de l'espèce (gènes de résistance aux maladies, restauration de la fertilité mâle...). En revanche, aucune étude sur les flux de gènes spontanés entre le colza et les crucifères adventices endémiques n'avait jusqu'alors été réalisée du fait que :

- ces espèces présentent des structures génomiques distinctes: le colza *(Brassica napus*, AACC, 2n=38) est un amphidiploïde issu de l'hybridation spontanée entre le chou (*B. oleracea*, CC, 2n=18) et la navette *(B. rapa* syn : *B. campestris*, AA, 2n=20) alors que les espèces adventices sont diploïdes, leur nombre chromosomique variant de 2n=14 à 2n=24,
- les hybrides interspécifiques triploïdes (ACX, X étant le génome haploïde de l'adventice) sont généralement très stériles à moins que l'espèce diploïde soit l'un des progéniteurs du colza (les travaux publiés par Mikkelsen et al. (1996)

montrent en effet qu'il est possible en 2 générations d'obtenir des introgressions de colza dans le génome de navette spontanée, cette dernière espèce étant fréquente au Danemark mais rare en France).

L'absence d'informations scientifiques sur les flux de transgènes du colza vers ses adventices nous a conduit à mettre en place des programmes pour tenter de répondre aux questions suivantes :

- la production d'hybrides interspécifiques est-elle possible ?
- des échanges entre les génomes en présence peuvent-ils se produire sachant qu'ils conditionnent la possibilité d'intégration stable dans le génome de l'adventice ?
- ces hybrides peuvent-ils produire une descendance dans laquelle le transgène s'exprime après pollinisation par l'espèce diploïde ?

La méthodologie choisie pour tenter d'apporter des réponses à ces questions a consisté à faire les croisements interspécifiques en serre dans un premier temps puis au champ en conditions favorables à l'hybridation interspécifique, c'est-à-dire en l'absence de pollen de colza en utilisant des plantes mâle-stériles puis en situation agronomique normale.

Dans un premier temps, l'étude a été réalisée en conditions contrôlées, par croisements manuels réciproques et sauvetage *in vitro* d'embryons.

La variété de colza transgénique utilisée était la variété canadienne de printemps, « Westar », contenant le gène *bar* qui confère la résistance au glufosinate (nom commercial Basta®). Les espèces adventices étudiées ont été choisies sur la base des connaissances acquises sur leur proximité phylogénétique relative avec le colza et sur celle de leur importance en tant que mauvaises herbes dans les cultures :

- le chou (*B. oleracea*, CC, 2n=18), une des espèces parentales du colza,
- la moutarde des champs ou sanve (*Sinapis arvensis*, SarSar, 2n=18),
- la ravenelle (*Raphanus raphanistrum*, RrRr, 2n=18)
- la moutarde noire (*B. nigra*, BB, 2n=16),
- la roquette bâtarde (*B. adpressa*, syn: *Hirschfeldia incana* AdAd, 2n=14).

Tableau 1 : Nombre d'hybrides interspécifiques produits pour 100 fleurs soit par croisement manuel et sauvetage d'embryons (A) soit en conditions naturelles, en utilisant la variété de colza 'Brutor' mâle stérile comme parent femelle (B).

Croisements	A	B
B. napus x B. oleracea	20,1	--
B. oleracea x B. napus	1,1	--
B. napus x H. incana	11,6	1,9
H. incana x B. napus	2,5	--
B. napus x B. nigra	4,2	--
B. nigra x B. napus	0,0	--
B. napus x Sinapis arvensis	3,7	0,2
Sinapis arvensis x B. napus	0,0	--
B. napus x Raphanus raphanistrum	1,2	2,8-23,8
Raphanus raphanistrum x B. napus	2,8	--

Des hybrides interspécifiques ont été produits pour toutes les combinaisons étudiées (Kerlan *et al*, 1992 ; **tableau 1**). Un plus grand nombre d'hybrides a cependant été

obtenu en utilisant le colza comme parent femelle, à l'exception de ceux impliquant la ravenelle. Aucun hybride ne s'est développé lorsque la moutarde noire ou la moutarde des champs était utilisée comme parent femelle.

Lorsque le gène *bar* est présent, il est exprimé, conférant ainsi aux hybrides interspécifiques la résistance au Basta®. Les hybrides ont généralement la structure génomique attendue (ACX), c'est-à-dire les génomes haploïdes du colza (AC) et de l'espèce sauvage (X). Cependant, parmi les hybrides colza-chou, colza-moutarde des champs et colza-ravenelle, des amphidiploïdes (AACCXX) ont été observés ; ils présentent une méiose presque régulière mais il n'a été possible de produire une descendance qu'à partir des amphidiploïdes obtenus avec le chou (Kerlan, 1992). L'analyse du comportement méiotique des hybrides triploïdes (ACX), comparé à celui d'haploïdes (AC) issus des colzas ayant permis de les produire, révèle que les pourcentages d'appariement varient en fonction du génome X (Kerlan *et al*, 1993; **tableau 2**). Ce sont les hybrides avec le chou, la ravenelle, la moutarde noire et la moutarde des champs qui présentent le plus fort taux d'appariement chromosomique lequel permet des échanges intergénomiques. Les hybrides avec la roquette bâtarde présentent par contre une inhibition de l'appariement chromosomique homéologue. Aucun effet cytoplasmique sur le taux d'appariement des chromosomes n'a été observé. La fertilité pollinique des hybrides varie de 0 à 30 %.

Les hybrides F1 interspécifiques étant peu fertiles, la production de graines est faible après croisements manuels et sauvetage d'embryons (Kerlan, 1992 : **tableau 3**).

Dans un second temps, les résultats présentés ci-dessus nous ont conduits à réaliser des essais au champ en conditions favorables à l'hybridation interspécifique, c'est-à-dire en utilisant comme parent femelle des colzas mâle-stériles (stérilité cytoplasmique *Ogu*-INRA). Deux facteurs ont été étudiés : l'espèce adventice et le génotype du colza.

Tableau 2 : Analyse du nombre moyen de chromosomes appariés des hybrides interspécifiques triploïdes issus de croisement manuel avec la variété 'Westar' transgénique suivi de sauvetage d'embryons (A) ou en conditions naturelles en utilisant la variété de colza 'Brutor' mâle stérile comme parent femelle (B).

Hybrides F1	Génomes	2n	A Nombre moyen de chromosomes appariés	B Nombre moyen de chromosomes appariés
B. napus x H. oleracea	ACC	28	18,1	--
B. napus x H. incana	ACAd	26	7,7	13,0-6,7
B. napus x B. nigra	ACB	27	12,4	--
B. napus x H. Sinapis arvensis	ACSar	28	11,5	19,1
B. napus x Raphanus raphanistrum	ACRr	28	13,0	15,3
B. napus haploïdes	AC	19	7,4	12,5

Tableau 3 : Nombre de graines obtenues pour 100 fleurs à partir d'hybrides interspécifiques soit après croisement manuel et sauvetage d'embryons (A) ou en conditions naturelles en présence de l'espèce adventice diploïde (B).

Croisements	A	B
B. napus x H. oleracea	0,8	--
B. oleracea x B. napus	0,3	--
B. napus x H. incana	0,3	0,2-0,3
H. incana x B. napus	0,0	--
B. napus x B. nigra	0,3	--
B. nigra x B. napus	--	--
B. napus x H. Sinapis arvensis	0,5	0,1
Sinapis arvensis x B. napus	--	--
B. napus x Raphanus raphanistrum	0,6	0,1-1,7
Raphanus raphanistrum x B. napus	0,6	--

Comparaison de différentes adventices

Les adventices étudiées sont les plus fréquentes dans les conditions françaises de culture à savoir la ravenelle, la roquette bâtarde et la moutarde des champs. Pour chacune de ces espèces, un isolement a été mis en place selon un dispositif en bandes alternées avec du colza de printemps mâle stérile, variété de printemps 'Brutor' mâle-stérile et non transgénique, selon un ratio 1/1. La production d'hybrides interspécifiques, identifiés parmi les graines présentant un diamètre inférieur à 1,6 mm, est présentée **tableau 1** (Eber *et al.*, 1994 ; Chèvre *et al.*, 1996).

Les hybrides interspécifiques produits sont vigoureux et ont une morphologie proche de celle du colza. L'observation du comportement méiotique (**tableau 2**) et des fertilités mâle et femelle ont confirmé les premières observations réalisées. L'implantation au champ, selon un dispositif équivalent à celui utilisé pour produire la première génération, a été réalisée : les hybrides F1 interspécifiques ont été cultivés en présence de l'espèce adventice. La production de plantes supposées issues de rétrocroisement par l'espèce adventice (« BC1 ») est faible (**tableau 3** ; Eber *et al.* 1994 ; Chèvre *et al*, 1996).

Ces études ont permis d'identifier la ravenelle comme étant l'espèce sauvage, parmi celles analysées, présentant la plus forte aptitude à l'hybridation avec le colza et une fréquence élevée d'appariements chromosomiques intergénomiques (Eber *et al*, 1994 ; Chèvre *et al*, 1996). Cette espèce est de plus l'une des principales adventices du colza en France. Pour la poursuite de l'étude, le modèle colza-ravenelle a donc été retenu.

Effet du génotype de colza sur la production d'hybrides interspécifiques avec la ravenelle

• *Effet du fond génétique colza sur la production d'hybrides interspécifiques avec la ravenelle*

Nous avons pu noter lors de l'étude du modèle colza mâle stérile - ravenelle que :

- les 10 génotypes de colza analysés, dont 5 produits à partir de la variété 'Westar' de colza contenant le gène *bar* de résistance au Basta®, présentent des aptitudes à l'hybridation interspécifique significativement différentes (**tableau 4** ; Baranger et al.

1995) ; il est important de noter que la période de floraison de la ravenelle coïncide avec celle du colza et que les variétés de colza d'hiver, principalement cultivées en France sous forme de lignées ou d'hybrides, présentent la plus forte aptitude à l'hybridation interspécifique;

- les hybrides F1 interspécifiques sont aussi vigoureux, ont toujours une morphologie proche de celle du colza et sont résistants au Basta® lorsque le transgène est présent. Ce dernier a une transmission mendélienne. Les hybrides interspécifiques ont généralement la structure génomique attendue (ACRr, 2n=28) à l'exception des quelques amphidiploïdes (AACCRrRr, 2n=56), et leur fertilité est fortement réduite ;
- les hybrides « BC1 », issus des graines récoltées sur des hybrides F1, sont généralement résistants au Basta® lorsque la plante-mère est résistante; la majorité d'entre eux a une morphologie proche de celle de la ravenelle ; ils ont des structures génomiques très distinctes : soit identiques à celle de la plante-mère (ACRr, 2n=28), soit de type BC1 (ACRrRr, 2n=37), soit de type amphidiploïde (AACCRrRr, 2n=56), soit à nombre chromosomique intermédiaire ; les plantes ayant le plus faible nombre de chromosomes présentent la meilleure fertilité femelle ;
- les hybrides « BC2 » produits dans les mêmes conditions, présentent majoritairement un nombre de chromosomes plus proche de celui de la ravenelle. Leur fertilité est meilleure que celle de la génération précédente, en revanche, le taux de transmission du transgène diminue ;
- les hybrides « BC3 » présentent un faible nombre de chromosomes. Peu d'entre eux présentent le transgène. Ces descendances sont actuellement en cours d'expérimentation.

Tableau 4 : Production d'hybrides interspécifiques en fonction du génotype maternel de colza.

		1993		1994	
	Génotypes	Nb gr	Nb gr	Nb gr	Nb
Lignées	**Brutor**	2,7	8,3	1,5	33,1
	Miyuki	1,4	5,3	8,1	38.9
	Drakkar	27,6	210,6	26,6	233,0
	Samourai	**26,4**	**206,1**	**37,7**	**525,6**
	Hobson	**41,3**	**202,1**	**95,4**	**1058,3**
Hybrides F1	**Brutor-WestarT5 Basta®**	37,4	175,0	17,3	175,7
	Miyuki-WestarT5 Basta®	28,9	393,6	25,5	361.2
	Drakkar-WestarT5 Basta®	15,9	89,8	29,3	250,2
	Samourai-WestarT5 Basta®	**88,6**	**445,0**	**47,8**	**498,9**
	Hobson-WestarT5 Basta®	**68,4**	**556,5**	**100,4**	**1213,3**

Les variétés d'hiver sont présentées en caractères gras.

• *Effet de la localisation du transgène sur le génome de colza*

Parallèlement, les risques de transfert pouvant être différents en fonction du site d'insertion du transgène dans le génome de colza, différents transgènes ont été localisés sur la carte génétique du colza et des hybrides interspécifiques entre la

ravenelle et ces différents événements de transformation ainsi que leurs descendances ont été produits.

Dans un premier temps, la même variété 'WestarT5' portant une copie du gène *bar* à l'état homozygote a donc été croisée avec la variété asiatique « Miyuki ». A partir de l'hybride F1, des haploïdes doublés ont été produits. Cette population en ségrégation a été utilisée pour constituer 2 mélanges d'ADN de 10 plantes résistantes au Basta® et de 10 plantes sensibles. L'utilisation de la méthode de marquage moléculaire avec des RAPD a permis d'identifier des marqueurs du site d'insertion (Baranger, 1995). La comparaison avec la carte génétique du colza (Foisset *et al.* 1996) a révélé que le transgène, placé en partie terminale d'un groupe de liaison, pourrait se trouver en position télomérique (Baranger *et al*, 1997). De plus ces marqueurs permettront de suivre la zone dans laquelle s'est inséré le transgène dans les différentes générations d'hybrides interspécifiques obtenues.

Parallèlement, sept plantes issues de sept événements différents de transformation de la variété « Westar », contenant le gène de la nitrilase, *Brnx,* conférant la résistance aux herbicides de la famille des oxynils, à l'état homozygote, ont été croisées avec la variété mâle stérile « Brutor ». Les hybrides F1 ayant la même structure génotypique mais des sites d'insertion supposés différents ont été :

- rétrocroisés par la variété 'Brutor' et par la variété 'Westar' afin de marquer par la même méthode que précédemment ces sites d'insertion,
- placés au champ en présence de ravenelles. Les hybrides F1 interspécifiques ont été produits ainsi que leur descendance. Les plantes « BC1 » sont en cours d'expérimentation.

L'étude des générations avancées de rétrocroisement par la ravenelle devrait permettre, connaissant la position initiale du transgène, de préciser si cette dernière a un effet.

Dans un troisième temps, des essais ont été réalisés en conditions agronomiques normales en association avec la ravenelle.

Un essai a été mis en place dans le cadre du projet Inter-Instituts en 1996 afin de déterminer quel peut être le taux d'hybrides interspécifiques en conditions de compétition pollinique. Un champ de 1ha de la variété 'Synergy' (80 % d'hybrides F1 mâle-stériles, hétérozygotes pour le gène *pat* conférant la résistance au Basta® + 20 % d'une lignée contenant 2 copies à l'état homozygote du transgène) a été implanté à Rennes et à Dijon. Selon un dispositif défini par H. Darmency (Malherbologie, INRA Dijon), des ravenelles à fleurs blanches ont été repiquées soit en tant que plantes isolées, soit en peuplement plus ou moins dense, en bordure et en milieu de champ. Les notations ont permis d'observer une bonne synchronisation des floraisons du colza et de la ravenelle. Les ravenelles ont été récoltées plante à plante. Les graines seront semées et les plantes traitées au Basta® pour identifier les hybrides interspécifiques. Un échantillonnage de graines de colza a également été récolté par prélèvement manuel et à la moissonneuse batteuse. Nos résultats antérieurs indiquant que les hybrides interspécifiques sont présents parmi les graines de diamètre inférieur à 1,6mm, seules ces dernières seront étudiées. Les plantes obtenues étant toutes résistantes au Basta®, seules les notations au printemps de plantes à fleurs blanches couplées à des études de cytométrie en flux indiqueront la présence d'hybrides interspécifiques.

CONCLUSION

L'utilisation de la transgenèse constitue une révolution dans le domaine de la sélection, ce qui justifie les mesures de précaution qui sont prises par le biais des différentes commissions. Des questions d'éthique se poseront en raison de l'accès à une variabilité génétique quasi illimitée. La décision de mise sur le marché sera prise au cas par cas en fonction principalement du caractère apporté.

Dans le cas du colza, le sélectionneur sera amené dans certaines situations à privilégier à court terme l'approche traditionnelle de la sélection, dans la mesure du possible, du fait des interrogations qui persistent en relation avec la biologie florale de cette espèce et des possibilités d'hybridation spontanée avec certaines crucifères adventices. Dans nos conditions, il paraît illusoire de vouloir isoler totalement une parcelle de colza transgénique de tout autre champ de colza, aucune distance limite d'isolement ne pouvant être définie. Les travaux entrepris sur la ravenelle permettront quant à eux de préciser les risques réels de flux de gènes dans cette espèce. Sachant qu'en dehors des progéniteurs du colza, la ravenelle est certainement l'espèce pour laquelle le risque de flux de gènes apparait le plus élevé, jusqu'à présent aucune plante à 18 chromosomes et résistante au glufosinate n'a encore été mise en évidence dans notre étude. Au vu des premiers résultats obtenus, les difficultés rencontrées dans la dissémination de colzas génétiquement modifiés concerneront plus le domaine de l'intraspécifique (fécondation croisée et surtout gestion des repousses) que le domaine de l'interspécifique. Les questions soulevées par les colzas génétiquement modifiés rejoignent en fait en grande partie celles posées par la diversification de la production de colza à usages alimentaires ou non alimentaires. Il faut signaler que des travaux ont été initiés par certaines équipes pour tenter de réduire les risques de flux de gènes à partir de cette espèce (morphologie florale, incompatibilité interspécifique) et tenter de mieux gérer les repousses (itinéraires techniques, approche génétique dont la résistance à l'égrenage).

Bibliographie

1. BARANGER A., 1995. Évaluation en conditions naturelles des risques de flux d'un transgène d'un colza (*Brassica napus*) résistant à un herbicide à une espèce adventice (*Raphanus raphanistrum*). Thèse de l'université d'Orsay n° d'ordre 3668, pp 97.
2. BARANGER A., CHEVRE A.M., EBER F., RENARD M., 1995. Effect of oilseed rape genotype on the spontaneous hybridization rate with a weedy species : an assessment of transgene dispersal. Theor. Appl. Genet. 91: 956-963.
3. BARANGER A., DELOURME R., FOISSET N., BARRET P., DUPUY P., RENARD M., CHEVRE A.M., 1997. Wide mapping of a T-DNA insertion site in rapeseed using bulk segregant analysis and comparative mapping (soumis)
4. CHEVRE A.M., EBER F., BARANGER A., KERLAN M.C., BARRET P, VALLEE P., RENARD M., 1996. Interspecific gene flow as a component of risk assessment for transgenic Brassicas. Ninth Crucifer genetic workshop, ISHS, Ed. J.S. Dias, I. Crute, A.A. Monteiro, Acta Horticulturae 407: 169-179.
5. EBER F., CHEVRE A.M., BARANGER A., VALLEE P., TANGUY X., RENARD M., 1994. Spontaneous hybridization between a male sterile oilseed rape and two weeds. Theor. Appl. Genet. 88 : 362-368.
6. FOISSET N., DELOURME R., BARRET P., HUBERT N., LANDRY B.S., RENARD M., 1996. Molecular-mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers on a doubled-haploid progeny. Theor. Appl. Genet. 93 : 1017-1025.

7. HEYN F.W., 1977. Analysis of unreduced gametes in the Brassiceae by crosses between species and ploidy levels. Z. Pflanzenzücht. 78 : 13-30.
8. KERLAN M.C., CHEVRE A.M., EBER F., 1993. Interspecific hybrids between a transgenic rapeseed (*Brassica napus* L.) and related species : cytogenetical characterization and detection of the transgene. Genome 36 : 1099-1106.
9. KERLAN M.C., CHEVRE A.M., EBER F., BARANGER A., RENARD M., 1992. Risk assessment of outcrossing of transgenic rapeseed to related species : I. Interspecific hybrid production under optimal conditions with emphasis on pollination and fertilization. Euphytica 62 : 145-153.
10. LAVIGNE C., GODELLE B., REBOUD X., GOUYON P.H., 1996. A method to determine the mean pollen dispersal of individual plants growing within a large pollen source. Theor Appl. Genet. 93: 1319-1326.
11. SCHEFFLER J.A., PARKINSON R., DALE P., 1993. Frequency and distribution of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). Transgenic research 2:356-364.
12. SCHEFFLER J.A., PARKINSON R., DALE P.,1995. Evaluating the effectiveness of isolation distances for field plot of oilseed rape (*Brassica napus*) using a herbicide-resistance transgene as a selectable marker. Plant Breeeding 114: 317-321.
13. SONG K., OSBORN T.C., WILLIAMS P.H., 1988. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment lenght polymorphisms (RFLPs). 1. Genome evolution of diploid and amphidiploid species. Theor. Appl. Genet. 75 : 784-794.
14. TIMMONS A.M., O'BRIEN E.T., CHARTERS Y.M., DUBBELS S.J., WILKINSON M J , 1995 Assessing the risks of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp *oleifera*. Euphytica 85: 417-423.

B2 : Impact de colzas transgéniques exprimant des inhibiteurs de protéases sur coléoptères phytophages et sur abeilles

JOUANIN L.[1], BONADÉ-BOTTINO M.[1], GIRARD C.[1], LE MÉTAYER M.[2], ZACCOMER B.[1]*, PICARD NIZOU A.L.[2], LERIN J.[3], PHAM DELÈGUE M.H.[2].

[1] Laboratoire de Biologie cellulaire, INRA, 78026 Versailles Cedex, France

[2] Laboratoire de Neurobiologie comparée des invertébrés, INRA, 91440 Bures/Yvette, France

[3] Station de Zoologie, 86600 Lusignan, France

* Adresse actuelle: Semences Cargill, BP17, 28310 Toury, France

INTRODUCTION

Le colza (*Brassica napus* L.) est une plante très cultivée en Europe (2 680 000 ha en 1996 dont 865 000 ha en France). Une grande partie de ce colza est plantée pour des usages alimentaires (huile, tourteaux...). La nécessité de laisser une partie des surfaces agricoles en jachère a stimulé la culture du colza à usage industriel (580 000 ha en 1996 pour la CEE). Le colza héberge de nombreux insectes qui ne sont pas tous nuisibles, toutefois les plus importants phytophages nécessite un contrôle de population (Cetiom, 1997). Certains de ces insectes comme la mouche du chou, le charançon du bourgeon terminal, l'altise, et le puceron cendré sont actifs en automne. Les autres se trouvent en printemps. Par ordre chronologique, il faut citer, le charançon de la tige, la méligèthe, le couple charançon des siliques/cécidomye, le baris, et les pucerons cendrés. Un seul de ces insectes (principalement des coléoptères) ne peut être considéré comme le ravageur principal du colza. L'attaque du colza à différents moments de sa culture fait qu'il est souvent nécessaire d'effectuer plusieurs traitements insecticides. Ces traitements sont coûteux et ne doivent être réalisés que si le nombre d'insectes atteint un certain seuil (différent pour chaque ravageur). De plus, le colza étant une plante mellifère, très visitée par les abeilles en période de floraison, il est primordial de n'utiliser que certains insecticides non nocifs pour cet insecte. Il serait très intéressant à différents niveaux (protection de l'environnement, coût cultural, simplification de la conduite de la culture...) de planter des variétés de colza plus résistantes aux insectes phytophages. L'utilisation des biotechnologies est une nouvelle voie d'obtention de telles plantes: la création de colzas transgéniques exprimant des protéines entomopathogènes pourrait contribuer à la protection de cette culture, tout en limitant l'emploi d'insecticides. La principale stratégie de création de plantes transgéniques résistantes aux insectes consiste à introduire et à exprimer dans le génome des plantes des delta-endotoxines de la bactérie, *Bacillus thuringiensis* (Vaek, 1987 ; Perofoen, 1992, 1997 ; Estruch *et al*, 1997). Toutefois, cette voie d'approche n'est pas adaptée au cas du colza car ces toxines possèdent un spectre d'hôte étroit et sont surtout actives sur des lépidoptères. La plupart des insectes ravageurs du colza sont des coléoptères, non sensibles aux toxines de *B. thuringiensis*. Une autre voie d'approche consiste à introduire et à exprimer dans les plantes des

gènes codant pour des inhibiteurs de protéases (IP) capables d'interférer avec la protéolyse digestive des insectes. L'ingestion de ces protéines par les insectes se traduit par des retards de développement et/ou une mortalité larviaire accrue. Cette stratégie a été décrite pour la première fois en 1987 sur un lépidoptère (Hilder *et al*, 1987). Nous avons essayé d'adapter cette stratégie pour la lutte contre les coléoptères chez le colza en utilisant 2 différents d'inhibiteurs de protéases. Toutefois, le colza étant une plante mellifère, il est important de vérifier que l'expression de ces protéines n'a pas d'effet sur l'abeille.

LES INHIBITEURS DE PROTÉASES

Les protéases appartiennent à quatre familles correspondant aux 4 mécanismes réactionnels indentifiés :

- protéases à sérine : trypsine, chymotrypsine, élastase ;
- protéases à cystéine : papaïne, bromélaïne, différentes cathepsines ;
- métallo-protéases : carboxypeptidases ;
- aspartyl protéases : pepsine, chymosine.

Face aux 4 types de protéases, on trouve 4 types d'inhibiteurs. Les IPs sont de petites protéines (généralement de PM inférieur à 25kDa) classées en famille en fonction de leurs spécificités et de leurs homologies (Ryan, 1990).

Dans les plantes, les IPs semblent remplir plusieurs fonctions :

- la régulation de la mise en place des réserves dans la graine ;
- la régulation des réserves lors de la germination ;
- la défense des graines ou des organes de réserve ;
- la défense des parties végétatives. Dans ce cas, les IPs sont inductibles par la blessure pour la défense contre les insectes ou inductibles par des éliciteurs pour la défense comme des pathogènes.

Les endoprotéases majoritaires dans le tube digestif des insectes étant de type sérine et/ou cystéine (Christeller *et al*, 1992; Murdock *et al*, 1987), nous nous sommes intéressés aux IPs à serine (= serpine) et aux IPs à cystéine (= cystatine) d'origine végétale.

Des essais d'alimentation artificielle comprenant de tels IPs sur différents insectes ont montré que l'ingestion de ces protéines pouvait avoir un effet délétère sur la croissance larvaire et entraîner la mort (Gatehouse *et al*, 1992 ; Boulter, 1993). Les IPs testés étaient principalement des IP à sérine sur des lépidoptères ou des IPs à cystéine sur des coléoptères.

Au début de notre travail, il n'existait aucune information sur les protéases digestives des insectes cibles pour le colza. De plus, si de nombreuses publications démontraient que les lépidoptères dépendent essentiellement de protéases à sérine pour leur digestion, Murdock *et al* (1987) avaient montré la présence de protéases à cystéine chez des coléoptères. En parallèle avec une caractérisation des protéases de certains insectes ravageurs du colza, nous avons choisi d'introduire dans cette plante les ADNc d'un IP à serine et d'un IP à cystéine. Nous avons choisi l'IP de type Bowman Birk CII isolé de graine de soja possédant une activité antitrypsine et anti chymotrypsine (Joudrier *et al*, 1987) et l'IP à cystéine OCI isolé de grain de riz (Abe *et al*, 1987). Ces ADNc ont été insérés dans des vecteurs de transformation sous le contrôle du promoteur de l'ARN 35S du virus du chou fleur (p35S) dont la séquence activatrice a été doublée (p70). La séquence leader Ω' du virus de la mosaïque du tabac a été ajoutée en 5' afin d'augmenter l'efficacité de la traduction. Le vecteur comprend

également le gène de la néomycine phosphotransférase (*nptII*) conférant la résistance à la kanamycine aux cellules transformées et le gène de la β-glucuronidase (*gus*).

TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE DU COLZA

Une méthode de transformation génétique du colza dérivée de celle publiée par Moloney *et al* (1989) a été utilisée sur le génotype de colza de printemps 00 Drakkar. Des pétioles de cotylédons prélevés sur des plantules de 3 jours cultivées en conditions stériles sont co-cultivés pendant 1h avec la souche C58pMP90 d'*Agrobacterium tumefaciens* possédant un vecteur binaire contenant les gènes *npt*II, *gus* et de l'IP. Après une culture de 48h sous lumière continue sur milieu RCC (Pelletier *et al*, 1983) en boite de Petri, les explants sont transférés sur milieu de régénération additionné de 15mg/l de kanamycine et placés en chambre de culture (26°C, 16h de jour/8h de nuit). Après 4 à 6 semaines, les bourgeons apparus sur les cals sont transférés sur milieu neuf additionné de céfotaxine et de tétracycline. Les plantules sont transférées en serre après enracinement.

En utilisant ce protocole, une dizaine de lignées ont été obtenues par construction. Des hybridations moléculaires de type northern ont permis de déterminer celles qui expriment le gène de l'IP à un fort niveau. Les lignées comportant un seul site d'insertion ont été identifiées par analyse de la ségrégation de la descendance sur kanamycine, et par des hybridations de type Southern. Les plantes sélectionnées ont été autofécondées afin d'avoir des lignées homozygotes. Les essais sur insectes ont été réalisés sur des descendants de ces lignées.

Pour les plantes exprimant l'IP à cystéine OCI, des expériences de type Western et ELISA réalisées avec un anticorps anti-OCI (Leplé *et al*, 1995) ont permis de déterminer le niveau de production de la protéine dans les différents tissus consommés par les insectes ravageurs. L'activité de la protéine OCI a été démontrée par la capacité des plantes transgéniques à inhiber la papaïne.

Tableau 1: Production d'OCI dans les tissus de la lignée OCI-4B.

	Jeunes feuilles	Pétioles	Graines	Pollen	Nectar
% des protéines solubles	0,1 à 0,3	0,03 à 0,07	0,05	Non détectée	Non détectée

La caractérisation des plantes exprimant l'IP à sérine CII s'est avérée beaucoup plus délicate car il n'a pas été possible de fabriquer un anticorps anti-CII et le colza possède des activités anti protéases à sérine endogènes qui perturbent la mesure de l'activité anti-trypsine. La production de la protéine due au transgène n'induit pas une très forte augmentation de cette activité. Actuellement, nous ne connaissons pas les raisons de cette faible accumulation de CII dans les tissus de colza. Des lignées contenant OCI et CII ont été obtenues par croisement et quelques bioessais ont été réalisés avec ces doubles transformants.

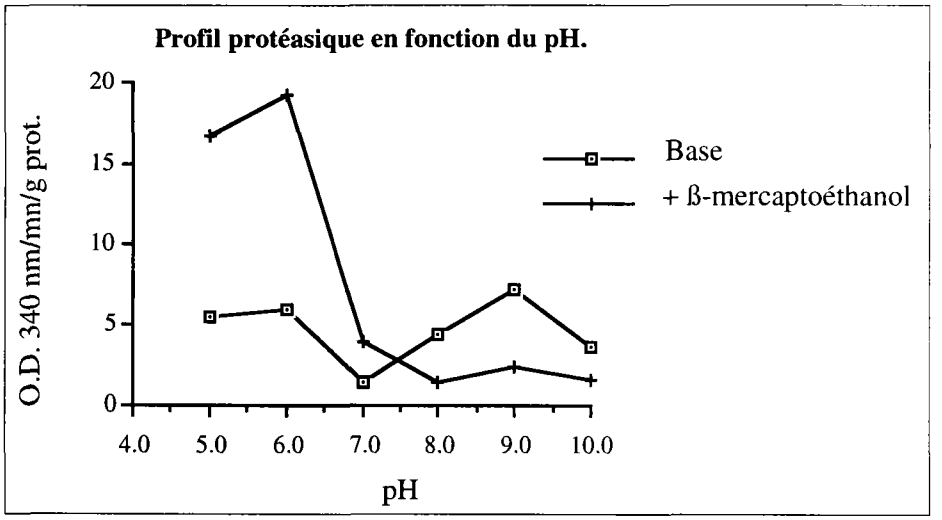
CARACTÉRISATION DES PROTÉASES DE PLUSIEURS COLÉOPTÈRES RAVAGEURS DU COLZA

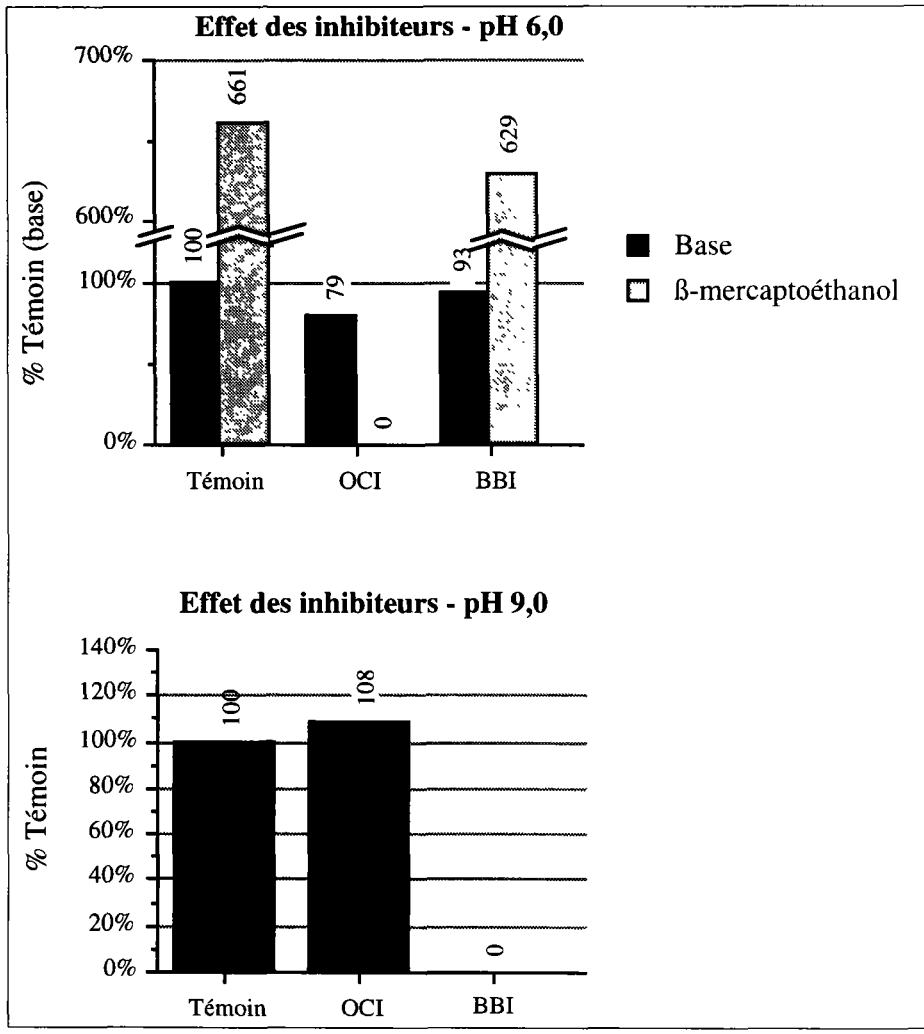
Les activités protéasiques de larves des 4 insectes, le baris (*Baris coerulescens*), l'altise (*Psylliodes chrysocephala*, le charançon des tiges (*Ceutorhynchus napi*) et le charançon des siliques (*Ceutorhynchus assimilis*) ont été déterminées sur une large

gamme de pH en présence ou sans agent réducteur (DTT, β-mercaptaéthanol). Leur inhibition par des agents spécifiques des différents types de protéases ainsi que par les IPs OCI (produit dans *E. coli*) et BBI (un IP similaire à CII, disponible commercialement) a été étudiée. De plus des gels d'activité (Michaud *et al* ; 1993) ont permis de caractériser les différentes protéases digestives de ces insectes.

Deux pics d'activité protéasique sont observés pour chaque insecte. Le premier pic à pH 6 ou 5 correspond à des protéases à cystéine. Cette activité est fortement réduite en présence de OCI. Le second pic détecté à pH 9 ou 10 correspond à des protéases à sérine et est inhibé par BBI. Ces résultats montrent que les larves de ces coléoptères ravageurs du colza possèdent les 2 types d'activité protéasique, sérine et cystéine. Toutefois, le pic correspondant à l'activité de protéases à cystéine est souvent le plus important et les plantes exprimant OCI ont été testées en premier.

Figure 1 : Activité endoprotéasique de la larve de charançon de la tige et effet d'inhibiteurs.





TESTS SUR PLANTES

Les coléoptères ravageurs du colza ne peuvent pas être élevés en laboratoire. Il est donc nécessaire de récolter des adultes dans les champs au moment opportun et de faire pondre les femelles. Les œufs ou les jeunes larves nées au laboratoire sont déposées sur les plantes de colza normal ou transgénique. Tous les bioessais ont été réalisés sur plante entière cultivée en conditions contrôlées en serre. En effet, à part pour l'altise adulte qui consomme des feuilles, seules les larves causent des dégats et sont foreuses (collet pour Baris, tige pour le charançon de la tige, graine pour le charançon des siliques). Vers la fin du développement larvaire, les larves sont récupérées sur plantes témoins et transformées, pesées et leur contenu en protéases est déterminé aux 2 pics correspondant aux maxima d'activités.

Chez les 4 insectes testés, les résultats ont été décevants. En effet, contrairement à ce qui avait été observé pour les larves de *Chrysomela tremulae* élevées sur des peupliers transgéniques exprimant OCI (Leplé *et al*, 1995) aucune mortalité ou retard dans le développement larvaire n'ont été observés. Au contraire, dans le cas de certains

insectes du colza, les larves consommant les plantes transgéniques sont plus grosses. Les analyses sur gels montrent des perturbations des profils de protéases digestives. Ainsi pour l'altise, une augmentation des 2 types de protéases est observée (tableau 2). Pour le charançon des siliques une protéase à cystéine est absente pour les larves élevées sur colzas transgéniques. Dans le cas du charançon des siliques et du baris, la détermination des protéases digestives après ingestion de plantes transgéniques est en cours. Les bioessais réalisés sur les doubles transformants (OCI + CII) donnent des résultats identiques à ceux obtenus avec les plantes exprimant OCI seul.

Tableau 2 : Résultats des tests avec l'altise.

De 3 à 5 larves ont été déposées au collet des plantes. Les larves ont été récoltées 14 jours après l'infestation.

Larves récoltées sur :	Plantes contrôles	Plantes exprimant OCI
Nombre de plantes infestées	16	13
Nombre de larves déposées	45	41
Nombre de larves survivantes	21	18
Poids (mg) ± SD	0,64 ± 0,25	1.1 ± 0,34
Activité protéasique à pH 6	100 %	167 %
Activité protéasique à pH 9	100 %	240 %

Sur gel d'activité, une plus forte intensité des différentes bandes est observée mais aucune nouvelle bande n'est détectée.

EFFETS SUR ABEILLE

OCI n'a pas été détecté dans le pollen et dans le nectar des colza transgéniques (tableau 1). Il semble que chez les crucifères, le promoteur 35S ne permette pas l'expression dans cet organe. Les risques d'ingestion des IPs par les abeilles au cours de leurs visites sont donc réduits. Toutefois, ce n'est pas le cas pour toutes les plantes (le même promoteur permet une expression dans le pollen de tabac ; Wilkinson *et al*, 1997). Il est donc important d'évaluer l'impact des IPs sur l'abeille (*Apis mellifera*). L'abeille possède essentiellement des protéases digestives à sérine (Belzunces et al, 1994). Différentes expériences ont d'abord été réalisées avec des doses d'IP voisines de celles produites dans les feuilles des plantes transgéniques (26 µg/l). Aucune toxicité à court et long terme de OCI et de BBI (similaire à CII) n'a été montrée. Les performances olfactives des abeilles ne sont pas perturbées et en situation de choix entre plantes normale et transgénique, aucune différence n'a été décélée au niveau du butinage (Girard *et al*, 1998). À cette dose, aucune modification du profil protéasique n'est observée.

Toutefois, afin d'établir un seuil de toxicité des IPs, des études ont été réalisées avec 3 différentes doses d'IP (0,1/ 1/ 10 mg/l). Les 2 premières doses (0,1 et 1 mg/l) correspondent à des niveaux d'expression compatibles avec une production *in planta*. Aucun effet d'OCI n'a été observé sur la mortalité à long terme, les performances d'apprentissage et le profil protéasique de l'abeille quelle que soit la dose. Ces résultats sont tout à fait compatibles avec le fait que l'abeille ne possède pas de protéase à

cystéine. Par contre, BBI dès 1 mg/l n'induit pas de mortalité sur le long terme mais perturbe les protéases digestives. Les abeilles consommant BBI à 10 mg/l ont une durée de vie réduite, des performances d'apprentissage olfactif perturbées (analysée par des expériences d'extension conditionnée du probocis en réponse à une odeur) et une forte augmentation des protéases digestives à sérine.

Des études sont en cours afin de déterminer si des perturbations peuvent être observées au niveau de la ruche si des IPs sont concentrés dans le miel qui sert à nourrir les larves. Les techniques mises au point pour ce travail seront utilisées pour tester les éventuels effets délétères sur l'abeille d'autres molécules à activité insecticide.

CONCLUSION

De nombreux travaux ont montré que différents inhibiteurs de protéases incorporés dans des diétes artificielles pouvaient induire des retards de développement larvaires et de la mortalité. Toutefois, la plupart de ces expériences a été réalisée sur des lépidoptères en utilisant des IPs à sérine. Quelques essais ont également montré un effet des IPs à cystéine sur des coléoptères (Liang *et al*, 1991; Edmonds *et al*, 1996). Le premier résultat montrant l'intérêt de la stratégie d'expression d'IP dans des plantes transgéniques concerne l'expression de CpTI, un IP à sérine isolé du Niébé (Hilder *et al*, 1987) dans le tabac. Plusieurs autres publications démontrent l'intérêt de cette stratégie pour différents lépidoptères phytophages (Johnson et al, 1989 ; McManus *et al*, 1994 ; Duan *et al*, 1996 ; Xu *et al*, 1996) tandis qu'une seule montre l'effet de l'ingestion de plantes exprimant un IP à cystéine, OCI, sur un coléoptère (Leplé *et al*, 1995). Nous avons voulu tester l'efficacité de cette stratégie vis-à-vis des coléoptères ravageurs du colza. Nous avons montré que ces coléoptères possèdent un pool de protéases digestives complexe de type sérine et cystéine. Des expériences réalisées *in vitro* ont montré que ces protéases sont respectivement sensibles à BBI et OCI. Sur la base de ces résultats, des lignées de colzas transgéniques exprimant un IP à cystéine (OCI isolé du soja), ou un IP à sérine de type Bowman-Birk isolé du soja (CII), ont été obtenues. Le niveau d'expression de OCI dans les colzas transgéniques est correct alors que celui de CII est faible. Les bioessais réalisés avec les larves de 4 insectes ravageurs du colza démontrent que l'ingestion des colzas exprimant OCI (et dans certains cas, des colzas exprimant OCI + CII) ne provoque pourtant pas de mortalité ni de retard dans le développement larvaire. Il a été montré que ces coléoptères sont capables de compenser l'inactivation d'un type de protéase par une hyperproduction de cette protéase ou par une augmentation d'une autre protéase. Des résultats semblables ont été observés chez le doryphore (Bolter et Jongsma, 1996). Ces résultats montrent une grande adaptibilité de ces insectes à l'ingestion prolongée d'un IP produit de manière continue dans une plante. Ils nous incite à faire des études plus fines entre protéases d'insectes et IP. D'autres équipes utilisant les IP sont arrivées à des conclusions identiques (Jonsgma *et al*, 1996 ; Michaud, 1997 ; Jonsgma et Bolter, 1997).

Les effets directs ou indirects sur abeille des IPs exprimés des plantes transgéniques ont été étudiés. Les abeilles possèdent des protéases à sérine (Girard *et al*, 1998). Néanmoins, l'ingestion d'un IP à sérine en alimentation artificielle, à des doses similaires à celles produites dans les plantes transgéniques, ne provoque pas de mortalité à court et long terme. Seule la consommation de doses beaucoup plus élevées induit une augmentation de mortalité à long terme. L'ingestion de l'IP à cystéine OCI ne provoque pas de mortalité même à forte dose. Le comportement de

butinage observé en cage de vol est identique pour les plantes témoins et les plantes transformées.

Une meilleure connaissance des interactions entre protéases d'insectes et inhibiteurs permettra peut être d'affiner la stratégie afin d'obtenir des plantes plus résistantes aux insectes. Ces résultats montrent également que pour que cette stratégie puisse se développer, il est urgent d'identifier de nouvelles protéines insecticides (Hallahan *et al*, 1992). En effet, de plus en plus de travaux montrent que l'expression d'une seule toxine de *B. thuringiensis* ne permettra pas de conférer une résistance durable et qu'il est souhaitable d'associer plusieurs protéines à activité entomopathogène possédant des modes d'action différents (Estruch *et al*, 1997 ; Peferoen, 1997). De plus, les toxines de Bt sont actives sur un nombre restreint d'insectes en particulier dans le cas des coléoptères. Le verrou de cette stratégie n'est donc pas la possibilité de transformer la plante cible mais de disposer de gènes codant pour des substances actives sur les insectes ravageurs de cette plante.

Remerciements

Les travaux sur insectes ravageurs et abeilles ont reçu le soutien de la Société Rustica-Prograin-Génétique et de la Fondation Limagrain. Les travaux sur les effets à long terme des IPs font partie du programme Européen Biotech ITI (PL96-365). Ce travail a également bénéficié de la collaboration avec la station d'amélioration des plantes de l'INRA de Rennes et de la Station expérimentale de Rothamsted (UK).

Bibliographie

1. ABE K., EMORIS Y., SUZUKI K., ARAA S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (Oryza/cystatin). J Biol Chem, 262 (1987) 16793-16797.
2. BELZUNCES L.P., LENFANT C., DI PASQUALE S., COLLIN M.E.. *In vivo* and *in vitro* effects of wheat germ agglutinin and Bowman Birk soybean trypsin inhibitor, two potential transgene products, on midgut esterase and protease activities from *Apis mellifera*. Comp. Biochem. Physiol. 109B (1994) 63-69.
3. BOLTER C.J., JONGSMA M.A. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decenlineata*) adapts to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. J. Insect Physiol., 12 (1995) 1071-1078.
4. D. BOULTER. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops Phytochem ., 34 (1993) 1453-1466.
5. CETIOM. Colza d'hiver : le contexte économique, les techniques culturales, les débouchés. 1997.
6. CHRISTELLER J.T., LAING W.A., MARKWICK N.P., BURGESS E.P.J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae - Dietary and protease inhibitor interactions Insect Biochem Mol Biol., 22 (1992) 735-746.
7. DUAN X., LI X., XUE Q., ABO-EL-SAAD M., XU D., WU R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. Nature Biotech., 14 (1996) 494-498.
8. EDMONDS H.S., GATEHOUSE L.N., HILDER V.A., GATEHOUSE J.A. The antimetabolic effects of oryzacystatin on larvae of the Southern corn rootworn (*Diabrotica undecimpunstata howard*); use of a bacterial expression system for oryzacystatin. Entomol. Exp. Appl., 78 (1996) 83-94.
9. ESTRUCH J.J., CAROZZI N.B., DESAI N., DUCK N.B., WARREN G.W., KOZIEL M.G. Transgenic plants : an emerging approach to pest control. Nature Biotech., 15 (1997) 137-141.
10. A.M.R. GATEHOUSE, V.A. HILDER et D. BOULTER, Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. Dans Biotechnology in Agriculture N° 7: Plant genetic manipulation for crop protection. CAB International, 1992, pp 155-181.

11. GIRARD C., PICARD-NIZOU A.-L., ZACCOMER B., GRALLIEN E., JOUANIN L., PHAM-DÉLÉGUE M.-P. Risk assessment of proteinase inhibitors expressed in transgenic crops : toxicity and behavioural effects on the honeybee. Transgenic Res., 7 (1998) 1-8.
12. HILDER V.A., GATEHOUSE A.M.R., SHEERMAN S.E., BARKER R.F., BOULTER D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature, 333 (1987) 160-163.
13. HALLAHAN D.L., PICKET J.A., WADHAMS L.J., WALLSGROVE R.M., WOODCOCK C. Potential of secondary metabolites in genetic engineering of crops for resistance. Dans Biotechnology in Agriculture n° 7 : Plant genetic manipulation for crop protection. CAB International, 1992, pp 215-248.
14. JOHNSON K.A., NARVAEZ J., GYNHEUNG A., RYAN C.A. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants : Effect on natural defense against *Manduca sexta* larvae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 (1989) 9871-9875.
15. JONGSMA M.A., STIEKEMA W.J., BOSCH D. Combatting inhibitor-insensitive proteases of insect pests. TIBTECH., 14 (1996) 331-333.
16. JONGSMA M.A., BOLTER C. The adaptation of insects to plants protease inhibitors. J. Insect Physiol., 43 (1997) 885-895.
17. JOUDRIER P.E., FOARD D.E., FLOENER L.A., LARKINS B. Isolation and sequence of cDNA encoding the soybean protease inhibitors PIIV et CII. Plant Mol Biol, 10 (1987) 35-42.
18. LEPLÉ J.-C., BONADÉ-BOTTINO M., AUGUSTIN S., PILATE G., DUMANOIS-LE TÂN V, DELPLANQUE A., CORNU D., JOUANIN L. Toxicity to *Chrysomela tremulea* (Coleoptera : Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. Mol Breeding 1 (1995) 319-328.
19. LIANG C., BROOKHART G., FENG G.H., REECK G.R., KRAMER K.J. Inhibition of digestive proteinase of the stored grain coleoptera by oryzacystaytin, a cysteine protease inhibitor from rice seeds. FEBS Lett., 278 (1991) 139-142.
20. MC MANUS M.T., WHITE D.W.R., MC GREGOR P.G. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. Transgenic Res., 3 (1994) 50-58.
21. MESQUIDA J., MARLILLEAU R., PHAM-DÉLÉGUE M.-H., RENARD M. A study of rapeseed (*Brassica napus* var. oleifera Metzger) flower nectar secretion. Apidologie 19 (1988) 307-318.
22. MOLONEY M.M., WALKER J.M., SHARMA K.K. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. Plant Cell Rep., 8 (1989) 238-242.
23. MICHAUD D., FAYE L., YELLE S.. Electrophoretic analysis of plant cysteine and serine proteinases using gelatin-containing polyacrylamide gels and class-specific proteinase inhibitors. Electrophoresis 14 (1993) 94-98.
24. MICHAUD D. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. Trends Biotech., (1997) 15 : 4-6.
25. MURDOCK L.L., Brookhart G., Dunn P.E., Foard D.E., Kelley S., Kitch L., Shade R.E., Shudkle R.H., Wolfson. Cysteine digestive proteinase in coleoptera. Comp. Biochem. Physiol., 87 (1987) 783-787.
26. PEFEROEN M. Engineering of insect-resistant plants with *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. Dans Biotechnology in Agriculture n°7 : Plant genetic manipulation for crop protection. CAB International, 1992, pp 135-153.
27. PEFEROEN M. progress and prospects for field use of Bt genes in crops. TIBTECH 15 (1997) 173-177.
28. PELLETIER G., PRIMARD C., VEDEL F., CHÉTRIT P., REMY R., ROUSELLE P., RENARD M. Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion. Mol Gen. Genet., 191 (1983) 244-250.
29. RYAN C.A., Proteinase inhibitors in plants : genes for improving defenses against insects and pathogens. Ann. Rev. Phytopathol., 28 (1990) 939-943.
30 THOMAS J.C., WASMANN C.C., ECHT C., DUNN R.L., BOHNERT H.J., MC COY T.J. Introduction and expression of an insect proteinase inhibitor in alfalfa. Plant Cell Rep., 14 (1994) 31-36.
31. THOMAS J.C., ADAMS D.G., KEPPENNE V.D., WASMANN C.C., BROWN J.K., KANOST M.R., BOHNERT H.J.. *Manduca sexta* encoded protease inhibitors expressed in *Nicotiana tabacum* provide protection against insects. Plant Physiol. Biochem., 33 (1995) 611-614.
32. VAECK M., REYNAERTS A., HÖFTE H., JANSENS S., DE BEUCKELEER M., DEAN C., ZABEAU M., VAN MONTAGU M., LEEMANS J. Transgenic plants protected from insect attack. Nature, 327 (1987) 33-37.
33. WILKINSON J.E., TWELL D., LINDSEY K. Activities of CaMV 35S and nos promoteurs in pollen : Implications for field release of transgenic plants. J. Exp. Bot., 48 (1997) 265-275.
34. XU D., XUE Q., MC ELROY D., MAWAL Y., HILDER V.A., WU R. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTi, in transgenic rice plants confers resistance to two major insect pests. Mol. Breeding, 2 (1996) 167-173.

B3 : Régénération efficace et rapide de plantes transgéniques après transformation d'entre-nœuds de Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) *via Agrobacterium tumefaciens*

BEAUJEAN A., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S.
Université de Picardie Jules Verne, Faculté des Sciences, Laboratoire Androgenèse et Biotechnologie, Ilot des Poulies, 33, rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex 01, FRANCE

INTRODUCTION

La Pomme de terre est l'une des plantes agronomiques les plus importantes au niveau mondial, notamment du fait de sa haute productivité et de sa teneur élevée en amidon, vitamines et protéines. Mais, en raison de sa tétraploïdie et de la stérilité mâle de nombreuses plantes, la sélection par les méthodes classiques de caractères intéressants est très longue et délicate, voire impossible pour certains caractères. Les techniques de culture *in vitro,* et plus particulièrement la transformation génétique *via Agrobacterium tumefaciens* rendent aujourd'hui possible la création de nouvelles variétés résistantes à différents types d'agression (maladie, herbicide, prédateur). Plusieurs protocoles de transformation génétique utilisant des feuilles, des entre-nœuds ou des disques de tubercule ont déjà permis de régénérer des plantes transgéniques. En raison de la faible fréquence de transformation obtenue et de la variation somaclonale importante ainsi décrite dans la littérature, il apparaît intéressant de développer de nouvelles méthodes de transformation génétique, permettant en un minimum de temps, la formation de bourgeons transgéniques en nombre important.

La variété Désirée est la variété la plus utilisée en transformation génétique malgré son importance économique relativement faible, car elle est très réactive en culture *in vitro* et permet des manipulations sur de nombreux organes (De Block, 1988 ; Ooms *et al.*, 1987 ; Wenzler *et al.*, 1989).

La variété Bintje et la variété Kaptah Vandel sont des variétés très importantes en Europe, Bintje de par ses qualités gustatives et culinaires, Kaptah Vandel de par ses qualités féculières. De nombreux travaux font état dans la littérature de la relative difficulté à régénérer en peu de temps et en grand nombre de nouvelles plantes transgéniques notamment sur la variété Bintje (Hänisch ten Cate *et al.*, 1988; Ottaviani *et al.*, 1993).

Nous reportons, ici, les travaux concernant la transformation génétique *via Agrobacterium tumefaciens* des variétés Bintje, Désirée et Kaptah Vandel à partir de deux types d'explants : les entre-nœuds et les feuilles. La méthode originale employée nous a permis d'obtenir en six semaines de nombreux bourgeons transgéniques sur les trois variétés. Nous n'avons pas observé de variations somaclonales sur les bourgeons transgéniques ainsi produits.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel végétal

Les plants de Pomme de terre cv. Désirée, Bintje et Kaptah Vandel sont cultivés de manière axénique sur un milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné de 20 g/l de saccharose et 8 g/l d'agar (Danagel) en chambre de culture avec une photopériode de 16h à 22°C. Les échantillons foliaires et internodaux sont prélevés après 4 semaines de culture sur ce milieu.

Matériel bactérien

La bactérie C58C1rif employée lors de nos expériences de transformation génétique est une *Agrobacterium* possédant un plasmide binaire. Elle nous a été fournie par J. LEEMANS (PGS, Gent, Belgique). Le plasmide pGS Gluc 1 possède entre les bordures de son T-DNA le gène NPT II codant pour la néomycine phosphotransférase conférant la résistance à la kanamycine et le gène Gus codant pour la β-glucuronidase (Sangwan *et al.*, 1991).

Régénération/transformation

Deux types d'explants ont été utilisés pour la transformation : les explants foliaires et internodaux. Ceux-ci sont prélevés sur des plantes âgées de 4 à 5 semaines.

Seuls les 6 premiers entre-nœuds et les 5 premières feuilles sont prélevés. Les entre-nœuds, d'une longueur d'environ 4 à 6 mm, sont découpés dans le sens de la longueur et les feuilles sont dégagées de leurs extrémités. Directement après dissection, les explants sont plongés dans du MS liquide dans lequel ont été ajoutés 10 % d'inoculum bactérien ensemencé 15 h avant dans du LB liquide. Après 30 min, les explants sont séchés sur papier puis déposés sur le milieu d'initiation CIM. Les échantillons foliaires sont placés la face abaxiale contre le milieu et les entre-noeuds la face coupée contre le milieu. Après 3 jours de coculture, les explants sont rincés dans du MS liquide additionné de claforan à 1 g/l pendant 30 min. Après séchage, les échantillons sont cultivés sur le milieu d'initiation CIM complété de 250 mg/l de Claforan et de 125 mg/l de Kanamycine (CIMs) puis repiqués sur un milieu d'organogenèse SIMs également complété de ces mêmes antibiotiques aux mêmes concentrations.

Après apparition des bourgeons, ceux-ci sont prélevés et repiqués sur un milieu d'enracinement (RIMs).

Analyse par cytométrie de flux

La détermination du niveau de ploïdie a été réalisée en cytométrie de flux par analyse avec un cytomètre (Partec CA II, Chemunex) comme décrit dans la littérature (Brown *et al.*, 1991 ; Sangwan *et al.*, 1991, 1992). Nous avons utilisé de jeunes feuilles provenant de plantes témoins et de plantes transgéniques passées en serre. Les suspensions de noyaux sont obtenues par coupage de 0.3g de feuille dans le tampon décrit par Brown (1991). Après filtration sur filtre de 30 µm, 10 µl de DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole) sont ajoutés à la solution qui est placée ensuite 15 min à 4°C. Chaque histogramme représente la distribution de la fluorescence de 3 000 noyaux environ.

Détermination de l'expression du gène Gus

L'activité enzymatique de la β-glucuronidase est détectée histochimiquement par la méthode de Jefferson (1987). Les explants de plantes potentiellement transgéniques sont incubés à 37°C pendant une nuit avec du 5-bromo-4-chloro-3-indolylglucuronide (X-Gluc) dans un tampon phosphate.

Amplification de l'ADN par PCR

L'ADN des plantes potentiellement transgéniques et des contrôles positif et négatif a été extrait suivant la méthode décrite par Rogers et Bendich en 1988. La présence du gène NPT II nouvellement introduit a été montrée en utilisant la technique PCR décrite par Sambrook *et al.*, 1989. Le gène NPT II a été amplifié à l'aide des primers : 201-222 : 5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG-3' ; 900-879 : 5'-ATC GGG AGG GGC GAT ACC GTA-3'. La taille du fragment que nous devons obtenir est de 700bp.

RÉSULTATS

Transformation à partir d'entre-noeuds

Nous avons donc réalisé la transformation génétique, à partir d'explants internodaux et foliaires sur une combinaison de milieux CIM2, CIM2s et SIM2s. Les protocoles utilisant des entre-nœuds pour permettre la régénération de plantes utilisent des entre-nœuds entiers (Ooms *et al.*, 1987 ; Visser *et al.*, 1989). Pour nos expériences, nous avons utilisé des entre-noeuds que nous avions préalablement coupés longitudinalement en deux parties égales. Ce protocole nous a permis d'obtenir un nombre de bourgeons important sur les deux variétés Bintje et Désirée, notamment sur les explants internodaux pour lesquels nous obtenons une moyenne de, respectivement, 3,7 et 6,4 bourgeons par explant (**Figure 1**). Mais, du fait de la phase cal relativement importante par cette méthode, nous avons obtenu plusieurs bourgeons (> 15 %) ayant une ploïdie anormale.

Utilisation d'une cytokinine forte lors de la régénération

C'est pourquoi nous avons utilisé une méthode différente impliquant une cytokinine forte, la zéatine riboside. Il est apparu que le temps de culture sur le milieu CIM3s est prépondérant pour obtenir dans un second temps une régénération de bourgeons sur le milieu d'organogenèse. Ainsi, après trois jours de coculture sur le milieu CIM3, nous avons placé les explants sur le milieu CIM3s pendant une période allant de 3 à 11 jours. Après cette période les explants sont repiqués sur le milieu SIM3s. On constate que les explants foliaires et internodaux, des deux variétés testées, cultivés de trois à six jours sur CIM3s se nécrosent après quinze jours de culture sur le milieu SIM3s (**Tableau 1**). En revanche, on note l'apparition de bourgeons sur les différents explants cultivés de sept à dix jours sur CIM3s après 3 semaines de culture sur SIM3s (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Pourcentage de transformation en fonction de la durée de culture sur le milieu de callogenèse CIM3 sur les variétés Bintje et Désirée.

		% de transformation[a]				
	(jours)	3	5	7	9	11
Bintje	**Entre-nœud**	0	0	24,7	**95,2**	55.9
	Feuille	0	0	28,3	**97,3**	67.4
Désirée	**Entre-nœud**	0	0	0	**88,7**	53.1
	Feuille	0	0	17,4	**91,2**	63.5

[a] *Résultats relevés après trois semaines de culture sur le milieu SIM3. Pour chaque expérience, 150 explants ont été mis en culture.*

Pour la suite de nos expériences, nous avons utilisé une période de culture sur le milieu CIM3s de 9 jours. Cette méthode nous a permis d'obtenir un grand nombre de bourgeons, 6 à 11 bourgeons par explant, sur les trois variétés que nous avons testées (Tableau 2), ceci dans une période de 4 à 6 semaines.

Tableau 2 : Pourcentage de transformation et nombre de bourgeons transgéniques formés sur les trois variétés testées

	type d'explant	Nombre d'explants[a]	% transformation[b]	Nb de bourgeons/explant[c]
Désirée	entre-nœud	155	88,7 (± 3,7)	**,8** (± 0,34)
	feuille	147	91,2 (± 4,1)	**10,8** (± 0,3)
Bintje	entre-nœud	163	95,2 (± 2,8)	**9,3** (± 0,87)
	feuille	172	97,3 (±5,3)	**11,4** (± 0,76)
Kaptah Vandel	entre-nœud	124	74,7 (± 3,4)	**8,2** (± 1,13)
	feuille	118	81,6 (± 4,8)	**11,3** (± 0,46)

[a] 3 répétitions de 50 (≈) explants par expérience. [b] % d'explants formant au moins un bourgeon après trois semaines de culture sur le milieu SIM3. [c] Nombre de bourgeons s'enracinant sur le milieu RIMs après trois semaines de culture.

Ces bourgeons ont ensuite été prélevés et repiqués sur le milieu RIMs. Après une semaine de culture sur ce milieu, 100 % des bourgeons s'enracinent et forment de nouvelles plantes transgéniques. En effet, dans la littérature, la concentration en antibiotiques utilisée est relativement faible dans les milieux de culture par rapport à la concentration utilisée ici. C'est pourquoi nous observons un taux d'échappement nul par cette méthode.

Analyse des plantes régénérées

Ces plantes ont ensuite été passées en serre. Une analyse morphologique et une analyse de la ploïdie par cytométrie en flux ont été effectuées sur ces plantes. En effet, l'un des problèmes le plus souvent rencontré en régénération/transformation de la Pomme de terre est le taux de variation somaclonale important rencontré sur les plantes régénérées (Hänish ten Cate *et al.*, 1987 ; Higgins *et al.*, 1992). Une inspection morphologique sur 150 plantes transgéniques provenant d'explants cultivés soit sur la série 1 soit sur la série 2 de milieux passées en serre révèle la présence de 8 plantes ayant une morphologie perturbée provenant d'explants cultivés sur la série 1. Cependant, aucune anomalie morphologique n'a été observée sur les plantes dérivant d'explants cultivés sur la série 2. Nous avons ensuite déterminé le taux de ploïdie des plantes transgéniques par cytométrie de flux. La position des pics était comparée aux pics obtenus avec des plantes témoins non transgéniques. Nous avons analysé 100 plantes transgéniques obtenues à partir d'explants cultivés sur la série 1 ou sur la série 2 de milieux. Cela nous a permis de mettre en évidence la présence de plantes provenant de la série 1 de milieux possédant une ploïdie différente des plantes témoins (**Figure 2C-D**), notamment chez les plantes présentant des anormalités morphologiques.

Afin de confirmer l'état transgénique des plantes, nous avons effectué des tests Gus sur des feuilles de plantes potentiellement transgéniques ainsi que sur des feuilles provenant de plantes témoins. Les feuilles transgéniques montrent une forte activité Gus alors qu'aucune activité de l'enzyme β-glucuronidase n'a pu être détectée chez les contrôles. L'intégration et l'expression du transgène semblent donc être stables dans les cellules de Pommes de terre transgéniques.

Analyse par PCR

Une analyse par PCR sur 20 plantes régénérées après transformation génétique nous a permis de mettre en évidence la présence dans le génome de la Pomme de terre du gène NPT II. En effet, les plantes transgéniques présentent une bande d'amplification à 700 bp, comme attendue, alors que les plantes témoins ne présentent pas cette bande d'amplification (**Figure 5**). La concentration en kanamycine, relativement élevée, utilisée dans les différents milieux de culture permet la sélection des bourgeons transgéniques sans que l'on puisse observer la présence d'échappement.

CONCLUSION

Nous avons mis au point une méthode reproductible de transformation régénération sur les variétés Bintje, Désirée et Kaptah Vandel sur des explants foliaires et internodaux provenant de plantes cultivées *in vitro*. Sur les 3 variétés et sur les 2 types d'explants, nous avons obtenu des pourcentages de régénération importants (6 à 11 bourgeons par explant). Les analyses par PCR et par cytométrie nous ont permis de montrer que ce protocole de transformation permet la régénération de nombreux bourgeons transgéniques ayant une ploïdie identique aux plantes mères n'ayant pas subi cette transformation. Dans la littérature, de nombreux auteurs reportent les problèmes de variation somaclonale rencontrés (Ooms et al, 1987 ; Visser et al 1989). Ces variations sont dues en partie au passage par une phase cal importante lors de la régénération des bourgeons chez la Pomme de terre. Les analyses de ploïdie effectuées montrent que ces variations sont essentiellement dues au nombre de chromosomes présents dans les bourgeons régénérés comme Ooms *et al*, 1987, avaient déjà montré ce phénomène. De plus, l'utilisation de cette technique semble être variété indépendante. Cela peut être dû à l'utilisation de zéatine, qui, comme chez De Block 1988, permet ici une régénération importante de bourgeons chez trois variétés différentes.

De plus, nous avons montré que la transformation sur la variété Kaptah Vandel était possible. Nous obtenons en effet, un pourcentage de transformation supérieur à 90 % avec la formation de 8 à 11 bourgeons par explant.

La possibilité d'obtenir un grand nombre de bourgeons en peu de temps permettra de sélectionner plus facilement des Pommes de terre développant un caractère agronomique intéressant ainsi que la possibilité d'utiliser cette plante pour effectuer des recherches fondamentales.

Composition des milieux de culture

On désigne par CIM, les milieux d'induction de la callogenèse, par SIM les milieux d'induction des bourgeons, par RIM le milieu inducteur de l'enracinement.

Tous les milieux ont pour base le milieu MB :

MB = MS macroéléments, microéléments, vitamines, fer chélaté + 25 g/l saccharose + 8 g/l agar.

Pour les milieux de callogenèse et d'organogenèse contenant des antibiotiques (300 mg/l de claforan + 125 mg/l kanamycine), ceux-ci sont notés respectivement CIMs et SIMs.

Série de milieux 1
CIM2 = BM + BAP (1 mg/l) + NAA (0,1 mg/l) + GA3 (0,1 mg/l)
SIM2s = BM + BAP (1 mg/l) + GA3 (0,1 mg/l) + kanamycine (125 mg/l) + cefotaxime (300 mg/l)
RIMs = BM + AIA (0, 1mg/l) + kanamycine (80 mg/ l) + céfotaxime (200 mg/l)

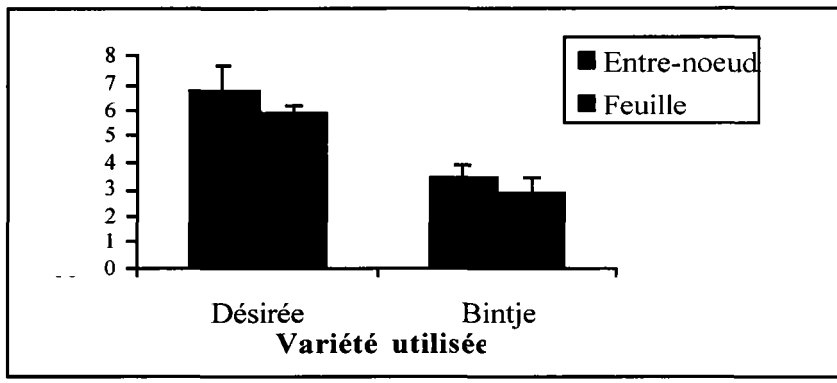
Série de milieux 2

CIM3 = BM +ZR (0,8mg/l) + 2.4-D (2 mg/l)

SIM3s = BM + ZR (0,8 mg/l) + GA3 (2 mg/l) + kanamycine (125 mg/l) + céfotaxime (300 mg/l)

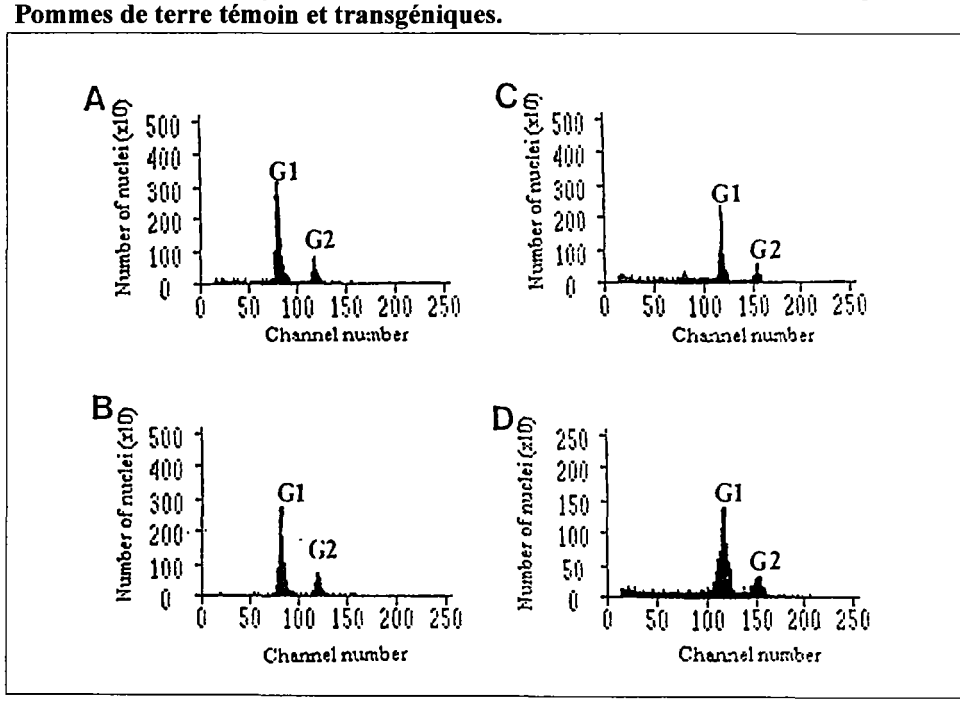
RIMs = BM + AIA (0,1mg/l) + kanamycine (80 mg/l) + cefotaxime (200 mg/l)

Figure 1. Nombre de bourgeons transgéniques obtenus en fonction du type d'explants et de la série de milieux utilisée.



Résultats relevés après trois semaines de culture sur le milieu RIMs 150 explants ont été mis en culture en trois répétitions de 50 explants par expérience par variété et par type d'explant.

Figure 2 A-D : Histogrammes du contenu en ADN des noyaux isolés de plants de Pommes de terre témoin et transgéniques.



A : plante tétraploïde témoin non transformée, B : Plante transgénique obtenue après culture sur la série de milieuxÊ2 ; C-D : Plantes transformées octoploïdes obtenues après culture sur la série 1.

Remerciements

Nous tenons à remercier plus particulièrement les Dr. C. ASSAF-DUCROCQ et L. DUVIVIER-LAVIEVILLE pour leur aide ainsi que la Station de Beaurains de la FNPPPT pour la production des différentes variétés utilisées pour nos expériences. Ce travail a bénéficié du support financier du Conseil Régional de Picardie, Association Biopôle Végétal.

Bibliographie

1. BROWN S.C., BERGOUNIOUX C., TALLET S., MARIE D. (1991). Laboratory guide for cellular and molecular plant biology, pp 326-345. Eds. I. Negrutiu, G. Gharti-Chhetri, Birkahäuser Verlag Basel, Switzerland.
2. DE BLOCK M. (1988). Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Theor. Appl. Genet., 76 : 767-774.
3. HANISCH TEN CATE C.H., RAMULU K.S (1987). Callus growth, tumour development and polyploidization in the tetraploid potato cultivar Bintje. Plant Science, 49 : 209-216.
4. HANISCH TEN CATE C.H., ENNIK E., ROEST S., RAMULU K.S., DIJKHUIS P., DE GROOT B. (1988). Regeneration and characterization of plants from potato root lines transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Theor Appl genet, **75** : 452-459.
5. HIGGINS E.S., HULME J.S., SHIELDS R. (1992). Early events in transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science, 82 : 109-118.
6. JEFFERSON R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants : the GUS gene fusion system. Plant Molecular Biology Reporter., 5 : 387-405.
7. MURASHIGE T., SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiol. Plant., 15 : 473-479.
8. OOMS G., BURRELL M.M., KARP A., BEVAN M., HILLE J. (1987). Genetic transformation in two potato cultivars with T-DNA from disarmed *Agrobacterium*. Theor. Appl. Genet., 73 : 744-750.
9. OTTAVIANI M-P., SMITS T., HANISCH TEN CATE C.H. (1993). Differential methylation and expression of the β-glucuronidase and neomycin phosphoyransferase genes in transgenic plants of potato cv. Bintje. Plant Science, 88 : 73-91.
10. ROGERS S.O., BENDICH A.J. (1988). Extraction of DNA from plant tissues. Plant Mol. Biol. Manual, A6 : 1-10.
11. SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989). Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor, 2nd eds, NY.
12. SANGWAN R.S., BOURGEOIS Y., SANGWAN-NORREEL B.S. (1991). Genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* zygotic embryos and identification of critical parameters influencing transformation efficiency. Mol. Gen. Genet., 230 : 475-485.
13. SANGWAN R.S., BOURGEOIS Y., BROWN S.C., VASSEUR G., SANGWAN-NORREEL B.S. (1992). Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. Planta, 188 : 439-456.
14. VISSER R.G.F., JACOBSEN E., HESSELING-MEINDERS A., SCHANS M.J., WITHOLT B., FEENSTRA W.J. (1989). Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious regeneration on leaf and stem segments. Plant Molecular Biology, 12 : 329-337.
15. WENZLER H., MIGNERY G., MAY G., PARK W. (1989). A rapid and efficient transformation method for the production of large numbers of transgenic potato plants. Plant Science, 63 : 79-85.

B4 : La transformation génétique des arbres tropicaux fixateurs d'azote de la famille des casuarinacées

FRANCHE C., BOGUSZ D., LAPLAZE L., DUHOUX E.
Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Arbres (ORSTOM/GeneTrop), 911 avenue Agropolis, BP 5045, 34 032 Montpellier cedex 1, France.
Tél : 04 67 61 10 12- Fax : 04 67 63 82 65- Email : franche@mpl.orstom.fr.

Dans les régions tropicales arides et semi-arides, les arbres de la famille des *Casuarinaceae* ont un rôle écologique extrêmement important. Grâce à leur aptitude à établir une symbiose avec un micro-organisme fixateur d'azote appelé *Frankia*, ces ligneux sont des espèces pionnières, colonisatrices de sols pauvres dont elles vont restaurer la fertilité (National Research Council, 1984). L'établissement de la symbiose implique le développement d'un nouvel organe, le nodule (appelé actinorhize pour les plantes vivant en symbiose avec *Frankia*), qui est le site de la fixation d'azote (Berry et Sunell, 1990). Il faut souligner que les plantes actinorhiziennes (c'est-à-dire vivant en symbiose avec *Frankia*) constituent, après les légumineuses, le deuxième groupe de plantes capables de fixer biologiquement l'azote atmosphérique.

La famille des *Casuarinaceae* comprend quatre genres, *Casuarina, Allocasuarina, Ceuthostoma* et *Gymnostoma*, et plus de 90 espèces d'arbres et d'arbustes dont l'aire d'origine s'étend de l'Australie aux îles du Pacifique et au sud-est de l'Asie (pour revue, voir National Research Council, 1984). Les *Casuarinaceae* possèdent des rameaux chlorophylliens à activité photosynthétique et des feuilles réduites à des écailles membraneuses verticillées, limitant les pertes en eau et leur permettant de survivre dans des climats chauds et secs. En association avec *Frankia* et des champignons mycorhiziens, les *Casuarinaceae* peuvent croître sur des sols marginaux carencés en azote et en phosphore. La famille des *Casuarinaceae* comprend des essences tropicales, subtropicales ou méditerranéennes, adaptées à différents climats (arides à humides), à différentes altitudes (0 à 3000 m) et à différents types de sols (acides à alcalins). L'ensemble de ces propriétés facilite l'introduction de ces arbres en zone tropicale, en dehors de leur aire d'origine. Les *Casuarinaceae* sont largement utilisées dans les régions tropicales pour enrichir les sols, fixer les terrains érodés et les dunes mobiles, et produire du fourrage et de la biomasse (Diem et Dommergues, 1990). Le bois de *Casuarina* possède également un pouvoir calorifique très élevé et constitue une source importante de charbon de bois ; il est également utilisé pour fabriquer des outils agricoles ou plus rarement pour produire de la pâte à papier.

À l'inverse des symbioses *Rhizobium*-Légumineuses qui font l'objet de nombreuses études du fait de leur intérêt agronomique (beaucoup d'espèces sont des plantes vivrières ou des plantes fourragères), peu de laboratoires étudient les symbioses actinorhiziennes. Le but poursuivi par notre laboratoire est de comprendre les interactions moléculaires qui président à l'établissement et au fonctionnement de la symbiose entre *Casuarina* et *Frankia*, afin de pouvoir obtenir des symbioses plus performantes et mieux adaptées aux stress de l'environnement.

Parallèlement à un programme d'isolement de gènes végétaux symbiotiques, nous avons entrepris de mettre au point des systèmes de transformation génétique sur deux espèces, *Allocasuarina verticillata* et *Casuarina glauca*. Les plantes transgéniques sont utilisées d'une part, comme outil de recherche fondamentale pour l'étude des gènes symbiotiques de la plante hôte, et d'autre part, comme moyen d'amélioration génétique des *Casuarina* grâce à l'introduction de gènes d'intérêt (tolérance aux pathogènes ou modification de la qualité de la lignine). Les différentes méthodes de transformation génétique des *Casuarinaceae* mises au point dans notre laboratoire seront décrites dans cet article.

LA TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE DES *CASUARINACEAE* PAR *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

La sensibilité des *Casuarinaceae* à plusieurs souches d'*A. rhizogenes* a été mise à profit pour obtenir des plantes transgéniques d'*Allocasuarina verticillata* (Phelep *et al.*, 1991). Les souches d'*A. rhizogenes* A4RS et 2659 ont été inoculées sur des jeunes plantes d'*A. verticillata* cultivées *in vitro*. Des racines transgéniques se sont développées sur le site d'inoculation, puis ont été excisées et cultivées en culture pure sur milieu gélosé. Deux mois après inoculation, des bourgeons sont apparus spontanément sur les racines transformées par la souche 2659, ou ont été induits par l'apport exogène de régulateurs de croissance dans le cas des racines induites par la souche A4RS. Des plantes transgéniques régénérées sont caractérisées par une altération importante de leur phénotype : système racinaire abondant et plagiotrope ; partie aérienne très ramifiée à dominance apicale réduite. Ces altérations sont le résultat de l'expression dans la plante hôte des oncogènes transférés dans le génome végétal par la bactérie. Outre les modifications de phénotype, ce sytème de transformation génétique est relativement long puisqu'il faut compter environ neuf mois pour régénérer des plantes transgéniques.

Notre laboratoire a donc développé une méthode de transformation génétique plus rapide, toujours basée sur l'utilisation d'*A. rhizogenes*, mais conduisant à l'obtention de plantes partiellement transformées appelées plantes composites (Diouf *et al.*, 1995). De jeunes plantes sont inoculées sur l'hypocotyle à l'aide d'une aiguille imbibée dans la culture d'agrobactéries. Des racines transformées caractérisées par une croissance rapide apparaissent cinq jours après inoculation. Au bout de trois semaines, le système racinaire principal est éliminé, et les jeunes plantes sont décontaminées par des lavages en présence de céfotaxime. Les plantes sont transférées en tube ; elles sont donc composées d'un système aérien non transformé et d'un système racinaire contenant l'ADN-T d'*A. rhizogenes*. L'introduction dans la souche d'*Agrobacterium* d'un plasmide binaire permet d'obtenir 40 % de plantes composites exprimant les gènes de l'ADN-T du vecteur binaire. Avec un tel système, une étude de la régulation de l'expression dans les racines et nodules transgéniques peut être réalisée.

TRANSFORMATION DES *CASUARINACEAE* PAR DES SOUCHES DÉSARMÉES D'*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

De nombreuses expériences ont été consacrées à l'optimisation des conditions de transformation de *C. glauca* par *A. tumefaciens* : choix de la souche, de l'explant végétal, présence d'inducteur des gènes de virulence, temps de coculture et de contact entre le matériel végétal et les agrobactéries, sélection des cellules transformées (Le *et al.*, 1996). Le protocole de transformation qui a été choisi pour *C. glauca* est le suivant : prélèvement des cotylédons, hypocotyles et épicotyles sur des jeunes plantes

âgées de trois semaines, contact pendant une heure avec une suspension à 10^8 bactéries/ml de la souche C58C1(GV2260 ; BIN19GUSINT), coculture de trois jours en présence de 25 µM d'acétosyringone, puis sélection en présence de kanamycine à 50 mg/l et de céfotaxime à 250 mg/l. Dans ces conditions, 13 % des hypocotyles, 19 % des cotylédons et 26 % des épicotyles développent de un à trois cals poussant sur antibiotiques et exprimant l'activité ß-glucuronidase. Après quatre mois de culture, on observe une différenciation de bourgeons sur 30 % des cals issus d'épicotyles. Après neuf à douze mois, la régénération de plantes transgéniques est observée à faible fréquence (Smouni et Franche, résultats non publiés). Les plantes obtenues possèdent un phénotype identique à celui de plantes témoins non transformées.

En raison de la difficulté à obtenir une régénération de plantes entières à partir des cals de *C. glauca*, notre laboratoire a également entrepris des expériences de transformation génétique avec *Allocasuarina verticillata* (Franche *et al.*, 1997a) Cette espèce est en effet moins récalcitrante que *C. glauca* en culture *in vitro*. Des embryons zygotiques matures d'*A. verticillata* ont donc été transformés dans les conditions définies pour *C. glauca*. Après trois semaines de culture sur milieu sélectif contenant 100 mg/l de kanamycine et 250 mg/l de céfotaxime, on observe sur 21 % des embryons transformés l'apparition de cals exprimant le gène rapporteur. Le développement de bourgeons est obtenu sur 70 % de ces cals 5 semaines après la coculture. En l'espace de six à neuf mois, il est possible de régénérer des plantes transgéniques présentant un phénotype identique à celui des plantes témoins non transformées. L'intérêt du système de transformation génétique mis au point réside dans sa simplicité (un seul milieu de culture est utilisé pour la régénération des rameaux) et dans la possibilité de régénérer de nombreux rameaux transgéniques à partir de chaque cal transformé.

LE TRANSFERT DIRECT DE GÈNES CHEZ LES *CASUARINACEAE*

Un canon à poudre a été utilisé pour étudier, chez *A. verticillata* et *C. glauca*, les possibilités de transfert direct de gènes par des microprojectiles accélérés à grande vitesse (Franche *et al.*, 1997b). Une optimisation des conditions de tir a tout d'abord été réalisée : choix des explants, des microparticules (nature et taille), de la technique d'enrobage, de la distance de la cible et de la charge de poudre. Les explants les plus favorables à l'expression transitoire du gène rapporteur GUS sont les cals de *C. glauca* et les cotylédons d'*A. verticillata*. Une moyenne de trois à quatre unités transitoires GUS a été mise en évidence par cal (d'environ 1 cm) et par cotylédon. En raison de la faible efficacité d'intégration stable obtenue avec les microprojectiles (0,1 %), la seule application du transfert direct par canon chez les *Casuarinaceae* est le système d'expression transitoire.

Des bombardements ont été réalisés avec des microparticules non enrobées d'ADN en vue de créer de multiples sites de blessure permettant un transfert plus efficace de l'ADN-T d'*A. tumefaciens* chez *C. glauca* (Le *et al.*, 1996). Quelles que soient les conditions de bombardement réalisées, un prétraitement des explants avec des microprojectiles n'augmente pas l'efficacité de transformation par *Agrobacterium*. Respectivement 16 % et 14 % de cals transgéniques ont été obtenus sur des cotylédons de *C. glauca* témoins et bombardés par canon, puis cocultivés avec la souche C58C1(GV2260 ; BIN19GUSINT). Les résultats suggèrent que l'ADN-T ne peut pas être transféré dans les cellules blessées, que la cible végétale a été trop endommagée par le tir, ou encore que la poudre a un effet toxique sur le matériel végétal.

LA NODULATION DES PLANTES TRANSGÉNIQUES PAR *FRANKIA*

Afin de vérifier qu'il n'y avait pas modification des propriétés symbiotiques occasionnées par la présence des transgènes, des expériences de nodulation ont été entreprises avec les plantes transgéniques résultant d'un transfert par *A. rhizogenes* ou d'un transfert par *A. tumefaciens*. Les plantes d'*A. verticillata* ont été inoculées avec la souche de *Frankia* Allo2 et celles de *C. glauca* par la souche THR.

Dans le cas des plantes transgéniques d'*A. verticillata* et des plantes composites de *C glauca* obtenues après inoculation par *A. rhizogenes*, on note une réduction importante (diminution d'un facteur 2 ou 3) de l'aptitude à la nodulation (Franche *et al.*, 1994; Diouf *et al.*, 1995). L'activité réductrice d'acétylène reste cependant identique dans les nodules transgéniques et dans les nodules témoins. Il faut noter que chez les légumineuses composites obtenues après transformation par *A. rhizogenes*, une réduction de la nodulation est également observée lorsque les plantes sont inoculées par *Rhizobium* (Beach et Gresshoff, 1988). L'hypothèse la plus vraisemblable est que cette réduction est la conséquence de la modification de la balance hormonale dans les racines transgéniques qui contiennent les oncogènes d'*A. rhizogenes*.

Plus d'une centaine de plantes transgéniques d'*A. verticillata* obtenues après tansformation par *A. tumefaciens* ont été transférées en serre, puis inoculées par la souche de *Frankia* Allo2. Après deux mois, 68,5 % des plantes transgéniques et 57 % des plantes témoins non transformées ont développé de un à 12 nodules. L'activité réductrice d'acétylène est identique dans les nodules transgéniques et témoins (Franche *et al.*, 1997a).

ÉTUDE DE L'INTÉGRATION DES TRANSGÈNES

La présence des gènes *uidA* et *nptII* a tout d'abord été mise en évidence par analyse PCR à la fois dans les cals de *C. glauca* (Le *et al.*, 1995) et dans les plantes transgéniques d'*A. verticillata* (Franche *et al.*, 1997a). Une amplification avec des oligonucléotides spécifiques du gène *virD1* d'*A. tumefaciens* a également été réalisée afin de vérifier l'absence de contamination par *Agrobacterium*. L'étude détaillée que nous avons réalisée sur 200 plantes d'*A. verticillata* potentiellement transformées a mis en évidence que :

- 89,1 % des plantes contiennent à la fois les gènes *nptII* et *uidA* ;
- 2,8 % des plantes régénérées à partir des cals poussant sur milieu sélectif ne contiennent ni le gène *nptII*, ni le gène *uidA*. Il s'agit vraisemblablement de plantes qui ont échappé à la sélection par la kanamycine ;
- 8 % des plantes poussant sur milieu avec kanamycine contiennent bien le gène *nptII*, mais pas le gène *uidA* ; l'ADN-T a donc été partiellement délété au cours du transfert à la cellule végétale ;
- enfin une amplification avec les oligonucléotides spécifiques du gène *virD1* a été obtenue sur 4,5 % des plantes, traduisant la présence d'agrobactéries contaminantes.

L'intégration de l'ADN-T dans le génome de cinq cals transformés de *C. glauca* et de cinq plantes transgéniques d'*A. verticillata* a été vérifiée par la technique de Southern (Le *et al.*, 1995 ; Franche *et al.*, 1997a). L'hybridation a été réalisée avec une sonde correspondant à la partie codante du gène *uidA*. Une à trois copies du gène *uidA* ont été mises en évidence dans le matériel transformé. Aucune hybridation n'a été obtenue sur les plantes ou cals témoins non transformés.

EXPRESSION DU GÈNE *UIDA* SOUS CONTRÔLE DU PROMOTEUR 35S CHEZ LES *CASUARINACEAE*

Cinquante cals résultant de la transformation de *C. glauca* par la souche C58C1(GV2260 ; BIN19GUSINT) ont été étudiés (Le *et al.*, 1995). 43 (soit 86 %) présentent des secteurs plus ou moins bleus. L'activité ß-glucuronidase déterminée par analyse fluorométrique varie de 1,5 à 628 µmoles/min/mg de protéine, avec une activité moyenne de 243 µmoles/min/mg de protéine. Les différents niveaux d'expression observés sont le résultat du site d'intégration des transgènes dans le génome de la plante hôte, de l'état physiologique des cals cultivés *in vitro*, du degré de méthylation des gènes introduits et du nombre de copies des transgènes.

Des plantes transgéniques d'*A. verticillata* ont été régénérées à partir de vingt cals provenant d'événements de transformation indépendants (Franche *et al.*, 1997a). Une grande variation a également été observée dans les niveaux d'expression du gène *uidA*, tant dans les racines (10,3 ± 26 µmoles/min/mg de protéine), que dans les rameaux (6,9 ±17 µmoles/min/mg de protéine). L'analyse histochimique révèle une expression constitutive dans les rameaux (à l'exception des cellules de l'épiderme des écailles), tandis que dans les racines, le gène rapporteur est surtout exprimé dans le cylindre central et la région méristématique.

EXPRESSION DE PROMOTEURS DE NODULINES

Le gène *uidA* a été placé sous le contrôle des promoteurs d'hémoglobine suivants : *Lbc3* (soja ; légumineuse/symbiose avec *Rhizobium*), *Parasponia* (non légumineuse/symbiose avec *Bradyrhizobium*) et *Trema* (non légumineuse/non symbiotique). En utilisant le système de transformation de *C. glauca* basé sur l'inoculation par *A. rhizogenes*, des racines et nodules transgéniques contenant ces différentes constructions ont été analysés (Franche *et al.*, 1997b).

Les promoteurs *Lbc3* et *Parasponia* sont exprimés dans les cellules infectées par *Frankia*. Le promoteur de *Trema* est exprimé dans les racines et dans le système vasculaire des nodules. Ces résultats mettent en évidence que la spécificité d'expression de ces promoteurs d'hémoglobine est conservée dans les plantes actinorhiziennes.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La transformation génétique d'une plante actinorhizienne a été entreprise pour la première fois en 1988, mettant en évidence la sensibilité d'*Alnus incana* et *Alnus glutinosa* à des souches sauvages d'*A. tumefaciens* (développement de tumeurs) (MacKay *et al.*, 1988). En 1990, le gène *uidA* était exprimé dans des protoplastes électroporés d'*Alnus incana* (Séguin et Lalonde, 1988). Les seules plantes actinorhiziennes transgéniques sont à notre connaissance celles qui ont été obtenues au laboratoire PCMA, grâce à l'utilisation d'*A. rhizogenes* et d'*A. tumefaciens*.

L'obtention de *Casuarinaceae* transgéniques ouvre de très nombreuses perspectives :

- Peu d'espèces ligneuses tropicales ont été transformées (pour revue, voir Sederoff, 1995) ; la possibilité de disposer d'un système de transformation génétique efficace et relativement rapide va permettre de faire progresser les connaissances fondamentales des espèces tropicales : expression de promoteurs connus et stabilité des transgènes dans un ligneux tropical.

- L'étude de l'expression de promoteurs de nodulines (symbiose avec *Rhizobium*) est désormais possible dans une plante actinorhizienne (symbiose avec *Frankia*). Les

résultats obtenus vont fournir des informations sur les similarités ou différences entre les symbioses avec *Rhizobium* et *Frankia*, et sur l'évolution des symbioses fixatrices d'azote.

- L'introduction de constructions géniques portant des gènes d'actinorhizines (gènes symbiotiques de plantes actinorhiziennes) en orientation sens ou antisens va conduire à moduler l'expression des gènes symbiotiques de *Casuarina*. A court terme, on pourra ainsi attribuer des fonctions aux gènes symbiotiques nouvellement isolés chez *Casuarina*. À long terme il devrait ainsi être possible d'améliorer ces symbioses.
- Enfin, l'introduction de gènes d'intérêt peut être entreprise chez *Casuarina* à la fois grâce aux techniques de transformation mises au point et à l'identification de promoteurs permettant de hauts niveaux d'expression des transgènes chez les *Casuarinaceae*.

Bibliographie

1. BEACH K.H., GRESSHOFF P.M. (1988) Characterization and culture of *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of forage legumes. Plant Sci., 57, 73-81.
2. BERRY M.A., SUNELL A.L. (1990) The infection process and nodule development Dans : The biological of *Frankia* and actinorhizal plants (Schwintzer, R.C. and Tjepkema, J.D. eds.), Academic Press Inc., San Diego, pp. 61-81.
3. DIEM H.G., DOMMERGUES Y.R. (1990) Current and potential uses and management of *Casuarinaceae* in the tropics and subtropics. Dans : The biological of *Frankia* and actinorhizal plants (Schwintzer, R.C. and Tjepkema, J.D. eds.), Academic Press Inc., San Diego, pp. 317-342.
4. DIOUF D., GHERBI H., PRIN Y., FRANCHE C., DUHOUX E., BOGUSZ D. (1995) Hairy root nodulation of *Casuarina glauca* : a system for the study of symbiotic gene expression in an actinorhizal tree. Mol. Plant-Microbe Interaction, 8, 532-537.
5. FRANCHE C., BOGUSZ D., LE V.Q., PHELEP M., DUHOUX E. (1994) Genetic transformation of trees in the *Casuarinaceae* family. Dans : Biotechnology in Agriculture and Forestry, Volume 29 (Bajaj, Y.P.S. ed.), Springer-Verlag, pp. 257-273.
6. FRANCHE C., DIOUF D., LE Q.V., N'DIAYE A., GHERBI H., BOGUSZ D., GOBÉ C., Duhoux E (1997a) Genetic transformation of the actinorhizal tree *Allocasuarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant J., 11, 897-904.
7. FRANCHE C., LAPLAZE L., DUHOUX E., BOGUSZ D. (1997b) Actinorhizal symbioses : recent advances in plant molecular and genetic transformation studies. Crit. Rev. Plant Sci., 17, 1-28.
8. LE Q.V., BOGUSZ D., GHERBI H., LAPPARTIENT A., DUHOUX E., FRANCHE, C. (1996) *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer to *Casuarina glauca*, a tropical nitrogen-fixing tree. Plant Sci., 118, 57-69.
9. MACKAY J., SEGUIN A., LALONDE M. (1988) Genetic transformation of 9 *in vitro* clones of *Alnus* and *Betula* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 7, 229-232.
10. National Academy of Sciences (1984) *Casuarinas* : Nitrogen-Fixing Trees for Adverse Sites. National Academy Press, Washington DC.
11. PHELEP M., PETIT A., MARTIN L., DUHOUX E., TEMPÉ J. (1991) Transformation and regeneration of a nitrogen-fixing tree, *Allocasuarina verticillata* Lam. Biotechnology, 9, 461-466.
12. SEDEROFF R.R. (1995) Forest trees. In *The transformation of plants and soil microorganisms* (Wang, K., Herrera-Estrella, A. and Van Montagu, M., eds). Cambridge University Press, pp. 150-163.
13. SEGUIN A., LALONDE M. (1988) Gene transfer by electroporation in *Betulaceae* protoplasts : *Alnus incana*. Plant Cell Rep. 7, 367-370.

B5 : Transformation génétique de la Pomme de Terre pour la production de plantes résistantes au PVY

GARGOURI-BOUZID R., ROUIS S., HASSAIRI A., MASMOUDI K., LAKHOUA L.[1]

Centre de Biotechnologie de Sfax B.P. 358, 3018, Sfax Tunisie.

[1] Ecole Nationale des Ingénieurs de Sfax, B.P. W 3038, Sfax Tunisie

INTRODUCTION

Le virus Y de la pomme de terre (PVY) est l'un des pathogènes les plus dévastateurs des cultures de pomme de terre, de tomates et de piments en Tunisie. L'infection par ce virus peut engendrer jusqu'à 80 % de pertes en rendement de tubercules.

Ce virus est le membre type de la famille des potyvirus. Son génome est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive polyadénylé à l'extrémité 3' et covalemment lié à une protéine (Vpg) à l'extrémité 5'. Sa séquence nucléotidique a été déterminé (Robaglia et coll., 1989). Cet ARN code pour une polyprotéine d'environ 350 kDa. Les huit protéines virales sont le produit d'un clivage autocatalytique de la polyprotéine. Les potyvirus se caractérisent par la formation d'inclusions nucléaires (NI) et cytoplasmiques (CI) dans les cellules qu'ils infectent. Ils représentent la famille de virus phytopathogènes la plus importante par le nombre de ces membres et par l'importance des dégâts qu'ils génèrent sur les différentes plantes hôtes.

En Tunisie, la culture de la pomme de terre se pratique essentiellement au nord du pays (16500 ha). Le calendrier de plantation et de récolte est réparti sur toute l'année selon trois saisons (primeur, de saison et d'arrière saison). La Tunisie importe 16 000 t/an de tubercules de semences en plus des tubercules (0-20000 t/an) pour la consommation en cas de déficit de la production nationale.

Afin de pallier ce besoin en tubercules de pomme de terre et de produire des semences de bonne qualité phytosanitaire, le programme de recherche que nous avons développé et présenté ici vise à utiliser la transformation génétique de la pomme de terre par *Agrobacterium tumefaciens* pour la production de plantes résistantes au PVY. Il est déjà connu dans la littérature que la pomme de terre est parmi les plantes faciles à transformer par cette méthode indirecte de transfert de gènes (Ooms et coll., 1983).

D'autre part, l'expression de gènes de capsides par les plantes transgéniques s'est avéré un moyen efficace de lutte contre les infections virales (cf revue de Beachy et coll., 1990 et Wilson, 1993). Il a même été montré que pour certains virus, l'insertion de cDNA de capsides du même virus ou de virus apparentés (hétérologue), a permis d'obtenir des plantes transgéniques totalement résistantes aux virus de la même famille (Beachy et coll. 1990).

Le projet de recherche développé dans le cas de la pomme de terre a pour but de faire exprimer par les plantes transgéniques des cDNA de gène de la protéine capside du PVY et de deux virus apparentés. Le gène de la capside du virus de la mosaïque de la laitue (LMV) a été testé en premier chez deux variétés de pomme de terre les plus cultivées en Tunisie (Spunta et Claustar).

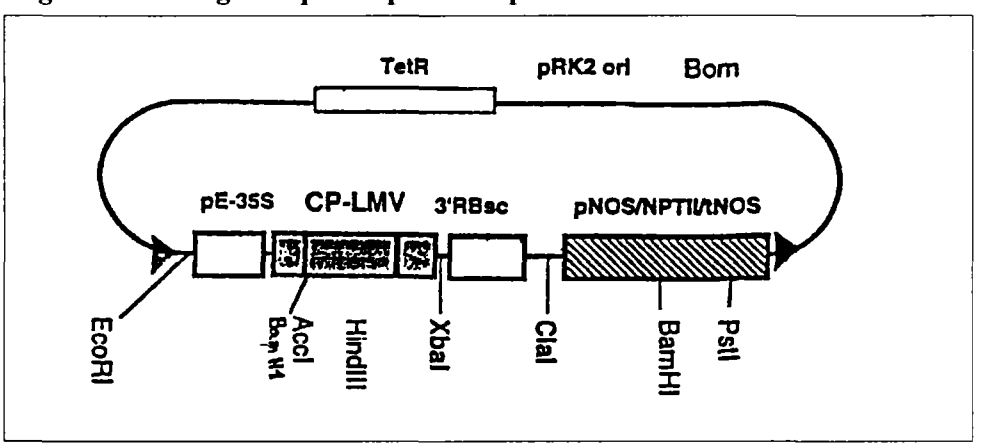
D'autre part, il a été démontré récemment que l'expression par les plantes transgéniques, d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine capside d'un virus permet à la plante d'acquérir une certaine immunité contre ces virus (revue dans Robaglia et Tepfer, 1996). Nous avons donc envisagé d'appliquer cette nouvelle approche dans le cas de la résistance de la pomme de terre au PVY et ce par production d'anticorps monoclonaux dirigés contre une protéine fonctionnelle du virus et non la capside. Nous discuterons ici la production et la caractérisation de 4 anticorps monoclonaux reconnaissant 4 protéines différentes du PVY.

MÉTHODOLOGIE

Transformation des microtubercules de pomme de terre

Le cDNA correspondant au gène de la capside du LMV que nous devons au Docteur J. Albouy (INRA Versailles) est inséré dans le vecteur binaire pKYLX-35S2 sous le contrôle du promoteur doublé de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMv). Ce vecteur porte également le gène codant pour la néomycine phosphotransférase (NPTII) conférant aux plantes transformées, la résistance à la kanamycine. Le plasmide résultant pKLY-35S2-CPLMV (**Figure 1**) est introduit dans *A. tumefaciens* C58 (pGV2260) par électroporation. La transformation de la pomme de terre est réalisée par incubation de disques de microtubercules obtenus *in vitro* avec la souche d'*Agrobacterium* portant le plasmide pKLYX-35S2-CPLMV pendant 3 jours. Les bactéries sont alors éliminées par addition de céfotaxime (100 mg/l). Les disques de microtubercules sont transférés sur milieu inducteur de bourgeons MS (Murashige et Skoog 1962) en présence de zéatine et d'ANA contenant également 50 mg/l de kanamycine. Au bout de 1 à 2 mois, les premiers bourgeons apparaissent. Ils sont alors transférés sur milieu inducteur de racines puis passés en pots pour l'acclimatation sous serre.

Figure 1 : carte génétique du plasmide pKLY-35S2-CPLMV.



La présence du transgène est vérifiée au niveau de l'ADN génomique des plantes par amplification d'un fragment interne du gène de capside du LMV par PCR. Un Southern blot sur les produits PCR et sur l'ADN génomique des plantes résistantes à la kanamycine après digestion par deux enzymes de restriction EcoR1 ou BamH1 est réalisé. Au niveau transcriptionnel, les ARN totaux sont extraits des plantes résistantes à la kanamycine puis une RT-PCR (transcription réverse suivie d'une amplification par PCR) est réalisée sur ces ARN traités au préalable à la DNaseI (*RNase-free*). Les

amorces utilisées permettent l'amplification d'une partie centrale du gène de la protéine capside du LMV. Une hybridation par Northern blot est également réalisée pour confirmer la transcription du gène CPLMV dans les plantes transgéniques Au niveau de la protéine, des hybridations par Western blot ont été réalisées sur un extrait brut de protéines avec un sérum dirigé contre la protéine CPLMV.

Les plantes transgéniques sont alors testées pour leur capacité à résister à l'infection par le virus. Une première inoculation est pratiquée 40 jours après acclimatation suivie d'une seconde 10 jours plus tard. Les tests sérologiques (ELISA) sont alors effectués tous les 10 jours pour suivre l'accumulation du virus dans les plantes et ce pendant 8 semaines. Le degrés d'accumulation du PVY dans les plantes est déterminé par mesure de la D.O. à 405 nm sur l'extrait de feuilles.

Le niveau de protection des plantes transgéniques contre le virus est également testé sur les plantes issues de minitubercules obtenus à partir des premiers clones transgéniques résistants.

Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines fonctionnelles de PVY

Une fraction semi-purifiée d'inclusions nucléaires a été obtenue à partir de feuilles de tabac infectées par le PVY selon le protocole décrit par Chang et coll. (1988). Cette fraction comprend, en plus des protéines d'inclusion nucléaire (NIa et NIb), la protéine CI d'inclusion cytoplasmique et la protéine capside. Le mélange a été injecté à des souris pour la production d'anticorps monoclonaux. Une centaine d'hybridomes ont été obtenus dont quatre, pris au hasard, ont été caractérisés. Ces anticorps ont été utilisés pour la détection *in situ* des protéines virales sur épiderme de feuilles de tabac infectées par le PVY.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Transformation de la pomme de terre

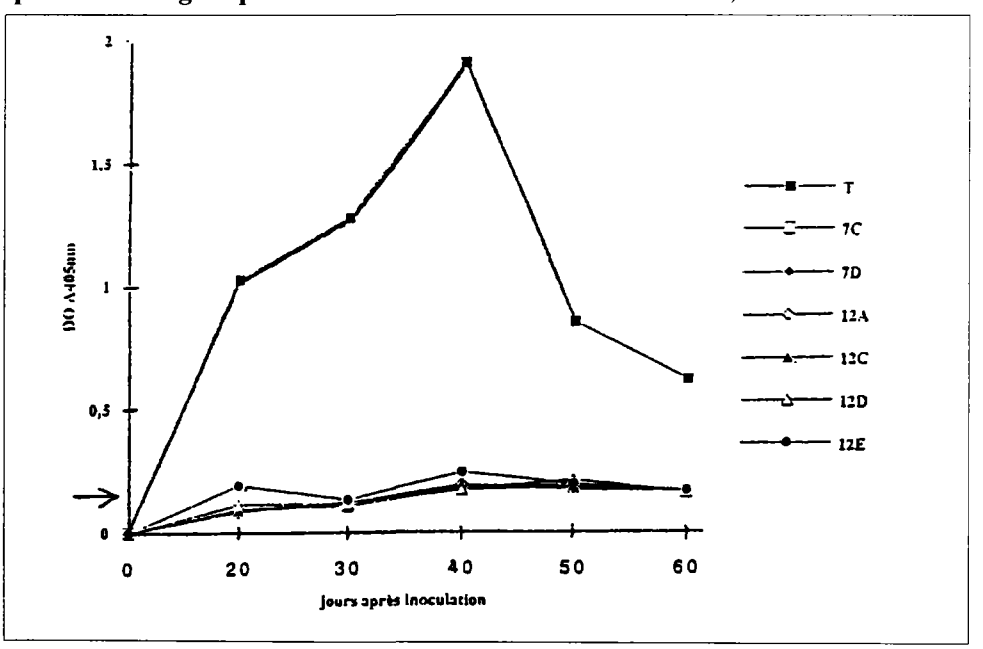
Après transformation de disques de microtubercules de pomme de terre (Spunta et Claustar) par la souche C58 d'*Agrobacterium tumefaciens* (pGV2260:pKYLX-35S2-CPLMV), la régénération de bourgeons est réalisée en présence de kanamycine. Le pourcentage de régénération est de l'ordre de 20 % dans les deux cas. L'amplification par PCR d'un fragment interne de 0,8 kpb de l'ADN génomique de ces plantes a permis de déterminer le pourcentage de transformation. Ainsi, 60 à 65,7 % des plantes régénérées en présence de kanamycine ont intégré le gène CP pour les deux variétés Spunta et Claustar.

L'hybridation par Southern blot de l'ADN génomique de 4 clones, digérés par EcoR1 ou BamHl a permis de confirmer l'intégration du gène (**Figure 2**). L'enzyme BamHl libère un fragment de 4 kpb alors que EcoRl reconnaît un site unique dans la séquence intégrée.

La présence de l'ARN correspondant au gène CPLMV a été testée sur 4 clones de la variété Spunta par RT-PCR. L'ARN total, traité par *DNase-RNase-free* a été utilisé pour synthétiser un cDNA correspondant à une partie centrale du gène. Dans un deuxième temps, la transcription du gène en ARNm a été confirmée par Northern blot sur l'ARN total (**Figure 3**). Le niveau de transcription est identique chez tous les clones testés.

Le niveau de résistance des plantes CPLMV+ a été testé sous serre. Après micropropagation, 15 boutures enracinées de chaque clone CP+ et des plantes témoins ont été transférées en pots sous serre. Une première inoculation mécanique de ces plantes est réalisée 40 jours après acclimatation suivie d'une deuxième 10 jours plus tard. Les tests sérologiques réalisés tous les 10 jours ont permis de montrer que les plantes CP+ sont résistantes au PVY. Aucune accumulation de virus n'est observée (**Figure 4**), alors que les plantes témoins non transformées ont développé des symptômes d'infection. Ces plantes CP+ ont produit des minitubercules qui ont été utilisés comme semence pour la production de plantes de deuxième génération. Ces plantes, inoculées à leur tour par le PVY comme dans le premier cas. Après 40 jours de l'inoculation, aucun symptôme n'est apparu sur ces plantes alors que les témoins non transformés ont été complètement nécrosés.

Figure 2. Accumulation du PVY dans les plantes témoins et transgéniques de pomme de terre variété Spunta T : témoin, 7C,7D, 12A, 12C, 12D, 12E : plantes transgéniques -> : bruit de fond DO à 405nm = 0, 14.



Production d'anticorps monoclonaux contre différentes protéines fonctionnelles du PVY

Une fraction semi-purifiée d'inclusions nucléaires a été préparée à partir de feuilles de tabac infectées par le PVY. Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant, nous avons pu détecter quatre protéines : celles formant les inclusions nucléaires (NIa et NIb), la protéine CI et la protéine capside. Le mélange a été utilisé comme antigène pour la production d'anticorps monoclonaux.

Quatre parmi les 100 hybridomes positifs ont été caractérisés. Les anticorps monoclonaux correspondants représentent 3 groupes différents reconnaissant trois protéines du PVY.

L'anticorps 22-1 est dirigé contre la protéine NIa et plus particulièrement la partie Vpg donc N-terminale de cette protéine. En effet, il reconnaît spécifiquement la protéine NIa dont le gène a été cloné dans E. coli.

L'anticorps 136-13 est dirigé contre la protéine capside du PVY. En effet, il donne le même profil d'hybridation qu'un anticorps dirigé contre cette protéine pure.

Les anticorps 15-1 et 18-5 semblent reconnaître des épitopes chevauchant sur la protéine CI. Ils donnent un profil d'hybridation similaire à celui obtenu avec un anticorps monoclonal dirigé contre cette même protéine.

Ces différents anticorps monoclonaux ont été utilisés pour le dépistage des protéines virales sur épiderme de feuilles de tabac infectées. Les résultats montrent que ces anticorps reconnaissent les protéines virales *in situ* et que le profil d'hybridation varie avec la nature de la protéine cible.

Bibliographie

1. AITCHITT M., AINSWORTH C.C., THANGAVELU M., (1993) Plant Mol. Biol. Rep., 11, 318-319.
2. BEACHY R., LOESCH-FRIES S., TUMER N.E. (1990) Ann. Rev. Phytopathol., 28, 451-474.
3. CHANG C.A., HIEBERT E., PURCIFULL D.E. (1988) Phytopathology, 78, 1266-1275.
4. MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) Physiol. Plant, 15, 473-497.
5. ROBAGLIA C., DURAND-TARDIF M., TRONCHET M., BOUDAZIN G., ASTIER-MANIFACIER S., CASSE-DELBART F. (1989) J. Gen. Virol., 70, 935-947.
6. VAN DER VLUGT R.A.A,. RUITER R.K., GOLDBACH R. (1992) Plant Mol. Biol., 20, 631-639.

B6 : Estimation des risques associés aux cultures transgéniques : outils et contraintes

PESSEL F.[1], LECOMTE J.[2], LAVIGNE C.[3], LAREDO C.[4], MESSEAN A.[5], GOUYON P.H.[2]

[1] Laboratoire Évolution et Systématique, CNRS-URA 2154, Bât. 362, Université Paris XI-Orsay, 91405 ORSAY CEDEX. Tel 01 69 15 61 15, Fax 01 69 15 73 53, Email Fabrice.Pessel@esv.u-psud.fr

[2] Laboratoire Évolution et Systématique, Université de Paris-Sud (CNRS-URA 2154) Bâtiment 362, F-91405 ORSAY CEDEX

[3] Laboratoire de Phytopathologie Moléculaire, Institut de Biotechnologie des Plantes Université de Paris-Sud, Bâtiment 630, F-91405 ORSAY CEDEX

[4] Laboratoire de Biométrie - INRA, Centre de Recherche de Jouy-en-Josas, Domaine du Vilvert, 78350 JOUY-EN-JOSAS

[5] Centre Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains, 174 Avenue Victor Hugo 75116 PARIS

INTRODUCTION

L'opinion publique largement sensibilisée par les événements de ces dernières années (sang contaminé, hormones de croissance, vache folle) exprime son inquiétude, voire son refus, des manipulations génétiques, angoisses généralement reprises et amplifiées par les médias. C'est dans ce contexte que la communauté scientifique, sous l'impulsion des pouvoirs publics et du secteur privé, tente aujourd'hui d'identifier et de quantifier les risques associés à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans notre environnement. Lorsque l'on parle de disséminations d'OGM, c'est principalement de plantes cultivées transgéniques dont il est question. Alors que dans certains pays comme les États-Unis, le Canada ou la Chine, les cultures transgéniques sont déjà largement répandues, l'introduction de ces nouvelles cultures en Europe fait encore l'objet de débats entre pouvoirs publics, industriels et consommateurs. En effet, si la transgenèse végétale apparaît comme une véritable révolution technologique et un outil puissant pour les sélectionneurs, de nombreuses interrogations subsistent quant à ses répercussions éventuelles sur l'environnement. Pour tenter de déterminer l'impact écologique de l'introduction massive de ces plantes transgéniques, les pouvoirs publics et les industriels se sont tournés vers la communauté scientifique, lui conférant ainsi un rôle d'arbitre dans un débat qui dépasse de loin les seules questions scientifiques. Nous présentons ici au travers de quelques résultats scientifiques une réflexion sur les outils dont disposent les scientifiques pour tenter d'estimer ces risques écologiques en insistant sur les contraintes afférentes à ces différentes approches.

LA NOTION DE RISQUE

L'estimation du risque passe à la fois par l'évaluation de la probabilité qu'un événement se produise et par la quantification des conséquences de ce dernier. Le risque se représente classiquement par le produit de deux composantes : la fréquence

d'un événement identifié comme potentiellement dangereux et les dommages occasionnés par cet événement (MacKenzie & Henry, 1990). Un exemple classique pour illustrer cette notion est celui de l'implantation d'une centrale nucléaire (encadré 1). Dans ce cas, l'estimation du risque doit tenir compte de la probabilité d'explosion de la centrale (fréquence de l'événement), de la présence de populations à proximité de celle-ci et des effets des radiations sur ces populations (dommage). Cet exemple illustre très bien l'une des difficultés rencontrées lorsqu'il s'agit de quantifier un risque puisqu'il s'agit généralement du produit d'une faible *fréquence* par un fort *dommage*. Notons également que le risque zéro n'existant pas, la prise de risque résultera d'un compromis entre les bénéfices attendus et les conséquences (négatives) envisagées. De ce fait, pour une même fréquence de l'événement (ici l'explosion de la centrale), le risque sera acceptable ou inacceptable suivant la sensibilité et les intérêts de chacun des intéressés.

En adoptant la même représentation que précédemment, le risque écologique associé à l'introduction de cultures transgéniques dans notre environnement peut se représenter par le produit de trois composantes (encadré 1) :

- la probabilité qu'un transgène présent dans une variété cultivée se retrouve dans un environnement autre que la culture (repousses hors champs et/ou hybridations avec des espèces sauvages apparentées) ;
- le devenir de ce transgène au sein de ce nouvel environnement lorsqu'il est soumis aux forces évolutives (génétique et hérédité du caractère transgénique) ;
- les conséquences écologiques de l'expression de ce transgène dans son nouvel environnement (impacts sur la stabilité des écosystèmes et sur la biodiversité).

Encadré 1 :

$$\text{risque} = \underbrace{\underbrace{\text{probabilité de transfert du transgène}}_{\text{fréquence}} \times \underbrace{\text{devenir du transgène dans un environnement sauvage}}_{\text{exposition}}}_{\text{dommage}} \times \underbrace{\text{effets(s) pour l'agriculteur, l'écologiste, l'industriel...}}_{\text{danger}}$$

Actuellement, si de nombreux travaux permettent de quantifier plus ou moins précisément les deux premières composantes de ce risque, peu de recherches portent aujourd'hui sur l'impact écologique, sans doute parce que leur mise en place est plus complexe. Pourtant les interrogations sont grandes, en particulier lorsqu'il s'agit de conservation des ressources génétiques. En effet, nous savons que les espèces sauvages apparentées aux plantes cultivées sont depuis toujours utilisées comme réservoirs naturels de résistances aux nouveaux ravageurs ou pathogènes des cultures. Une des questions est donc de déterminer comment cette diversité génétique, base de l'adaptation de ces plantes aux changements environnementaux, est susceptible d'être modifiée par l'introduction de caractères génétiques nouveaux, caractères souvent corrélés à des modifications de la valeur sélective des individus. Toutefois, pour quelques cas particuliers, cet impact a été discuté. Il fût proposé, par exemple, d'introduire un gène d'apomixie[1] chez le mil ou le maïs afin d'aider les agriculteurs

[1] Aptitude de certaines plantes à produire des graines sans intervention de la reproduction sexuée (pollen).

traditionnels d'Afrique et d'Amérique Centrale à sélectionner eux-mêmes les génotypes les plus productifs en semant uniquement les graines issues des plantes présentant les plus forts rendements. Cette transformation aurait eu cependant des conséquences importantes à long terme sur la diversité génétique des populations sauvages de mil et de téosinte. En effet, les plantes apomictiques gardant la capacité de produire du pollen, le gène d'apomixie se serait propagé massivement dans les populations sauvages, entraînant de ce fait une homogénéisation génétique de ces populations. Ce raisonnement évolutif a d'ailleurs été confirmé par des résultats de modélisation (Lavigne, 1994). Dans le cas de l'introduction d'une stérilité mâle nucléaire, les conclusions vont dans le sens contraire. En effet, ce type de modification génétique s'accompagnant d'une forte diminution de la fitness des individus exprimant ce caractère, le transgène ne pourrait se propager.

L'estimation du risque passe donc par une étape d'identification des événements à considérer et des conséquences à envisager. Il s'agit ensuite de dresser une liste aussi exhaustive que possible des paramètres susceptibles d'interférer sur les processus identifiés (tableau 1) en hiérarchisant *a priori* leur importance au regard des connaissances déjà acquises dans des domaines comme la génétique, l'évolution, la biologie des populations, l'amélioration des plantes, la malherbologie...

Tableau 1. Paramètres intervenant dans l'estimation des risques liés à la culture de plantes transgéniques (d'après Arnould *et al.*, 1993).

			Composantes du risque		
			Transfert	**Devenir**	**Impact**
Biologie des espèces cultivées et sauvages	*Régime de reproduction*	autogamie	√	√	
		homogamie	√	√	
	Possibilités de croisements entre espèces cultivées et sauvages	barrières à l'hybridation	√		
		décalage de floraison	√		
		distance entre plantes et populations	√	√	
		distance et mode de dissémination du pollen et des graines	√	√	
	Comportement des types sauvage, hybride ou cultivé	aptitude compétitrice		√	√
		survie dans les différents milieux ("coût de la domestication")		√	√
Introduction et expression du (ou des) gène(s)	*Paramètres génétiques*	hérédité		√	
		stabilité dans le nouveau génome		√	√
		liaison génétique avec d'autres gènes		√	√
	Expression du nouveau caractère	recessif ou dominant		√	
		conséquence sur la valeur sélective		√	√
Paramètres de l'environnement	*Pression de sélection sur le caractère*	structuration temporelle		√	
		structuration spatiale		√	
	Techniques culturales	pourcentage de récolte des différents types sauvage, hybride ou cultivé		√	
		rotation des cultures		√	
		travail du sol		√	

LES OUTILS

On peut considérer qu'il existe trois approches pour tenter de quantifier et de prédire les risques associés à l'introduction de plantes transgéniques en culture. La première est basée sur l'observation de situations existantes, la seconde sur l'expérimentation et la troisième sur l'extrapolation des observations et des expérimentations à des situations hypothétiques au moyen de modèles mathématiques ou informatiques.

L'observation

La transgenèse végétale en sélection a pour objectif de créer, non pas des nouvelles espèces, mais bien des nouvelles variétés exprimant des caractères venant s'ajouter à ceux de la plante domestiquée. Par conséquent, pour tout un ensemble de caractères transgéniques neutres (c'est-à-dire ne conférant ni avantage, ni désavantage sélectif à la plante), certaines situations "naturelles" existantes peuvent être considérées comme relativement proches de ce qui pourrait se passer si des plantes transgéniques venaient à être introduites en culture. De plus, dans la littérature, existent de nombreux travaux relatifs aux échanges génétiques entre variétés cultivées et leurs apparentées sauvages existent et peuvent être extrapolés au cas des plantes transgéniques comme par exemple les travaux de Robert *et al.* (1991) sur le mil ou de Langevin, Clay & Grace (1990) sur le riz (Oard *et al.*, 1996).

Pour ce qui est de l'observation de situations existantes, on peut citer par exemple les travaux effectués sur le colza (*Brassica napus*) par une équipe anglaise. Après avoir montré que le comportement écologique d'un colza transgénique (résistant au glyphosate) était identique à celui d'un colza classique en conditions naturelles (Crawley *et al.*, 1993), les auteurs se sont intéressés à la dispersion et à la dynamique de populations de colza non-transgénique le long de l'autoroute M25 menant à une usine de trituration (Crawley & Brown, 1995). Ils ont ainsi mis en évidence, à une large échelle (190 km autour de Londres), une corrélation entre le sens de circulation des camions de transport de semence et la présence de populations spontannées de colza sur le bord des routes. De plus, par un suivi sur plusieurs années, ils ont montré qu'en absence de perturbations, ces populations avaient tendance à s'éteindre. Des données récentes viennent compléter les données écologiques sur ces populations de colza, montrant que les potentialités de dormances des graines de colza issues de variétés transgéniques sont légèrement inférieures à celle d'un colza non-transgénique et très inférieures à celles d'une apparentée sauvage (Hails *et al.*, 1997). On voit, à travers cet exemple, que l'aller-retour entre l'observation de terrain et l'expérimentation fournit des informations très intéressantes même si les résultats obtenus dépendent fortement des conditions écologiques considérées (Hails *et al.*, 1997).

Dans le même esprit, une équipe américano-écossaise (Luby & Mc Nicol, 1995), profitant de la situation particulière que représente la culture de framboise (*Rubus idaeus*) dans le centre de l'Écosse, a étudié les flux de gènes entre populations cultivées et sauvages à l'échelle de la région d'exploitation (superficie de plus de 2 000 ha). Se basant sur deux caractères phénotypiques facilement identifiables et spécifiques des variétés cultivées (gros fruits, allèle L1 et fermeté de la tige, allèle s), ces chercheurs ont ainsi mis en évidence des flux de gènes entre populations cultivées et sauvages. Toutefois, malgré deux décennies de cultures de variétés à tiges fermes, l'allèle s ne se retrouve qu'à de très faibles fréquences (0,4 % en moyenne) dans les populations spontanées de *Rubus*. En conclusion, les auteurs soulignent combien une telle situation d'étude est exceptionnelle. Ils précisent également que leurs observations ne peuvent pas être extrapolées à des caractères transgéniques augmentant, même très faiblement, la valeur sélective des individus dans un

environnement non-anthropisé, comme ce que l'on attend *a priori* dans le cas de résistances à des ravageurs ou à des pathogènes.

En résumé, ces approches sont particulièrement intéressantes dans la mesure où elles peuvent être réalisées à des échelles voisines de situations réellement envisageables contrairement à l'expérimentation sur matériel transgénique (voir ci-après). D'ailleurs, Gliddon (1994) avait déjà souligné l'intérêt de ces approches en rappelant qu'elles étaient, de plus, bien moins coûteuses que les études sur plantes modifiées par transgenèse. Toutefois, de telles observations doivent s'accompagner d'expérimentations contrôlées comme l'illustrent très bien les travaux sur le colza (Crawley & Brown, 1995 ; Crawley *et al.*, 1993 ; Hails *et al.*, 1997) et ne peuvent être extrapolées qu'au domaine d'observation comme le soulignent Timmons *et al.* (1996, 1995) en conclusion de leurs études.

L'expérimentation

Les approches expérimentales sur du matériel transgénique sont donc souvent nécessaires, en particulier lorsqu'il s'agit d'identifier l'effet du transgène sur le comportement propre de la plante (coût d'expression du transgène : sur le colza (Crawley *et al.*, 1993 ; Hails *et al.*, 1997), ou sur son environnement direct (ravageurs, pathogènes, pollinisateurs (Picart-Nizou *et al.*, 1995). Mais on constate également que le matériel transgénique s'impose comme un très bon support pour étudier les flux de gènes, qu'ils soient intra-spécifiques (distances de dispersion) ou inter-spécifiques (croisements cultivées-sauvages). En effet, le transgène codant généralement pour une tolérance, voire une résistance, à une pression de sélection (herbicides, antibiotiques, insectes...), il est souvent facile de mettre en évidence ce caractère en appliquant simplement le traitement sélectif sur la descendance des plantes soumises aux flux de pollen transgénique (Baranger *et al.*, 1995 ; Darmency, 1996 ; Mikkelsen, 1996 ; Paul, 1995 ; Scheffler, 1993 ; Scheffler, 1995). De plus, la nature exacte du transgène introduit étant connue, il est plus facile de confirmer au niveau moléculaire la présence du caractère dans la descendance au moyen de techniques moléculaires de type PCR-RAPD (Baranger *et al.*, 1995 ; Chevre *et al.*, 1996 ; Skogsmyr, 1994) ou « Southern Blots » (Frello *et al.*, 1995).

Toutefois, ces expérimentations soumises en Europe à la législation sur la dissémination volontaire des organismes génétiquement modifiés (directive 90/220 CEE), ne peuvent être réalisées que sur des parcellaires réduits et sur une durée limitée généralement à une génération de plantes transgéniques. De ce fait, comme il s'agit souvent de quantifier des événement se produisant à faible fréquence (hybridations interspécifiques) ou à longue distance (migration pollinique), les résultats de ces expérimentations doivent être interprétés avec précaution, en particulier lorsqu'il s'agit de les extrapoler à une situation commerciale. Les travaux réalisés par Scheffler *et al.* sur la dispersion du pollen de colza transgénique résistant au Basta illustrent très bien les limites de ce type d'approche. Alors qu'en 1990, ils n'observaient que 0,00034 % de colza résistants à 47 mètres de la source de transgène (Scheffler *et al.*, 1993), en 1992, ces mêmes auteurs en recensaient 10 fois plus dans des blocs situés cette fois-ci à 400 mètres (Scheffler *et al.*, 1995). Les travaux réalisés dans le cadre du projet européen BRIDGE sur la dispersion du pollen de colza fournissent des résultats similaires. Pour un même dispositif expérimental, alors qu'en 1989 des résistants avaient été trouvés en fréquence non négligeable à 50 mètres de la source de transgène, leur fréquence était quasi-nulle à 24 mètres en 1990 (BRIDGE, 1994). Cette même équipe de l'INRA de Rennes a également pu observer en 1993, de façon tout à fait fortuite, des colza résistants (10 à 12 % sur mâle-stériles) à plus de

800 mètres de toute plante transgénique. On sait d'ailleurs aujourd'hui que le pollen de colza se disperse sur des distances de plusieurs kilomètres (Timmons *et al.*, 1996).

On voit donc au travers de ces quelques exemples que les expérimentations sur matériel transgénique fournissent des résultats qui dépendent non seulement des conditions du milieu (BRIDGE, 1994) mais aussi et surtout du dispositif expérimental (Scheffler *et al.*, 1995 ; 1993). Lorsque l'on examine en détail ces expérimentations, on retrouve systématiquement des hybrides intra-spécifiques en bordure de parcelle (BRIDGE, 1994; Lavigne, 1998), ce qui suppose que d'autres peuvent apparaître à des distances plus élevées. Ce problème d'échelle entre expérimentations et situations réellement envisageables est une contrainte forte qui pèse sur l'estimation des risques. D'ailleurs, les protocoles expérimentaux tendent de plus en plus à considérer cette dimension spatiale : on peut citer par exemple le projet pluriannuel inter-instituts[1] « Impact du développement des plantes transgéniques dans les systèmes de culture » mis en place en 1995 sur trois sites en France.

Quoiqu'il en soit, les expérimentations sont absolument nécessaires puisqu'elles fournissent une estimation des paramètres biologiques identifiés comme pertinents dans l'étude des risques. On peut par exemple, définir des lois de dispersion individuelle du pollen (Lavigne *et al.*, 1996) à partir de données expérimentales sur le colza (Lavigne, 1998) qui pourront par la suite être introduites dans des modèles mathématiques ou des simulations informatiques.

La modélisation

Pour l'ensemble des raisons que nous avons évoquées précédemment, les observations de situations existantes ainsi que les expérimentations sur matériel transgénique sont donc difficilement extrapolables, en l'état, à des situations commerciales d'introduction de plantes transgéniques. En résumé et pour simplifier, ces approches sont soumises à trois types de contraintes :

- des contraintes d'ordre temporel (nombre de générations en expérimentations) ;
- des contraintes d'ordre spatial (superficie réduite des expérimentations) ;
- des contraintes d'ordre « évolutif » (extrapolation des observations uniquement pour des caractères neutres ou légèrement contre-sélectionnés).

Pour estimer les risques, il faut donc disposer d'outils théoriques permettant à la fois de synthétiser les résultats d'expérimentation et les observations de terrain et de les extrapoler à des échelles spatiales et temporelles plus proches de situations réellement envisageables, sans omettre de considérer les forces évolutives (migration, sélection, dérive et mutation) auxquelles va être soumis le transgène dans son nouvel environnement. La modélisation mathématique et les simulations informatiques sont donc apparues comme des outils puissants dans l'étude des risques puisqu'elles permettent de prendre en compte ces deux dimensions. Si la littérature est riche en résultats d'expérimentations et d'observations, on ne trouve que peu de publications de modèles théoriques (Andow, 1994 ; Kareiva, 1994) ou de simulations (Van Raamsdonk & Schouten, 1997) directement reliées à la problématique. Pourtant, comme le souligne Andow (1994), les modèles mathématiques fournissent un cadre de recherche intéressant, non seulement pour les raisons exposées précédemment, mais aussi parce qu'ils évitent le « flou » généralement entretenu par le discours verbal. Ces modèles permettent également de hiérarchiser l'influence des différents paramètres considérés, réorientant le cas échéant les expérimentations. Par exemple, Reboud

[1] AGPM, CETIOM, INRA, ITB, ITCF.

(1992) et Lavigne (1994) ont observé dans leurs simulations que le coût de la résistance à un herbicide était le paramètre déterminant, à long terme, la fréquence du transgène dans une population soumise à des flux de pollen cultivé. Nous retrouvons également que dans un modèle spatialisé, ce paramètre détermine très fortement la distance maximale de dispersion d'un transgène depuis un champ source (non publié).

Bien que l'approche par modélisation des risques écologiques associés à l'introduction de plantes transgéniques soit relativement récente, la structure des modèles a évolué rapidement. On constate aujourd'hui que la structuration spatiale des populations sources et réceptrices de transgène ainsi que leur évolution dans le temps (prise en compte de la rotation des cultures, des extinctions de populations sauvages...) apparaissent comme des paramètres importants. De même, les effectifs des populations sauvages réceptrices de transgènes, ainsi que leurs caractéristiques biologiques, s'imposent comme des paramètres incontournables pouvant éventuellement modifier les échanges génétiques entre compartiments cultivé et sauvage (Ellstrand, Devlin & Marshall, 1989). En effet, si aujourd'hui l'ensemble de la communauté scientifique s'accorde à dire qu'avec les constructions génétiques actuelles il n'est pas envisageable de confiner un transgène uniquement au niveau de la parcelle cultivée, il devient absolument nécessaire de déterminer :

1. la dynamique de dispersion du transgène (vitesse et distance de diffusion dans les populations sauvages) ;
2. l'impact de son expression sur les populations sauvages (modification des équilibres écologiques, de la diversité génétique au sein de ces populations).

Ceci sous-entend de considérer davantage dans les modèles ce qui différencie les populations sauvages des populations cultivées, en particulier en terme de composantes de fitness : aptitudes compétitives (Andow, 1994), potentialité invasives, dormance des graines (Adler *et al.*, 1993 ; Hails *et al.*, 1997 ; Linder & Schmitt, 1994), etc. En particulier, il faut s'attacher à prendre en compte comment, en absence ou en présence de pressions de sélection sur le caractère transgénique, ces paramètres vont modifier les effectifs (Van Raamsdonk & Schouten, 1997) et le maintien de ces populations.

Toutefois, il faut bien garder à l'esprit que les modèles ne sont que des simplifications de la réalité biologique. Même si de plus en plus ces derniers intègrent de nouveaux paramètres et se complexifient (approche métapopulationnelle, modèles combinant génétique des populations et démographie), il reposent sur des hypothèses, souvent fortes, qu'il ne faut pas mettre de côté. Notons également que l'exploration de ces modèles nécessite de fixer un certain nombre de paramètres à des valeurs biologiques (paramétrisation) et que de plus ces modèles doivent être validés par des expérimentations. Par conséquent, on constate que certaines contraintes portant sur les expérimentations et les études de terrains se répercutent indirectement sur les modèles.

CONCLUSION

L'estimation scientifique des risques écologiques associés à la culture des plantes transgéniques peut donc se faire suivant trois approches : l'observation, l'expérimentation et la modélisation. Nous avons montré que ces trois types d'approches sont intimement liés et complémentaires puisque réalisés à des échelles de temps et d'espace différents (de la plante transgénique à des situations commerciales de culture). Nous avons également souligné, indirectement au travers de quelques exemples, que des études au cas par cas sont incontournables, chaque complexe plante cultivée-plantes sauvages apparentées présentant ses propres caractéristiques qu'elles

soient culturales ou biologiques. Pour l'ensemble de ces raisons, l'évaluation scientifique du risque s'avère complexe et demande des investissements importants aussi bien en personnes qu'en temps. Ce dernier point est d'ailleurs souvent incompatible avec les délais fournis par les instances décisionnaires soumises également à des contraintes dépassant largement cette fois le simple cadre scientifique. Aux difficultés techniques (observation impossible de situations réelles) s'ajoutent des problèmes socio-économiques, voire politiques, que les scientifiques ne sont ni habitués à rencontrer, ni habilités à résoudre. Les affaires concernant le sang contaminé, la vache folle ou les hormones de croissance pour ne citer que les plus voyantes, remettent aujourd'hui en cause la confiance que pouvait accorder notre société au système de décision (BEPCA, 1997). Pendant un temps, la logique de la compétition industrielle a conditionné cette prise de décision mais aujourd'hui les mouvements citoyens sont à même de créer un contrepoids à la pression industrielle lorsqu'il est question de défendre l'individu et son environnement. Il n'est donc pas étonnant de constater que dès qu'il s'est agi d'introduire des OGM dans l'environnement, l'opinion publique ait été facilement mobilisable. Dans ces interactions complexes entre industriels, citoyens et pouvoirs politiques, les scientifiques sont souvent consultés mais presque toujours pour appuyer une décision donnée *a priori*. Or ces derniers, en tant qu'ensemble d'individus, n'ont pas d'opinion tranchée à avoir sur ces questions. Ils peuvent se mettre d'accord sur des données (distances de dispersion, probabilités d'hybridation...) mais les avis restent individuels et les décisions ne peuvent être prises que par des instances politiques issues du système démocratique. Dans ce contexte, l'information des citoyens est une nécessité et nous espérons que cet article contribuera à montrer au lecteur toute la complexité du dossier.

Bibliographie

1. ADLER L.S., WIKLER K., WYNDHAM F.S., LINDER C.R., SCHMITT J. (1993). Potential for persistence of genes escaped from canola : germination cues in crop, wild, and crop-wild hybrid *Brassica napus*. *Functional Ecology* 7, 736-745.
2. ANDOW D. A. (1994). Community response to transgenic plant release . using mathematical theory to predict effects of transgenic plants. *Molecular Ecology* 3, 65-70.
3. ARNOULD J., GOUYON P.H., LAVIGNE C., REBOUD X. (1993). OGM: Une théorie pour les risques. *Biofutur* Juin, 45-50.
4. BARANGER A., CHEVRE A.M., EBER F., RENARD M. (1995). Effect of oilseed rape genotype on spontaneous hybridization rate with a weedy species : an assessment of transgene dispersal. *Theoretical and Applied Genetics* 91, 956-963.
5. Biotechnology and the European Public Concerted Action group (1997). Europe ambivalent on biotechnology. *Nature* 387, 845-847.
6. BRIDGE (1994) Safety assessment of the deliberate release of two model transgenic crop plants, oilseed rape and sugar beet. Final report.
7. CHEVRE A. M., EBER F., BARANGER A., KERLAN M.C., BARRET P., FESTOC G., VALLEE P. & RENARD M. (1996). Ninth Crucifer Genetics Workshop. In *International Symposium on Brassicas*, vol. 407 (ed. C. I. Dias J.S., Monteiro A.A.), pp. 169-179. Acta Horticultura.
8. CRAWLEY M.J., BROWN S.L. (1995). Seed limitation and the dynamics of feral oilseed rape on the M25 motorway. *Proceedings of The Royal Society* 259, 49-54.
9. CRAWLEY M.J., HAILS, R.S., REES M., KOHN D., BUXTON J. (1993). Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *Nature* 363, 620-623.
10. DARMENCY H., FLEURY A., LEFOL E. (1996). Effect of transgenic release on weed biodiversity oilseed rape and wild radish. In *Brighton Crop Protection Conference-Weeds*, Brighton.

11. ELLSTRAND N.C., DEVLIN B., MARSHALL D.L. (1989). Gene flow by pollen into small populations: data from experimental and natural stands of wild radish. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 86, 9044-9047.
12. FRELLO S., HANSEN K.R., JENSEN J., JORGENSEN R.B. (1995). Inheritance of rapeseed (*Brassica napus*)-specific RAPD markers and a transgene in the cross *B. juncea* x (*B. juncea* x *B. napus*). *Theoretical and Applied Genetics* 91, 236-241.
13. GLIDDON C. (1994). The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species : biological models and Theoretical perspectives. *Molecular Ecology* 3, 41-44.
14. HAILS R.S., REES M., KOHN D.D., CRAWLEY M.J. (1997). Burial and seed survival in *Brassica napus* subsp. *oleifera* and *Sinapis arvensis* including a comparison of transgenic and non-transgenic lines of the crop. *Proceedings of The Royal Society* 264, 1-7.
15. KAREIVA P., MORRIS W., JACOBI C.M. (1994). Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and wild relatives. *Molecular Ecology* 3, 15-21.
16. LANGEVIN S.A., CLAY K., GRACE J.B. (1990). The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). *Evolution* 44, 1000-1008.
17. LAVIGNE C., GODELLE B., REBOUD X., GOUYON, P.H. (1996). A method to determine the mean pollen dispersal of individual plants growing within a large pollen source. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 1319-1326.
18. LAVIGNE C., KLEIN E.K., VALLÉE P., PIERRE J., GODELLE B., RENARD M. (1998). A pollen dispersal experiment with transgenic oilseed rape : estimation of the average pollen dispersal of an individual plant within a field.
19. LAVIGNE C. (1994). Les risques associés à la culture de plantes transgéniques résistantes aux herbicides, Institut National Agronomique Paris-Grignon.
20. LINDER C.R., SCHMITT J. (1994). Assessing the risks of transgene escape through time and crop-wild hybrid persistence. *Molecular Ecology* 3, 23-30.
21. LUBY J.J., MC NICOL R.J. (1995). Gene flow from cultivated to wild raspberries in Scotland : developing a basis for risk assessment for testing deployment of transgenic cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 90, 1133-1137.
22. MAC KENZIE D.R., HENRY S.C. (1990). Toward a consensus. In *Kiawah Island Conference . Biological monitoring of genetically engineered plants and microbes* (ed. D. R. MacKenzie and S. C. Henry), pp. 273-283. Agriculture Research Institute, Beteshda, Maryland, USA.
23. MIKKELSEN R.T., ANDERSEN B., JORGENSEN R.B. (1996). The risk of crop transgene spread *Nature* 380, 31.
24. OARD J.H., LINSCOMBE S.D., BRAVERMAN M.P., JODARI F., BLOUIN D C., LEECH M., KOHLI A., VAIN P., COOLEY J.C., CHRISTOU P. (1996). Development, field evaluation, and agronomic performance of transgenic herbicide resistant rice. *Molecular Breeding* 2, 359-368.
25. PAUL E.M., THOMPSON C., DUNWELL J.M. (1995). Gene dispersal from genetically modified oil seed rape in the field. *Euphytica* 81, 283-289.
26. PICART-NIZOU A.L., PHAM-DELÈGUE M.H., KERGUELEN V., DOUALT P., MARILLEAU R., OLSEN L., GRISON R., TOPPAN A., MASSON C. (1995). Foraging behaviour of honey bees (*Apis mellifera* L.) on transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L. *var. oleifera*). *Transgenic Research* 4, 270-276.
27. REBOUD X. (1992). Les risques associés aux manipulations génétiques : le cas de la résistance aux herbicides, Institut National Agronomique Paris-Grignon.
28. ROBERT T., LESPINASSE R., PERNÈS J., SARR A. (1991). Gametophytic competition as influencing gene flow between wild and cultivated forms of pearl millet (*Pennisetum typhoides*). *Genome* 34, 195-200.
29. SCHEFFLER J.A., PARKINSON R., DALE P.J. (1993). Frequency and distance dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Research* 2, 356-364
30. SCHEFFLER J. A., PARKINSON R., DALE P.J. (1995). Evaluating the effectiveness of isolation distances for field plots of oilseed rape (*Brassica napus*) using a herbicide-resistance transgene as a selectable marker. *Plant Breeding - Zeitschrift Fur Pflanzenzuchtung* 114, 317-321.
31. SKOGSMYR I. (1994). Gene dispersal from transgenic potatoes to conspecifics : a field trial. *Theoretical and Applied Genetics* 88, 770-774.
32. TIMMONS A.M., CHARTERS Y.M., CRAWFORD J.W., BURN D., SCOTT S.E., DUBBELS S.J., WILSON N.J., ROBERTSON A., O'BRIEN E.T., SQUIRE G.R., WILKINSON M.J. (1996). Risks from transgenic crops. *Nature* 380, 487.

33. TIMMONS A.M., O'BRIEN E.T., CHARTERS Y.M., DUBBELS S.J., WILKINSON M.J. (1995). Assessing the risks of wind pollination from fields genetically modified *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Euphytica* 85, 417-423.

34. VAN RAAMSDONK L.W.D., SCHOUTEN H.J. (1997). Gene flow and establishment of transgenes in natural plant populations. *Acta Botanica Neerlandica* 46, 69-84.

B7 : Les risques liés à la commercialisation des plantes transgéniques

LAINE E.[1], HAICOUR R.[2], MENIEUX JJ.[3]

[1] Université de Picardie J. Verne Labo Biotechnologies Végétales 33, rue St Leu 80039 Amiens Cedex FRANCE

[2] Université Paris Sud Labo Morphogenèse Végétale Expérimentale Bât 360 91405 Orsay Cedex FRANCE

[3] Université Paris Sud Labo Morphogenèse Végétale Expérimentale Bât 360 91405 Orsay Cedex FRANCE

INTRODUCTION

La transgenèse végétale réalisée par l'homme est une technique récente, on peut faire remonter ses débuts à 1983 environ avec les premières utilisations d'*Agrobacterium tumefasciens* et ses premiers produits commercialisés à 1994 (tomate « Calgene » à maturation retardée aux USA). Aux États-Unis la part des surfaces dévolues à la culture de plantes transgéniques devient significative : 6 % pour le maïs et 12 % pour le soja et représente des millions d'hectares (surtout colza, soja, coton et maïs).

À l'heure actuelle plusieurs milliers d'essais au champ de plantes transgéniques ont été autorisés. Plus des trois quarts sont effectués avec la douzaine de plantes suivante : colza, tabac, tomate, pomme de terre, maïs, tournesol, soja, coton, luzerne, betterave sucrière, courgette et melon. Les **gènes** introduits jusqu'à présent ne sont guère plus variés, la plupart codant pour des résistances aux pathogènes (surtout aux insectes) et des résistances à des herbicides. La maturation retardée ou modifiée est également au point pour plusieurs espèces de fruits (et bientôt pour les fleurs). La gamme des **promoteurs** utilisés est encore plus réduite puisque la plupart des réalisations emploient des promoteurs viraux constitutifs. Les plantes déjà commercialisées reflètent l'état de la technique du début des années 90.

Comme pour toute technique qui en est à ses balbutiements l'évaluation est nécessairement difficile, d'abord parce qu'étant encore peu répandue son impact est difficile à évaluer (certains problèmes ne se font jour que lors d'une diffusion de masse), ensuite parce qu'elle est encore très imparfaite et que de nombreux perfectionnements ne manqueront pas de voir le jour, sans doute aussi d'ailleurs certaines défaillances ou dérives

Des recherches pluridisciplinaires sont menées afin de fournir des données fiables aux experts et aux politiques qui ont à prendre les décisions d'autoriser production et consommation des produits issus de la transgenèse. Ainsi, l'agence américaine de l'agriculture (USDA) finance 10 projets d'évaluation des risques liés aux agro-biotechnologies.

RISQUES SANITAIRES

Toxicité

Les gènes introduits sont inquiétants pour le public car ils ne viennent plus seulement d'autres végétaux comme pour la sélection classique mais de bactéries ou de virus qui ne font pas habituellement partie de notre alimentation. Certains composés, même végétaux, peuvent montrer des effets nocifs seulement après une consommation

répétée, par exemple il y débat actuellement sur les effets féminisants des « phyto-œstrogènes » du soja. Une toxicité pourrait aussi résulter de la transgenèse dans le cas où la résistance à un herbicide serait accompagnée de la rémanence de produits de dégradation toxiques dans la partie consommée de la plante, le risque est alors celui d'un « empoisonnement à bas bruit durant des dizaines d'années » (Bargoin, 1997).

Ces problèmes toxicologiques sont en fait les mêmes que ceux rencontrés lors de la mise sur le marché de nouvelles molécules pharmaceutiques ou phytosanitaires, dans ces domaines aussi il y eut des retraits du marché lorsque des effets nocifs à long terme sont apparus après des années de consommation, remarquons que personne n'a demandé alors l'interdiction globale des insecticides ou des médicaments...

Pour le moment les autorisations de mise sur le marché se font pour des plantes qui expriment le gène dans tous les organes et en particulier dans ceux qui constituent la récolte. **Il est possible d'éviter la consommation du produit résultant de la transgenèse.** En utilisant des promoteurs spécifiques d'organes ou de stade de développement qui vont conduire à une expression localisée, dans ce cas la toxicité éventuelle restera limitée à des organes non consommés. En effet l'expression des gènes introduits n'est souvent pas nécessaire dans l'organe consommé, ainsi les résistances doivent parfois être exprimées au niveau des feuilles ou des racines alors que la partie consommable est constituée par la graine ou le fruit. **Il est aussi envisageable de choisir d'autres gènes** : il existe, pour lutter contre les insectes ravageurs ou pathogènes, d'autres stratégies que la substance insecticide, par exemple le transfert du génome d'un virus pathogène pour le parasite (ex : cotonnier résistant au ver de la capsule, réalisé par le CSIRO (ADIT, 1996)). On peut citer encore l'exacerbation des défenses naturelles du végétal (chitinases, thionines, résistance systémique acquise) voire la synthèse par le végétal de « planticorps » (contre les nématodes). Les résistances aux virus de végétaux ne posent pas à priori de problèmes de toxicité.

Allergies

Hormis les transformations ayant des stratégies antisens (ou cosuppression) la transgenèse entraîne au minimum la présence de protéines nouvelles dans une plante et donc celle d'allergènes potentiels. Les propriétés allergéniques des protéines ne sont toutefois pas toujours imprévisibles, on connaît par exemple des familles de protéines allergéniques très conservées dans le règne végétal (profilines du pollen, protéinases, lyzozyme etc.) et on peut donc parfois prédire ce risque, à l'inverse celles dont les masses moléculaires ne sont pas comprises entre 10 et 70kDa sont rarement allergéniques (Monneret-Vautrin, 1997).

La démonstration (ou la bourde?) la plus célèbre à ce jour est la réalisation par une équipe de Pionner Seeds d'un soja transgénique (non commercialisé) possédant un gène codant pour l'albumine 2S de la noix du Brésil, ceci était destiné à améliorer la richesse en acides aminés indispensables à l'homme. Il se trouve que les propriétés allergisantes (connues) de la noix du Brésil étaient dues à cette protéine et furent transférées aussi (Nordlee et al., 1996). La transformation des gluténines du blé est également à l'ordre du jour, or pour ce type de transformation, il ne sera jamais question d'expression en dehors du produit récolté !

En soi, le risque d'allergie existe pour toute nouvelle plante consommée et on va retrouver les problèmes rencontrés lors de l'introduction de n'importe quel nouvel aliment. Le problème en fait réside plutôt dans la possibilité pour le consommateur allergique d'être informé de la présence éventuelle de protéines

nouvelles par un étiquetage. On objectera que cela sera difficile, en effet il est plus facile d'éviter un aliment identifié particulier (fraise, œuf etc...) qu'une variété transgénique de soja ou de blé, surtout si de plus elle entre dans la composition de produits alimentaires dérivés. Cependant un tel étiquetage existe déjà : on peut lire sur de nombreux produits des mises en garde comme « peut contenir un produit issu d'arachide » (responsable fréquent d'allergies alimentaires)... Le corollaire d'une telle obligation est que les récoltes transgéniques et non-transgéniques doivent être identifiées, pour l'heure c'est plutôt le contraire qui est la règle, bien qu'il existe la possibilité technique de marquer simplement une récolte, avec des confetti par exemple (cela a déja été effectué pour du colza, les confetti sont ôtés par soufflage avant la trituration). L'étiquetage sera peut être en fait bientôt réalisé plutôt sur les produits non transgéniques si ceux ci deviennent minoritaires, à la façon des produits « bio ».

Le problème soulevé par l'étiquetage réside dans sa véracité qu'il sera difficile de contrôler. En effet il faut que techniquement le contrôle soit réalisable afin que toute fraude puisse être détectée, ce qui n'est pas le cas. Il y a deux obstacles majeurs : la détection par PCR impose de connaître les séquences nucléotidiques introduites : il faut savoir quel gène on cherche !, une solution proposée est d'imposer la présence d'une petite séquence donnée dans tous les organismes transgéniques (Benoit-Browaeys, 1997).

Il est à signaler que le transfert de gène pourra aussi servir à rendre non allergisantes certaines plantes qui l'étaient naturellement, ceci en empêchant l'expression de gènes codant pour les protéines impliquées dans ces allergies (par stratégie antisens, cosuppression ou action via des régulateurs de transcription). Du riz ne contenant pas la protéine à l'origine d'allergie chez 10 000 Japonais a été obtenu par fusion cellulaire, la réalisation de la même performance par transgenèse est envisageable.

Acquisition de résistances par des organismes pathogènes pour les humains

Faut-il craindre que des organismes du sol ou de la flore commensale ou pathogène, intestinale ou stomacale, des hommes et des animaux puissent être en contact avec des transgènes conférant des résistances ?. Ceci étant particulièrement important pour les gènes de résistance aux antibiotiques (parfois utilisés pour la sélection des plantes ayant reçu un transgène). La transmission horizontale de matériel génétique entre espèces non apparentées existe, particulièrement chez les bactéries, et son existence est un élément important du risque lié à la transgenèse. En dehors de ces cas l'insertion de gènes exogènes reste difficile à prouver... sauf exceptions très notables... comme ce qui est réalisé par *Agrobacterium!*. De plus on commence à réaliser que l'ADN transféré n'est pas toujours seulement celui que l'on croit : Van de Graff et al. (1996) ont ainsi montré qu'en plus de l'ADN-T, tout ou partie d'un plasmide d'*Agrobacterium* était parfois intégré dans le génome végétal (et donc éventuellement d'autres gènes de résistance que ceux souhaités). Le passage *via* le sol d'un transgène de résistance à l'hygromycine d'un végétal vers *Aspergillus niger* et son expression par celui ci a été décrit par Hoffmann et al. (1994), les auteurs avancent l'hypothèse que la dégradation de l'ADN est retardée par des molécules protectrices. Il a été également remarqué que les transferts de gènes entre bactéries sont favorisés en présence de vers de terre ! (Daane et al., 1996). Cependant souvent l'organisme d'origine de la résistance existe déjà dans le sol (par exemple résistance au glufosinate d'ammonium). **Rappelons à cette occasion que jusqu'à présent les gènes de résistance introduits ne sont pas synthétiques mais tirés d'organismes déjà présents dans la nature, l'opportunité**

de leur transfert naturel vers d'autres organismes préexistait donc à la transgenèse ! Remarquons quand même qu'il s'agit souvent d'antibiotiques plus ou moins obsolètes en raison justement de la grande fréquence de souches de pathogènes déjà résistants. Cependant l'ampicilline ou la kanamycine entrent encore dans la composition de spécialités pharmaceutiques commercialisées.

Une stratégie simple serait de n'utiliser que des gènes de résistance à un herbicide.

Une source plus efficace de dissémination des gènes vers les bactéries est *Agrobacterium* lui-même. Une étude récente (Barrett et al. 1997) a démontré qu'une importante proportion de tiges transgéniques abritait encore des agrobactéries (portant encore leur plasmide binaire), en particulier dans le xylème. **Il apparaît donc souhaitable de s'assurer de l'axénie des plantes régénérées (PCR avec des amorces correspondant à des gènes d'agrobactéries et culture d'explants sur milieux favorable à la multiplication des bactéries pour indexation).**

En fait la transmission de gènes de résistance est déjà très répandue parmi les bactéries, cependant les plasmides qui les portent tendent à être perdus en l'absence de pression de sélection. **Ce qui conduit à la multiplication gênante de souches résistantes c'est donc plus l'usage intensif d'un antibiotique que l'apparition sporadique, nécessaire mais pas suffisante, d'individus résistants.** Un antibiotique utilisé dans l'alimentation des porcs (l'avoparcine ; analogue à la vancomycine utilisée pour les entérocolites humaines multirésistantes) vient d'ailleurs d'être interdit pour cette raison. Les souches multirésistantes qui posent des problèmes sanitaires resteront sans doute plus à même d'être trouvées dans les hôpitaux que dans le rumen d'une vache élevée au maïs transgénique...

Il est possible d'utiliser une résistance à un antibiotique mais de l'éliminer après usage en réalisant une double transformation à l'aide de deux plasmides ayant chacun un ADN-T, les double-transformations donneront des insertions à des sites différents avec ensuite une ségrégation dans la descendance permettant de recouvrer des plantes portant seulement le gène d'intérêt (Casse-Delbart, 1996).

RISQUES ÉCOLOGIQUES

Sélection de populations de pathogènes résistantes

La population parasite évolue d'autant plus vite que la pression de sélection qui s'applique est forte et ceci se produit lorsque la variété résistante devient très répandue. Ainsi des variétés d'avoine résistantes à la rouille mises sur le marché américain en 1943 furent ravagées dès 1949 par de nouvelles races de rouilles. Même plurigéniques les résistances seront vraisemblablement contournées si elles concernent des voies métaboliques proches : il existe déjà des insectes multirésistants aux différentes protéines de *Bacillus thurigiensis*. **La prochaine génération de plantes transgéniques sera plus sophistiquée avec entre autres stratégies possibles l'introduction conjointe de plusieurs résistances très différentes ou l'introduction de gènes codant pour des inhibiteurs de protéases afin de protéger le produit générateur de la résistance, ceci va rendre plus difficile la multiplication de ravageurs résistants.** À défaut, la rotation des cultures présentant des résistances variées ou la culture conjointe de plantes non résistantes prévient aussi la sélection du parasite. Une autre parade existe c'est la culture de parcelles non-transgéniques servant de « refuge » pour des insectes non virulents se croisant avec les résistants diminuant ainsi la proportion de résistants dans la génération suivante (Peferoen, 1997).

Dissémination des plantes résistantes : de nouvelles adventices ?

La plupart des plantes devenues envahissantes après leur introduction hors de leur zone d'origine l'ont été parce qu'elles n'ont pas été accompagnées de leurs pathogènes ou prédateurs d'origine. L'introgression dans la flore sauvage des transgènes fait donc l'objet d'études nombreuses et contradictoires, pourtant elle semble inéluctable dès que d'importantes populations de plantes transgéniques seront cultivées dans des zones où existent des adventices interféconds. En effet lorsqu'on augmente le nombre de « tirages », même avec une probabilité faible, l'espérance mathématique tend vers un.

Une étude Néerlandaise (De Vries et al., 1992) réalisée sur 42 plantes cultivées concluait que la moitié de celles-ci étaient peu ou pas à même de se croiser avec des espèces sauvages apparentées, par contre pour un quart d'entre elles un flux de gènes important était probable. Ce dernier pourcentage peut être plus élevé sous les tropiques, zone d'origine de nombreuses espèces cultivées ou si l'on prend en compte les croisement provoqués. Ainsi, une étude plus récente (Hancock et al., 1996) mentionne que la quasi-totalité des espèces cultivées peut se croiser avec un cousin sauvage. Le colza par exemple peut polliniser des espèces sauvages apparentées et ceci dans un rayon important. Le passage de transgène de résistance au glufosinate a ainsi déjà été observé du colza vers *Brassica campestris* (Mikkelsen et al. 1996).

La question qui se pose n'est donc plus vraiment « les gènes vont-ils s'échapper ? » mais plutôt quelles en seront les conséquences ?

L'apparition d'une plante sauvage portant le transgène ne signifie pas qu'une population importante va en découler, une pression de sélection doit s'exercer pour cela.

Les résistances aux herbicides sont appelées à se multiplier si l'on considère qu'en plus de leur intérêt agronomique elles sont la principale alternative aux résistances aux antibiotiques. Si des adventices apparentées et fécondables existent, le risque va être important de voir apparaître des mauvaises herbes hybrides capables de résister aussi bien que la culture au traitement herbicide voulu sélectif. Si l'on veut bien admettre que ces plantes vont être envahissantes ce ne sera que par rapport à un traitement herbicide donné et non pas en conditions naturelles, leur avantage sélectif n'existant qu'en présence de l'herbicide. Il faudra donc envisager une rotation de cultures (résistantes à des produits différents). Sinon, ce qui risque fort de se produire, c'est que l'herbicide en question devienne inefficace donc invendable ainsi d'ailleurs que les variétés résistantes à cet herbicide : ce sera une catastrophe économique pour le producteur de l'herbicide et des variétés résistantes. **L'apparition d'une résistance des adventices à ces herbicides totaux, peu toxiques et facilement bio-dégradés, en conduisant à leur abandon présente donc indirectement un risque plus sanitaire qu'écologique !**

Contrairement aux résistances aux herbicides, dans ce cas de *résistances à des pathogènes ou à des stress abiotiques* la pression de sélection sera naturelle et non pas créée par l'homme et on peut craindre de donner ainsi la possibilité à certaines « mauvaises herbes » de se développer plus ou de sortir de leur niche écologique pour en coloniser une nouvelle.

Plus ou moins d'herbicides?

Les sélectionneurs ont déjà mis sur le marché des variétés de maïs résistantes à des herbicides *obtenues par sélection classique* (Asgrow, 1997), chez le colza on rencontre aussi de telles résistances « spontanées » ; **les problèmes posés par ces plantes ne sont donc pas limités aux variétés transgéniques.** La quasi-totalité des

cultures reçoit actuellement des herbicides, soit totaux appliqués en pré-levée (avant la culture), soit sélectifs durant la culture (10 % seulement des cas). On retrouve certains de ces produits pourtant très suspectés d'effets nocifs (ex : atrazine très utilisée pour le maïs) dans la nappe phréatique. Bien sûr, les menaces d'interdiction limitent la création des variétés qui lui soient résistantes. **Il est plus sûr commercialement pour un obtenteur de réaliser des transformations avec des gènes codant pour des résistances à des herbicides peu toxiques et facilement dégradés, sur lesquels ne pèse aucun risque d'interdiction.**

On peut donc considérer que les herbicides « ex-totaux » destinés aux plantes transgéniques sont un moindre mal car ils sont parmi les plus facilement et rapidement biodégradables, par exemple par des bactéries du sol, celles précisément d'où provient le gène de résistance.

Et les pollinisateurs ?

Un risque particulier et attaché aux résistances aux insectes c'est celui de la toxicité possible pour l'insecte pollinisateur, le plus souvent l'abeille. Des études menées à la station apicole de Bures-sur-Yvette (Pham-Delègue) ont montré un impact seulement à dose très élevée dans le cas d'une antiprotéase de riz mais il existe d'autres substances insecticides à tester. Il faut préciser que le promoteur CaMV 35S, très utilisé, n'est pas vraiment constitutif : ainsi parfois il ne s'exprime quasiment pas dans le pollen qui fournit une partie de la ration alimentaire des abeilles (Wilkinson et al., 1997).

De nouveaux virus végétaux ?

Les résistances à différents virus phytopathogènes posent un autre problème : l'incorporation de séquences virales est une des stratégies qui a fait ses preuves. Des acquisitions de propriétés nouvelles de transmission ou de spectre d'hôte par des virus venant infecter de telles plantes transgéniques sont elles possibles ? On sait que des recombinaisons peuvent exister entre ARN de transgène et virus inoculé même si cela n'a pas été observé en champ (Wintermantel et Schoeltz, 1996). Un autre phénomène, déjà observé (Prufer et al., 1995) est la transencapsidation qui est la possibilité qu'un virus vienne « surinfecter » la plante et que son acide nucléique soit emballé dans la protéine de capside « transgénique ».

Une menace pour la biodiversité ?

Peut-on considérer comme Kahn (1996) que « le transfert d'un gène d'une espèce dans une autre espèce, en particulier, crée une nouvelle diversité biologique et ne la réduit pas. »?

L'appauvrissement variétal n'a pas attendu la transgenèse pour se produire : quelques variétés vedettes issues de la sélection classique représentent une part prépondérante des emblavements. On peut le déplorer mais il s'agit d'un autre débat. Quel effet spécifique peut avoir la transgenèse ? L'amélioration de variétés déjà performantes peut les rendre encore plus attractives et renforcer l'uniformisation déjà en cours. Mais contrairement à ce que l'on pourrait penser la transgenèse ne va pas uniquement faire disparaître des variétés : en rendant possible l'amélioration de variétés existantes ou abandonnées elle peut leur redonner une chance. Par exemple, le fait de réaliser une maturation sur commande peut donner un attrait nouveau à une variété de melon comme le Charentais, intéressant pour ses qualités organoleptiques mais difficilement exportable.

RISQUES ÉCONOMIQUES

Distorsion de concurrence due aux situations réglementaires différentes : l'Europe, les USA, les PVD

On craint que le génome lui même ne soit breveté par des sociétés de génétique, en fait, une *invention* est brevetable, pas une découverte! La nuance est d'importance : il faut démonter une faisabilité technique et la notion d'un produit généré par ce procédé. En réalité cela est très flou : certaines sociétés déposent des séquences par centaines !

Le système de dépôt de variété est en France indépendant du système des brevets, la brevetabilité du vivant est pour l'heure interdite mais la réglementation européenne est en cours de « finition ». PGS s'est vu refuser un brevet sur du colza transgénique en 1995 par l'Office des brevets européens qui a considéré qu'il s'agissait d'une nouvelle « variété » et refuse maintenant d'examiner les brevets de plantes transgéniques. Aux États-Unis le dispositif réglementaire est différent : on peut breveter une plante transgénique par un « Utility Patent » (brevet) en plus des deux autres systèmes du « Plant Variety Certificate » et du « Plant Patent ». Il y donc dans ce pays un développement rapide du commerce des semences transgéniques. À l'inverse, de nombreux pays du tiers-monde n'ont aucune législation protégeant les variétés, ni même d'organisme certificateur, ce qui peut décourager la création de variétés qui leur soient destinées.

À signaler qu'il existe une alternative au dépôt de brevet de plante transgénique : pour certaines utilisations, telles la production de vaccins dans un végétal, il sera possible d'infecter des plantes « normales » par un virus transgénique ayant intégré une séquence codante pour un épitope (Miele, 1997).

Concentration des pouvoirs, monopoles

Transgenèse ou pas, la domination du marché des semences par quelque firmes ou pays est déjà bien avancée : environ deux tiers des semences de grande culture exportées le sont par trois pays (USA, Pays-Bas et France) (Le Buannec, 1996). Les trois « grands » : Novartis, Agrevo et Monsanto achètent les sociétés d'ingénierie génétique ou les semenciers. On tend vers une situation où le fabricant de produits phytosanitaires sera aussi le fournisseur de graines. La situation du fournisseur de semences également acheteur de la récolte existe déjà pour les céréales et la dépendance de l'agriculteur augmente comme cela s'est produit avec les élevages en batterie contrôlés par les groupes d'aliment pour volaille ou bétail. Une telle dépendance serait-elle compensée par un revenu plus élevé et plus régulier ? Pour le moment les variétés transgéniques de soja et de maïs sont vendues 50 % plus cher que les variétés équivalentes non transgéniques... malgré cela l'augmentation très importante des surfaces emblavées cette année laisse penser qu'un gain a été perçu par les cultivateurs... Parfois l'existence de solution alternative va entraîner une compétition plus forte, par exemple le lâcher de trichogrammes est une alternative intéressante pour lutter contre la pyrale du maïs.

Désintérêt pour les cultures des PVD ou nouvelles opportunités ?

Peut-on prétendre avoir pour but de nourrir le monde grâce à la transgenèse alors que les essais et les demandes de mise sur le marché concernent quasi exclusivement des plantes cultivées en zones tempérées ou des cultures tropicales non vivrières. Mellon se demandait récemment (1996) si des efforts équivalents à ceux entrepris pour retarder la maturité des melons ne devraient pas aussi exister pour améliorer des plantes de PVD. Ces travaux sont peut-être moins médiatisés que ceux touchant les

espèces phares mais ils existent : ainsi l'ORSTOM en France ou les grand organismes internationaux monogénériques (IRRI, CIMIT etc.) réalisent des transferts de gènes sur des plantes tropicales : résistance à la bactériose du riz (Philipon, 1997), résistance à un virus pour la papaye et la patate douce (Monsanto, 1997).

On peut objecter que le travail à accomplir en agronomie et sélection classique reste immense en ce qui concerne les cultures des pays économiquement défavorisés mais **la transgenèse, en permettant d'introduire des résistances à des pathogènes est de nature à réduire le coût des intrants et à limiter les pertes avant et après récolte.**

Pour les fruits exportés, l'intérêt de la maturation retardée est également important : on estime à un quart la part des récoltes qui pourrissent ! (par exemple les bananes dans les docks du Costa-Rica ou les ananas à même le champ) (Evans, 1996). Il en va de même pour les cultures vivrières avec des pertes estimées parfois à plus de 50 % (Grierson, 1996).

Vers une modification de la répartition mondiale des cultures ?

En conférant des caractéristiques radicalement nouvelles à certaines cultures ou récoltes, la transgenèse peut conduire à des bouleversements dans la répartition mondiale des cultures, et ce d'autant plus que les multinationales contrôlent une grande partie des cultures faisant l'objet d'un commerce international (fruits, café, bois papetier entre autres).

Ainsi, la création de fruits (et bientôt de fleurs) à maturité retardée (par inhibition de la synthèse d'éthylène ou de sa perception), en rendant possible un transport du fruit vert puis un mûrissement sur commande autorise la délocalisation des cultures vers des zones mêmes lointaines aux coûts de main-d'oeuvre très bas et bénéficiant d'ensoleillements plus élevés. Il peut y avoir là de nouveaux débouchés pour les PVD dont certains souffrent de la désaffection pour leurs cultures d'exportation (café robusta ou arachide par exemple)... et des problèmes pour les agriculteurs des pays auparavant producteurs.

À l'inverse, de nombreuses plantes aromatiques ou médicinales constituent pour certains pays des monopoles en raison d'une répartition géographique étroite des espèces considérées. **Or il va devenir possible de faire produire certains de ces métabolites par des plantes de grande culture des climats tempérés. Il en va de même pour des cultures comme le palmier à huile, menacé par l'introduction dans le colza de gènes conduisant à la synthèse d'acides gras comme le laurate... Des pans entiers de l'économie d'un pays peuvent ainsi s'écrouler.**

En cas de « coup dur » : risque d'écroulement de filières

Pour l'instant le consommateur perçoit plus les risques de la transgenèse que ses avantages, ce qui est normal car les gains sont pour le producteur de semence et pour le cultivateur ... et les risques pour le consommateur ou son environnement. En effet les réalisations actuelles apportent rarement un gain en qualité du produit mais plutôt un avantage pour la culture ou le stockage ; la situation évoluera sans doute : un quart des tests au champ déjà réalisés concerne la qualité (Aphis, 1997). Si un problème de santé publique consécutif à la transgenèse se révèle après plusieurs années de production il y a fort à parier qu'on assistera à un phénomène analogue à celui rencontré par la filière viande bovine suite à l'épidémie d'encéphalite bovine : désaffection brutale des consommateurs et effondrement des cours.

CONCLUSION

Pour pouvoir considérer qu'un *danger réel* est *dû* aux plantes transgéniques il faut réunir deux critères :

- l'événement favorisé par la transgenèse doit avoir une *conséquence réellement néfaste.* Par exemple l'apparition sporadique de bactéries ou d'adventices résistants doit pour constituer une menace être suivie de leur survie et de leur multiplication importante, ce qui suppose une adaptation au milieu et une pression de sélection ;
- le danger considéré *ne doit pas préexister* à l'apparition des plantes transgéniques. Ainsi l'existence de bactéries résistantes à des antibiotiques ou la sélection de pathogènes végétaux virulents n'est aucunement une nouveauté. Les recombinaisons entre génomes viraux peuvent se produire lors d'une co-infection naturelle. De même l'utilisation intensive d'herbicides constitue déjà la règle. L'habileté des opposants à la transgenèse consiste à jouer sur l'ignorance du public concernant la situation présente afin de faire ressortir la « nouveauté » d'un événement.

De nombreuses recherches restent pourtant à mener dans des domaines comme :

- **l'écologie et la génétique des populations** afin de mieux cerner les risques de dissémination de gènes et leur impact ;
- **la génétique et la physiologie des plantes transgéniques** : l'expression d'un gène introduit semble pouvoir varier dans le temps, dans l'espace et au fil des générations sans qu'on en connaisse bien les causes ;
- **la recherche de promoteurs spécifiques** évitant l'expression souvent inutile dans ce qui constitue la récolte, celle aussi de gènes d'expression et de sélection moins porteurs de risques sanitaires ;
- **la toxicologie** des expositions longues à un produit (insecticide naturel par exemple) pour l'homme, l'animal domestique et aussi les insectes pollinisateurs.

En conséquence, on peut penser que la réglementation, quitte à retarder parfois de quelques années la mise sur le marché, pourrait être exigeante sur au moins quatre points :

1- l'absence de populations d'adventices capables de s'hybrider avec la plante transgénique dans la zone de culture envisagée lorsque le gène introduit confère une résistance ;

2- l'absence *dans les parties consommées* d'une plante d'un produit dont la non-toxicité à long terme n'est pas démontrée. Ceci limiterait l'utilisation de promoteurs constitutifs ;

3- l'utilisation de constructions n'utilisant *pas de résistances à des antibiotiques* encore utilisés en médecine humaine ou vétérinaire (sauf en cas de protocoles permettant d'ôter ensuite le gène) ;

4- *l'étiquetage* des produits (même dérivés) particulièrement en cas d'allergie connue à l'organisme d'origine du gène introduit.

En effet, une mise en évidence d'effets néfastes mal évalués à priori aurait à coup sûr un impact très négatif sur le marché des plantes transgéniques. Quand aux risques qui effraient plus le public que les scientifiques, en ces temps d'érosion de la confiance envers les experts, il est quand même utile d'y parer cela ne pourra que faciliter l'acceptation des produits transgéniques.

Bibliographie

1. BARGOIN V. Aliments transgéniques : les résistants expriment leur gène. Le Quotidien du Médecin. 1997 ; 6059 : 20-21.
2. BARRETT C., COBB E., MC NICOL R., LYON G.. A risk assessment study of plant genetic transformation using *Agrobacterium* and implications for analysis of transgenic plants PCTOC. 1997 ; 47 : 135-144.
3. BENOIT-BROWAEYS D. L'étiquetage des "nouveaux aliments" est un leurre. La Recherche 1997 ; 299 : 34-6.
4. CASSE-DELBART F. La transgenèse végétale *in* Les plantes transgéniques en agriculture; John Libbey Eurotext. 1996 : 59-88.
5. DAANE L.L., MOLINA J.A., BERRY E.C., SADOWSKY M.J.. Influence of earthworm activity on gene transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous soil bacteria. Appl Environ Microbiol. 1996 ; 62 (2) : 515-52.
6. DE VRIES F.T., VAN DER MEIJDEN R., BRANDENBURG W.A. Botanical files-a study of the real chances for spontaneous gene flow from cultivated plants to the wild flora of the Netherlands. Gorteria 1992 ; 1-100.
7. EVANS D. Produce on demand: What's good for US markets is good for world markets too. Nature Biotech. 1996 ; 14 : 802.
8. GRIERSON D. Silent genes and everlasting fruits and vegetables?. Nature Biotechnology. 1996 ; 14 : 828-29.
9. HANCOCK J.F., GRUMET R., HOKANSON S.C. The opportunity for escape of engineered genes from transgenic crops. Hort. Science 1996 ; 31 (7) : 1080-85.
10. KAHN A. Société et révolution biologique. 1996. INRA éditions.
11. HOFFMANN T., GOLZ C., SCHIEDER O. Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *Aspergillus niger* after co-culture with transgenic higher plants.Curr Genet 27(1). 1994 ; 27 : 70-76.
12. LE BUANNEC B. Perspectives économiques de la transgenèse végétale. *in* Les plantes transgéniques en agriculture; John Libbey Eurotext. 1996 ; 19-34.
13. MELLON M. Ripen on command: In a society with ample food, why bother ? nature Biotechnology. 1996 ; 14 : 800.
14. MIELE L. Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. TibTech. 1997 ; 15.
15. MIKKELSEN T.R., ANDERSON B., JORGENSEN R.B. The risk of transgene spread. Nature. 1996 ; 380 : 31.
16. MONNERET-VAUTRIN D.A. Les allergènes alimentaires et leurs modifications par les technologies agro-alimentaires. Cahiers Agricultures 1997 ; 6 : 21-9.9.
17. NORDLEE J.A., TAYLOR S.L., TOWSEND J.A., THOMAS L.A., BUSH R.K. Identification of a brazil-nut allergen in transgenic soybeans. N Engl J Med 1996 ; 334 : 688-92.
18. PEFEROEN M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops TibTech. 1997 ; 15 : 173-7.
19. PHILIPON P. Pas de miracle pour les pays en voie de developpement. Biofutur 1997 ; 164 : 23-24.
20. PRUFER D., WIPF-SCHEIBEL C., RICHARDS K., GUILLEY H., LECOQ H.,JONARD G. Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borneyellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses. Virology 1995 ; 214 (1): 150-8.
21. VAN DE GRAFF E., DULK-RAS A., HOOYKAAS P.J.J. Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium* to plants. Plant Molec Biol. 1996 ; 31 : 677-81.
22. WINTERMANTEL W.M., SCHOELZ J.E. Isolation of recombinant viruses between cauliflower mosaic virus and a viral gene in transgenic plants under conditions of moderate selection pressure.Virology 1996 ; 223 (1): 156-64.
23. WILKINSON J.E., TWELL D., LINDSEY K. Activities of CaMV 35S and *nos* promoters in pollen : implications for field release of transgenic plants. J of Exp. Bot. 1997 ; 307 : 265-75.

Pages WEB :

ADIT<http://www.adit.fr>.

APHIS <http://www.aphis.usda.gov:80/bbep/bp> et USDA <http://usda.gov>.

B8 : Incidence écologique de la diffusion des plantes transgéniques

CHARRIER A.[1], JACOB S.[2]

[1] UFR Génet. et Amélior. Plantes ENSAM 2, place Viala 34060 Montpellier Cedex 1 France

[2] INERA BP 7192 Ouagadougou 03 Burkina Faso

INTRODUCTION

L'utilisation de plantes génétiquement modifiées par génie génétique sera probablement l'un des faits marquants du début du XXI[e] siècle. Des perspectives d'applications intéressantes sont attendues pour l'amélioration des productions végétales à des fins alimentaires, médicinales, industrielles...Dans le même temps, la société est très déstabilisée par des « affaires » touchant la santé publique et très inquiète de l'émergence des biotechnologies végétales visant son alimentation, sa santé, son environnement...

Il faut tout d'abord rappeler l'intérêt scientifique majeur du génie génétique pour la connaissance du génome et de l'expression des gènes... Le transfert des résultats de ces recherches concerne en particulier la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés (OGM) ; la mise en culture des 1[ers] cultivars transgéniques se fait sous l'impulsion des institutions de recherche et des entreprises agro-industrielles. Cette nouvelle technologie émergente est encadrée par des législations nationales, des recommandations internationales (FAO, PNUE...), des directives européennes (90/220 CEE)... Les commissions chargées de ce dossier, telle la commission du génie biomoléculaire (CGB) en France, fondent leurs recommandations et propositions sur l'expertise et l'indépendance des scientifiques (Kahn, 1996).

Dans le cas des cultures de plantes OGM, la dissémination des transgènes et ses conséquences pour l'environnement peuvent être abordées par différentes approches complémentaires, au cas par cas. Elles sont fonction de la biologie de l'espèce, des relations entre espèces apparentées, de la nature du transgène, du caractère considéré et de l'écosystème récepteur. Les travaux réalisés concernent des expérimentations en conditions contrôlées (Chèvre et al 1996), des modélisations et simulations informatiques (Lavigne,1994) ou encore l'analyse de situations de terrain favorables pour des plantes cultivées tropicales (Charrier, 1991).

Dans le cadre de cette dernière approche, nous présentons un nouvel éclairage sur les flux de gènes (et de transgènes) existant dans les systèmes de culture du maïs au Burkina Faso (Sanou, 1996) et sur l'impact écologique potentiel de la diffusion des plantes transgéniques dans les pays tropicaux.

CADRE DE L'ÉTUDE

Dans beaucoup de pays d'Afrique de l'ouest, les cultivars locaux des cultures vivrières sont encore largement exploités et leur multiplication assurée par les paysans ; la diffusion lente de nouvelles variétés améliorées peut conduire à la cohabitation des 2 types de variétés. Dans certaines régions favorables de savane comme la zone

cotonnière, l'accès à la culture attelée, à la fertilisation et à la semence améliorée est plus aisée. C'est le cas pour le maïs au Burkina Faso avec la coexistence de nombreux cultivars locaux adaptés aux différentes zones écologiques du pays et la vulgarisation de quelques variétés améliorées chez les producteurs de coton.

Les collectes des cultivars locaux de maïs réalisées de 1988 à 1994 dans 80 villages sur l'ensemble du territoire ont été réalisées dans le double objectif de la conservation *ex situ* des ressources génétiques et de l'étude de la variabilité de la centaine de cultivars identifiés. Ils se répartissent en 2 zones agro-écologiques liées au climat et aux systèmes de culture :

1. une zone principale de culture du maïs, avec une pluviométrie de 900 à 1100 mm, associée à des cultures vivrières (sorgho, riz) et industrielles (coton, arachide) ;
2. une zone secondaire de culture de maïs, avec une pluviométrie de 600 à 900 mm, associée au sorgho-mil et à l'élevage pastoral.

Il est possible de donner une typologie des cultivars en rapport avec les pratiques agricoles. Les populations rurales du Burkina Faso cultivent le maïs soit dans des jardins de case, soit dans des champs plus ou moins éloignés des villages. En zone principale et secondaire, dans le jardin de case, véritable potager, les femmes cultivent en association des plantes vivrières (maïs, sorgho, niébé, gombo, tomate, oseille), avec des apports de matière organique et des arrosages. Les cultivars de maïs de case sont précoces (80 jours) et utilisés en immatures. En zone principale, l'agriculture itinérante, de brousse, accueille sur de grandes parcelles cultivées par les hommes, des cultures pures (maïs, sorgho ou mil, coton) ou des associations céréale-légumineuse en saison de pluies. On y cultive des maïs plus tardifs (100 jours) à grain corné-denté, utilisé pour la préparation du tô.

L'étude de la variabilité des cultivars a porté sur la variation des caractères agro-morphologiques et sur la diversité génétique neutre évaluée par les marqueurs isoenzymatiques (Sanou et al 1997).

MISE EN ÉVIDENCE DE FLUX DE GÈNES

Les marqueurs utilisés concernent 10 systèmes enzymatiques représentés par 18 loci répartis sur 9 des 10 chromosomes du maïs. La variabilité intra et inter cultivars a été analysée pour l'ensemble des variétés locales ainsi que 2 variétés élites IRAT 171 et SR22. L'analyse en composantes principales effectuée sur les fréquences alléliques met en évidence l'originalité du cultivar SR22 associée à 2 allèles IDH 1.2 et IDH 2.4.Ê: ils sont fréquents chez SR22 (fréquence 0.4 et 0.14 respectivement) et absents chez la plupart des cultivars locaux. Seuls 10 cultivars locaux possèdent ces allèles et pourraient résulter de flux de gènes avec SR22.

Un faisceau d'arguments en faveur de cette hypothèse est à considérer :

1. Les cultivars locaux présentant les allèles IDH 1.2 et 2.4.2 proviennent de villages pionniers de la zone cotonnière où a été cultivée la variété SR22, ainsi que dans 3 villages où des essais de comportement de SR22 ont eu lieu.
2. La variété améliorée SR22 a été diffusée à partir de 1986 pour son bon comportement vis-à-vis de la virose du maïs (maize streak virus) qui provoque des dégâts importants sur les cultivars locaux. Son taux d'adoption par les paysans peut dépasser 50 % bien que la qualité des grains soit inférieure.
3. Les flux de gènes entre plantes de maïs sont favorisés par le mode de reproduction allogame de l'espèce et sa pollinisation anémophile. La densité de

pollinisation décroît rapidement dans les premiers mètres, mais la distance de pollinisation à taux faible dépasse plusieurs dizaines de mètres.

4. Le niveau d'exposition des cultivars à l'introgression est dépendant des pratiques agricoles. La substitution par SR22 concerne les cultivars de plein champ chaque fois que le paysan accède à des conditions de culture améliorée et favorise la pollution des parcelles voisines ensemencées avec nombre d'autres cultivars locaux. L'isolement des cultivars de case est relatif, quelques exemples d'introgression ayant été identifiés.

5. La technique de multiplication par le paysan de ses propres semences s'accompagne d'une sélection des épis les mieux remplis, sur les plantes les plus vigoureuses. Ce choix favorise à chaque génération les plantes introgressées par la variété élite présentant de l'hétérosis - tel que démontré expérimentalement pour quelques caractères agronomiques.

En conclusion, l'existence d'échanges géniques entre la variété SR22 et les cultivars locaux du Burkina Faso a pu être démontrée grâce à une situation particulièrement favorable. En effet, SR22 a été sélectionné dans un pool génique original constitué par le CIMMYT à partir de cultivars mexicains. Il présente de ce fait une constitution génétique différente des cultivars africains pour quelques allèles et une distance génétique plus importante : la (distance de Nei entre cultivars locaux est de 0,004 à 0,006 et atteint avec SR22 0,049 à 0,067.

Dans une étude des cultivars locaux de maïs d'une région du Mexique, Louette (1994) a aussi mis en évidence les facteurs favorables à de tels flux géniques et l'enrichissement génétique des variétés résultant de cette gestion paysanne.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LA DIFFUSION DES TRANSGÈNES

1. Les échanges génétiques entre plantes d'une même espèce cultivée, surtout si elle est allogame, et avec les espèces apparentées sont connus (Darmency, 1994; Jorgensen et al, 1996). Les fondements conceptuels de cette approche reposent sur la notion d'espèce biologique d'une part, sur les pools géniques de Harlan et de Wet et les complexes d'espèces de Pernès d'autre part. Ainsi, nombre d'espèces végétales cultivées sont capables de se croiser avec les espèces spontanées ancêtres ou apparentées et de donner naissance à des plantes adventices.

La mise en culture prochaine de variétés transgéniques constitue une situation nouvelle, non pas du point de vue des flux géniques, mais par les conséquences du recours à des gènes nouveaux d'origine bactérienne, virale, voire artificielle. Il est donc indispensable d'étudier et d'approfondir au cas par cas notre connaissance des ensembles d'espèces apparentées, surtout ceux pour lesquels des variétés transgéniques sont en cours de développement. Les régions tropicales étant les zones d'origine et de diversification de nombre d'espèces cultivées, des risques potentiels de diffusion de transgènes sont à prévoir à terme, à cause de la circulation des semences à l'échelle mondiale, même si les pays concernés ne développent pas d'OGM à l'heure actuelle.

2. La majorité des scientifiques est consciente de l'impossibilité d'empêcher la diffusion de n'importe quel gène dans les cultures, ainsi qu'aux espèces adventices et spontanées avoisinantes. C'est la raison pour laquelle des mesures très strictes de confinement en laboratoire et en serre sont appliquées aux expérimentations sur les OGM et des mesures d'interdiction d'importation et de mise en culture sont prises par les législations nationales.

Par contre, il n'est guère possible de prédire la vitesse, l'étendue et l'impact à long terme des flux de gènes introduits par génie génétique. Les facteurs à prendre en considération dans une modélisation sont :

- la biologie de l'espèce (mode reproduction, dissémination pollen et grains...), et les paramètres démographiques ;
- la nature du caractère (déterminisme, valeur sélective...) ;
- l'agroécosystème.

3. Il est intéressant de considérer l'ensemble de ces paramètres agissant sur la dissémination des gènes dans le cas du maïs, en comparant des situations extrêmes de culture intensive aux USA ou en Europe et des pratiques culturales traditionnelles des régions tropicales (Sanou 1996 ; Louette et al. 1997).

Dans le premier cas, un nombre limité de variétés hybrides est cultivé sur de grandes surfaces au niveau de chaque exploitation et de la région agro-écologique. L'utilisation généralisée des traitements herbicides (triazines) depuis plusieurs décennies a permis la monoculture sur une même parcelle pendant plusieurs années. Cette pression de sélection constante a entraîné le tri de mutants résistants à la triazine dans les espèces adventices des champs de maïs comme le chénopode blanc. La dissémination de maïs transgéniques pour la résistance à des herbicides totaux à base de glyphosate ou glyfosinate mimerait la situation actuelle, avec les mêmes conséquences vis-à-vis de la flore adventice.

Dans les pays africains où l'on cultive de nombreux cultivars de maïs sur de petites surfaces, les possibilités de croisements sont favorisées, et la diffusion des transgènes serait rapide. L'introduction volontaire ou fortuite de maïs transformé résistant à la toxine de Bt entraînerait une sélection d'insectes résistants, identique à celle de la lutte chimique.

En conclusion, la notion de risque écologique associé à la diffusion des OGM n'est pas facile à évaluer et ne se prête à aucune généralisation selon les espèces végétales, les transgènes, le lieu, la période.... Les phénomènes biologiques (flux de gènes, introgressions) et le fonctionnement des populations (sélection, migration, dérive) intervenant ne sont pas nouveaux, mais nul ne peut prédire l'impact d'une nouvelle biotechnologie. Le principe de précaution (Godard, 1997) servira donc de guide à toute expérimentation et à toute diffusion d'OGM. Quant aux scientifiques, ils peuvent contribuer à la prise de décision (Roqueplo, 1997), en fournissant aux décideurs et au public des informations biologiques solides et en réalisant des expérimentations adaptées à chaque situation particulière.

Bibliographie

1. CHARRIER A., 1991. *in* Actes des Journées de l'Environnement/CNRS, 249-255.
2. CHÈVRE et al., 1996. Acta Hort. 407, 169-179.
3. DARMENCY H., 1994. Mol. Ecol. 3, 37-40.
4. GODARD, 1997. INRA Editions, Paris.
5. JORGENSEN R.B. et al., 1996. Trends in plant sciences, 10,356-358.
6. KAHN A., 1996. John Libbey Eurotext, 165 p.
7. LAVIGNE C., 1994 . Thèse INA.PG, Paris.
8. LOUETTE D., CHARRIER A., BERTHAUD J., 1997. Economic Botany 51(1), 20-38..
9. ROQUEPLO P., 1997. INRA Edition.
10. SANOU J., 1996. Thèse ENSA. Montpellier.
11. SANOU J., GOUESNARD B. et CHARRIER A., 1997. Maydica 42, 1-11.

SECTION B

Textes et résumés des Affiches

de B9 à B16

B9 : Vers la création de variétés d'épinard à teneur réduite en nitrate

CHARLES G., ASKOUK L., LEGUILLON S., DAMIOLINI F., XIAO X.G., LE ROUX M., BRANCHARD M.

Laboratoire d'Amélioration des Végétaux - Biotechnologie. ISAMOR, Université de Bretagne Occidentale

Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané (France). email : Gilbert.Charles@univ-brest.fr

INTRODUCTION

Certains végétaux, tels que l'épinard, la laitue ou la carotte, accumulent le nitrate aux niveaux feuille, tige et racine. Si la consommation de cet ion en tant que tel n'apparaît pas préjudiciable à la santé, il n'en n'est pas nécessairement de même pour ses dérivés, nitrite et nitrosamines. En conséquence, il existait dans certains pays, dont la France, des recommandations concernant la teneur maximale en nitrate des légumes commercialisés et une directive européenne limitant leur taux est appliquée depuis le début de l'année 1997. La concentration en nitrate peut être diminuée, notamment par le contrôle de la fertilisation azotée, le choix du génotype et le moment de la récolte. Cependant, même dans les meilleures conditions, dont la mise en pratique à l'échelon industriel n'est que partiellement envisageable, la teneur en nitrate de l'épinard peut rester élevée. La sélection traditionnelle n'ayant pas permis d'obtenir de variétés à teneur réduite en nitrate, la transgenèse a été envisagée. L'intégration du gène codant pour la nitrate réductase, et s'exprimant de façon constitutive, doit permettre d'éviter l'accumulation de nitrate généralement observée dans les vacuoles. Les résultats obtenus sur des plants de tabac transgéniques ayant intégré de telles constructions (Dorlhac de Borne *et al.*, 1994 ; Crété, 1995) ont conforté le bien-fondé de cette approche.

Diverses méthodes de régénération et de transgenèse ont donc été étudiées dans notre laboratoire afin d'intégrer chez l'épinard une construction codant pour la nitrate réductase. Les principaux résultats sont récapitulés dans cet exposé.

MÉTHODES DE RÉGÉNÉRATION

La maîtrise de la néoformation de plantes a déjà été obtenue soit par embryogenèse somatique, à partir de segments d'hypocotyles (Xiao et Branchard, 1993) ou de racines (Komai *et al.*, 1996), soit par organogenèse à partir de cals foliaires (Al-Khayri *et al.*, 1991), de segments d'hypocotyles et de racines (Mii *et al.*, 1992 ; Xiao et Branchard, 1995) et par culture de cellules (Xiao *et al.*, 1997) ou de protoplastes (Komai *et al.*, 1996).

Les protocoles de régénération actuellement mis au point sont en cours d'optimisation pour deux raisons majeures : i) un taux de régénération important est nécessaire pour produire des plantes à partir des cellules transformées ; ii) les plantes obtenues par les méthodes actuelles fleurissent prématurément, ce qui limite la production de graines. Signalons que l'épinard *in vitro*, qu'il sagisse d'une germination ou d'une régénérération à partir de cellules ou de tissus, ne se bouture pas : les plantes obtenues se développent, fleurissent rapidement, produisent éventuellement quelques graines et meurent. Un génotype intéressant, tout comme une structure transgénique nouvelle, doivent donc être entretenus par culture de tissus. Dans nos expériences, les explants « traditionnels », segments de racines ou d'hypocotyles, passent par une phase de callogenèse importante avant de néoformer des plantes, plusieurs mois après la mise en culture. De plus, le taux de régénération observé est limitant. Les facteurs génétiques, physiques et nutritionnels doivent donc être redéfinis pour résoudre ces problèmes, et ceci pour chacune des nouvelles méthodes de régénération retenues et actuellement en cours d'étude, à savoir les couches cellulaires minces transversales (CCMt) et les suspensions cellulaires. Le

choix d'un explant initial de petite taille devrait accroître les chances de régénérer une plante transgénique homogène.

Les couches cellulaires minces transversales

Cette technique de préparation de l'explant reprend celle mise au point par Tran Thanh Van (1973) avec des couches cellulaires minces longitudinales, et a permis de résoudre le problème de la régénération chez de nombreuses espèces récalcitrantes, mono et dicotylédones (Gendy *et al.*, 1996 ; Detrez *et al.*, 1988). Elle consiste à mettre en culture des explants obtenus par coupes transversales de différents organes et ne comportant que quelques assises cellulaires d'épaisseur. Ces explants sont donc particulièrement sensibles au milieu de culture et à l'environnement. De plus, l'origine des cellules réactives est facilement identifiable au sein de l'explant.

Les milieux de Xiao (Xiao et Branchard, 1993, 1995) mis au point et utilisés au laboratoire, à base d'une combinaison hormonale GA_3-AIA, ne sont plus adaptés pour régénérer à partir de couches minces.

Des plantes de 7 jours développées *in vitro* sont entièrement découpées en CCMt et déposées en boîtes de Petri sur un milieu utilisé par Komai *et al.* (1996) à base de MS/2 additionné d'ANA (10 µM), de GA_3 (0,1 µM) et de saccharose (10 g/l). Après 2 semaines d'obscurité à 25°C, où les premiers cals apparaissent, les boîtes sont transférées en photopériode de 16h (50 $\mu M.m^{-2}s^{-1}$). Après 8 semaines sur ce même milieu, les cals sont repiqués sur milieu MS à 20 g/l de saccharose. Les régénérations sont visibles après 8 semaines, au niveau des cals issus des fragments de la base des cotylédons (1,7 % des CCMt totales) et sont transférées en tubes où elles se développent et fleurissent rapidement. Chaque couche mince embryogène produit généralement plusieurs plantes, les embryons pouvant également porter des embryons secondaires.

Un autre milieu d'induction à base de MS additionné d'ANA, de GA_3 et de BAP (respectivement 100, 10 et 1 µM) a, pour l'instant, donné les meilleurs résultats et permet en particulier d'observer des embryons somatiques après 2 mois, ce qui est le temps le plus court actuellement réalisé pour régénérer l'épinard. Ce milieu sert donc maintenant de référence pour évaluer l'effet du préconditionnement de la plante-mère, de la concentration en ANA et des sucres (nature et concentration).

Les suspensions cellulaires

Le protocole de Xiao *et al.* (1997) a été repris en vue d'augmenter le nombre de régénérants, de raccourcir leur délai d'obtention et d'augmenter leur conformité. Des milieux moins riches en régulateurs de croissance ont tout récemment permis d'observer de nouvelles régénérations, et ceci à partir de différents génotypes et de différentes fractions cellulaires, selon le protocole suivant : les racines et les hypocotyles de germinations âgées d'une semaine sont découpés et déposés sur milieu de callogenèse (milieu MS avec 49 µM d'AIA et 10 µM de GA_3) durant 4 à 5 semaines. Des cals friables sont obtenus et mis en agitation (125 rpm) en milieu liquide (milieu de Dalton et Street (1976) avec AIA, GA3 et kinétine (respectivement 6, 1 et 2,3 µM)) en photopériode de 10h (40 $\mu M. m^{-2}s^{-1}$), à 22°C. Une semaine plus tard, les cellules libres sont récupérées par filtration (fraction 100-200 µm et 63-100 µm) et remises en suspension (90 rpm) dans du milieu neuf, avec repiquage toutes les deux semaines et changement de milieu toutes les 4 semaines (contenant AIA, GA3 et kinétine aux concentrations respectives : 6,1 et 2,3 µM puis 14,1 et 0 µM et enfin 0,1 et 0 µM). Les petites cellules de la première fraction sont les plus actives. Au bout d'un mois, les cals visibles à l'œil nu, apparus en milieu conditionné, sont transférés en milieu liquide de régénération (milieu de Al Khayri (1991)). Certains forment alors des pousses feuillées qui sont repiquées sur le même milieu de croissance solide en boîtes de Petri, puis en tube à essais contenant un milieu de culture solide, sans hormones (MS/2), qui les conduit à une floraison généralement précoce.

TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE

Différentes méthodes de transgenèse, directes et indirectes, ont été utilisées pour notre étude, et les principaux résultats sont récapitulés ci-après.

Agrobacterium rhizogenes

Cette méthode est la seule qui permette de s'affranchir d'un protocole de régénération très performant quant au taux de plantes produites par explant, puisque la transformation induit le développement d'une racine transgénique génétiquement « homogène ». En théorie, il suffit donc de régénérer quelques plantes de « bonne qualité » à partir de cette racine. C'est aussi la seule méthode qui ait permis d'obtenir des plantes transgéniques et des descendants Gus positifs à l'heure actuelle (Askouk, 1996). Des difficultés demeurent néanmoins, en particulier pour régénérer des plantes à floraison normale et abondante en vue de produire des graines.

La souche A4 utilisée est une souche à agropine. Le TL-DNA contient le plasmide pMarcel 70 GUS (Robaglia *et al.*, 1987), porteur d'un gène *gus* chimérique sous contrôle du promoteur 2x35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Des plantes de la variété Carpo, âgées de 15 jours et développées *in vitro* sont décapitées et infectées. Les racines apparues au site d'infection sont repiquées en boîtes de Petri sur milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) avec 250 mg/l de céfotaxime. Un mois plus tard, des segments d'1 à 2 cm sont placés sur milieu MS additionné d'AIA (8 mg/l) et GA3 (3,5 mg/l) où des cals puis des pousses feuillées vont se développer pour atteindre 2 à 5 cm après 10 semaines. Toutes ces pousses expriment le caractère Gus et fleurissent le mois suivant. Une pollinisation manuelle a permis d'obtenir quelques graines ainsi qu'une descendance exprimant également le caractère Gus.

Ce protocole a été appliqué à l'obtention de racines transgéniques chez divers génotypes (Carpo, lignées #2 de Rijk Zwaan et RS1 de Royal Sluiss) pour intégration du gène codant pour la nitrate réductase. Les difficultés rencontrées ont conduit à mettre en évidence une inhibition du développement racinaire induite par la céfotaxime au cours de la phase de décontamination. Elles laissent également envisager une perturbation du métabolisme, liée à la surexpression de la nitrate réductase, qui fera l'objet d'une étude spécifique.

Des cals résistants à la kanamycine et ayant potentiellement intégré le gène de la nitrate réductase ont cependant été obtenus et sont en cours de différenciation.

Agrobacterium tumefaciens

Des développements tumoraux ont été observés après inoculation de plantes et d'explants par les souches sauvages C58 et 139.82. Cette dernière souche a produit des tumeurs rhizogènes, et non des tumeurs caulogènes comme observé habituellement chez le peuplier (Brasileiro *et al*, 1991) et le chou-fleur (Passelègue et Kerlan, 1996), mais les racines obtenues n'ont néoformé aucune plante. L'utilisation des souches désarmées LBA 4404 GUSint, C58GV2260 GUSint et C58pMP90 GUSint a permis d'induire la formation de quelques secteurs Gus positifs (colorés en bleu), mais aucune structure transgénique organisée n'a pu se développer.

Plus récemment, des expériences ont été réalisées en transformant non plus les fragments traditionnels, mais des CCMt. Plus de 90 % des CCMt traitées se sont révélées Gus positives.

Biolistique

Notre étude de cette approche de la transgenèse directe a été effectuée sur le cultivar Carpo, en utilisant un plasmide pCH 1 (8,5 kb) contenant le gène *gus* et le gène de sélection *npt* II conférant la résistance à la kanamycine. Différents facteurs ont été testés en vue d'évaluer la capacité des microprojectiles à transférer l'ADN étranger dans le génome de l'épinard : poids de la charge propulsive, concentration en CaCl2, spermidine, ADN et tungstène. L'efficacité du transfert a tout d'abord été évaluée par bombardement de disques foliaires et comptage du nombre de spots bleus obtenus par boîte de Petri deux jours après le bombardement. Les meilleures conditions de transfert sont obtenues avec 30 à 40 mg de poudre, 10 µl d'ADN (0,5 µg/µl), 25 µl de CaCl2 (2,5 M) et 25 µl de spermidine (100 mM).

Ces conditions ont été appliquées à des cals organogènes et embryogènes (0,5 cm de diamètre). Sept jours après bombardement et culture sur milieu MS additionné d'AIA (8 mg/l), GA3 (3,5 mg/l) et kanamycine (25 mg/l), le test histochimique GUS a révélé 21 ± 7 spots bleus par boîte de Petri (80 cals par boîte). Deux semaines après, 6,5 % des cals formés étaient GUS positifs et 6 semaines après bombardement, 5 cals parmi les 1460 bombardés ont régénéré des pousses qui ont fini par se nécroser. Les mêmes conditions appliquées à des suspensions cellulaires ont permis d'isoler des cellules bleues mais les divisions ont cessé après 2 semaines.

L'utilisation de cette méthode directe a conduit à la première introduction et expression d'un gène étranger chez l'épinard, mais aucune plante transgénique n'a pu être obtenue et sevrée.

CONCLUSION

Le point sur ces recherches montre que l'obtention d'épinard transgénique est possible. L'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens*, comme celle du canon à particules, a permis de transférer de l'ADN étranger qui s'est exprimé dans des cellules d'épinard, mais aucune plante n'a encore été régénérée par ces méthodes.

L'utilisation d'*Agrobacterium rhizogenes* comme vecteur de transfert a conduit à la production de plantes transgéniques. Bien que le processus soit très lent (environ 9 mois), il est efficace et reproductible.

Le principal obstacle actuel concerne la floraison précoce des pousses transgéniques, comme déjà constaté chez *Nicotiana* (Schmülling *et al.*, 1988) ou *Cichorium* (Sun *et al.*, 1991). L'effet du génotype et de l'environnement physique et hormonal seront évalués pour résoudre ce problème.

Les méthodes de transformation par canon à particules ou par *A. tumefaciens*, combinées avec des méthodes de régénération à partir de couches cellulaires minces ou de cellules, devraient également permettre d'évaluer un plus grand nombre de régénérants et d'accroître leur conformité notamment en raccourcissant la durée du cycle de culture *in vitro*.

Abréviations

AIA : acide indole-3 acétique, ANA : acide 1-naphtalène acétique, GA_3 : acide gibbérellique, CCMt : couches cellulaires minces transversales, MS : milieu de Murashige et Skoog (1962).

Remerciements

Les auteurs remercient le Dr. Caboche (INRA Versailles) pour la construction « nitrate réductase », le Dr. L. Jouanin et le Dr. M. Tepfer pour la souche d'*Agrobacterium rhizogenes* et le plasmide pCH1, les Compagnies Nunhems Zaden, Rijk Zwaan et Royal Sluis pour les semences, Coopagri-Bretagne et la région Bretagne pour leur support financier.

Bibliographie

1. AL-KHAYRI J.M., HUANG F.H., MORELOCK T.E., 1991. Regeneration of spinach from leaf callus. HortSci., 26, 913-914.
2. AL-KHAYRI J.M., HUANG F.H., MORELOCK T.E., ZHANG H.T., 1992. Transient gene expression in spinach callus transformed with *Agrobacterium tumefaciens* Hort Sci., 27, 621.
3. ASKOUK L., 1996. Mise au point d'une méthode de transformation génétique de l'épinard (*Spinacia oleracea* L.) en vue de l'obtention de plantes à teneur réduite en nitrate Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, 90p.
4. BRASILEIRO A.C.M., LEPLÉ J.C., MUZZIN J., OUNNOUGHI D., MICHEL M.F. JOUANIN L., 1991. An alternative approach for gene transfer in trees using wild-type *Agrobacterium* strains. Plant Mol. Biol., 17, 441-452.
5. CRÉTÉ P., 1995. Dérégulation de l'expression de la nitrite réductase : conséquences physiologiques et mise en évidence d'un contrôle post-transcriptionnel. Thèse de doctorat, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 107 p.

6. DALTON C.C., STREET H.E., 1976. The role of the gas phase in the greening and growth of illuminated cell suspension cultures of spinach (*Spinacia oleracea* L.). In Vitro, 12, 485-494.
7. DETREZ C., TETU P., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S., 1988 Direct organogenesis from petiole and thin layer explants in sugar beet cultured *in vitro*. J. Exp Bot., 39, 917-926.
8. DORHLAC DE BORNE F., DE ROTON C., DELON R., CHUPEAU Y., 1994. Étude du comportement agronomique de tabacs industriels transgéniques présentant une activité nitrate réductase élevée. Ann. du Tabac - Seita - Bergerac - Sect 2, 26, 19-37.
9. GENDY C., SÉNE M., BUI VAN LE, VIDAL J., KIM TRAN THANH VAN, 1996 Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Plant Cell Rep., 45, 900-904
10. KOMAI F., OKUSE I., HARADA T., 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in culture of root segments of spinach (*Spinacia oleracea* L.). Plant Sci., 113, 203-208.
11. KOMAI F., MASUDA K., HARADA T., OKUSE I., 1996. Plant regeneration from adventitious root of spinach (*Spinacia oleracea* L.) grown from protoplasts. Plant Sci., 120, 89-94.
12. MII M., NAKANO M., OKUDA K., IIZUKA M., 1992. Shoot regeneration from spinach hypocotyl segments by short term treatments with 5,6-dichloro-indole 3-acetic acid. Plant Cell Rep., 11, 58-61
13. MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15, 473-497.
14. PASSELÈGUE E., KERLAN C., 1996. Transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) by transfer of cauliflower mosaic virus genes through combined cocultivation with virulent and avirulent strains of *Agrobacterium*. Plant Sci., 113, 79-89.
15. ROBAGLIA C., VILAINE F., PAUTOT V., RAIMOND F., AMSELEMJ., JOUANIN L., CASSE-DELBART F, TEPFER M., 1987. Expression vectors based on the *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid transformation system. Biochimie, 69, 231-237.
16. SCHMULLING T., SCHELL J., SPENA A., 1988. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. EMBO J., 7, 2621-2629.
17. SUN L.-Y., TOURAUD G., CHARBONNIER C., TEPFER D., 1991. Modification of phenotype in Belgian endive (*Cichorium intybus*) through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes* conversion from biennial to annual flowering.-Transgenic Research, 1, 14-22
18. TRAN THANH VAN M., 1973. Direct flower neoformation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. Planta, 115, 87-92.
19. XIAO X.-G., BRANCHARD M., 1993. Embryogenesis and plant regeneration of spinach (*Spinacia oleracea* L.) from hypocotyl segments. Plant Cell Rep., 13, 69-71.
20. XIAO X.-G., BRANCHARD M., 1995. *In vitro* high frequency plant regeneration from hypocotyl and root segments of spinach by organogenesis. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 42, 239-244
21. XIAO X.-G., CHARLES G., BRANCHARD M., 1997. Plant regeneration from cell suspensions of spinach. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. In Press.

B10 : Régénération et transformation par biolistique chez *Digitaria sanguinalis* (L.) scop utilisant la méthode des couches cellulaires minces

BUI V.L., DO M.Y.T., GENDY C., VIDAL J., TRAN THANH VAN K.
Institut de Biotechnologie des Plantes, Université de Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

Des embryons somatiques puis des plantes ont été régénérées directement à partir de couches cellulaires minces transversales (CCMt) de *Digitaria sanguinalis*. Les CCMt (de 0,1 à 0,3 mm, 1 mm de diamètre) sont excisées à partir de jeunes plantes de 4 semaines. L'influence des différentes auxines, celle du saccharose et des conditions d'environnement seront présentées ainsi que les techniques de transformation par biolistique des CCMt.

Différentes constructions d'ADN ont été utilisées, notamment de promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), le promoteur phosphoénolpyruvate carboxylase du sorgho (PEPC). Les gènes de résistance soit à la kanamycine (gène NPT II) soit au glufosinate (gène BAR) sont utilisés comme marqueurs de sélection et le gène de la β-glucuronidase (GUS) comme marqueur de visualisation.

Des plantes résistantes au glufosinate et au Basta ont été sélectionnées (F_0). Des graines issues de F_0 ont été testées pour leur résistance au même agent de sélection : 5 % de plantes résistantes à 3 mg/l de glufosinate ont été obtenues, alors que 100 % des plantes-témoin meurent.

B 11 : Transformation génétique de suspensions embryogènes de bananier (*Musa* AAB) par bombardement de particules

COTE F.X., LEGAVRE T., GRAPIN A., VALENTIN B., MONMARSON S., FRIGOUT O., BABEAU J., BAKRY D., TEISSON C.

CIRAD-FLHOR, CIRAD-BIOTROP. Av. du val de Montferrand. 34032 Montpellier cedex. F

Une technique de culture de suspensions cellulaires établies à partir de tissus embryogènes issus de fleurs mâles a été développée. Cette technique a été appliquée avec succès à des cultivars AAA, AAB, AA. Les suspensions ont un pouvoir embryogène élevé. Les embryons somatiques régénérés ont dans leur majorité une origine unicellulaire. Un canon à particules (BioRad PDS-1000/ He) a été utilisé pour développer une méthode de transfert de gène, la cible étant constituée d'agrégats d'une suspension cellulaire en phase de croissance exponentielle. Deux paramètres ont une influence majeure sur le niveau d'expression transitoire (déterminé par l'activité β-glucuronidase du gène GUS) : les niveaux d'expression les plus importants sont obtenus lorsque la croissance de la suspension embryogène est rapide et ils sont proportionnels à la pression du flux d'hélium. On passe ainsi de moins de 100 points bleus par tir à 900 PSI à plus de 1200 points à 1500 PSI. Les niveaux moyens d'expression sont supérieurs à 1000 spots par tir (chaque tir est réalisé sur 0,2 ml de volume cellulaire) et peuvent atteindre plus de 4000 spots. Des suspensions du cv French sombre (plantain *Musa* AAB) ont servi de cible pour la transformation stable. La transformation a été réalisée avec le plasmide pILTAB 309 contenant les gènes *gus* et *hph* de résistance à l'hygromycine sous le contrôle de la séquence promotrice du CaMV35S. Quatre jours après le tir, les agrégats cellulaires sont placés sur milieu de multiplication auquel est ajouté 50 mg/l d'hygromycine. Les masses embryogènes résistantes sont transférées après 100 jours de culture sur un milieu de régénération contenant également un agent sélectif. Les plantules qui se sont développées sur ce milieu sont repiquées 50 jours plus tard sur un milieu d'enracinement contenant lui aussi de l'hygromycine. Dans ces conditions, la croissance des plantules est continue mais retardée alors que les plantes témoins se nécrosent entièrement en moins de 15 jours. L'analyse moléculaire de ces plantules confirme une intégration stable du transgène. Cette méthode de transformation est en cours de transfert sur d'autres génotypes.

B12 : Application de la technique biolistique pour la transformation du blé (*Triticum aestivum L.*)

DELPORTE F., JACQMIN S., JACQUEMIN J.M.
Centre de Recherches Agronomiques - Station d'Amélioration des Plantes. Rue du Bordia, 4, B-5030 GEMBLOUX. (BELGIQUE)

L'intérêt du canon à particules est clairement établi pour la transformation génétique d'espèces végétales d'intérêt agronomique récalcitrantes aux techniques classiques de transformation. Le succès d'une méthode de transformation génétique repose sur la définition de la meilleure combinaison d'un vecteur de transformation et d'une méthode de régénération à haute fréquence. Cette combinaison est couplée à des techniques efficaces de sélection des transformants et de validation du phénomène de transgenèse. Les travaux publiés jusqu'à présent faisant état de l'obtention de blé transgénique sont basés sur un système de régénération induit au départ d'embryons immatures. Nous développons deux modes de régénération par embryogenèse somatique. La callogenèse est initiée, soit au départ d'agrégats cellulaires d'embryons matures, soit au départ de la culture du scutellum d'embryons immatures. Deux constructions plasmidiques sont utilisées conjointement pour effectuer le bombardement. La construction pUCBasta contient la séquence codante *bar* (De Block et al. 1987) flanquée du promoteur du transcrit 35S du virus de la mosaïque du chou fleur et la construction pEmuGN comporte la séquence codante *gus* insérée en aval du promoteur pEmu (Last et al. 1991). Le gène marqueur *bar* code pour la phosphinotrycine acétyle transférase, il confère aux cellules qui l'expriment la résistance à la Phosphinotrycine (PPT), matière active entrant dans la composition de l'herbicide Basta. Le gène marqueur *gus* code pour l'enzyme ß-glucuronidase, dont l'activité est décelable par un essai de type colorimétrique ou fluorométrique.

CALLOGENÈSE INITIÉE AU DÉPART D'EMBRYONS MATURES

Les agrégats cellulaires d'embryons matures sont obtenus par extrusion de ces derniers au travers d'un fin tamis en Nylon, en conditions aseptiques. Cette méthode de régénération créée au laboratoire est un procédé original qui offre l'avantage d'un gain de temps et de simplicité du mode opératoire. Les procédés de régénération utilisés par Narender *et al.* 1994 et Becker *et al* 1994 pour l'induction de l'embryogenèse somatique au départ d'embryons immatures furent adaptés à nos conditions de culture. Le choix des conditions de culture finalement adoptées est déduit de la comparaison des moyennes du pourcentage de régénération relatives à chacune de ces méthodes. L'effet du bombardement sur la capacité de callogenèse et de régénération est estimé ainsi que l'effet du rapport ADN/particules sur le taux d'expression transitoire du gène marqueur *gus*. Nous avons testé les conditions de bombardement et les modalités d'application de la pression de sélection en fonction de l'état physiologique des explants.

CALLOGENÈSE INITIÉE AU DÉPART D'EMBRYONS IMMATURES.

Les embryons sont prélevés en conditions aseptiques, 12 à 20 jours après fécondation. Nous évaluons l'efficacité de la pression de sélection lorsque celle-ci est appliquée immédiatement après bombardement ou de manière différée, ainsi que l'avantage de combiner la molécule sélective à une source de carbone autre que le saccharose. De plus, nous comparons l'efficience du bialaphos (antibiotique naturel, précurseur de la PPT) comparée à celle du sel d'ammonium de la phosphinothrycine.

RÉGÉNÉRATION DE PLANTES AU DÉPART DE CALS EMBRYOGÈNES BOMBARDÉS AVEC LES GÈNES MARQUEURS *BAR* ET *GUS*

Près de 7000 cals obtenus selon l'une ou l'autre des méthodes précitées furent bombardés avec les plasmides pUCBasta et pEmuGN. 146 plantules sont obtenues par embryogenèse somatique au départ des cals embryogènes bombardés et sélectionnés en présence de l'agent sélectif PPT. 2,09 plantes en moyenne sont générées par 100 explants bombardés, ce pourcentage de régénération moyen oscillant entre les valeurs extrêmes de 0,4 et 6 %. 10^6 et 40 plantes émanent respectivement de la mise en culture des embryons immatures et des agrégats cellulaires d'embryons matures. Tous les cals témoins non bombardés et sélectionnés ont dépéri. L'analyse des plantes F0 est réalisée par les méthodes PCR et Southern. Afin de discerner les plantes non transgéniques des plantes ayant intégré les transgènes de manière stable (selon une nature chimérique ou non), nous avons examiné la génération F1 émanant de l'autofécondation des plantes F0. Trente lignées de 15 graines d'un même épi F0 sont semées et pulvérisées au stade 3 feuilles avec l'herbicide Basta. Certaines familles F0 donnent naissance à des plantes F1 dont le comportement au traitement sélectif se démarque légèrement de celui des témoins. Ces plantes sont soumises à un dosage de l'activité du marqueur *gus*, par un essai de type fluorométrique. On observe que des épis F0 ont produit des plantes dont l'activité moyenne est de 2,6 et 3 fois plus élevée que celle des témoins. Trente autres lignées de 15 graines F1 sont semées et soumises au dosage fluorométrique de l'activité du gène marqueur *gus*, indépendamment de tout traitement sélectif. Treize descendances F1 présentent une activité moyenne au moins 2 fois supérieure à celle des témoins. L'ADN de ces plantes F1 est extrait en vue d'effectuer des analyses de type Southern. Les résultats préliminaires indiquent la présence de séquences homologues aux plasmides introduits. Des études plus détaillées de la structure des séquences intégrées dans le génome sont en cours.

Bibliographie

1. BECKER D. et al. (1994) The Plant Journal 5(2). 299-307.
2. DE BLOCK et al. (1987) The EMBO Journal 6(9): 2513-2518.
3. LAST et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 81: 581-588.
4. NARENDER S., NEHRA et al. (1994) The Plant Journal 5(2)·285-297.

B13 : Définition d'un modèle d'embryogenèse somatique du blé dur (*Triticum durum* Desf.) propice à l'application d'une méthode de transformation génétique

FERNANDEZ S., COUMANS M.
Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie Végétale Appliquée UMII, Place Eugène Bataillon. Case 002, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Le blé dur (*Triticum durum* Desf.) est une céréale tétraploïde *circum* méditerranéenne, utilisée pour confectionner les pâtes et la semoule.

Dans le but d'en améliorer génétiquement les variétés, la transgenèse offre une alternative intéressante, celle de pouvoir introduire spécifiquement dans le génome d'une plante, le ou les gènes désirés. L'application des méthodes de transformation génétique (Biolistique,

Electroporation, *Agrobacterium tumefaciens*...) nécessite l'établissement de systèmes hautement embryogènes. Chez le blé dur, de tels systèmes ont été initiés sur cal à partir du scutellum d'embryons immatures de blé dur [1] ou par l'intermédiaire de protoplastes [2]. Toutefois, les 2 techniques décrites nécessitent un temps de culture *in vitro* important et il est admis que c'est l'un des facteurs impliqués dans l'apparition des variations somaclonales [3].

Nous avons donc cherché à définir un système d'embryogenèse somatique de préférence d'origine unicellulaire ou oligocellulaire rapide et à haut rendement de régénération à partir du scutellum de l'embryon immature de blé dur.

Une étude morphologique, complétée d'une étude histologique, a permis de déterminer la chronologie de la réponse des embryons immature *in vitro*. Dès le 5^{e} jour de culture sur milieu d'induction, les proembryons sont visibles à la surface du scutellum de l'embryon immature cultivé sur milieu MS modifié. Après 21 jours de culture, 3 types de réponses sont observés : cals non régénérants, cals régénérants mais non embryogènes et explants embryogènes. Après 28 jours de culture, certains embryons somatiques sont déjà développés et montrent une structure foliacée semblable à un scutellum. Après 42 jours de culture, les explants embryogènes sont repiqués sur milieu de germination. Une optimisation du taux de conversion des embryons somatiques en plantes vertes est actuellement en cours d'étude. Ces données rejoignent les résultats obtenus récemment sur d'autres cultivars de blé dur [4].

Une étude histologique plus détaillée des premiers jours de culture a démontré que ces embryons somatiques sont d'origine oligocellulaire. Pendant cette même période, l'estimation des index mitotiques des zones sous-épidermique et épidermique supérieure et inférieure du scutellum montre que ces embryons somatiques proviennent de divisions de l'épiderme supérieur du scutellum. D'autre part, cette même étude permet de définir de façon plus précise la transition entre les divisions normales d'harmonisation de croissance de l'épiderme et la reprise des divisions de l'épiderme lié à l'ontogenèse des embryons somatiques ce qui permet de mieux cibler dans le temps la période de bombardement. Le modèle défini répond en partie aux caractéristiques recherchées puisque des embryons d'origine oligocellulaire s'individualisent dès les 8 premiers jours de culture et sont complètement formés après 6 semaines de culture. De plus, l'origine épidermique stricte des embryons somatiques est susceptible de faciliter la transformation génétique.

Toutefois, le potentiel embryogène de ce modèle s'est révélé nettement insuffisant (13,6 % de cals embryogènes). Le repiquage des explants à partir de 7 jours après l'initiation des cultures a conduit à une perte du potentiel embryogène. Ceci a suggéré une implication de l'éthylène dans le processus d'embryogenèse somatique du blé dur, déjà démontrée pour l'embryogenèse somatique du maïs [5] et pour l'androgenèse du blé dur [6]. Un mg.l^{-1} d'$AgNO_3$ augmente significativement la capacité embryogène des explants *via* le pourcentage de cals embryogènes (x 6) ainsi que le nombre moyen d'embryons somatiques par explants (x 22).

Ce modèle a servi de point de départ à des manipulations de transformation génétique par biolistique (canon type PIG). La comparaison des effets de 2 plasmides (pJIT 72 et pRPA-RD 109 fournis par Rhône-Poulenc) sera présentée. Des expérimentations d'expression transitoire ont permis d'optimiser les paramètres du canon utilisé (distance de tir, pression d'hélium). Une étude histologique menée en parallèle devrait permettre de localiser la couche cellulaire la plus touchée par les impacts de billes. L'influence du tir sur la capacité embryogène des explants et les essais de transformation stable sont en cours.

Bibliographie

1. BORELLI G.M., LUPOTTO E., LOCATELLI F., WITTMER G., Long-term embryogenic cultures in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Plant Cell Rep., 10 (1991) 296-299.
2. YANG Y.M., HE D.D., SCOTT K.J., Plant regeneration from protoplasts of durum wheat (*Triticum durum* Desf. D6962). Plant Cell Rep., 12 (1993) 320-323.
3. SKIRVIN R.M., MC PHEETERS K.D., NORTON M., Sources and frequency of somaclonal variation. HortSci., 29 (1994) 1231-1237.
4. BOMMINENI V.R., JAUHAR P.P., Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. Plant Sci., 116 (1996) 197-203.

5. VAIN P., FLAMENT P., SOUDAIN P., Role of ethylene in embryogenic callus initiation and regeneration in *Zea Mays* L. J. Plant Physiol., (1989) 537-540.
6. SÉVENIER R., COUMANS M., Ethylene production and involvement during the first steps of durum wheat (*Triticum durum*) anther culture. Physiol. Plant., 96 (1996) 146-151.

B14 : Production massive de transgènes OCI de pomme de terre (cv. Kennebec) par le système de transfert *Agrobacterium tumefaciens*

LE V.Q., MICHAUD D.

Nous avons développé un protocole à haut rendement pour la transformation et la régénération de plantules de pomme de terre (cv. Kennebec) à partir d'explants foliaires matures. Une lignée d'*Agrobacterium tumefaciens* (souche LB4404) transformée avec un plasmide encodant le marqueur de sélection nptII et le gène de résistance aux insectes oryzacystatin I (OCI) a été utilisée comme vecteur de transfert. Dans les conditions utilisées, environ 80 % des explants avaient produit des cals résistants à la kanamycine (5 à 15 cals par explant) aprés 4 semaines sur milieu de sélection. Après 5-6 semaines sur milieu d'organogenèse, les cals ont produit des bourgeons dans une proportion de 60 % à raison de 10 à 20 bourgeons distincts par cal, alors que des tiges de 5 cm prélevées à partir des cals et placées sur milieu d'enracinement avaient développé des racines aprés 10 jours en présence de kanamycine (50 mg/l). En bref, le cycle de transformation/régénération décrit est d'environ 10 semaines, avec un taux de transformation de 700-800 plantes par 100 explants traités. L'intégration du gène nptII au génome des plantes enracinées a été confirmée dans la quasi-totalité des cas. Les plantules obtenues, de phénotype normal, montraient une gamme variée de taux d'expression (de 0 à 2,5 % des protéines solubles) et d'activité OCI. Des rendements de transformation similaires ont été obtenus pour d'autres variétés de pomme de terre et pour d'autres gènes d'intérêt.

B15 : Transformation génétique du tournesol (*Helianthus annuus* L.) par *Agrobacterium tumefaciens* : analyse de différents facteurs

MOLINIER J.
Institut de Biologie Moléculaire des Plantes12, rue du Général Zimmer 67084 Strasbourg Cedex

Le tournesol, *Helianthus annuus* L., est devenu au début des années 90 la deuxième espèce oléagineuse cultivée au monde après le soja. On le retrouve actuellement dans les zones tempérées de l'Europe, de l'Asie et de l'Amérique du Sud. Ses akènes contiennent un fort pourcentage d'huile constituée essentiellement d'acides gras insaturés (plus de 65 % d'acide linoléique et 20 % d'acide oléique) mais trés peu d'acides gras saturés (moins de 12 % d'acides palmitique et stéarique). Actuellement la valorisation du tournesol à des fins alimentaires (huile pour salade, pour cuisson, margarine) représente 80 % de la valeur économique de la plante. D'un autre coté l'utilisation du tournesol à des fins non alimentaires (détergents, peintures, produits pharmaceutiques) nécessiterait une modification de son équilibre en acides gras et pourrait permettre aux agriculteurs de valoriser leurs cultures sur un marché économique novateur et porteur. Pour cela, des programmes de sélections ont été mis en œuvre, mais ces procédés s'avérent long et limités. L'évolution du génie génétique permet d'appréhender ce

probléme d'une façon plus directe et plus ciblée. L'introduction, grâce à *Agrobacterium tumefaciens*, de génes codant pour des enzymes intervenant dans la biosynthèse des acides gras, telles des thioestérases, permettant la production de chaînes moyennes d'acides gras, ou des désaturases, permettant la modification de l'équilibre entre acides gras saturés et insaturés, est envisagée. Plusieurs protocoles de transformation du tournesol par Agrobacterium tumefaciens ont été développés (Everett et al. 1987, Schrammeijer et al. 1990) mais ils s'avèrent d'une fiabilité aléatoire dans l'optique d'une application à grande échelle. En se basant sur le travail de Burrus et al. (1997) nous avons fait une étude systématique de l'ensemble des facteurs intervenant dans le protocole de transformation. Dans un premier temps les quantifications ont été réalisées après 4 semaines de culture par la visualisation de l'expression d'un gène marqueur codant pour la ß-D glucuronidase (GUS). L'utilisation de différentes combinaisons de facteurs de croissance (AIA/BAP, TIBA/BAP, TDZ/AIA) nous a permis d'augmenter le pouvoir de régénération et de formation de pousses adventives des axes embryonnaires. Le nombre de cellules dans lesquelles l'ADN-T des agrobactéries a été transféré a aussi été augmenté en multipliant les sites de blessure sur les explants. La virulence des agrobactéries (souches GV 2260 et EHA 105) vis-à-vis des axes embryonnaires a été stimulée grâce à l'utilisation de composés phénoliques activant les gènes vir de l'agrobactérie. La combinaison de ces différents facteurs nous a permis d'optimiser le protocole existant et d'obtenir, après 4 semaines de culture, une fréquence beaucoup plus élevée de plantules présentant l'expression de gènes rapporteurs tels que le GUS ou la GFP (Green Fluorescent Protein). La deuxième phase du travail reposera sur le maintien de l'expression de ces génes marqueurs après le transfert en serre. L'ensemble de ces travaux sera appliqué à l'introduction des gènes codant pour l'acyl-[ACP] thioestérase et la Δ9-stéaroyl-[ACP]désaturase sous le contrôle de promoteurs spécifiques de l'embryon ainsi qu'à l'analyse de la descendance des plantes transgéniques et la stabilité de l'expression du transgène.

Bibliographie

1. BURRUS et al. (1997). Molecular Breeding 2: 329-338.
2. EVERETT et al. (1987). Biotechnology 5 : 1201-1204.
3. SCHRAMMEIJER et al. (1990). Plant Cell Reports 9 : 55.

B16 : Ingénierie de la stérilité-mâle à l'aide d'un gène mitochondrial non-édité. Restauration de la fertilité par la stratégie des ARNm antisens

MOURAS M.

Laboratoire de Biologie Cellulaire & Biotechnologie Végétale Université de Bordeaux II. Laboratoire de Biologie Moléculaire. Institut de Biochimie & Génétique Cellulaires - CNRS, Bordeaux.

Le contrôle de la fertilité mâle chez les plantes est un des problèmes clés des programmes d'amélioration des plantes ; il repose fréquemment sur l'exploitation de la stérilité mâle cytoplasmique (CMS) qui se traduit par un avortement du pollen. Dans les systèmes alloplasmiques, la CMS est due à une incompatibilité noyau-cytoplasme. Des observations réalisées chez le Maïs et le Pétunia émerge l'hypothèse que la CMS est due à une déficience de la machinerie bioénergétique mitochondriale. Au niveau cellulaire, cette déficience est corrélée avec une dégénérescence des cellules du tapis de l'anthère sans perturber le développement de la plante. Nous avons émis l'hypothèse que toute altération du fonctionnement des complexes

impliqués dans la chaîne bioénergétique pourrait conduire à une baisse substantielle et permanente du taux d'ATP synthétisé, sans perturber les étapes essentielles du développement de la plante. Cette situation pourrait se traduire par le phénotype mâle-stérile. Notre démarche a consisté à importer dans les mitochondries une protéine du complexe ATP synthase, la sous-unité 9 (ATP 9) modifiée (protéine non fonctionnelle), laquelle entrerait en compétition avec la protéine endogène. Notre projet fait appel à une fonction mitochondriale concernant la modification du message génétique (editing). Nous avons disposé de deux formes du gène *atp9* (édité et non édité) dont les protéines seraient le produit d'un message avant editing ou après editing, ce dernier correspondant à la forme fonctionnelle. En effet, il a été montré chez le blé que la protéine fonctionnelle dérive d'un ARNm édité alors que les produits des messagers non-édités ne sont pas détectables. L'importation dans les mitochondries est assurée par la fusion en 5' d'*atp9* de la préséquence du gène *cox IV* de levure. Ce gène chimère a été placé sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV dont l'activité est constitutive. Ce projet a pour but le contrôle de la formation du pollen par une approche qui prétend se rapprocher d'une situation qui se produit *in vivo*. L'application de ce modèle sera étendue à des plantes d'intérêt agronomique. En outre ce modèle d'étude constitue un modèle très intéressant pour comprendre la fonction de l'editing chez les plantes

OBTENTION DE PLANTES MÂLE-STÉRILES

Les plantes transgéniques, renfermant la forme non-éditée ou la forme éditée du gène, ont un phénotype comparable voire identique aux plantes témoins contenant uniquement le gène de sélection ou aux plantes non transformées *N. tabacum* SR1 : croissance pondérale, vitesse de croissance, nombre d'entre-nœuds, taille et forme des feuilles, nombre et forme des fleurs. La fertilité des plantes transgéniques obtenues après transformation avec le gène *atp 9* non-édité est en revanche considérablement modifiée : 19 % d'entre-elles présentent une fertilité très réduite, 31 % sont mâle-stériles. La stérilité et la semi-fertilité est corrélée avec une production de pollen trés faible, voire nulle, et une viabilité (test de germination du pollen) qui varie de 0 à 40 % pour les plantes stériles à semi-fertiles contre 50 à 90 % pour les fertiles. La mise en évidence de la protéine transgénique a été analysée à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre la partie préséquence du transgène. Ces anticorps ne réagissent pas avec les protéines des plantes témoin non transformées ; ils présentent par contre, chez les plantes transgéniques, une réaction croisée, avec deux types de protéines : une protéine cytosolique de 15 kD représentant le précurseur qui aprés maturation donne naissance à une protéine mitochondriale de 12 kD. L'analyse cytologique de plantes mâle stériles a montré que le tapis des anthères est affecté. La dégénérescence des mitochondries en est le symptôme. Ces résultats sont conformes avec l'hypothèse formulée à savoir que le dysfonctionnement mitochondrial est corrélé avec la présence de la protéine transgénique sous sa forme non-éditée.

RESTAURATION DE LA FERTILITÉ DES PLANTES TRANSGÉNIQUES MÂLE-STÉRILES PAR LE BIAIS DE LA STRATÉGIE « ARN ANTISENS »

Dans un souci d'application de notre travail au domaine de l'amélioration des plantes, la restauration de la fertilité des plantes transgéniques mâle-stériles s'avérait absolument nécessaire. Pour ce faire, une expérimentation similaire à celle déjà réalisée pour produire des plantes mâle-stériles a été mise en œuvre. Elle est toutefois basée sur la stratégie des « antisens » à savoir que des plantes transgéniques fertiles exprimant le géne *atp9* disposé en position inverse dans le vecteur de transformation devraient produire des ARNm antisens dont la séquence nucléotidique devrait être complémentaire de celle produite dans les plantes transgéniques mâle-stériles. Des croisements entre des plantes mâle-stériles (parent femelle) avec des plantes produisant l'ARN antisens (parent mâle) étaient susceptibles de conduire à des plantes fertiles-restaurées. Des lignées restauratrices hémizygote (H4.4) et homozygote (H4.4s) de tabac transgénique exprimant fortement le transcrit antisens coxIV-atp9, sous le contrôle du promoteur constitutif 35S, ont été créées. Une lignée mâle-stérile homozygote (H2.11s) a

également été sélectionnée pour les études de restauration de la fertilité. L'intégrité des transgènes dans les plantes a été contrôlée par la technique de PCR à l'aide de primers qui permettent de distinguer les constructions sens des antisens, ainsi que la liaison entre le marqueur de sélection et le transgéne. Les croisements (H2.11s) x (H4.4s) et (H2.11s) x (H4.4) ont été réalisés. La descendance F1 issue de ce croisement a fait l'objet d'investigations au niveau phénotypique, génétique et moléculaire :

- Au niveau phénotypique, les plantes F1 présentent des caractéristiques semblables à celles des parents. En ce qui concerne la fertilité, deux cas de figure sont à distinguer:
- la descendance du croisement (H2.11s) x (H4.4s) produit des plantes chez lesquelles le pollen relativement abondant est capable de germer, sur un milieu approprié, dans des proportions allant de 26 à 85 % suivant les plantes. La F1 produit en moyenne 2,3 g de graine par plante.
- La descendance du croisement (H2.11s) x (H4.4) produit deux types de plantes : des plantes produisant du pollen fertile, et des plantes produisant du pollen stérile. Ces dernières ne produisent pas de graines. Quant aux plantes fertiles, elles produisent approximativement la même quantité de graines que les plantes sauvages.
- Au niveau génétique, la descendance F1 du croisement (H2.11s) x (H4.4s) ségrège dans les proportions 4:0 (fertile : stérile). Les graines de 2 plantes prises au hasard dans la population F1 ont été semées en serre pour suivre la ségrégation de la fertilité à la génération F2. La descendance des 2 plantes analysées, ségrège le caractère fertile : stérile dans les proportions 13:3, selon un schéma classique de ségrégation mendelienne. La descendance F1 du croisement (H2.11s) x (H4.4) ségrége dans les proportions 1:1 (fertile : stérile).
- Au niveau moléculaire, des expériences de RT-PCR réalisées sur des descendants des croisements de H2.11s avec les plantes hétéro- et homozygotes « restauratrices anti-sens », montrent que les transcrits correspondant au transgène antisens sont détectables dans toute la descendance. Par contre, les transcrits du transgène non-édité, inducteur de la stérilité mâle, sont absents. Dans tous les individus ou l'expression du transgène atp9 non-édité est inhibée par les antisens, le phénotype est mâle fertile. Des expériences de Northern blot sur des ARNm poly(A^+) confirment les résultats de RT-PCR et corrèlent parfaitement avec la ségrégation du phénotype mâle-stérile. À la lumiére de ces résultats, il est possible de : (a) confirmer la fonctionnalité du transgène coxIV-atp9-non-édité (contrôlé par le promoteur 35S de CaMV) dans l'induction de la stérilité mâle chez le tabac. (b) conclure à l'effet restaurateur de la construction antisens et considérer la lignée H4.4 s comme restauratrice de la fertilité.

SECTION C

Biotechnologies et sélection pour l'adaptation aux stress biotiques et abiotiques

Communications orales C1 à C5

C1 : Variation somaclonale et sélection *in vitro* pour l'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques chez le riz (*Oryza sativa* L.)

BERTIN P.[1], LUTTS S., VAN SINT JAN V., COSTA DE MACEDO C., KINET J.-M.

Université catholique de Louvain, Laboratoire de Cytogénétique, place Croix du Sud 5 b13, B-1348 Louvain-la-Neuve, BELGIQUE

[1] : Adresse actuelle: Station d'Amélioration des Plantes, rue du Bordia 4, B-5030 Gembloux, BELGIQUE

INTRODUCTION

Le riz (*Oryza sativa* L.) est l'une des principales plantes alimentaires du globe : il constitue la nourriture de base de plus de la moitié de l'humanité. Son importance est particulièrement grande dans les régions intertropicales, zones où la croissance démographique pèse le plus sur un équilibre alimentaire précaire. Rien d'étonnant, dès lors, qu'il soit de plus en plus souvent cultivé dans des zones marginales, où la salinité, la toxicité aluminique, et les basses températures sont les facteurs abiotiques qui limitent le plus sa productivité et l'extension de sa culture. La création de génotypes nouveaux, résistants à ces contraintes, constitue une des voies possibles pour résoudre ce problème. Plusieurs méthodologies peuvent être envisagées : les techniques classiques d'amélioration des plantes, l'ingénierie génétique et les variations induites par les cultures de tissus - variation somaclonale -, phénomène connu depuis plus de trente ans. Chez le riz, le taux de variation particulièrement élevé en culture *in vitro* confère un intérêt réel à cette technique, couplée ou non à la sélection *in vitro*, à des fins d'amélioration.

Au cours de ces dix dernières années, la variation somaclonale a été utilisée au laboratoire de Cytogénétique pour la production de génotypes plus résistants aux stress abiotiques. Ces génotypes ont été criblés pour leur résistance pendant plusieurs générations, en conditions contrôlées et dans certains cas au champs, et analysés d'un point de vue physiologique et/ou biochimique afin de mieux comprendre les facteurs impliqués dans les mécanismes de résistance qui ont conduit à leur amélioration.

Cet article est une synthèse de différents travaux dont certains ont fait l'objet de publications antérieures. Il rappelle de manière simplifiée les techniques utilisées et quelques résultats sont présentés à titre indicatif. Le lecteur se reportera aux publications citées en annexe pour de plus amples informations.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal et techniques de criblage variétal

Au total, 44 variétés de riz ont été testées pour leur résistance aux différents stress étudiés et/ou pour leur aptitude à la culture *in vitro*. Pour la résistance à l'aluminium, les plantes ont été cultivées sur des solutions nutritives renfermant des doses d'aluminium de 0, 500, 1000 ou 1500 $\mu atg\ L^{-1}$ (Costa de Macedo et al., 1997). Pour la résistance à la salinité, les teneurs en NaCl de la solution nutritive étaient de 0, 10, 20, 30, 40 et 50 mM (Lutts et al., 1995). Pour la résistance aux basses températures, les

plantes ont été cultivées sur mélange de terre à 5 ou 10°C, durant 3, 6 ou 9 jours (Bertin et al., 1996). Les observations ont été réalisées après différentes durées d'exposition au stress.

Sur base de différents tests de résistance et de tests d'aptitude à la culture *in vitro*, plusieurs variétés ont été retenues de façon à représenter un éventail suffisamment large quant à leur résistance au stress considéré.

Les variétés dont il sera question dans cet article sont Aiwu et IR6115-6-1 pour l'étude de la résistance à l'aluminium, I Kong Pao, Aiwu et IR2153 dans le cas de la salinité, Facagro 57, Facagro 76, Kirundo 3 et Kirundo 9 pour l'étude des basses températures.

Techniques de culture et de sélection *in vitro*

Des cals ont été produits au départ d'embryons matures et cultivés à 25°C à l'obscurité sur milieu LS (Linsmaier et Skoog, 1965) additionné de 0,5 mg L^{-1} 2,4-D, 1 mg L^{-1} ANA, 1 mg L^{-1} BA, 30 g L^{-1} saccharose et 2,5 ou 4 g L^{-1} Gelrite™, à pH 5,7. Après 4 semaines de callogenèse en l'absence de stress, les cals ont été subcultivés soit en conditions de sélection *in vitro*, soit en l'absence de stress. Dans le cas de la sélection pour la tolérance à l'aluminium, le pH et la composition minérale du milieu ont été modifiés, afin de permettre une meilleure expression de la toxicité aluminique (Van Sint Jan et al., 1997). L'aluminium a été ajouté au milieu de culture à des concentrations variant de 250 à 2500 µatg L^{-1}. La durée de culture était de 20 semaines. Pour la résistance à la salinité, les doses de NaCl ajoutées au milieu LS étaient comprises entre 50 et 350 mM, et les durées de culture entre 2 et 6 mois (Lutts, 1996). Pour la résistance aux basses températures, le milieu LS est resté inchangé et les cals ont été cultivés à 4°C durant 2 à 6 semaines (Bertin et al., 1995).

Les cals ont ensuite été placés sur milieu de régénération de plantes (minéraux de LS à mi-concentration, additionnés de 0,01 mg L^{-1} 2,4-D, 1 mg L^{-1} ANA, 1 mg L^{-1} BA, 20 g L^{-1} saccharose et 4 g L^{-1} Gelrite™, à pH 5,7), en présence de lumière et à 25°C. Les cals porteurs de plantules régénérées (R_0) ont alors été placés sur milieu de développement racinaire (minéraux de LS additionnés de 1 mg L^{-1} AIA, 30 g L^{-1} saccharose et 4 g L^{-1} Gelrite™, à pH 5,7), en présence de lumière et à 25°C.

Acclimatation et criblage des vitro-plants

Les plantules ont été acclimatées en serre et le criblage des plantes a eu lieu en conditions de stress pendant une ou plusieurs générations. Pour chaque stress, la procédure de criblage la plus discriminante parmi celles testées au niveau variétal a été retenue. Le criblage pour la résistance à l'aluminium est réalisé par culture en présence de 1500 µatg L^{-1} de Al pendant 80 jours, au départ de 63 plantes régénérées pendant 4 générations successives. Pour la salinité, une méthodologie similaire est suivie, 154 familles R_1 étant mises en présence de 30 mM de NaCl pendant 21 jours. Pour les basses températures, environ 4000 vitro-plants R_1 ont été criblés à 5°C pendant 5 jours pour la variété la plus tolérante aux basses températures, à 10°C pendant 9 et 6 jours, respectivement pour la variété intermédiaire et pour les variétés les plus sensibles ; les descendances des survivants ont été testées jusqu'en R_3. Les résultats des sélections ainsi opérées ont été comparés aux résultats d'une sélection massale réalisée sur les variétés de départ. En outre, d'autres vitro-plants ont été testés pour leur tolérance aux basses températures par culture en altitude au Burundi (de 800 à 1950 m) pendant deux générations (Bertin et al., 1996b, 1997b).

Caractérisation physiologique ou biochimique des vitro-plants sélectionnés

Les familles ou lignées de vitro-plants dont le niveau de résistance était le plus élevé ont été soumises à différents tests et comparées aux variétés dont elles proviennent. La concentration en aluminium dans les feuilles et dans les racines a été déterminée pour les lignées R_0 résistantes, la variété d'origine et une variété résistante (Van Sint Jan et al., 1994). Les lignées résistantes au NaCl ont été analysées en R_1 et R_2 pour leur teneur en minéraux, la tolérance tissulaire au NaCl et la perméabilité membranaire (Lutts, 1996). Les familles somaclonales résistantes aux basses températures ont été analysées en R_3 pour la perméabilité membranaire (Bertin et al., 1996a), l'efficience photosynthétique (Bertin et al., 1997a) et leurs teneurs en acides gras (Bertin et Bouharmont, 1997).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Tests de résistance des vitro-plants

Pour la résistance à la salinité, 17 familles R_1 ont présenté des taux de survie significativement supérieurs à ceux de la variété initiale. Pour la résistance à l'aluminium, la procédure de sélection menée durant 4 générations (de la R_0 à la R_3) a conduit à la sélection de trois lignées particulièrement résistantes. La résistance a été perdue pour d'autres lignées en R_1 ou en R_2. Enfin, des résultats similaires ont été obtenus dans le cas de la résistance au froid.

Lorsqu'elle a été réalisée (cas de l'étude de la salinité et des basses températures), la sélection massale n'a jamais permis d'obtenir une telle amélioration, prouvant que celle-ci ne provient pas de la variabilité préexistante au sein des variétés utilisées, mais bien de la sélection d'une variabilité produite ou tout au moins révélée par la culture *in vitro*, ce qui correspond à la variation somaclonale au sens large. Ces résultats suggèrent que la variation somaclonale peut présenter un caractère novateur en induisant l'apparition de caractéristiques qui n'existent pas au sein de la variété initiale et dont certaines, génétiquement transmissibles, pourraient être utilisées dans un programme d'amélioration.

L'effet de la sélection *in vitro* est plus controversé. Il n'y a pas de relation définie entre les performances des familles R_1 et la dose de NaCl à laquelle la plante parentale R_0 a été sélectionnée en phase de culture *in vitro* ; les lignées résistantes ont été produites au départ de cals stressés ou non au NaCl. Aucune famille provenant d'une sélection en présence de sel en phase d'enracinement ou d'une application progressive des pressions sélectives lors de la culture *in vitro* ne présente d'avantage par rapport à la variété initiale. D'autre part, une des trois familles sélectionnées pour la résistance à l'aluminium provient d'un cal n'ayant subi aucune pression de sélection. Pour les basses températures, l'effet de la sélection *in vitro* est lié à la variété utilisée: les familles les plus résistantes ont été obtenues par les pressions de sélection les plus longues pour la variété la plus résistante, des durées moyennes pour la variété de résistance intermédiaire, et en l'absence de stress *in vitro* pour les deux variétés sensibles. Il semble donc que, pour être efficace, une pression de sélection appliquée *in vitro* doive faire l'objet d'un ajustement en fonction du génotype de départ.

Les tests en champs ont mis en évidence la présence d'un très grand nombre de vitro-plants présentant des caractères délétères. Cependant, bon nombre de ceux-ci sont éliminés en une seule génération. Des vitro-plants plus résistants ont pu être obtenus, à condition toutefois d'appliquer une pression de sélection (par culture à une altitude suffisamment élevée) au niveau des plantes dès la première génération.

Caractérisation physiologique ou biochimique des vitro-plants sélectionnés

Les plantules des lignées résistantes à l'aluminium cultivées en présence de fortes doses de cet élément en accumulent nettement moins au niveau des feuilles que les plantes sensibles.

Pour la salinité, contrairement aux plantules provenant d'une sélection massale, 4 familles R_1 se distinguent des variétés initiales par des modifications physiologiques déterminantes, dont la relation avec la résistance au NaCl a été démontrée précédemment (Lutts et al., 1996a, 1996b) : meilleure discrimination K-Na, accumulation préférentielle d'ions toxiques au sein des tissus âgés, meilleure tolérance tissulaire au NaCl, plus faible perméabilité membranaire associée à une plus forte teneur en Ca et à une moindre accumulation de Zn, selon les lignées. Dans les trois derniers cas, une augmentation significative du nombre d'épillets par panicule et du poids total de grains produit par plante fertile a été observée. Les deux premières modifications précitées ont été transmises à la descendance R2.

Pour la résistance au froid, les études concernant la perte d'électrolytes, l'efficience photosynthétique et les teneurs en acides gras aboutissent aux mêmes conclusions : les différentes familles somaclonales provenant d'une même variété se comportent généralement de la même manière lorsqu'elles sont comparées aux témoins. Cependant, les tendances sont différentes selon l'origine variétale : les pertes d'électrolytes sont généralement plus faibles chez les familles somaclonales provenant de Kirundo 9 et Facagro 76 que chez les témoins correspondants, ce qui indique une meilleure conservation de la semi-perméabilité des membranes cellulaires soumises au froid. Chez Kirundo 3, par contre, les pertes d'électrolytes des familles somaclonales sont plus élevées que chez la variété de départ, mais l'efficience photosynthétique de ces familles est supérieure à celle des témoins, ce qui n'était pas le cas pour les familles issues de Facagro 76 et Kirundo 9. La composition en acides gras des phospholipides et galactolipides est modifiée dans plusieurs familles somaclonales. Ces changements se traduisent le plus souvent par un indice de doubles liaisons plus élevé, ou par de plus fortes teneurs en acides linoléique et linolénique, caractères souvent associés à la résistance aux basses températures.

L'usage des familles somaclonales pour l'étude des mécanismes impliqués dans la tolérance aux stress abiotiques a donc conduit à des résultats inattendus. Pour chaque caractérisation physiologique ou biochimique effectuée, une partie seulement des lignées sélectionnées a présenté des caractéristiques propres aux plantes plus résistantes, ce qui démontre la diversité des mécanismes impliqués dans la résistance à un stress donné et son amélioration par la voie de la variation somaclonale.

En conclusion, la variation somaclonale constitue un outil susceptible d'être utilisé à des fins fondamentales, telle que l'étude des mécanismes de résistance aux stress abiotiques, ou à des fins appliquées, telles que l'amélioration des plantes pour ces mêmes résistances. L'obtention d'une nouvelle variété résistante nécessiterait cependant sa culture au champs pendant plusieurs générations supplémentaires.

Remerciements

Ce travail a été financé par l'Union européenne (TS3-CT92-0095), une bourse F.N.R.S. (Belgique) et une bourse C.A.P.E.S. (Brésil). Les auteurs remercient Mrs. J. Bar, M. Hennebert et W. Deprins pour leur excellente assistance technique, le Pr. J. Bouharmont pour ses nombreux conseils, ainsi que Mme N. Skali-Senhaji et Mrs. A. Dekeyser et M. Amssa pour leurs travaux antérieurs ou parallèles.

Bibliographie

1. BERTIN P.,KINET J.-M., BOUHARMONT J., 1995. Heritable chilling tolerance improvement in rice through somaclonal variation and cell line selection. *Aust J. Bot.*44: 91-105.
2. BERTIN P., BOUHARMONT J.,KINET J.-M., 1996a. Somaclonal variation and chilling tolerance in rice: changes in chilling-induced electrolyte leakage. *Plant Breed.* 115: 268-272.
3. BERTIN P., BUSOGORO J.-P., TILQUIN J.-P., KINET J.-M., BOUHARMONT J., 1996b. Field evaluation and selection of rice somaclonal variants at different altitudes. *Plant Breed.* 115: 183-188.
4. BERTIN P., KINET J.-M., BOUHARMONT J., 1996c. Evaluation of chilling sensitivity in different rice variaties. Relationship between screening procedures applied during germination and vegetative growth. *Euphytica* 89: 201-210.
5. BERTIN P., BOUHARMONT J., 1997. Use of somaclonal variation and *in vitro* selection for chilling tolerance improvement in rice. *Euphytica* (96:135-142).
6. BERTIN P., BOUHARMONT J, Kinet J.-M., 1997a. Somaclonal variation and chilling tolerance in rice: changes in chilling-induced chlorophyll fluorescence. *Crop Sci.* (37:1727-1735).
7. BERTIN P., BUSOGORO J.-P., TILQUIN J.-P., KINET J.-M., BOUHARMONT J., 1997b. Field performances of rice somaclones at low temperature: effects of callus chilling treatment *Crop Sci.* (37:1943-1950).
8. COSTA DE MACEDO C., KINET J.-M., VAN SINT JAN V., 1997. Effects of duration and intensity of aluminium stress on growth parameters in four rice genotypes differing in aluminium sensitivity. *J. Plant Nutr.* 20: 181-193.
9. LINSMAIER E.M., SKOOG F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
10. LUTTS S., 1996. Étude des mécanismes de résistance à la salinité chez le riz (*Oryza sativa* L.): variation somaclonale et stratégie d'amélioration par utilisation des cultures *in vitro*. Thèse de doctorat, Université catholique de Louvain, Belgique. 379 p.
11. LUTTS S., KINET J.-M., BOUHARMONT J., 1995: Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *J. Exp. Bot.* 46: 1843-1852.
12. LUTTS S., KINET J.-M., BOUHARMONT J., 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Ann. Bot.*78: 389-398.
13. VAN SINT JAN V., BOUHARMONT J., 1994. Amélioration de la tolérance à l'aluminium chez le riz, par sélection *in vitro*. *Rev. Cytol. Biol. végét. - Bot.* 17: 99-104.
14. VAN SINT JAN V., COSTA DE MACEDO C, KINET J.-M., BOUHARMONT J., 1997. Selection of Al-resistant plants from a sensitive rice cultivar, using somaclonal variation, *in vitro* and hydroponic cultures. *Euphytica* (97:303-310).

C2 : Apport des marqueurs biochimiques et moléculaires dans l'étude de la structure génétique des palmeraies marocaines

BENDIAB K.[1,2], BAAZIZ M.[1], MAJOURHAT K.[1], MOKHLISSE N.[1]

[1] Laboratoire de Biochimie et Amélioration des Plantes, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences-Semlalia, B.P. S 15 Marrakech, Maroc.

[2] Laboratoire de Biochimie, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences, et Techniques de Gueliz, B.P. 618, Marrakech, Maroc.

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), monocotylédone pérenne, est l'arbre pivot de l'écosystème oasien des régions sahariennes et pré-sahariennes. Les zones les plus favorables à sa culture sont comprises entre les degrés 24 et 34 de latitude nord (pays du Maghreb, Iraq, ...). Aux États-Unis d'Amérique, la culture du palmier dattier s'étend du 33^{e} au 35^{e} parallèle. Seules des surfaces négligeables de palmier dattier existent dans l'hémisphère sud (Australie, Amérique du sud).

Les cultivars constituent la première catégorie de ressources génétiques du palmier dattier. Ils résultent d'une multiplication végétative par bouturage des rejets provenant d'un même pied. La plupart des cultivars ne s'adaptent pas dans des régions différentes de leur aire d'origine. Ainsi, l'hétérogénéité de ce matériel à l'échelle d'un même cultivar, a été souvent remarquée. C'est le cas de certains cultivars algériens qui sont très polymorphes (Deglet Nour et Timjohart), par comparaison à d'autres variétés plus homogènes (Tinnaser et Hmira) [1].

La deuxième catégorie de ressources génétiques du palmier dattier, souvent oubliée, est représentée par les *khalts* (appelés également *sairs*). Elle correspond aux palmiers provenant d'une multiplication sexuée donnant un matériel très hétérogène pouvant être mâles ou femelles.

Selon les évaluations de la Direction de la Production Végétale (1990), le nombre des palmiers dattiers au Maroc est 4,25 millions de pieds répartis sur 84 500 ha et dont une grande partie est constituée de khalts très diversifiés et de qualité variable [2]. Actuellement, ce matériel reste encore non identifié. En Algérie, le nombre de palmiers dattiers s'élève à 9 millions dont 45 % de la variété Deglet Nour. Il occupe une superficie de presque 85000 ha [3]. En Tunisie, les palmeraies comptent au total 3 millions de pieds dont 56 % de la variété Deglet Nour [4]. La superficie occupée s'élève à 22500 ha.

La production des dattes au Maroc est étroitement liée à la composition variétale des palmeraies. Elle est caractérisée par la rareté des dattes de bonne qualité fruitière (Mejhoul, Bou-Feggous, Jihel et Bou-Skri) qui ne représentent que 25 % de la production nationale. Cette proportion est variable d'une région à l'autre. Elle est d'environ 30 % dans la région de Tafilalet et seulement 12 % dans la région d'Ouarzazate.

L'identification des cultivars est la première opération nécessaire pour la valorisation des palmeraies. Elle est basée essentiellement sur les caractéristiques des dattes obtenues après fructification (âge des plantes égal environ à 7 ans). Cette méthode, ne

pouvant être appliquée que pendant une courte durée du cycle du palmier dattier, ne permet pas d'effectuer une sélection précoce des génotypes supérieurs chez le palmier dattier.

Depuis une quinzaine d'années, environ, les recherches sur les marqueurs biochimiques et moléculaires appliqués au palmier dattier, commencèrent à prendre de plus en plus d'importance [5-9]. Ces marqueurs ont été exploités en particulier, dans l'identification variétale et la comparaison des plants descendant des croisements dirigés.

Dans ce travail, la composition variétale de 7 palmeraies marocaines est déterminée sur la base de marqueurs isoenzymatiques reproductibles et faciles à révéler chez le palmier dattier. Ils correspondent aux systèmes estérases (EST), glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et endopeptidases (ENP).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Afin d'identifier les cultivars de palmier dattier par méthode isoenzymatique, les folioles sont prélevées à partir de 28 cultivars de palmier dattier préalablement décrits par Pereau-Leroy [10] et Saaidi [11]. Ils font partie de la collection de la station phoenicicole de Nebch à Zagora. Le **tableau 1** donne un aperçu sur leurs caractéristiques principales et leurs localités originales.

Tableau 1 : Cultivars de palmier dattier utilisés dans cette étude.

Cultivars*	Abréviation	Caractéristiques du fruit
Bou-Skri	BSK	Datte sèche, qualité bonne
Bou-Feggous ou Moussa	BFGM	Datte molle, qualité faible
Bou-Sthammi Blanche	BSTB	Datte molle, qualité moyenne
Bou-Zeggar	BZG	Datte semi-molle, qualité bonne
Haoua	HOA	Datte semi-molle, qualité moyenne
Race-Lahmar	RLM	Datte semi-sèche, qualité moyenne
Bou-Sthammi Noire	BSTN	Datte molle, qualité moyenne, **tardif**
Mest-Ali	MST	Datte semi-molle, qualité très bonne
Jihel	JHL	Datte semi-sèche, qualité bonne, **tardif**
Oum-N'hale	OMH	Datte molle, qualité très bonne
Ahardane	AHD	Datte semi-molle, qualité moyenne
Bou-Cerdoun	BCD	Datte semi-sèche, qualité moyenne
Bou-Ittob	BIT	Datte semi-sèche, qualité bonne
Outoukdim	OTK	Datte semi-sèche, qualité bonne
Mah-Lbaid	MLB	Datte molle, qualité bonne, **très tardif**
Tadment	TDMT	Datte semi-sèche, qualité bonne, **précoce**
Admou	ADM	Datte semi-sèche, qualité moyenne
Bel-Hazit	BAZ	Datte semi-molle, qualité moyenne
Mekt	MKT	Datte molle, qualité moyenne
Sair Layalet	SLY	Datte semi-sèche, qualité bonne
Azegzao	AZO	Datte sèche, qualité faible, **précoce**
Iklane	IKL	Datte molle, qualité faible, **très tardif**
Bou-Feggous	BFG	Datte molle, qualité très bonne, **précoce**
Bou-Temda	BTD	Datte semi-sèche, qualité moyenne
Aguelid	AGL	Datte semi-molle, qualité bonne, **très précoce**
Bou-Slikhene	BSL	Datte semi-sèche, qualité moyenne
Aïssa-Youb	AIB	Datte semi-sèche, qualité moyenne
Mejhoul	MJH	Datte molle, qualité très bonne, **précoce**

* *Tous les cultivars sont décrits dans Saaidi (1979).*

Afin de déterminer la composition variétale des palmeraies, les folioles provenant de 95 à 391 palmiers sont échantillonnées à partir de 7 palmeraies de situations géographiques différentes (**Tableau 2**).

Tableau II. Palmeraies étudiées et leurs localisations géographiques approximatives.

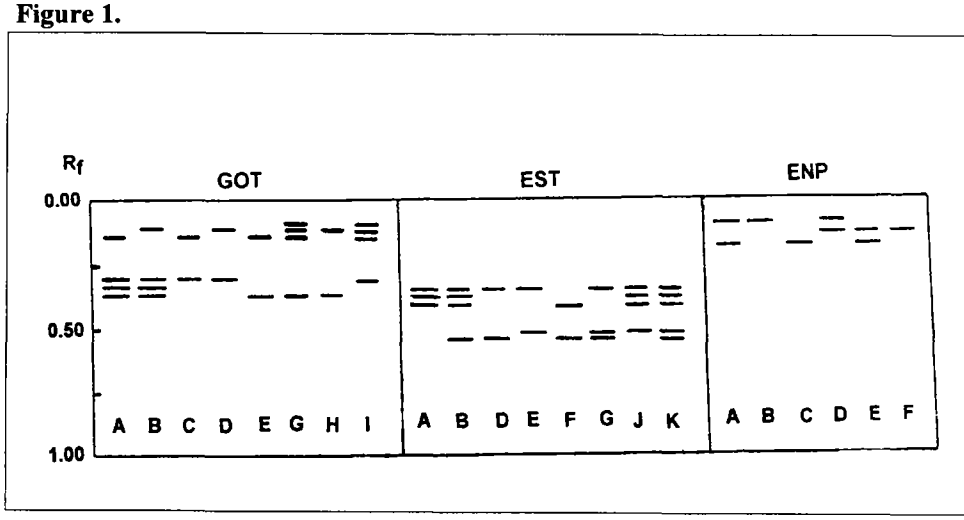
Palmeraie	Rivière	Position géographique approximative
Marrakech (1)	Tensift	Marrakech, nord du haut Atlas
Skoura (2)	Dades	Dades, entre le haut Atlas et Jbel Saghro
Agdz (3)	Draa	Draa, sud du Jbel Saghro
Zagora (4)	Draa	Draa, sud du Jbel Saghro
M'hamid (5)	Draa	Draa, sud du Jbel Saghro
Tinjdad (6)	Todra	Todra Todra, est du Jbel Saghro
Tafilalet (7)	Ziz	Tafilalet, est du Jbel Saghro

Les extraits enzymatiques sont préparés à partir des folioles en utilisant le tampon TAMET (pH 7,0) [8]. La séparation des isoenzymes d'estérases (EST), glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et endopeptidases (ENP) est réalisée sur gel de polyacrylamide 11 % [8, 12]. Les phénotypes isoenzymatiques sont appelés arbitrairement A-F, A-G et A-J pour les systèmes ENP, GOT et EST, respectivement. Les 28 cultivars de palmier dattier sont caractérisés par des triplets de phénotypes ENP-GOT-EST. Les fréquences de 26 triplets de phénotypes sont calculées pour chacune des 7 palmeraies étudiées. Elles permettent de déterminer la composition variétale des palmeraies investies.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

En utilisant de faibles quantités de folioles de palmier dattier, 21 phénotypes isoenzymatiques ont été obtenus pour les systèmes ENP, GOT et EST (**Figure 1**). Ces phénotypes reproductibles ont permis une identification rapide de la majorité des cultivars de la station expérimentale de Zagora [9].

Figure 1.



Afin de tester la présence ou l'absence des 28 cultivars de palmier dattier dans les 7 palmeraies marocaines investies, les fréquences des triplets ENP-GOT-EST les caractérisant, ont été déterminées (**Tableau 3**). Elles ont permis de démontrer que les cultivars JHL et BFG sont représentés dans toutes les palmeraies étudiées. Par contre, les cultivars TDMT, ADM et BAZ ne sont pas rencontrés. Cette absence est probablement due à leur faible représentativité [11]. Le cultivar BFG, précoce et de très bonne qualité fruitière, est rencontré principalement dans les régions de Tafilalet et Tinjdad. Le cultivar JHL, tardif, est prépondérant dans la palmeraie de M'hamid qui est caractérisée, également, par une proportion relativement élevée de la variété IKL, très tardive et résistante au Bayoud. C'est dans cette même localité qu'un pourcentage de présence élevé a été enregistré pour le cultivar BSK qui produit des dattes sèches s'apprêtant à une meilleure conservation. Quant à la palmeraie de Zagora, elle se distingue par la présence du cultivar BSTN, tardif, très résistant au Bayoud et caractérisé par des dattes noires, molles et difficiles à conserver. La palmeraie de Marrakech, située plus au nord, parait être plus diversifiée, avec une proportion de khalts (palmiers inconnus) très élevée (80 %, environ). Ce pourcentage est variable d'une palmeraie à l'autre. Il est plus faible à M'hamid (22,30 %) et égal en moyenne à 67 % dans les autres palmeraies.

La composition variétale déterminée sur la base des phénotypes isoenzymatiques montre beaucoup de similitudes avec celles précédemment déterminées et qui reposent sur les caractères morphologiques (essentiellement le fruit) [10-11]. Ainsi, par exemple, la présence généralisée du cultivar BFG dans toutes les palmeraies, a été confirmée par les deux méthodes. L'abondance de ce cultivar dans les palmeraies de Tafilalet est confirmée par les données statistiques de la Direction de la Production Végétale où les dattes de première classe (MJH, BFG, BSK, AGL et Khalts) représentent 30,7 % [2] avec 25 %, environ, de BFG. Aussi, les évaluations concernant la proportion moyenne des khalts sont semblables. Dans ce cas, la méthode isoenzymatique, offrant plus de phénotypes électrophorétiques, peut être plus discriminante que la méthode classique, utilisée antérieurement.

Tableau 3 : Fréquences des triplets de phénotypes isoenzymatiques ENP, GOT and EST (dans l'ordre) déterminées pour 7 palmeraies marocaines.

Triplets de phénotypes[a]	Palmeraie[b]						
	1 (208)	2(112)	3(95)	4(278)	5(173)	6(108)	7(89)
AAA (BSK)	2,40	-	1,00	-	8,10	-	0.50
AAB (BFGM)	1,40	0,90	3,20	0,60	-	-	0.27
AAD(BSTB,BZG,HOA,RLM)	3,80	1,80	2,10	1,35	6,40	-	4.72
DFD & FCD (RLM)	0,50	-	-	-	-	-	0.25
ACB & ACJ (BSTN)	0,50	1,80	-	13,15	-	-	0.22
ACD & BAD (MST)	2,90	4,50	1,10	2,10	0,60	-	1.27
AED (JHL)	2,90	4,50	28,40	14,60	40,50	1.8	2.65
AFD (OMH)	-	0,90	-	-	-	-	-
BAA (AHD)	0,50	1,80	-	-	-	-	0.27
BAD (BCD, BIT)	1,00	0,90	1,10	-	-	-	0.22
BAC (OTK)	1,40	3,60	2,10	0,30	-	0.9	0.57
BBB (MLB)	0,50	-	-	-	-	-	-
CDG (TDMT)	-	-	-	-	-	-	-
CFD (ADM)	-	-	-	-	-	-	-
CGA (BAZ)	-	-	-	-	-	-	-
DAA (MKT)	-	-	-	-	-	0.9	0.75
DAB (SLY)	-	-	-	0,65	-	-	-
DAC (AZO)	1,00	0,90	-	-	1,20	-	1.17
DAD (IKL)	0,50	-	-	0,45	17,40	-	1.75
DEC (BFG)	1,00	2,70	8,50	4,45	3,50	30.6	26.00
DEF (BTD)	-	-	1,10	-	-	-	-
EDD (AGL, BSL)	-	-	-	0,85	-	-	0.30
EEA (BIT)	-	-	1,10	0,45	-	2.8	0.30
EEC (AIB)	0,50	1,80	1,10	2,15	-	2.8	3.85
EEE (MJH)	-	-	-	0,75	-	-	-
Khalts	79,20	73,90	49,20	58,15	22,30	60.2	54.80

[a] entre parenthèses, les abréviations des cultivars comme décrit dans le tableau 1

[b] se reporter au tableau II pour les noms des palmeraies Le nombre des palmiers utilisés est indiqué entre parenthèses

Remerciements

Ce travail est soutenu par la Fondation Internationale pour la Science (Stockholm, Suède), le CNCPRST (Rabat, Maroc) et l'AUPELF-UREF.

Bibliographie

1. BRAC DE LA PERRIÈRE R.A., BENKHALIFA A. (1991) Progression de la fusariose du palmier dattier en Algérie. Sécheresse 2, 119-128.
2. HADDOUCH M. (1996) Situation actuelle et perspectives de développement du palmier dattier au Maroc. Options Méditerranéennes A 28, 63-79.

3. MESSAR E.M. (1996) Le secteur phoenicicole algérien : Situation et perspectives à l'horizon 2010. Options Méditerranéennes A 28, 23-44.
4. RHOUMA A. (1996) Le palmier dattier en Tunisie : un secteur en plein expansion. Options Méditerranéennes A 28, 85-104.
5. TORRES A.M., Tisserat B. (1980). Leaf isoenzymes as genetic markers in date palm. Amer. J. Bot. 6, 162-167.
6. BAAZIZ M., SAAIDI M. (1988) Preliminary identification of date palm, cultivars by esterase isoenzymes and peroxidase activities. Can. J. Bot. 66, 89-93.
7. BENNACEUR M., LANAUD C., CHEVALLIER M.H., LANAUD C. (1991). Genetic diversity of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from Algeria revealed by enzyme markers. Plant breed. 107, 56-69.
8. BENDIAB K., BAAZIZ M., BRAKEZ Z., SEDRA, MY H. (1993) Correlation of isoenzyme polymorphism and Bayoud-disease resistance in date palm cultivars and progeny. Euphytica 65, 23-32.
9. BAAZIZ M., BENDIAB K. (1994). Amélioration génétique du palmier dattier assistée par les marqueurs biochimiques et moléculaires. In : Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?. AUPELF-UREF, Ed John Libbey Eurotext, Paris, pp.413-422.
10. PEREAU-LEROY P. (1958) Le palmier dattier au Maroc. Ministère de l'Agriculture, Service de la Recherche Agronomique, Maroc et Institut Français de Recherches Fruitière Outre-Mer.
11. SAAIDI M. (1979) Contribution à la lutte contre le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier. Thèse de Doctorat d'Université, Université de Dijon.
12. BENDIAB K. (1992) Contribution à l'étude de la variabilité enzymatique et protéique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Apport dans l'amélioration génétique de la plante. Thèse de Doctorat de 3e cycle, Université Cadi Ayyad, Marrakech.

C3 : Recherche de critères physiologiques pour le tri de plantes tolérantes au sel

LACHÂAL M.[1], ABDELLY C.[1], SLEIMI N.[1], HAJJI M.[2], SOLTANI A.[1], GRIGNON C.[3]

[1] Laboratoire de Nutrition Minérale, INRST, BP 95, 2050 Hammam-lif, Tunisie

[2] Département de Biologie, Faculté des Sciences de Tunis, Campus Universitaire, 1060 Tunis, Tunisie

[3] Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, ENSA-M/INRA, 34060 Montpellier CEDEX 1, France.

INTRODUCTION

Le développement des cultures irriguées au champ, ou sous abri se heurte en Tunisie aux difficultés liées à l'utilisation intensive d'eaux de qualité médiocre. La mise en valeur des terres salées pour le pâturage ou tout autre système de production est un objectif agronomique national. Il résulte de cette situation que la recherche de variétés résistantes au sel présente un intérêt certain. La compréhension des mécanismes physiologiques impliqués dans la tolérance au sel est une étape déterminante pour établir des critères de tri d'espèces et de variétés intéressantes.

La réduction de la vitesse de production de matière sèche (MS) au stades végétatifs est un critère très fréquemment utilisé dans la littérature, car il est aisé à mesurer. La baisse de production de biomasse est une réponse classique à la contrainte saline. Elle est souvent associée à une accumulation importante de Na^+ et Cl^- dans les feuilles. Nous présentons ici des résultats tirés d'un ensemble d'expériences visant à déterminer si cette réduction de croissance est due aux restrictions (nutritionnelle ou hydriques) imposées par le sel dans le milieu, ou aux effets toxiques des ions accumulés dans les tissus. Ces résultats sont obtenus sur des plantes sensibles au sel (des légumineuses alimentaires : haricot, pois chiche et lentille), ou tolérantes (orge). Le laurier-rose, qui associe des caractères de tolérance et de sensibilité, est pris comme modèle de plante à comportement intermédiaire.

RÉSULTATS

Croissance et accumulation foliaire de Na^+ et Cl^-.

La masse de matière sèche de jeunes plantes âgées de quelques semaines est réduite quand elles sont cultivées sur milieu liquide en présence de NaCl. La concentration de sel causant une inhibition de croissance égale à 50 % de la croissance du témoin (cultivé en absence de sel) permet de classer les plantes sur une échelle de tolérance (Maas, 1986). Par exemple, la **figure 1** montre que cette concentration est de l'ordre de 5 g/l (85 mM) pour le haricot, de 10 g/l (170 mM) pour le laurier-rose, et 16 g/l (274 mM) pour l'orge.

Ces réductions de croissances s'accompagnent d'accumulations de Na^+ et Cl^- plus ou moins importantes dans les feuilles. Chez les glycophytes tolérants, comme chez les halophytes, les deux ions sont accumulés en quantités comparables (**Figure. 2**, cas de l'orge). La réduction de croissance est corrélée à l'accumulation ionique. Au contraire, l'accumulation foliaire de Na^+ reste très inférieure à celle de Cl^- chez les glycophytes

sensibles (**Figure 2**, cas du haricot). De plus, chez ces derniers, on peut observer une réduction de croissance prononcée alors que l'accumulation de Na^+ et Cl^- est relativement faible.

Ces exemples suggèrent que la sensibilité au sel de la croissance est liée à l'aptitude des plantes à tolérer l'accumulation de Na^+ et Cl^- dans leurs feuilles, particulièrement dans les plus jeunes d'entre elles (**Figure 3** et **Figure 4**).

Figure 1. Effet de NaCl sur la croissance. La production de matière sèche est exprimée en % de la production sur milieu sans sel. Les plantes sont âgées de 1 à 2 mois selon les espèces.

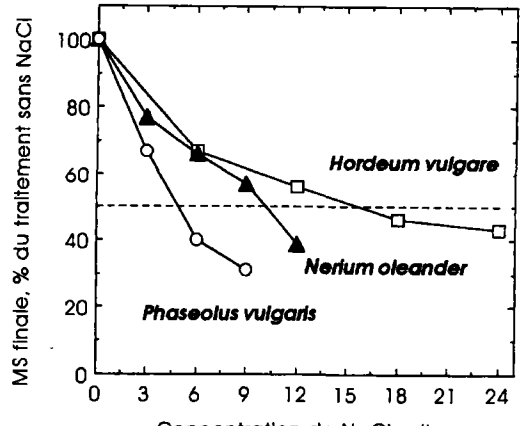


Figure 2. Relation entre l'accumulation de sodium dans les feuilles et leur croissance. Les plantes témoins sont cultivées dans un milieu dépourvu de NaCl.

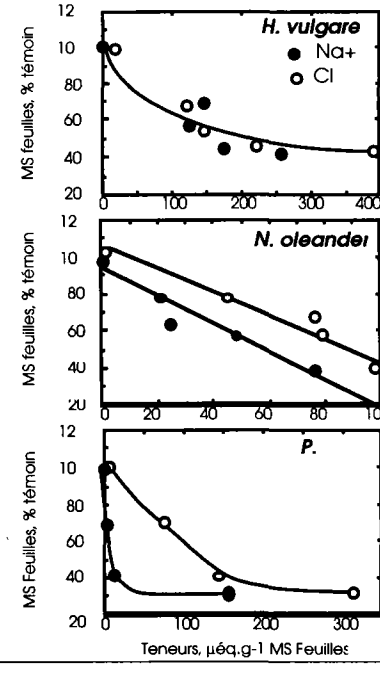


Figure 3. Croissance de la lentille et accumulation de sodium dans les feuilles. Tam et Wes sont deux populations de *L. culinaris*. La première est plus tolérante à la salinité que la seconde. V et Vs désignent respectivement un milieu à 10 mM/l de sodium, et un milieu à 36 mM/l. La variété sensible accumule plus de Na^+ dans ses jeunes feuilles.

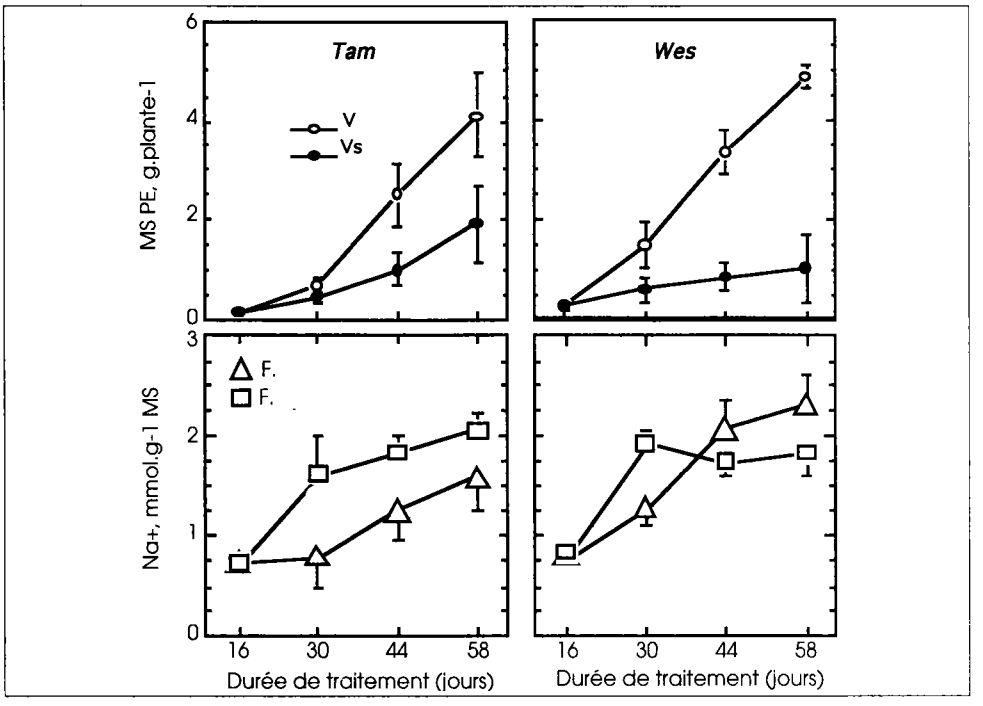
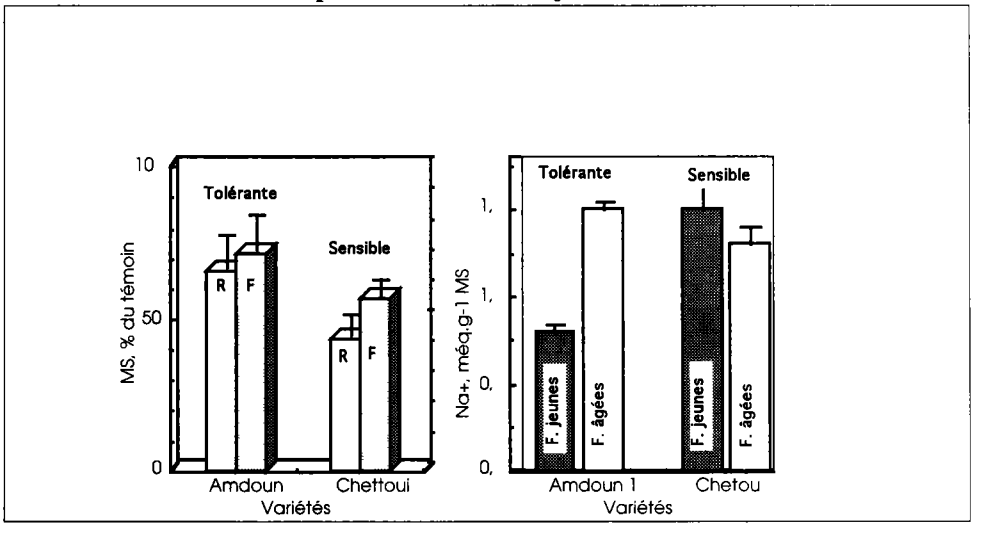


Figure 4. Croissance du pois chiche et accumulation de sodium dans les feuilles. Amdoun et Chettoui sont deux variétés de *Cicer arietinum*. La première est plus tolérante à la salinité que la seconde. Le milieu contient 34 mmol/l de NaCl. La variété sensible accumule plus de Na^+ dans ses jeunes feuilles.



Croissance et approvisionnement en éléments essentiels (exemple de K^+)

La présence de sel dans le milieu conduit également à des perturbations de l'alimentation minérale de la plante. Par exemple, la quantité de K^+ accumulée dans les feuilles (µéq/plante) est fortement diminuée quand le milieu contient NaCl (**Figure 5**). Chez les deux plantes les plus sensibles (haricot et laurier-rose), cette diminution de la quantité de K^+ accumulée ne s'accompagne pas d'une baisse équivalente de la teneur (µéq/g MS) (**Figure 6**). La relative constance de la teneur signifie que la croissance de la feuille est proportionnelle à la quantité de K^+ qui lui parvient, et suggère qu'en présence de sel dans le milieu, la nutrition potassique est limitante.

Figure 5. Relation entre l'accumulation de Na^+ dans les feuilles et la quantité totale de K^+ dans ces organes (cf. Figure 1).

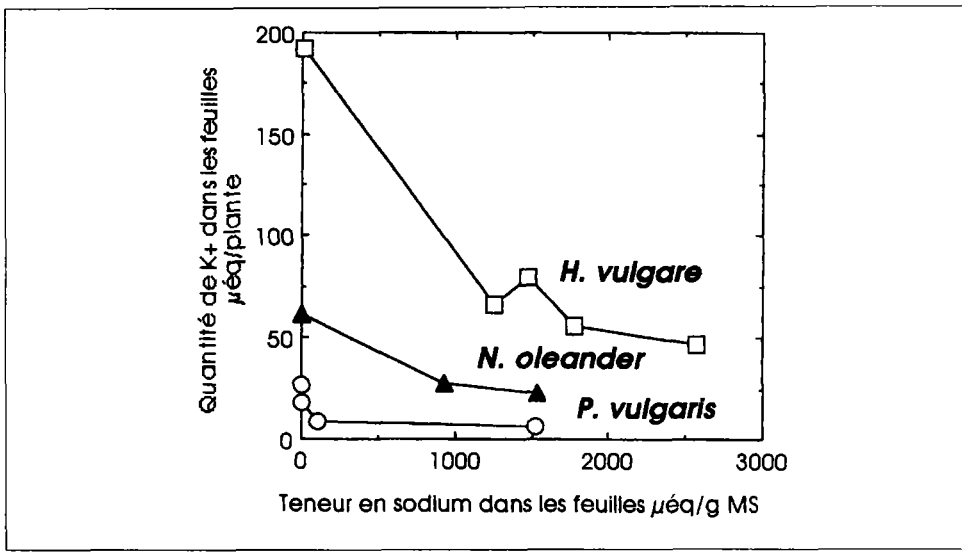
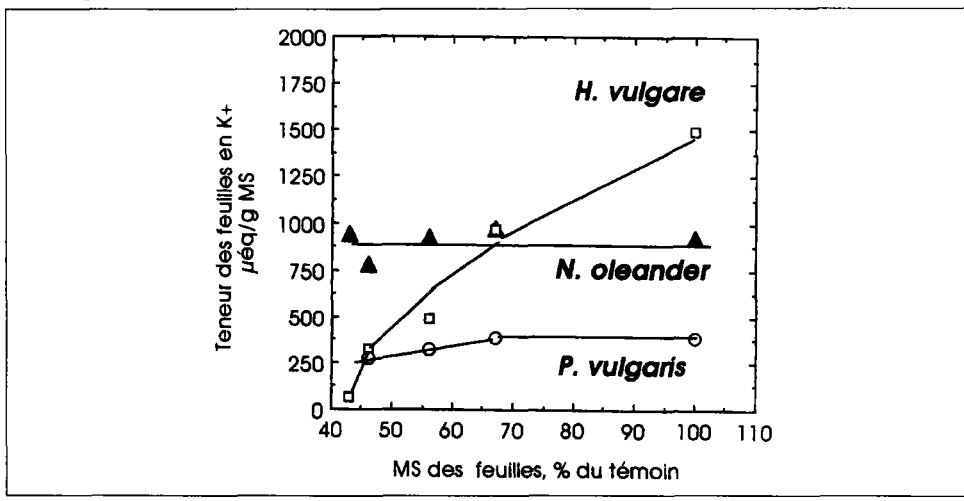


Figure 6. Relation entre la croissance des feuilles et la teneur en Na^+. La croissance des plantes est modulée par la concentration de NaCl dans le milieu (cf. Figure 1).



Le sel induit d'autres perturbations de la nutrition minérale, au niveau des anions. Nous avons vu plus haut que les plantes sensibles transportent dans leurs feuilles moins de Na^+ que de Cl^-. Cette situation résulte essentiellement de l'exportation sélective vers le bas de la plante du sodium préalablement importé dans la feuille par le xylème (Lessani et Marschner, 1978). Le chlorure qui accompagne Na^+ dans la sève du xylème reste majoritairement dans la feuille, et le sodium exporté est accompagné d'autres anions tels que HPO_4^{2-} ou des acides organiques. L'une des conséquences de cette discrimination entre Na^+ et Cl^- est que chez les plantes sensibles (accumulatrices de Cl^-) cultivées en présence de sel, les feuilles les chlorures prennent la place d'autres anions indispensables pour la croissance. Il s'ensuit un déficit foliaire en anions indispensables, que l'on peut évaluer par le paramètre ΔA^- :

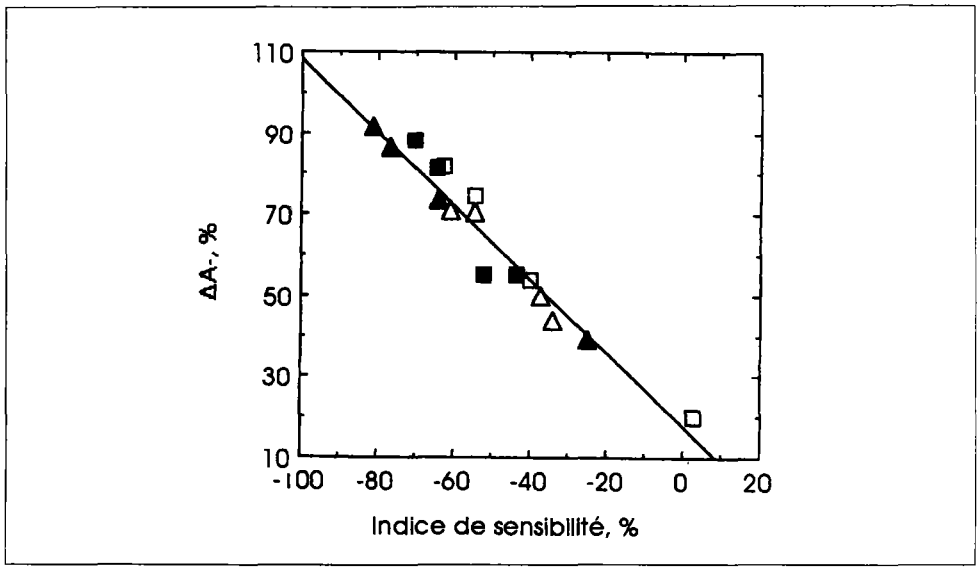
$$\Delta A^- = \frac{J(A^-)\text{témoin}}{J(A^-)\text{NaCl}}$$

où $J(A^-)$témoin et $J(A^-)$NaCl sont les quantités d'anions autres que Cl^- accumulées dans la feuille pendant l'expérience, sur milieu témoin et en présence de NaCl :

$$J(A^-) = \Sigma J(K^+ + Ca^{2+} + Mg^{2+}) - J(Cl^-)$$

Le paramètre ΔA^-, calculé sur les feuilles ou sur la plante entière, est en général bien corrélé avec la diminution de production de matière sèche sur milieu salé (Lachaâl, 1992 ; Lachaâl *et al.* 1995) : plus la plante est sensible au sel, plus ce paramètre est élevé (**Figure 7**).

Figure 7. Déficit anionique et sensibilité des plantes au sel. Le déficit anionique ΔA- est une mesure de l'inhibition de l'approvisionnement des tissus en anions nécessaires à la croissance (cf. le texte). L'indice de sensibilité est calculé à partir des quantités Q de matière sèche produites sur milieux contenant NaCl 10 ou 36 mM : IS = 100 (Q_{36} - Q_{10})/Q_{10}. Les différents symboles correspondent à 4 populations de lentille.



En résumé, les exemples cités dans ce paragraphe suggèrent que le sel inhibe la croissance en limitant l'approvisionnement des feuilles en nutriments essentiels. On est donc amené à se demander si les réductions de croissance en présence de sel sont dues à un effet « toxique » des ions Na^+ et Cl^- accumulés dans les feuilles, ou bien aux restrictions de la nutrition minérale de ces dernières qu'impose le sel dans le milieu.

DISTINCTION DES EFFETS DES IONS NA^+ ET CL^- DANS LE MILIEU ET DANS LES TISSUS FOLIAIRES

Les expériences d'alimentation mixte permettent de séparer les effets de l'envahissement des feuilles par Na^+ et Cl^- de ceux du déficit de l'approvisionnement minéral de la plante (Hajji, 1980).

Des plantes d'abord cultivées sur milieu témoin (sans NaCl) sont disposées ensuite avec la moitié de leur système racinaire dans un milieu additionné de sel (par exemple 100 ou 200 mM), et l'autre moitié restant dans le milieu témoin. Deux autres cultures sont conduites simultanément, avec des plantes dont tout le système racinaire plonge dans des milieux nutritif témoin, ou additionné de NaCl aux mêmes concentrations que celles utilisées en alimentation mixte. Ces deux cultures sont les deux témoins qui permettent d'apprécier l'effet de l'alimentation mixte sur la croissance.

Le tableau 1 montre que l'alimentation mixte élimine totalement l'effet dépressif du milieu salé sur la croissance des feuilles même lorsque les quantités de Na (et de Cl) qui parviennent aux feuilles sont importantes. Il n'y a pas de correspondance entre les accumulation de Na^+ (et de Cl^-) et la croissance de ces organes. Toutes les expériences de ce type conduisent aux mêmes conclusions (Hajji, 1980 ; 1983 ; Soltani, 1988) :

1. Ce dispositif d'alimentation mixte assure simultanément aux feuilles un approvisionnement normal en ions essentiels (par exemple en K^+, Tableau 1) et une forte accumulation de Na^+ et Cl^-.
2. Il permet d'obtenir une croissance identique ou parfois supérieure à celle des plantes cultivées sur milieux témoin sans NaCl.

Tableau 1 : Croissance et accumulation ionique en alimentation mixte.

Paramètres	Laurier-rose			Haricot			Orge		
	Témoin	Mixte	NaCl	Témoin	Mixte	NaCl	Témoin	Mixte	NaCl
MS, % du témoin	100	100	58	100	76	40	100	108	75
Na^+, µéq/g MS	traces	1150	1540	traces	414	117	33	1932	2835
K^+, µéq/plante[a]	41	45	28	27	21	9	162	136	94

(a) Quantité de K^+ accumulée dans la totalité des feuilles d'une plante.

Les plantes sont cultivées avec une partie du système racinaire dans un milieu témoin (sans NaCl), et l'autre partie dans un milieu contenant NaCl 100 mM (haricot) ou 200 mM (laurier-rose et orge). Au début du traitement les plantes sont âgées de 15 jours (haricot), 1 mois (orge) ou 1 mois et demi (laurier-rose). La durée du traitement est de 10 jours Les paramètres concernent les feuilles

Ces résultats démontrent que la forte accumulation foliaire de Na^+ et de Cl^- n'est pas responsable de la réduction de la croissance (Hajji, 1980 ; Cramer *et al.* 1994). Le dispositif mixte, en autorisant une alimentation ionique correcte de la plante par les racines placées dans le milieu témoin, élimine totalement les effets inhibiteurs du sel sur la croissance. C'est donc le sel du milieu qui perturbe l'alimentation minérale de la plante.

CONCLUSION

Même chez les plantes sensibles à la salinité, l'accumulation de Na^+ et de Cl^- en quantités importantes dans les feuilles peut être compatible avec la croissance à condition que la fourniture d'autres éléments indispensables à la croissance soit assurée. Les différents exemples cités ci-dessus montrent que la sensibilité des plantes est due à l'inhibition par le sel des transports des éléments nutritifs, et non aux effets toxiques des ions Na^+ et Cl^- accumulés en excès dans les feuilles.

Bibliographie

1. CRAMER G.R., ALBERICO G.J., SCHMIDT C. 1994 Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids. Aust. J. Plant Physiol. 21: 675-692.
2. HAJJI M. 1980. La responsabilité de la racine dans la sensibilité du Laurier-rose au chlorure de sodium. Physiol. Vég. 18: 505-515.
3. HAJJI M. 1983 Mécanismes des effets du milieu salé sur la nutrition minérale d'une plante ripicole : interactions des transports d'ions et d'eau chez le laurier-rose. Thèse de Doctorat d'État, Faculté des Sciences de Tunis, 278 p.
4. LACHAAL M. 1992. Exploration de la variabilité de la tolérance au sel chez la lentille (*Lens culinaris* L.). Thèse de Spécialité, Faculté des Sciences de Tunis, 163 p.
5. LACHAAL M., ABDELLY C., SOLTANI A., HAJJI M., GRIGNON C. 1995. Réponses physiologiques de quelques légumineuses spontanées et cultivées à la contrainte saline *In* Facteurs Limitant la Fixation Symbiotique de l'Azote en Zones Méditerranéennes,. J.-J. Drevon éd. Éditions INRA, pp 93-109.
6. LESSANI H., MARSCHNER H. 1978. Relation between salt tolerance and long distance transport of sodium and chloride in various crop species. Aust. J. Plant Physiol. 5: 27-37.
7. MAAS E.V. 1986. Salt tolerance of plants. Appl. Agric. Res. 1 : 12-26.
8. SOLTANI A. 1988. Analyse des effets du chlorure de sodium et de la source d'azote sur la nutrition minérale de l'orge. Thèse de Doctorat d'État, Faculté des Sciences de Tunis, 322 p.

C4 : Transfert de caractères de résistance au *Verticillium* chez la Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) par fusion interspécifique de protoplastes avec *S. tarijense* Hawkes

JADARI R.[1], ELMESBAHI L.[1], GERUNGAN R.F.I.[2], MUSSIO I.[2], ELLOUZ O.[3], LAKHOUA L.[3], AMBROISE A.[2], SERVAES A.[2], DUCREUX G.[2], SIHACHAKR D.[2]

* Laboratoire de Phytogénétique et de Biotechnologies, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (IAVH), Rabat Institut, BP 6202, Rabat, Maroc ; télécopie : +212 7 77 71 19

** Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât. 360, Université Paris Sud, 91405 Orsay Cedex, France ; télécopie : +33 (0)1 69 85 54 90, e.mail : dara.sihachakr@mve.u-psud.fr

*** Laboratoire de Culture *in vitro*, École Nationale d'Ingénieurs de Sfax (ENIS), BP " W ", 3038 Sfax, Tunisie ; télécopie : +216 4 27 55 95

INTRODUCTION

Le flétrissement dû au champignon *Verticillium dahliae* est une des maladies graves de la Pomme de terre, mais il frappe également d'autres plantes cultivées dans des régions tempérées (Platt et Sanderson 1987 ; Sihachakr et al. 1996). Son développement est particulièrement favorisé par la présence de nématodes. Il cause de lourdes pertes de rendement et affecte notamment la qualité des tubercules. Il n'existe pas de variétés de Pomme de terre totalement résistantes. Quelques unes, en particulier les variétés Katahdin, Targee et Désiré ne sont que tolérantes à l'infection du champignon (Sihachakr et al. 1996). Des caractères de résistance au *Verticillium* ont été identifiés chez quelques espèces sauvages de *Solanum*, notamment *S. berthaultii*, *S. phureja*, *S. torvum* et en particulier *S. tarijense*, mais l'introgression de gènes de résistance est limitée par des incompatibilités sexuelles partielles ou totales avec la Pomme de terre cultivée. Pour contourner les incompatibilités sexuelles, l'hybridation somatique par fusion de protoplastes a été utilisée afin de réaliser des combinaisons génomiques avec des espèces sauvages, irréalisables par les moyens conventionnels (Sihachakr et al. 1994 ; Pehu 1996). Ainsi, à partir de fusion entre des génotypes dihaploïdes de pomme de terre, des hybrides somatiques intraspécifiques ont été régénérés à l'état tétraploïde hétérozygote, nécessaire pour retrouver la vigueur et la performance (Debnath et Wenzel 1987 ; Chaput et al. 1990). De plus, des caractères de tolérance au froid à partir de *S. brevidens* (Preiszner et al. 1991), à la salinité à partir de *Lycopersicon pennellii* (Serraf et al. 1994), ceux de la résistance aux virus (PLRV et PVY) à partir de *S. brevidens* (Austin et al. 1985 ; Gibson et al. 1988), aux insectes à partir de *S. berthaultii* (Serraf et al. 1991), et à la verticilliose à partir de *S. torvum* (Jadari et al. 1992), ainsi qu'au *Phytophthora* (Cooperbland et al. 1996) et aux nématodes (Mojtahedi et al. 1995 ; Rasmussen et al. 1996) ont été introduits avec succès dans la pomme de terre cultivée.

Dans cette étude, nous avons réalisé l'hybridation somatique par électrofusion de protoplastes dans le but d'élargir la variabilité génétique et d'introduire des caractères de résistance au *Verticillium* à partir de l'espèce sauvage, *S. tarijense*, dans la pomme

de terre. Le partenaire sauvage de fusion a été choisi parmi les clones les plus résistants de *S. tarijense* suite à des tests de résistance *in vitro* en utilisant le filtrat brut de culture du champignon.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Un clone dihaploïde de pomme de terre, var. Cardinal à tubercules à peau rouge (2n = 2x = 24 chromosomes), et un clone résistant d'une espèce sauvage apparentée tubérifère et diploïde, *Solanum tarijense* (2n = 2x = 24 chromosomes), ont été multipliés par repiquages successifs *in vitro* de nœuds selon la méthode de Chaput et al. (1990).

Isolement de protoplastes et régénération de plantes

Le protocole d'isolement de protoplastes et de régénération de plantes a été précédemment décrit (Chaput et al. 1990). Des mésophylles prélevés sur des plantes *in vitro* âgées de 3-4 semaines ont été scarifiés et mis en incubation dans une solution enzymatique composée de sels minéraux (Frearson et al. 1973), de 0,5 % (m/v) de Cellulase RS, de 0,05 % (m/v) de Pectolyase Y23 et de 0,5 M de mannitol, le pH étant ajusté à 5,5. Après une période de digestion de 16 h à 27°C et à l'obscurité, les protoplastes ont été purifiés et rincés respectivement dans une solution de saccharose à 21 % (m/v), et une solution de rinçage contenant 0,5 M de mannitol et 0,5 mM de $CaCl_2$.

Les protoplastes fusionnés ont été cultivés dans le milieu liquide VKM (Binding et al. 1978) additionné de 250 mg/l de polyéthylène glycol (PEG), de 0,2 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), de 0,5 mg/l de zéatine et de 1 mg/l d'acide α-naphthalèneacétique (ANA). La pression osmotique est assurée par l'ajout de 0,18 M de glucose et de 0,18 M de mannitol.

Les cals suffisamment développés ont été repiqués dans le milieu de régénération MS (Murashige et Skoog 1962) contenant notamment 2 mg/l de zéatine et 0,1 mg/l d'acide indole-3-acétique (AIA).

Protocole d'électrofusion

L'appareillage d'électrofusion et le protocole de fusion ont été précédemment décrits (Sihachakr et al. 1988). Brièvement, la chambre de fusion, constituée d'électrodes parallèles, est placée au fond d'une boîte de pétri (15 x 50 mm) contenant environ 600-700 µl d'un mélange, à parties égales, de protoplastes des deux parents. La densité des suspensions de protoplastes est ajustée à 4 x 10^5 protoplastes/ml. L'application d'un courant sinusoïdal de haute fréquence (1 MHz) pendant 15 s provoque l'alignement des protoplastes, assurant ainsi le contact membranaire nécessaire à la fusion cellulaire. La fusion est réalisée à la suite de l'application de 1-2 impulsions d'un champ électrique d'une amplitude de 1,2 KV/cm, pendant 40 µs chacune.

Tests de résistance in vitro à partir de filtrats bruts et en serre contrôlée

Des clones de *S. tarijense* ont été testés pour la résistance au filtrat brut du champignon selon la méthode précédemment décrite (Jadari et al. 1992). Des boutures nodales comportant un nœud et la feuille axillaire ont été repiquées dans des tubes à essais contenant 20 ml de milieu solide MS. Après 3 semaines de culture, on ajoute dans chaque tube 1 ml d'une solution constituée de 50 % d'eau stérile ou de filtrat brut du champignon.

Des tests à partir des inoculations artificielles à l'aide de spores de champignon ont été effectués en serre contrôlée sur les clones parentaux et hybrides. Les symptômes foliaires ont été notifiés selon des critères morphologiques en utilisant deux indices (Beye et Lafay, 1985), « Indice d'étendue des symptômes foliaires ou IESF » et « Indice d'altération foliaire ou IAF » qui reflètent respectivement la progression et la gravité de la maladie.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Electrofusion et culture des protoplastes

Sous l'effet du courant alternatif (230 V/cm ; 1 Mhz), les protoplastes migrent et s'alignent en chaînes parallèles, établissant ainsi le contact membranaire nécessaire à la fusion cellulaire. La fusion des protoplastes alignés se produit dès l'envoi des impulsions de courant continu. Le taux de fusion est estimé à environ 40 % de l'ensemble du mélange de protoplastes après l'application de 2 impulsions du courant continu (1200 V/cm pendant 40 µs chacune, Jadari et al. 1992).

Il est intéressant de noter que le comportement des protoplastes est peu affecté par les traitements électriques lors du processus d'électrofusion. Cultivés dans le milieu VKM (Binding et al. 1978), plus de 90 % des protoplastes issus du traitement d'électrofusion synthétisent leur paroi cellulaire après 48 h de culture, identifiables grâce à la perte de la forme sphérique des protoplastes. Les premières divisions cellulaires n'apparaissent qu'après 4-5 jours de culture. Globalement pour l'ensemble des fusions réalisées, environ 45 % des protoplastes traités ont survécu, et dont 20 %, soit 9,0 % des protoplastes initialement mis en culture, ont subi des divisions soutenues aboutissant à la formation de microcals visibles à l'œil nu après 2 semaines de culture. Après 2 à 3 semaines de culture, afin d'éviter le brunissement des microcals, et de stimuler leur croissance, les cultures ont été diluées 10 fois dans le milieu VKM dont les régulateurs de croissance ont été remplacés par 0,2 mg/l de 2,4-D et 2 mg/l de BAP. Les microcolonies se développent rapidement en cals. Cependant, un séjour trop prolongé, au-delà de 6-8 semaines, dans le milieu de dilution conduit à l'arrêt de croissance des cals dont certains brunissent et meurent quelques semaines plus tard. Le maintien d'une croissance rapide et soutenue de cals nécessite leur transfert, à l'aide d'une pipette de 5 ml, sur du milieu MS (Murashige et Skoog 1962) solide contenant des vitamines (Morel et Wetmore 1951), 20 g/l de saccharose, 7 g/l d'agar et 0,5 mg/l zéatine et 0,5 mg/l de d'ANA. Sur le milieu de croissance, on peut observer plusieurs types de comportement de cals. Trois à 4 semaines plus tard, les cals les plus développés, et dont la taille atteint 3-4 mm, sont transférés sur le milieu de régénération contenant notamment 2 mg/l de zéatine et 0,1 mg/l d'AIA. Les premiers bourgeons régénérés, à raison d'1 à 3 par cal régénérant, sont apparus après 4 semaines sur le milieu de régénération. Ceux ayant développé 2 à 3 feuilles étalées sont prélevés et multipliés dans du milieu MS pour des analyses ultérieures.

Identification des hybrides somatiques

La sélection précoce des hybrides somatiques putatifs est basée sur la vigueur des plantes régénérées qui s'expriment notamment à travers une régénération précoce (Sihachakr et al. 1994). Elle est également basée sur les caractères morphologiques intermédiaires des hybrides. La sélection précoce des hybrides somatiques, utilisant la vigueur des plantes comme critères de sélection, a été appliquée avec succès pour isoler notamment des hybrides somatiques de pomme de terre et d'aubergine (Chaput et al. 1990, Jadari et al. 1992 ; Serraf et al. 1991, 1994 ; Daunay et al. 1993 ; Sihachakr

et al. 1994, 1996). Dans cette étude, plus d'une centaine de plantes ont été régénérées à partir de plusieurs expériences de fusion, et parmi lesquelles seulement une trentaine ont été retenues répondant aux critères de sélection précoce. Finalement, 23 plantes sélectionnées ont été identifiées comme des hybrides putatifs. L'analyse cytologique révèle que 20 plantes sont tétraploïdes avec 2n = 4x = 48 chromosomes, 3 aneuploïdes avec un nombre de chromosomes proche de 48. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs concernant le niveau tétraploïde des plantes obtenues (Chaput et al. 1990 ; Serraf et al. 1991, 1994 ; Sihachakr et al. 1994). Cette situation serait probablement due à l'utilisation des tissus différenciés, tels que des feuilles, comme source de protoplastes, alors qu'une variation plus importante du niveau de ploïdie est obtenue à partir de culture de protoplastes de suspensions cellulaires (Schieder et Kohn 1986 ; Sihachakr et al. 1994). Les plantes hybrides putatives sont vigoureuses et ont un bon enracinement. Elles présentent une morphologie intermédiaire des deux parents. Leur nature hybride est confirmée par l'analyse des isoenzymes, notamment les estérases (Est) et les phosphoglucomutases (Pgm) montrant des bandes complémentaires des profils parentaux.

Analyse des hybrides somatiques

Afin d'étudier leur comportement, huit clones d'hybrides somatiques et les deux parents ont été évalués pour leur capacité à tubériser *in vitro* et en serre, ainsi que pour la résistance au champignon.

Des essais de microtubérisation ont été effectués en bocaux en conditions inductives de tubérisation *in vitro*, comprenant notamment une concentration élevée en glucose (60 g) et l'obscurité. En moyenne, les clones hybrides forment 5 tubercules par plante, dont 3 ont un calibre supérieur à 5 mm et pesant 322 mg/tubercule ; alors les parents n'en produisent que 3 par plante, dont 1 seul mesure plus de 5 mm de diamètre avec une masse moyenne de 120 mg/tubercule (**tableau 1**).

Tableau 1 : Calibrage des microtubercules des parents, *S. tarijense* et *S. tuberosum*, et de leurs hybrides somatiques, obtenus à partir des essais effectués en bocaux.

Calibrage	Microtubercules ∅ > 5 mm ➢ Nombre ✻ Masse (g)	Microtubercules 3.5 < ∅ > 5 mm ➢ Nombre ✻ Masse (g)
S. tarijense	1	0
	0,153	-
S. tuberosum	1	4
Var. cardinal	0,087	0,043
HS 5a	7	2
	0,757	0,169
HS 11b	3	1
	0,312	0,113
HS 12c	3	2
	0,279	0,208
HS 16b	1	3
	0,277	0,058
HS 17a	6	3
	0,194	0,046
HS 12a	2	1
	0,221	0,088
HS 31a	2	1
	0,377	0,036
HS 35a	3	3
	0,159	0,059

En conditions de serre, les plantes hybrides ont un développement et une croissance plus rapides et sont plus vigoureuses que les parents. En effet, la taille et la masse totale de la partie aérienne des plantes hybrides sont nettement supérieures respectivement de 1,20 et 3 fois à celles des parents (**tableau 2**). Dans les conditions de serre, les clones parentaux et hybrides sont capables de tubériser. Les tubercules de *S. tarijense* et de pomme de terre var. Cardinal ont respectivement la peau jaune et rose foncé ; alors que la couleur des tubercules de la majorité des hybrides varie du rose au violet, montrant ainsi leur caractère hybride. Les clones hybrides ont un rendement moyen en tubercules 2 à 3 fois supérieur à celui des parents, avec une masse moyenne de 12,6 g/tubercule (**tableau 2**).

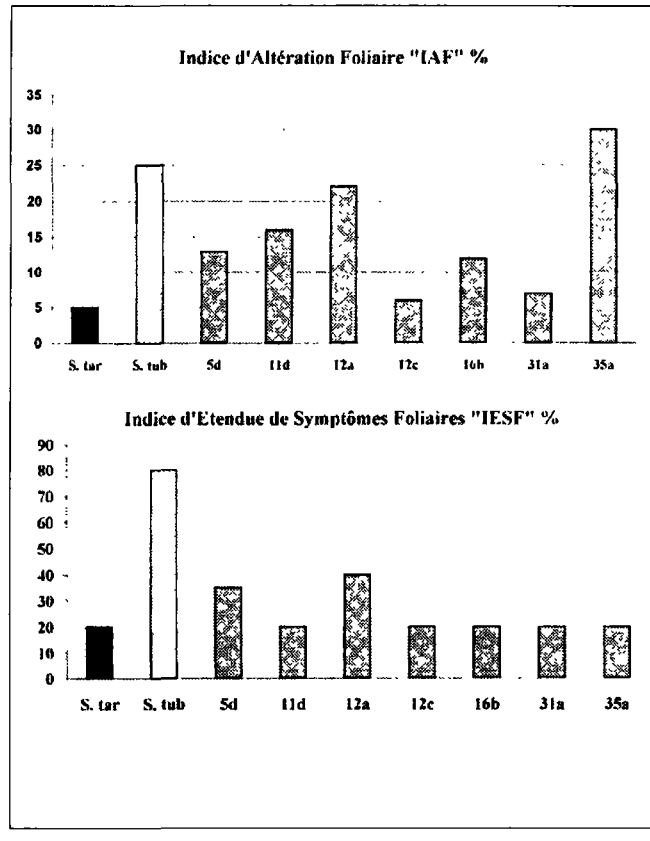
Des inoculations artificielles ont été réalisées en serre contrôlée à partir de spores du champignon. Le degré de résistance a été évalué à l'aide de deux indices des symptômes foliaires, indice d'altération foliaire « IAF » et indice d'étendue des symptômes foliaires « IESF » qui reflètent l'état des plantes infectées. L'indice IAF rend compte de la gravité de la maladie. En effet, cet indice indique que le parent sauvage est résistant car seulement 5 % des feuilles présentent les symptômes de la maladie ; alors que le parent cultivé est assez sensible. Quelques clones hybrides sont résistants, notamment les clones 5d, 12c, 16b, 31a, avec en moyenne 7 % de feuilles atteintes. Le 2e indice, IESF, rend compte de la progression de la maladie sur la plante. Apparemment tous les hybrides testés semblent être résistants, car leur indice IESF est comparable à celui du parent sauvage , estimé à 20 % (**figure 1**). Chez le parent pomme de terre, on constate que la maladie a bien progressé, car 80 % de la plante présente les symptômes.

Tableau 2 : Caractéristiques de la partie aérienne de la plante et des tubercules obtenus.

Caractères	Partie aérienne des plantes		Tubercules		
Clones	Hauteur (cm)	Nbre de tiges formées	Masse totale/plante (g)	Masse moy. (g)	Couleur des tubercules
S. tarijense	52,7	5	15,7	2.6	Jaune
S tuberosum Cardinal	34,7	3	27,4	2,7	Rose foncé
HS 5a	72	3	140	28	Rose
HS 11b	55,5	6	74,7	14,9	Violet
HS 12c	47,2	4	56	8,7	Rose
HS 16b	64	7	43	14,3	Rose
HS 17a	44,3	5	25	6	Jaune
HS 12a	39	1	26	7	Violet
HS 31a	49,3	7	47,0	7,7	Rose
HS 35a	51	4	72	14,2	Rose

Les résultats du test de résistance réalisé en serre contrôlée à l'aide de spores du champignon confirment ceux effectués *in vitro* à partir du filtrat brut sur le degré de résistance du parent sauvage. Ils montrent ainsi la validité du test *in vitro* et l'efficacité de l'hybridation somatique pour l'introgression des caractères de résistance indépendamment des contraintes de la reproduction sexuée (Jadari et al. 1992 ; Sihachakr et al. 1994 ; 1996).

Figure 1. Test de résistance *in vitro* au filtrat brut de *Verticillium dahliae* ; S. tar : *Solanum tarijense* ; S. tub. : *S. tuberosum*, var. Cardinal ; 5d-35a : hybrides somatiques.



CONCLUSION

En conclusion, pour l'amélioration de la pomme de terre, les techniques de fusion de protoplastes sont très prometteuses pour l'obtention rapide de nouvelles combinaisons génomiques entre la pomme de terre cultivée et des espèces sauvages apparentées ayant des caractères de résistance intéressants. Nous avons montré dans cette étude que les hybrides somatiques obtenus sont très vigoureux et ont des performances bien supérieures à celles des parents. De plus, ils sont tous résistants au *Verticillium dahliae*. La généralisation de ces techniques d'hybridation somatique, combinée avec les méthodes conventionnelles, devrait aboutir à la création de nouvelles variétés plus performantes de pomme de terre.

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier du Comité Mixte de Coopération Universitaire (CMCU) (Coopération Franco-Tunisienne) et du Fonds International de Coopération Universitaire (FICU) (AUPELF-UREF)

Bibliographie

1. AUSTIN S., BAER M.A., HELGESON J.P. (1985) Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. Plant Sci 39 :75-82.
2. BEYE I., LAFAY J.F. (1985) Étude de critères pour une réponse générale à la verticilliose chez la Tomate. Agronomie 5 :305-311.
3. BINDING H., NEHLS R., SCHIEDER O., SOPORY S.K., WENZEL G. (1978) Regeneration of mesophyll protoplasts isolated from dihaploid clones of *Solanum tuberosum*. Physiol Plant 43 :52-54.
4. CHAPUT M.H., SIHACHAKR D., DUCREUX G., MARIE D., BARGHI N. (1990) Somatic hybrid plants produced by electrofusion between dihaploid potatoes : BF15 (H1), Aminca (H6) and Cardinal (H3). Plant Cell Rep 9 :411-414.
5. COOPERBLAND S., DEMAINE M.J., STEWART H.E., FLEMING M.L.M.H., PHILLIPD M S , KUMAR A. (1996) Interspecific somatic and sexual hybridization between dihaploid lines of *Solanum tuberosum* L. Evaluation of morphological traits and resistance to late blight Phytophthora infestans (Mont.) de Bary in the foliage. Euphytica 90 : 209-216.
6. DAUNAY M.C., CHAPUT M.H., SIHACHAKR D., ALLOT M., VEDEL F., DUCREUX G. (1993) Production and characterization of fertile somatic hybrid plants of eggplant (Solanum melongena L.) with Solanum aethiopicum L. Theor Appl Genet 85: 841-850.
7. DEBNATH S.C., WENZEL G. (1987) Selection of somatic fusion products in potato by hybrid vigour. Potato Res 30 :371-380.
8. FREARSON E.M., POWER J.B., COCKING E.C. (1973) the isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. Dev Biol 33 :130-137.
9. GIBSON R.W., JONES M.G.K., FISH N. (1988) Resistance to potato leaf roll virus and potato virus Y in somatic hybrids between dihaploid *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. Theor Appl Genet 76 : 113-117.
10. JADARI R., SIHACHAKR D., ROSSIGNOL L., DUCREUX G. (1992) Transfer of resistance to *Verticillium dalhiae* Kleb. from *Solanum torvum* SW into potato (*Solanum tuberosum* L.) by protoplast electrofusion. Euphytica 64 :39-47.
11. MOJTAHEDI H., BROWN C.R., SANTO G.S. (1995) Characterization of resistance in a somatic hybrid of *Solanum bulbocastanum* and *Solanum tuberosum* to *Meloidogyne chitwoodi*. J Nematology 27 : 86-93.
12. MOREL G., WETMORE R.H. (1951) Fern callus tissue culture. Am. J. Bot., 38:141-143.
13. MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15 : 473-497.
14. PEHU E. (1996) The current status of knowledge on the cellular biology of potato. Potato Res 39 : 429-435.
15. PLATT H.W., SANDERSON J.B. (1987) Comparison methods for field studies of varietal response to *Verticillium* wilt potatoes. Am Potato J 64 :87-92.
16. PREISZNER J., FEHÉR A., VEISZ O., SUTKA J., DUDITS D. (1991) Characterization of morphological variation and cold résistance in interspecific somatic hybrids between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *S. brevidens* Phil. Euphytica 57 :37-49.
17. RASMUSSEN J.O., NEPPER J.P., RASMUSSEN O.S. (1996) Analysis of somatic hybrids between 2 sterile dihaploid *Solanum tuberosum* L. breeding lines ; restoration of fertility and complementation of Globodera pallida Pa2 and Pa3 resistance. Theor Appl Genet 92 : 403-410.
18. SCHIEDER O., KOHN H. (1986) Protoplast fusion and generation of somatic hybrids. In : Cell Culture Somatic Cell Genetics of Plants, I.K. Vasil (eds) Academic Press, pp 569-596.
19. SERRAF I., SIHACHAKR D., BROWN S., BARGHI N., DUCREUX G., ROSSIGNOL L (1991) Interspecific somatic hybridization in potato by electrofusion. Plant Sci 76 : 115-126.
20. SERRAF I., TIZROUTINE S., CHAPUT M.H., ALLOT M., MUSSIO I., SIHACHAKR D , ROSSIGNOL L., Ducreux G. (1994) Production and characterization of intergeneric somatic hybrids through protoplast electrofusion between potato (Solanum tuberosum L.) and Lycopersicon pennellii. Plant Cell Tissue Org Cult 37: 137-144.
21. SIHACHAKR D., HAÏCOUR R., SERRAF I., BARRIENTOS E., HERBRETEAU C , DUCREUX G., ROSSIGNOL L., SOUVANNAVONG V. (1988) Electrofusion for the production of somatic hybrid plants of *Solanum melongena* L. and *Solanum khasianum* CV Clark Plant Sci 57 :215-223.

22. SIHACHAKR D., DAUNAY M.C., SERRAF I., CHAPUT M.H., MUSSIO I., HAICOUR R., ROSSIGNOL L., DUCREUX G. (1994) Somatic hybridization of eggplant (*Solanum melongena* L.) with its close and wild relatives. In : Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, Vol 27, Somatic hybridization in crop improvement I. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp255-278.

23. SIHACHAKR D., JADARI R., KUNOTHAI-MUHSIN A., ROSSIGNOL L., HAICOUR R., DUCREUX G. (1996) *In vitro* production of *Verticillium dahliae*-resistant potato plants. In : YPS Bajaj (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, Vol 36, Somaclonal variation in crop improvement II, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp119-131.

C5 : Typage moléculaire de variétés tunisiennes de palmier dattier en relation avec la résistance au bayoud

TRIFI M.[1], BENSLIMANE A.A.[2], RHOUMA A.[3], MARRAKCHI M.[1], RODE A.[4]

[1] Laboratoire de génétique, Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie

[2] Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc

[3] INRA, CRP Degache, Tunisie

[4] Laboratoire BMV III, IBP, Bat. 630, UPS, Orsay, France

INTRODUCTION

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) joue un rôle important dans la stabilité socio-économique des régions oasiennes de l'Afrique du nord. Cependant, depuis quelques décennies, la phoéniciculture est fortement menacée de disparition à cause d'une maladie cryptovasculaire appelée le « bayoud ». Cette maladie est causée par un champignon imparfait : *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*. Probablement d'origine marocaine (vallée du Drâa), cette fusariose a ravagé les 3/4 de la palmeraie marocaine. Actuellement, le bayoud sévit dans l'ouest algérien. Sa progression constitue une menace, sans cesse permanente, pour les palmeraies de l'Est algérien et celles de la Tunisie et ce en dépit des moyens de lutte mobilisés contre l'agent pathogène (Djerbi, 1982 et 1985).

Par ailleurs, la détection, dans les régions où la fusariose est endémique, de cultivars spontanément résistants au champignon n'a pu satisfaire aux exigences agronomiques des phoéniciculteurs (Saaidi, 1979 et 1992 ; Sedra, 1992). En effet, outre le faible nombre des cultivars résistants, ces derniers présentent des dattes de qualité moyenne à médiocre. Ainsi la recherche de marqueurs moléculaires de la résistance à la fusariose serait d'un apport considérable dans l'élaboration d'un programme efficace de sélection de nouvelles variétés résistantes et de bonne qualité dattière. Dans cette optique, les marqueurs biochimiques (en particulier des protéines enzymatiques) se sont avérés insuffisants (Baaziz et al. 1990 ; Bennaceur et al. ; 1991). D'autres travaux récents (Benslimane et al., 1994 ; Benslimane 1995) ont permis de mettre en évidence la présence de plasmides circulaires, appelés S (1454 pb) et R (1346pb), dans les mitochondrie de vitroplantes de palmier dattier. Ces mêmes travaux suggèrent que ces plasmides mitochondriaux pourraient représenter les marqueurs recherchés. En effet, le plasmide S est présent particulièrement dans les mitochondries des plantes sensibles alors que le plasmide R ne l'est que dans celles qui sont résistantes à l'agent pathogène.

Il est donc intéressant de rechercher ces plasmides chez les variétés et cultivars tunisiens de palmier dattier. Pour ce faire, la technique de la réaction enzymatique de polymérisation en chaîne (PCR) a été utilisée. En effet, grâce à sa très grande sensibilité, cette technique est actuellement devenue un outil puissant permettant de générer des séquences spécifiques amplifiées à partir d'une très faible quantité d'ADN cible (Saiki et al., 1985 ; Weining et Langridge, 1991).

Dans ce travail, seront présentés les résultats de l'analyse des produits d'amplification, par PCR, grâce à l'utilisation d'un jeu d'oligonucléotides appropriés permettant d'identifier sans ambiguïté chaque type de plasmide mitochondrial présent dans la plante.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel biologique :

Les variétés et cultivars tunisiens de palmier dattier utilisés sont décrits dans le **tableau 1**. Le matériel végétal, composé de jeunes palmes, provenant du Centre de Recherche Phoénicicole, INRA de Degache, situé dans le sud tunisien. La nomenclature des variétés et cultivars utilisés est celle établie par Rhouma (1994).

Tableau 1 : Variétés et cultivars tunisiens de palmier dattier (nomenclature selon Rhouma 1994).

Var. n°	Nom commercial	Origine
01	Deglet Bey	Degache
02	Boufagous	Tozeur
03	Khalt Boufagous	Degache
04	Ftimi	Djerid
05	Khouat Ftimi	Djerid
06	Kenta	Djerid
07	Kentichi	Djerid
08	Gondi	Tozeur
09	Ammari	Djerid
10	Lagou	Djerid
11	Besser Hlou	Djerid
12	Antiche	Djerid
13	Tazerzit Noire	Degache
14	Deglet Nour	Degache
15	Okht Deglet	Degache
16	Okht Gondi	Degache
17	Zehdi	Tozeur
18	Hlaoui	Degache
19	Ghars Mtig	Djerid
20	Hourra	Djerid
21	Rhimia	Degache
22	Tronja	Djerid
23	Khad Khadem	Tozeur
24	Tazerzit Jaune	Degache
25	Arichti	Degache

Extraction de l'ADN

Les acides nucléiques ont été préparés à partir de jeunes feuilles préalablement congelées dans de l'azote liquide. L'ADN cellulaire total est extrait selon la méthode décrite par Aitchitt et al. (1993) avec de légères modifications. Les ADN ainsi purifiés sont quantifiés par spectrophotométrie et leur qualité a été déterminée par migration électrophorétique sur minigel d'agarose selon la méthode de Sambrook et al. (1989).

Réaction enzymatique de polymérisation en chaîne

Cette réaction est faite grâce à deux oligonucléotides flanquant la séquence délétée du plasmide S (Benslimane 1995) de telle sorte que les fragments amplifiés seront de deux types : ceux qui correspondent au plasmide S et dont la taille est de 373 pb et ceux issus du plasmide R et dont la taille est de 264 pb (soit 373 - la taille du fragment délété de 109 pb)

Chaque réaction a été réalisée dans un volume de 100µl contenant : 25ng d'ADN cellulaire total ; 10µl de tampon de l'enzyme (10X) ; 1,5U de Taq DNA polymérase ; 20OµM de chaque dNTP et 5OpM de chaque oligonucléotide. Un volume égal d'huile minérale est ajouté afin d'éviter l'évaporation du milieu réactionnel. La polymérisation est conduite dans un thermocycler programmé selon les conditions suivantes : le mélange réactionnel est d'abord porté à 94°C pendant 5 minutes avant d'entamer 35 cycles. Chaque cycle comporte : 30 sec. à 94°C pour la dénaturation 1 min à 48°C pour l'hybridation des amorces et 2 min à 72'C pour la synthèse. Une ultime étape de 10 min à 72°C a été programmée à la fin du dernier cycle de toutes les amplifications. La standardisation des expériences est assurée grâce à l'utilisation de deux témoins comprenant chacun de l'ADN plasmidique R ou S.

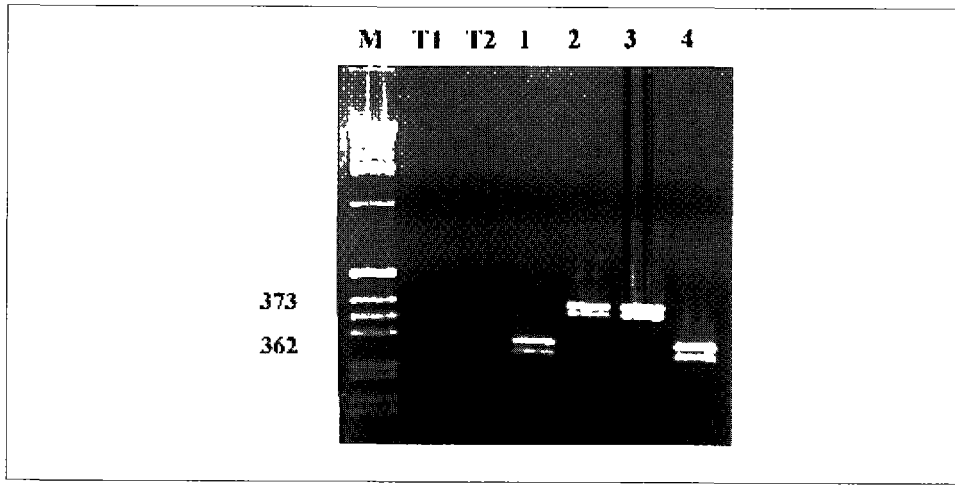
L'analyse des produits d'amplification a été faite par séparation électrophorétique sur gel d'agarose à 1,4 % et contenant du bromure d'éthidium (l µg/ml) selon la méthode décrite par Sambrook et al. (1989).

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Optimisation de la technique de polymérisation enzymatique en chaîne (PCR)

Afin d'optimiser les paramètres d'amplification des fragments attendus en utilisant les primers sus-indiqués, plusieurs réactions d'amplification ont été réalisées, faisant varier la température d'hybridation avec les amorces à partir de 38°C jusqu'à 52°C. Notons qu'au cours de ces expériences, seuls les ADN plasmidiques issus des clones R et S ont servi d'ADN cible. Les résultats montrent des produits amplifiés dont la taille et le nombre varient en fonction de la température d'hybridation. Ainsi pour des températures supérieures ou inférieures à 48°C, des produits d'amplification non spécifiques sont observés. Cependant des fragments correspondants aux plasmides recherchés sont obtenus pour une température égale à 48°C. Ainsi cette dernière température est considérée comme optimale pour amplifier spécifiquement des sous-fragments correspondants aux plasmides mitochondriaux R et S et dont les tailles respectives sont de 373pb et 264pb (**figure 1**).

Figure 1. Fragments amplifiés à partir des ADN plasmidiques R et S et de l'ADN cellulaire total issu de deux variétés de palmier dattier séparés sur gel d'agarose à 1,5 %.



M marqueur de poids moléculaire 1 KB ladder : témoins inclus mélange réactionnel sans ADN (T1) ou sans enzyme (T2) , fragment correspondant au plasmide R (piste 1) et au fragment S (piste 2) , fragment amplifié à partir de l'ADN cellulaire total des variétés Boufagous (piste 3) et de Zehdi (piste 4) La taille des fragments est exprimée en paire de bases

Mise en évidence des plasmides mitochondriaux chez les variétés tunisiennes de palmier dattier

Dans le but de mettre à profit la technique de PCR, décrite ci-dessus, afin de rechercher les plasmides R et S chez les variétés et cultivars tunisiens de palmier dattier, des réactions de polymérisation enzymatique sont réalisées en utilisant comme cible l'ADN cellulaire total extrait à partir de jeunes palmes. Les résultats obtenus montrent effectivement la présence de fragments amplifiés qui correspondent à ceux issus des ADN plasmidiques des clones R et S. En effet, les bandes amplifiées et visualisées après séparation électrophorétique sur gel d'agarose sont identiques à celles issues des plasmides R et S (**Figure 1**). Ainsi les conclusions suivantes peuvent être tirées :

* Il est possible d'utiliser cette approche pour rechercher le type de plasmide présent dans les mitochondries d'une variété donnée.
* Les mitochondries de la variété 1 hébergent le plasmide S alors que celles de la variété 2 hébergent le plasmide R.

Tenant compte de ces considérations, une étude similaire a été conduite en partant de l'ADN cellulaire total des variétés décrites précédemment. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le **tableau 2**. L'analyse de ce tableau montre que, selon le type de plasmide présent dans les mitochondries, les variétés peuvent être regroupées en trois classes :

* La première est composée des variétés : Deglet Bey, Boufagous, Khalt Boufagous, Kenta, Kentichi, Ftimi, Khouat Ftimi, Gondi, Ammari, Lagou, Besser Hlou, Antiche et Tazerzite Noire. Toutes ces variétés possèdent des mitochondries qui hébergent exclusivement le plasmide S.

* La deuxième classe composée des variétés : Deglet Nour, Okht Deglet, Okht Gondi, Zehdi, Hlaoui et Ghars Mtig, montre exclusivement le plasmide R. Il s'agit de :
* Le troisième groupe formé des variétés : Arichti, Rlhimia, Tronja, Khad Khadem et Tazerzite Jaune, présente en même temps les plasmides R et S.

Tableau 2 : Phénotype et profil plasmidique des variétés et cultivars tunisiens utilisés (* : phénotype d'après Saaidi, 1992 et Sedra, 1992).

Var n°	Nom commercial	Phénotype *	Plasmide
01	Deglet Bey	?	S
02	Boufagous	Sensible	S
03	Khalt Boufagous	?	S
04	Ftimi	Sensible	S
05	Khouat Ftimi	Sensible	S
06	Kenta	Sensible	S
07	Kentichi	Sensible	S
08	Gondi	Sensible	S
09	Ammari	?	S
10	Lagou	?	S
11	Besser Hlou	Sensible	S
12	Antiche	?	S
13	Tazerzit Noire	?	S
14	Deglet Nour	Sensible	R
15	Okht Deglet	?	R
16	Okht Gondi	?	R
17	Zehdi	?	R
18	Hlaoui	?	R
19	Ghars Mtig	?	R
20	Hourra	Sensible	R/S
21	Rhimia	?	R/S
22	Tronja	?	R/S
23	Khad Khadem	?	R/S
24	Tazerzit Jaune	?	R/S
25	Arichti	?	R/S

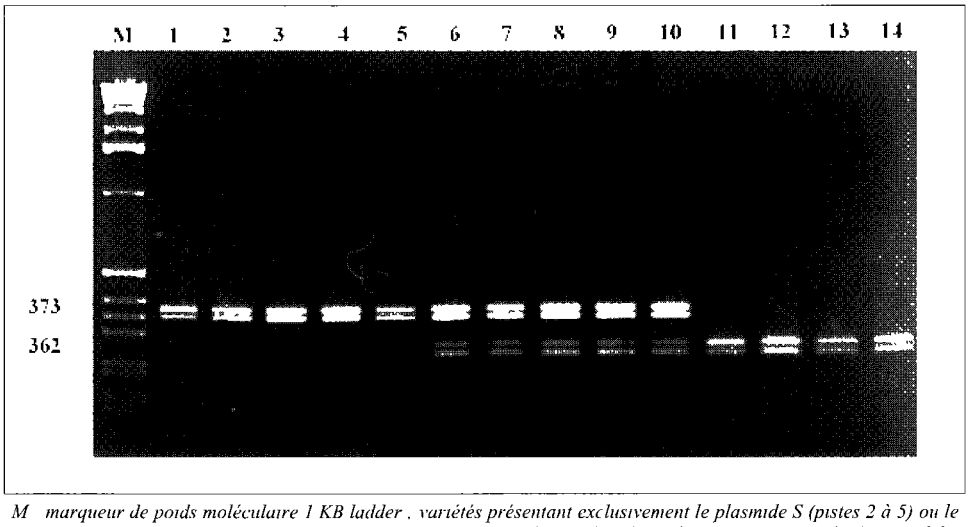
Ce résultat montre clairement l'existence d'un profil plasmidique mitochondrial qui diffère d'une variété à une autre. L'hypothèse d'un équilibre dynamique, probablement dû à des mécanismes de recombinaison intra et intermoléculaire, pourrait expliquer les variations observées. En effet, il a été démontré chez le palmier dattier que ces plasmides possèdent des séquences répétées directes qui, par recombinaison, peuvent générer des molécules subgénomiques (Benslimane 1995 et Benslimane et al. 1996). De même les propriétés recombinogènes des plasmides mitochondriaux ont été également mises en évidence chez d'autres espèces, en particulier chez la fève (Flamand et al., 1993) ainsi que chez *Neurospora intermedia* (Arganoza and Akins, 1995 ; Debets et al. ; 1995). Pour rendre compte du maintien des différentes formes plasmidiques mises en évidence chez l'ensemble des variétés testées, les hypothèses suivantes peuvent être avancées :

(i) La présence exclusive du plasmide S serait la conséquence d'une inhibition totale du mécanisme de recombinaison due à l'absence de potentialités d'expression de l'information nucléaire.

(ii) Par contre, la présence exclusive du plasmide R serait due au fait que les séquences répétées directes ont retrouvé leurs capacités recombinogènes permettant de générer le plasmide R et un fragment non autoréplicatif de 109pb qui disparaîtra progressivement par dilution.

(iii) Enfin la présence simultanée des plasmides R et S chez certaines variétés suppose d'une part le maintien du fragment de taille 109pb et d'autre part que la recombinaison se fait aussi bien au niveau intra-moléculaire, grâce au jeu de séquences répétées directes du plasmide S, qu'au niveau intermoléculaire par l'intermédiaire du plasmide R et du fragment de taille 109 pb. Il en résulte plusieurs situations intermédiaires faisant qu'une forme plasmidique est en surnombre par rapport à l'autre. Les résultats obtenus montrent effectivement quelques unes de ces situations (**figure 2**). Toutefois la recherche du fragment de taille 109 pb permettrait de renforcer cette argumentation.

Figure 2. Exemple de produits d'amplification obtenus à partir de l'ADN cellulaire total issu des variétés tunisiennes de palmier dattier et séparés sur gel d'agarose à 1,5 %.



M marqueur de poids moléculaire 1 KB ladder , variétés présentant exclusivement le plasmide S (pistes 2 à 5) ou le plasmide R (pistes 11 à 13) , variétés montrant la présence simultanée des plasmides R et S (pistes 6 à 10) , amplifiat standard des plasmides S (piste 1) et R (piste 14) La taille des fragments est exprimée en paire de bases

Par ailleurs, la comparaison de ces résultats avec ceux décrits dans la littérature concernant le comportement des variétés tunisiennes de palmier dattier vis à vis du bayoud montre qu'à l'exception des variétés Deglet Nour et Hourra, l'hypothèse de la corrélation entre le type de plasmide présent et le phénotype de la plante est fortement soutenue. En effet, les variétés : Boufagous, Ftimi, Khouat Ftimi, Kenta, Kentichi, Gondi et Besser Hlou sont supposées être sensibles à l'agent pathogène (Saaidi, 1992 ; Sedra, 1992) et possèdent le plasmide S. Cependant les variétés Deglet Nour et Hourra, bien qu'elles soient sensibles au bayoud, présentent respectivement le plasmide R et les plasmides R et S. Les explications suivantes permettraient de rendre compte au moins en partie du comportement particulier de ces deux variétés :

(i) Deglet Nour et Hourra peuvent être considérées comme variétés présentant une résistance intermédiaire entre celles qui sont résistantes ou sensibles au bayoud

(Saaidi, 1992 ; Sedra, 1992) suggérant ainsi que l'évolution du phénotype sensible vers le phénotype résistant s'accompagnerait de la conversion de la forme plasmidique S vers la forme R.

(ii) La résistance n'a pas un déterminisme simple et serait sous un contrôle multigénique. Ainsi, selon les gènes impliqués dans l'acquisition de la résistance, les plasmides R et/ou S pourraient être considérés comme étant des marqueurs phénotypiques des plantes vis-à-vis de la maladie. D'ailleurs, la variété Deglet Nour, en manifestant peu de réaction immédiate à la présence du champignon après inoculation de jeunes plantes, témoignerait de la multiplicité des gènes impliqués dans la résistance à la fusariose (Matheron et Benbadis, 1990).

Quoi qu'il en soit, il semble que la présence de ces plasmides mitochondriaux n'est pas nécessairement impliquée dans la contribution du phénotype de la plante vis-à-vis du champignon. La résistance serait de ce fait au moins en partie adaptative comme en témoigne la persistance de quelques pieds de la variété Deglet Nour (~17 %) transplantés, au Maroc, dans des champs « bayoudés » après 25 années d'observation (Saaidi, 1992).

CONCLUSION

L'ensemble des données expérimentales basées sur l'utilisation de la technique de polymérisation enzymatique (PCR) montre que les variétés testées se regroupent en trois catégories : celles qui présentent exclusivement le plasmide S, celles qui montrent la présence du plasmide R seulement et celles dont les mitochondries hébergent simultanément les plasmides R et S. Des hypothèses permettant de rendre compte de la variabilité des formes plasmidiques ont été proposées.

En outre, la présence des plasmides décrits semble être en forte corrélation avec le phénotype de la plante vis-à-vis de l'agent pathogène. Les résultats présentés semblent être en accord avec l'hypothèse selon laquelle ces plasmides mitochondriaux seraient des marqueurs moléculaires de la résistance du palmier dattier au bayoud (Benslimane et al., 1994). Les travaux sont actuellement en cours dans le but de préciser la relation entre le comportement du palmier dattier et le profil plasmidique des mitochondries chez cette espèce.

Remerciements

Ce travail a été partiellement financé par le CNRS et l'IBP (France) dans le cadre de la coopération CMCU et des accords DGRST/CNRS et par le Ministère de l'Enseignement Supérieur dans le cadre de l'appui à la recherche.

Bibliographie

1. AITCHITT M., AINSWORTH C.C., THANGAVELU M. A rapid and efficient method for extraction of total DNA from mature leaves of date-palm *(Phoenix dactylifera* L.) Plant Mol Biol Reptr 11 (4): 317-319 (1993).
2. ARAGANOZA M.T., AKINS R.A. Recombinant mitochondrial plasmids in *Neurospora* composed of Varkud and a new multimeric mitochondrial plasmid. Curr Genet 29: 34-43 (1995).

3. BAAZIZ M. Contribution à l'étude des peroxydases du palmier dattier (*Phoenix dactyllfera L.*). Relations avec la résistance de la plante à la maladie du bayoud, fusariose vasculaire à *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Cadi Ayed, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc (1990).
4. BENNACEUR M., LANAUD C., CHEVALLIER M.H., BOUNAGA N. Genetic diversity of the date-palm (*Phoenix dactylifera* L.) from Algeria revealed by enzyme markers. Plant breeding 107: 56-69 (1991).
5. BENSLIMANE A.A., RODE A., QUETIER F., HARTMANN C. : Characterization of two minicircular plasmide-like DNAs isolated from date-palm mitochondria. Curr Genet 26: 535-541 (1994).
6. BENSLIMANE A.A. Plasmides mitochondriaux du palmier dattier (Phoenix dactylifera L.). Mise en évidence et caractérisation moléculaire. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Cadi Ayed, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc (1995).
7. BENSLIMANE A.A., HARTMANN C., OUENZAR B., RODE A. Intramolecular recombination of a mitochondrial minicircular plasmide-like DNA of a date-palm mediated by a set of short direct-repeat sequences. Curr Genet 29: 591-593 (1996).
8. DEBETS F., YANG X. and GRIFFITHS A.J.F. : The dynamics of mitochondrial plasmids in Hawaiian population of *Neurospora intermedia*. Curr Genet 29: 44-49 (1995).
9. DJERBI M. Seminar on bayoud disease in Africa. Nenadates News 1: 2 (1982).
10. DJERBI M., SEDRA M.Y., EL IDRISSI-AMMARI M.A. Caractéristiques culturales et identification du *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, agent causal du bayoud. Ann Inst Nat Rech Agron Tunis 58: 178 (1985).
11. FLAMAND M.C., DUC G., GOBLET J.P., HONG L., LOUIS O., BRIQUET M., BOUTRY M. Variant mitochondrial plasmids of broad bean arose by recombination and are controlled by the nuclear genome. Nuc Acids Res 21-23: 5468-5473 (1993).
12. MATHERON B., BENBADIS A. Contribution à l'étude du bayoud, fusariose du palmier dattier. I. Etude du cultivar sensible Deglet-Nour. Can. J. Bot 68: 2054-2058 (1990).
13. RHOUMA A. Le palmier dattier en Tunisie. I. Le patrimoine génétique. Arabesques Editions et Créations, Tunis, Tunisie (1992).
14. SAAIDI M. Contribution à la lutte contre le bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Dijon, France (1979).
15. SAAIDI M. Comportement au champ de 32 cultivars de palmier dattier vis-à-vis du bayoud: 25 années d'observations. Agronomie 12: 359-370 (1992)
16. SAIKI R.K., SCHARF S., MULLIS K.B., HORN G.T., ELRICH H.A., ARNHEIM N Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostis of suckle cell anemia. Science 239: 1350-1354 (1985).
17. SAMBROOK J., FRITISCH E.F. and MANIATIS T. Molecular cloning : a laboratory manual. 2d ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989).
18. SEDRA M.E. Evaluation and selection of cultivars and clones of date-palm for resistance to the bayoud-disease. Arab J. Plant Prot 10 (2) : 155-160 (1992).
19. WEINING S., LANGRIDGE P. Identification and mapping of polymorphism in cereals based on the polymerase chain reaction. Theor Appl Genet 82: 209-216 (1991).

SECTION C

Textes et résumés des Affiches

de C6 à C39

C6 : Développement et utilisation de lignées isogéniques pour l'évaluation du rôle de la glaucescence dans l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le blé

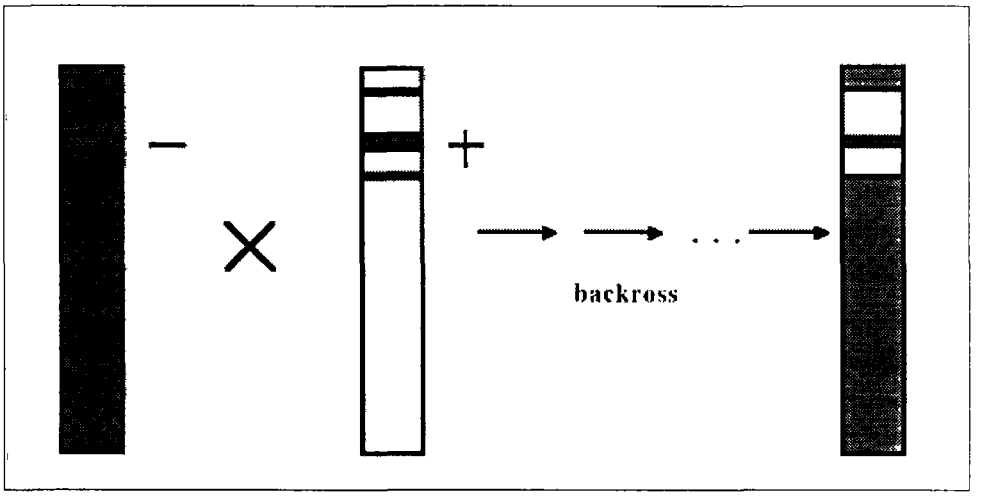
QARIANI L.[1], JLIBENE M.[2], EL JAAFARI S.[1]

[1] Laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes, Faculté des sciences, Université Moulay Ismaïl, BP 4010 Béni M'hamed, 50000- Meknès, MAROC.

[2] Institut National de Recherche Agronomique, Programme Bour Favorable, CRAA-Saïs et Moyen Atlas. BP 578, 50000 Meknès, MAROC.

INTRODUCTION

Les lignées isogéniques pour un gène ou locus donné sont des lignées qui possèdent le même génotype, à l'exception d'un locus qui a fixé des allèles différents. Dans la pratique, l'obtention de celles-ci se fait en réalisant des backross successifs entre une lignée « donneuse » d'un gène favorable, et une lignée receveuse (ou récurrente).



R : Lignée «receveuse» (ou récurrente) ; D : Lignée «donneuse» d'un gène favorable : R' Lignée ayant reçu le gène

La création de ces lignées n'est en fait, en l'état actuel des recherches, réalisable que pour des caractères à déterminisme génétique simple.

À l'institut National de Recherche Agronomique (INRA) de Meknès, des lignées isogéniques du blé sont développées dans le but de créer des variétés à résistance multiple aux maladies. Certaines de ces lignées présentent des différences concernant des caractères morphologiques potentiellement impliqués dans l'efficacité d'utilisation de l'eau comme les barbes, la glaucescence et la pilosité. En effet, ces caractères induisent une augmentation de la réflectance et donc une réduction de la température foliaire limitant ainsi les pertes en eau par transpiration. Un tel matériel peut constituer un moyen pour valider le rôle de ces caractères dans l'efficacité d'utilisation de l'eau.

La présente étude vise l'examen et l'analyse de l'effet des différences relatives à la quantité de cires épicuticulaires, entre lignées isogéniques de blé, sur l'efficacité d'utilisation de l'eau. L'objectif de ce travail étant d'évaluer le rôle de ces adaptations micromorphologiques du tissu foliaire dans l'EUE et la tolérance à la sécheresse chez le blé.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des lignées isogéniques de blé développées à L'INRA - Meknès et caractérisées par leur résistance multiple aux maladies (cécidomyie, rouilles jaunes, brunes et noires) ont été utilisées et évaluées sur base de caractères morphophysiologiques liés aux pertes d'eau et leurs relation avec le satut hydrique et l'EUE. Ces lignées sont issues de croisement entre les principales variétés cultivées au Maroc (Achtar, Marchouch, Kenz, Nesma) et des sources de résistance aux maladies citées ; suivie de croisements retours au parent récurrent que constitue la variété cultivée. La proportion minimale du génome en commun étant de 97 %. Il convient de noter que ce matériel végétatif est d'une obtention récente et qui n'a fait l'objet d'aucune étude physiologique.

Les paramètres mesurés relatifs aux pertes d'eau par ces lignées, concernent : la transpiration, la résistance stomatique, la glaucescence et la perte relative en eau en condition de lumière et d'obscurité. La résistance stomatique et la transpiration foliaire sont mesurées à l'aide d'un poromètre à diffusion qui fournit la résistance (R) à la diffusion de vapeur d'eau. La feuille étendard qui sert de mesure est placée de telle sorte que le thermocouple de l'appareil soit en contact avec la partie médiane de la face abaxiale moins soumise aux forts rayonnements, donc plus homogène que la face adaxiale (surface foliaire fixée est de 0.65 cm^2). Ces mesures sont réalisées au cours de la mi-journée sur un ciel bien dégagé. La perte relative en eau, dans les deux cas, repose sur la dessication de la feuille excisée pendant 4 heures et ceci à des intervalles de temps fixés (2h, 4h et 6h). La glaucescence est déterminée par dosage de la quantité des cires par unité de surface foliaire. Notons que nous avons pu déjà opérer un classement de notre matériel végétatif quand à leur aptitude à accumuler des cires.

RÉSULTATS & DISCUSSION

Relation « Glaucescence-EUE »

Chez le blé, la réduction des pertes d'eau, élément important qui pourrait attribuer à l'amélioration de l'EUE, s'obtient en partie par la mise en place de barrières morphologiques des tissus foliaires dont les cires, caractère génétique ayant la faculté de s'extérioriser et de s'exprimer mieux en conditions de déficit hydrique. La quantité de ces cires épicuticulaires est conditionnée, chez le sorgho, par deux loci (Bm1 et Bm2) tandis que leur nature est contrôlée par des allèles récessifs correspondants à trois loci au moins (h1, h2, et h3) (Peterson *et al*, 1982). Les deux caractères ségrègent de manière indépendante et aux différentes combinaisons correspondent divers types et quantités de cires. McIntosh (1983) a montré que la glaucescence est contrôlée chez le blé, par une série de gènes (wl, W1, W1', W2a, W2b, W2') correspondant aux génomes B et D. Par ailleurs, Johnson *et al*, (1983) ont indiqué que l'expression de la glaucescence dépend de l'arrangement des cires déposés plutôt que de la quantité de cires.

D'après nos résultats, on a enregistré trois types de classes de lignées isogéniques selon leur aptitude à accumuler des cires (figures 1, 2 et 3) :

Classe I : comprend les lignées isogéniques 1-2 caractérisées par leur capacité à accumuler des quantités de cires élevées. Ces lignées se sont distinguées comparativement aux autres lignées par, un taux de transpiration faible, une résistance stomatique et une température foliaire relativement élevées et enfin par des pertes relatives en eau basses.

Classe II : comprend les lignées isogéniques 3-4-5 avec les caractéristiques suivantes : une glaucescence moyenne, une transpiration et une résistance stomatique intermédiaires et des pertes relatives en eau moyennes.

Classe III : avec la lignée isogénique 6 présentant une quantité de cires épicuticulaires faible, une transpiration plus prononcée, une résistance stomatique et une température foliaire relativement faibles et des pertes en eau élevées.

Ainsi, il semble que le flux d'eau (stomatique et cuticulaire) au niveau de la feuille est déterminé par la quantité de cires cuticulaires : un taux de cires élevé est lié à un taux de transpiration bas. Cependant, la réduction de la transpiration ne se traduit pas forcément par une augmentation de la température foliaire ; ceci pourrait être expliqué par l'augmentation de la réflectance due aux cires et induisant une réduction de la radiation interceptée et limitant ainsi les pertes en eau.

Soulignons que la majeure partie de l'eau se perd par transpiration à travers les stomates, à l'exception d'une portion qui s'échappe par la cuticule de la feuille. Cette perte relative en eau qui reflète le taux de transpiration cuticulaire a lieu en condition d'obscurité du fait qu'à part les plantes CAM, toutes les autres plantes ouvrent leurs stomates en réponse à la lumière et les ferment à l'obscurité.

Par ailleurs, il convient de noter qu'en général, les lignées isogéniques qui ont présenté une accumulation plus importante en cires sont celles qui se sont distinguées par une supériorité très marquée du point de vue efficacité d'utilisation de l'eau (EUE exprimée par le rapport de la matière sèche aérienne par quantité d'eau consommée). Ceci est en accord avec les travaux de Clarke et Richards (1988) et ceux de Clarke *et al* (1989) qui ont montré que la majorité des accessions glaucescentes (en moyenne 94 %) ont des rendements en biomasse plus élevés que celles à glaucescence faible. Dans ce sens, Dakheel et Makdis (1991) ont montré que les lignées isogéniques glaucescentes présentent un rendement en biomasse 11 % plus élevé que chez les lignées non glaucescentes.

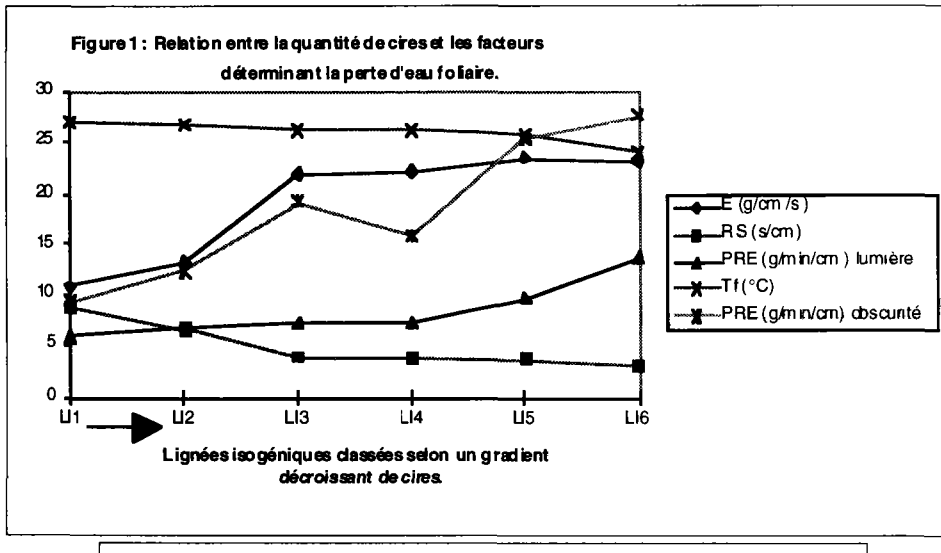


Figure 1 : Relation entre la quantité de cires et les facteurs déterminant la perte d'eau foliaire.

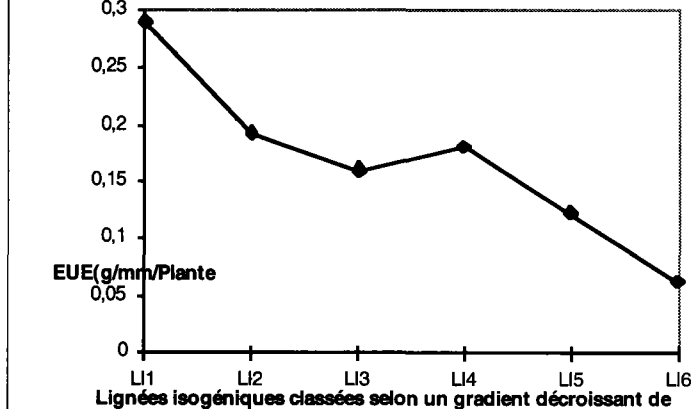


Figure 2 : Relation entre la quantité de cires et l'efficacité d'utilisation de l'eau

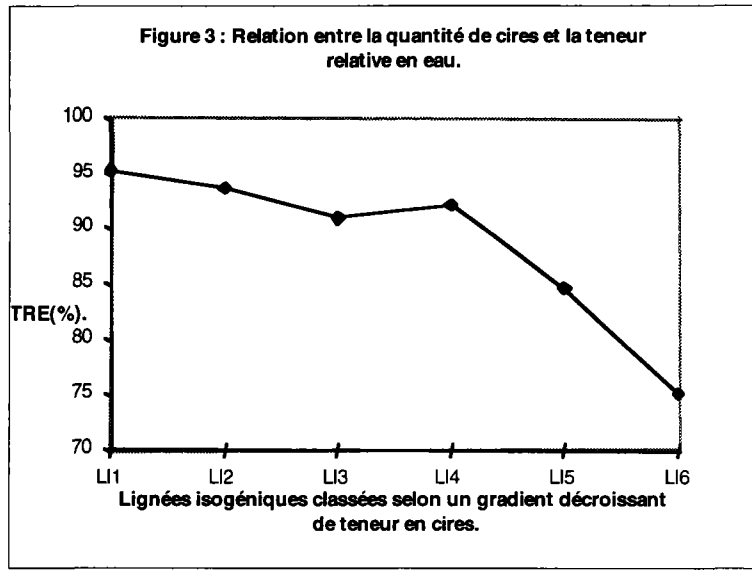


Figure 3 : Relation entre la quantité de cires et la teneur relative en eau.

Relation « TRE - glaucescence »

Généralement, Les lignées isogéniques qui ont enregistré les teneurs relatives en eau les plus élevées sont les plus performantes en terme de glaucescence (**Figure 3**). Ceci pourrait être expliqué partiellement par une réduction des pertes en eau par transpiration. Par ailleurs, les lignées isogéniques à teneur relative en eau élevée se sont montrées les plus efficaces vis-à-vis de la production de matière sèche. La caractérisation du statut hydrique d'une plante est donc d'une importance certaine dans la sélection de plantes plus efficientes en eau.

Dans une précédente étude (Qariani *et al.*, 1997), nous avons démontré l'existence d'une forte corrélation positive entre la teneur relative en eau et l'efficacité d'utilisation de l'eau expliquée partiellement par une réduction des pertes d'eau par transpiration. Une EUE élevée s'est révélé un mécanisme d'esquive plutôt qu'un mécanisme de tolérance semblait être plus utile en conditions de stress sévère qu'en conditions de stress modéré. Nous avions alors conclu que, suivant le niveau de stress auquel le blé est exposé, la recherche d'un niveau donné d'EUE doit tenir compte du compromis entre la limitation de la transpiration et le maintien des échanges gazeux et que pour une même EUE, les niveaux du rendement absolu (et non par rapport à l'eau consommée) peuvent être différents.

CONCLUSION

Compte tenu de ces résultats, on peut conclure que les lignées isogéniques les plus performantes en terme d'efficacité d'utilisation de l'eau exprimée ici par le rapport de la matière sèche et de la quantité d'eau consommée, sont pratiquement des lignées glaucescentes. Cette relation taux de cires - EUE pourrait être expliquée par : une perte d'eau faible par réduction de la température foliaire réduisant ainsi à la fois la transpiration stomatique et cuticulaire, et contribuant ainsi au maintien d'un statut hydrique foliaire favorable caractérisé dans cette étude par la mesure de la teneur relative en eau.

Par ailleurs, des paramètres morphophysiologiques comme l'EUE, la TRE ou le taux de cires, ne peuvent, en toute rigueur être utilisés en sélection qu'après que leur rôle effectif dans la tolérance au déficit hydrique ait été vérifié. Dans le cas d'un caractère morphologique à déterminisme génétique simple comme la glaucescence (Monneveux et This, 1997), les lignées isogéniques sont un matériel de choix pour valider le rôle de ces caractères dans la tolérance à la sécheresse.

Bibliographie

1. CLARKE J.M., RICHARDS R.A. (1988). Can. J. Plant Sci., 68, 975.
2. CLARKE J.M., RAMAGOSA I., JANA S., SRIVASTAVA J.P, MC GRAIG T.N. (1989) Can J. Plant Sci., 69, 1075.
3. DAKHEEL A., MAKDIS F. (1991). In «CIP report», ICARDA, Aleppo, 120
4. JOHNSON D.A., RICHARDS R.A., TURNER N.C. (1983). Crop Sci., 23, 318.
5. MC INTOSH R.A. (1983). Proc. VIth. Int. Wheat Genet. Symp., 1197.
6. MONNEVEUX Ph., This D. (1997). Sécheresse, 8, 29.
7. PETERSON G.C., KRITTIKA S., WEIBEL D.E. (1982). Crop Sci., 22, 63.
8. QARIANI L., DJEKOUN A., EL JAAFARI S. (1997). In « Adaptation des blés aux contraintes environnementales ». S. El Jaafari & Ph. Monneveux eds., INRA- GRAM-eds., Paris (en préparation).

C7 : Étude de la ségrégation transgressive pour la résistance de l'orge à *Pyrenophora teres*

CHERIF M., HARRABI M.
INAT, Tunisie

INTRODUCTION

La rayure réticulée causée par *Pyrenophora teres* (Died.) Drechsl. (stade conidien : *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem.) est l'une des maladies majeures de l'orge *(Hordeum vulgare* L.) en Tunisie (Cherif et al., 1994). Sa gravité est due en partie à la culture de variétés sensibles.

La résistance variétale, est l'un des moyens les plus économiques, les plus écologiques et les plus efficaces de contrôle de cette maladie. Cette approche a nécessité le criblage des sources de résistance dans un certain nombre de pays producteurs d'orge. Plusieurs sources de résistance ont été identifiées à partir de différentes régions du monde. Les études génétiques effectuées sur ce matériel résistant ont révélé dans la plupart des cas une hérédité simple (Bockelman et al., 1977, Ho et al., 1996 ; Wilcoxson et al., 1992).

Parallèlement à cette résistance simple, estimée d'une manière qualitative, un autre type de résistance qualifié de résistance quantitative, incomplète ou partielle a été décrit, et son contrôle génétique a été étudié dans le but d'assister des programmes d'amélioration de la résistance (Arabi et al., 1990 et Steffenson et al., 1991). L'intérêt de ce type de résistance réside dans la réduction du taux de développement de la maladie tout en étant non spécifique au pathotype. La manifestation de la résistance serait alors plus stable et plus durable.

Pour ce type de résistance, Khan et Boyd (1969) ont attribué l'expression génétique à l'effet de(s) gène(s) majeur(s) qui est (sont) influencé(s) par la(es) réponse(s) de(s) gène(s) mineur(s) et à l'effet de l'environnement. Cependant, en absence de gène(s) majeur(s), l'expression quantitative de la résistance peut être due uniquement à l'effet des gènes mineurs. C'est ainsi que Bjarko (1979) et Bordelon (1981) ont rapporté la présence de gènes mineurs de résistance chez les variétés d'orge sensibles. Ils ont décelé une ségrégation transgressive pour la résistance au cours des générations F2, F3 et F4 issues de croisements entre des parents d'orge sensibles à *P. teres.*

De même, un programme de croisements et de sélections a été établi en 1985, par le laboratoire de génétique de la résistance aux maladies de l'Institut National Agronomique de Tunisie en vue de profiter de la ségrégation transgressive pour la résistance. Ainsi, huit variétés d'orge sensibles à *P. teres* ont été croisées pour produire sept croisements.

La sélection au champ (à des infections naturelles) des descendants les plus résistants à *P teres a* commencé en F2, et en conditions contrôlées de laboratoire à partir de la F5. Ainsi, seules les plantules F5 les plus résistantes ont été repiquées au champ, où elles ont été soumises à une seconde sélection en fin de leur cycle. Au niveau de toutes les générations, les graines appartenant aux plantes résistantes sont récoltées en mélange pour former la population suivante. Après les deux ans de double sélection (F5 et F6), des familles F7 ont été formées. Toutes ces familles ont été avancées pour donner successivement les générations F8, F9 et F10.

Le but du présent travail étant d'étudier l'évolution de la résistance de l'orge à *P. teres* au cours des générations en ségrégation et d'identifier l'origine et de sélectionner les lignées les plus résistantes au niveau des générations avancées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour étudier l'évolution de la résistance, les parents ainsi que leurs descendants : FI, F2, F3, F4, F5 et F6 ont été testés au stade juvénile en conditions contrôlées à des isolats différents de *P. teres*. Les trois premières générations ont été évaluées par un mélange de 5 isolats Tunisiens de *P. teres*. Les générations F4, F5 et F6 ont été évaluées respectivement par 3, 7, et 2 isolats d'origine maghrébine. Le nombre de plantes testées était compris entre 200 et 300 pour toutes les générations exceptée la F1, dont le nombre de plantes testées était de l'ordre de 15 à 25.

Toutes les plantes ont été semées dans des plateaux en plastique, cultivées pendant une semaine dans une chambre de culture, inoculées par des suspensions de spores ajustées à 10^4 conidies/ml, incubées pendant 36 heures dans une chambre humide puis retournées dans la chambre de culture. Elles ont été évaluées à l'âge de 15 à 20 jours selon le type d'infection (TI) qui varie de : 0 à 4.

L'évaluation à l'infection naturelle par *P. teres*, des descendants F7, F8 et F10 a été faite au champ, au stade épiaison respectivement durant les années : 1993, 1994 et 1996. Chaque lignée a été semée sur deux lignes de 1 mètre. La variété « Rihane » utilisée comme témoin sensible a été semée après toutes les 5 lignées.

La génération F7 a été évaluée à la station de Mornag. La génération F8 a été évaluée dans les 2 stations : Mornag et INAT, alors que la génération FI0 a été évaluée dans les trois sites : Mornag, Mograne et Béja. Le pourcentage d'infection globale a été utilisé pour estimer l'importance de la maladie.

RÉSULTATS

Pour simplifier le travail, seules les données relatives à quatre croisements sont présentées dans l'étude de l'évolution de la résistance en fonction des cycles de sélection.

Pour les quatre croisements, un profil de résistance est observé au cours des générations F1, F2, F3, F4, F5 et F6 avec une augmentation progressive et régulière du pourcentage de plantes résistantes d'une génération à une autre. L'augmentation du pourcentage de plantes résistantes entre la première et la sixième génération est respectivement de 70 ; 77 ; 80,5 et 49 % pour les croisements 1, 2, 3 et 4.

Une analyse de régression linéaire des réactions en fonction des générations a été effectuée pour les quatre croisements et pour les deux critères d'évaluations de la maladie (**Tableau 1**). Ce modèle a été trouvé significatif au seuil 5 % pour tous les croisements et pour les deux critères, sauf pour le croisement 4 lorsqu'il est évalué par le type d'infection moyen.

Les équations de régression établies à partir de ces analyses montrent que les coefficients de régression sont négatifs pour les types d'infections et positifs pour les pourcentages de plantes résistantes. En d'autres termes, le type d'infection diminue à chaque génération, alors que le pourcentage de plantes résistantes augmente. Théoriquement, si on continue la sélection, on atteint la résistance totale avec un type d'infection nul à la F10 pour les croisements 1 et 2, à la F11 pour le croisement 3, et à la F19 pour le croisement 4. En outre, toutes les plantes issues des quatre croisements seront résistantes entre la 8^e et la 10^e génération.

Tableau 1 : Analyse de régression linéaire du type d'infection et du pourcentage de plantes résistantes sur les générations issues des 4 croisements.

Croisement	Critère d'évaluation	Coeff. de corrélation	Equation de régression
1	Type d'infection	-0,89 *	Y = - 0,37 X + 3,67
	% de pl. résistantes	0,93 *	Y= 11,91 X + 2,80
2	Type d'infection	- 0,90 *	Y = - 0,43 X + 4,10
	% de pl. résistantes	0,95 *	Y= 15,33 X -15,57
3	Type d'infection	- 0,88 *	Y = - 0,35 X + 3,87
	% de pl. résistantes	0,89 *	Y = 12,50 X - 9,50
4	Type d'infection	- 0,65 NS	Y= - 0,19 X + 3,60
	% de pl. résistantes	0,96 *	Y = 9,91 X - 5,20

** : Coefficient de corrélation entre x et y est significatif au seuil 5%. NS : Coefficient de corrélation entre x et y est non significatif*

Les résultats relatifs aux comportements des générations avancées (F7, F8 et F10) dans les différents sites se ressemblent globalement. Seules les réactions des générations F8 issues de cinq croisements évalués dans les sites : Mornag et INAT sont représentées dans cette étude.

Au cours de cette année, les conditions climatiques étaient assez bonnes au développement de la maladie. De tous les croisements, les croisements 2 et 3 ont exprimé les sévérités moyennes les plus faibles et le plus grand nombre de plantes résistantes (**Figure 1**). On note toutefois, à la station de l'INAT, 5 % de lignées appartenant au croisement 1 qui sont presque indemnes de maladie. Le croisement 4 montre toujours une sévérité moyenne la plus élevée (supérieure à 20 %), le plus grand nombre de plantes sensibles et le nombre le plus réduit de plantes résistantes. Cependant, ces évaluations restent nettement inférieures à celles des témoins ayant montré une sévérité de 42 et 51 % respectivement à Mornag et à l'INAT (données non représentées dans les courbes).

Ainsi, après évaluation des lignées F10 dans les sites : Mornag, Mograne et Béja, les plus résistantes ont été retenues. Des essais de rendement sont en cours pour l'évaluation de ces lignées homozygotes retenues.

DISCUSSION

Une ségrégation transgressive pour la résistance est observée dans la descendance issue des quatre croisements de parents sensibles. Cette ségrégation serait due à la présence de gènes mineurs de résistance à *P. teres* chez les parents sensibles utilisés (Bjarko, 1979 et Bordelon, 1981). En effet, au niveau des parents, les effets individuels des gènes mineurs sont trop faibles pour être détectés, ce qui explique la sensibilité de ces parents. Au moment des hybridations, il y a eu addition des gènes mineurs qui se sont exprimés au cours des générations en ségrégation sous forme d'une résistance partielle. Des études précédentes ont attribué les bases génétiques de cette résistance à des effets géniques additifs (Arabi et al., 1990), à des effets géniques additifs et additifs x épistasiques (Cherif et Harrabi, 1990), et à l'effet d'un seul gène partiellement dominant combiné à des effets géniques additifs (Douglas et Gordon, 1985).

Il est clair, d'après cette étude, que la ségrégation transgressive est plus évidente dans les générations les plus avancées (F6, F5 et F4). Cette augmentation de la résistance pourrait être expliquée par, d'une part le rôle de la sélection dans un programme d'amélioration des plantes, et d'autre part par les combinaisons favorables des gènes mineurs récessifs dont les allèles homozygotes apparaissent successivement au cours des générations en ségrégation. Il semble bien évident que l'effet de la sélection est celui qui a contribuée le plus à cette manifestation de résistance. En effet, au cours de cette étude, une pression de sélection a été exercée sur les plantes adultes F2-F6 et sur les plantules F5 et F6.

La seconde étude a montré que les générations avancées (F7-F10) manifestent une résistance partielle au champ à *P. teres*. Les combinaisons de gènes sont cependant meilleures à partir de certains croisements qu'à partir d'autres. En effet, les sévérités moyennes et les distributions des fréquences ont indiqué un maximum de résistance pour le croisement 3. Les données collectées au stade plantule sont en accord avec ce résultat. Il est alors supposé que les gènes apportés par les deux parents formant ce croisement, sont d'origines assez éloignées et présentent une bonne aptitude à la combinaison.

Bibliographie

1. M ARABI I., SARRAFI LA., BARRAULT G., ALBERTINI L. (1990) Inheritance of partial resistance to net blotch in barley. Plant Breeding 105, 150-155.
2. BJARKO M.E. (1979). Sources and genetic action of resistance in barley to different virulence types of *Pyrenophora teres*, the causal organism of net blotch. Bozeman, Montana State University, 97 pp M Sc Thesis.
3. BOCKELMAN H.E., SHARP E.L.,ESLICK R.F. (1977). Trisomic analysis of genes for resistance to scald and net blotch in several barley cultivars. Can. J. Bot. 55,2142-2148.
4. BORDELON B.P. (1981). Transgressive segregation for résistance in barley to net blotch Bozeman, Montana State University, 86 pp. M. Sc Thesis.
5. CHERIF M., HARRABI M. (1990). Generation mean analysis of inheritance of resistance to *Pyrenophora teres* in barley. Plant Breeding 105,69-74.
6. CHERIF M., HARRABI M., MORJANE H. (1994). Distribution and importance of wheat and barley diseases in Tunisia, 1989 to 1991. Rachis 13, 25-34.
7. DOUGLAS G.B., GORDON I.L. (1985). Quantitative genetics of net blotch resistance in barley. New Zealand J. of Agr. Res. 28,157-164.
8. HO K.M., TEKAUZ A., CHOO T.M., MARTIN R.A. (1996). Genetic studies on net blotch resistance in barley cross. Can. J. Plant Sci. 76,715-719.
9. KHAN T.N., BOYD W.J.R. (1969). Environmentally induced variability in host reaction of barley to net blotch. Austral. J. Biol. Sci. 22,1237-1244.
10. STEFFENSON BRIAN J., WEBSTER R.K., JACKSON L.F. (1991). Reduction in yield loss using incomplete resistance to *Pyrenophora teres f teres* in barley. Plant Dis. 75,96-100.
11. WILCOXSON R.D., RASMUSSON D.C., TREEFUL L.M., SUGANDA T. (1992). Inheritance of résistance to *Pyrenophora teres* in Minnesota barley. Plant Dis. 76,367-369.

C8 : Évaluation de la résistance à la contrainte hydrique et calorique d'une collection de blé dur: recherche de paramètres précoces de sélection

BEN SALEM M., BOUSSEN H., SLAMA A.

Département de Physiologie et de Biotechnologie, Laboratoire de Physiologie Végétale, INRAT. Rue Hédi Karray, 2049, Ariana, Tunis, Tunisie.

INTRODUCTION

Les céréales sont soumises, essentiellement dans les régions de la rive sud de la Méditerranée à des sécheresses très fréquentes. Ainsi, la culture du blé dur est associée en général aux zones dont les pluviométries annuelles sont de 300-400 mm (Srivastava, 1984). En Tunisie la stabilité des productions céréalières constitue actuellement une priorité dans la stratégie tunisienne d'amélioration des céréales (Ben Salem et al., 1995).

La lutte contre les sécheresses (Rognon, 1996) doit être envisagée moyennant une approche multidisciplinaire qui intègre, dans le cas des céréales, essentiellement l'irrigation, les techniques culturales et la sélection d'un matériel adapté. Les travaux réalisés dans le cadre de l'ARC « Biotechnologie et résistance à l'aridité des céréales » s'inscrivent dans le dernier cadre. En effet, l'association des techniques agrophysiologiques et biotechnologiques peut constituer une des voies permettant l'amélioration des productions dans les zones soumises à des contraintes abiotiques et biotiques (Demarly et Sibi, 1989).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Nous avons utilisé au cours des différentes manipulations 14 variétés de blé dur qui ont été choisies de telle façon à présenter le plus possible de diversité sur les plans agrophysiologique, origine géographique et époque d'adoption en tant que variété de grande culture. Ainsi :

- Jennah khottifa 1 (JK1), Jennah Khottifa 2 (JK2), Chili, Inrat et Bidi117, constituent des accessions anciennes cultivées essentiellement en Afrique du Nord (Tunisie et ou Algérie).
- Maghrébi, Ben Bachir, Karim, Razzak, Khiar et Om Rabiaa 3, sont, par contre, des obtentions tunisiennes relativement nouvelles. Les deux variétés karim et Khiar couvrent actuellement la plus grande partie des superficies emblavées en blé dur dans le nord de la Tunisie (sub-humide et semi-aride supérieur et inférieur).
- Duriac et Villemur, sont des variétés cultivées actuellement en grande culture en France et ont été obtenues suite à un programme de coopération avec le laboratoire d'amélioration des plantes de l'INRA/ENSAM de Montpellier.
- Cham 1 est une obtention de l'ICARDA (témoin du réseau de l'ARC).

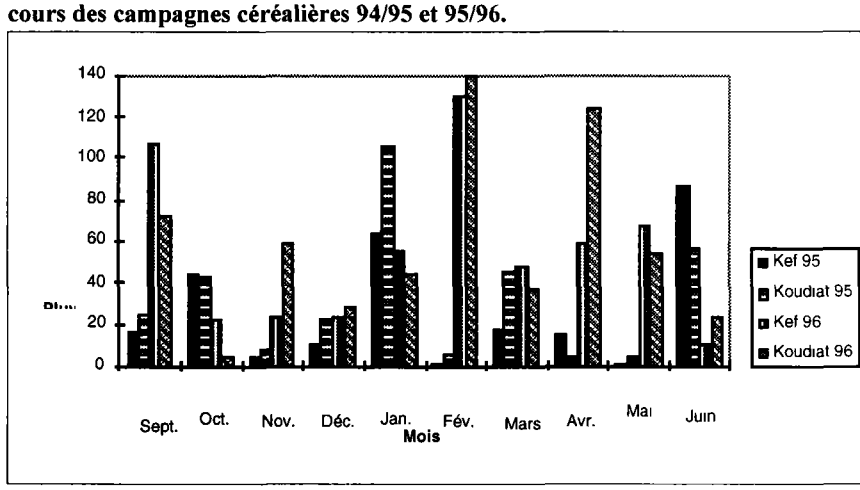
Les variétés Cham 1 et Jennah Khottifa ont été utilisées en raison de leur meilleure aptitude à la production d'haploïdes. Les résultats peuvent ainsi servir les autres partenaires impliqués dans les C.I.V.

Conduite des cultures

• *Essais de plein champ*

Les diverses variétés ont été cultivées au cours d'une succession de campagnes céréalières dans le cadre du programme d'adaptation des céréales aux zones arides conduit par le laboratoire de physiologie végétale de l'INRAT. Ces essais servent essentiellement à des déterminations du rendement en grains et de ces composantes. Les résultats sont relatifs aux campagnes 94/95 et 95/96. les pluviométries mensuelles relatives à ces deux campagnes sont données à la **figure 1**.

Figure 1. Variation de la pluviométrie mensuelle dans les sites du Kef et du Koudiat au cours des campagnes céréalières 94/95 et 95/96.



Au cours de la campagne céréalière 94/95, les essais ont reçu dans le site de Koudiat une irrigation de 50 mm avant le semis.

Un autre essai comportant 13 variétés de BD semées en lignes de 2 m de long à raison, suivant les disponibilités en semences, d'une à deux lignes / variété, espacées de 0,25 m. Le semis a été réalisé, à la station de l'INRAT à l'Ariana, le 23/12/96 pour JK, le 1/3/97 pour Villemur et le 2/12/96 pour le reste des variétés. Les plants ont été utilisés pour des mesures, au stade montaison (Zadoks,49) de l'évolution de la TR% en fonction du dessèchement foliaire et de l'intégrité cellulaire.

• *Essais en milieu contrôlé*

Ces essais ont été utilisés pour des mesures aux stades jeunes (coléoptile et 3 feuilles). Ils ont été conduits en chambre de culture sous une intensité lumineuse de 150 µ moles m-2 s -1 et une photopériode de 12 heures. La température ambiante est de 25°C environ. L'humidité relative a été maintenue à 50 % grâce à un humidificateur à déclenchement automatique.

Les semis ont été échelonnés, suivant les besoins de l'expérimentation, à partir de décembre 1996. Ils ont été réalisés dans des pots en plastique à raison de 5 graines/pot. Chaque pot contenait 2,5 Kg de sol sec. Celui-ci a été maintenu, suivant les besoins, soit à 70 % de la R.E.U., soit à 20 % de la R.E.U.

Au stade 3 feuilles, nous avons déterminé le ψh foliaire de base et à 10h., la fréquence et l'indice stomatique, l'évolution du dessèchement foliaire en fonction du temps et l'intégrité cellulaire. Au stade coléoptile (Zadok, 11) nous avons déterminé uniquement les deux derniers paramètres.

Méthodes

L'intégrité cellulaire a été réalisée selon la technique proposée par Blum (1983) et modifiée dans le cas des prélèvements au stade coléoptile (carrés de limbes au lieu de disques : résultats du premier rapport de l'ARC). Les résultats sont exprimés en pourcentages de dommage :

CL

$$P.I\,(a) = \left(1 - \frac{\text{------}}{CT}\right) \times 100 \qquad (1)$$

$$P.I\,(r) = \frac{PI\,(a)\ TR}{PI\,(a)\ Te} \times 100 \qquad (2)$$

$$P.D. = 100 - P.I\,(r) \qquad (3)$$

P.I (a) = pourcentage d'intégrité absolue.

P.I (r) = pourcentage d'intégrité relative.

TR = traitement.

Te = témoin.

Le potentiel hydrique foliaire a été mesuré par une chambre de pression pms. La teneur relative en eau a été évaluée selon la formule : TR% = PF - PS / PT - PS.

L'évolution de la teneur relative en eau en fonction du dessèchement foliaire a été réalisée selon la technique proposée par Vieira Da Silva (1967).

RÉSULTATS

Essai au champ

• *Variation des composantes du rendement en grains*

Les résultats ne montrent aucune différence significative de l'effet variété au cours de la campagne céréalière 95/96 sur le nombre de plants/m^2 (PL/m^2), le nombre de talles/ m^2 (Tl/m^2) et le nombre d'épis/m^2 (Ep/m^2) : **tableau 1.**

Par contre, un effet significatif de la variété a été observé pour la durée en jours depuis la levée jusqu'à l'épiaison (L-Ep). Les épiaisons les plus tardives ont été enregistrées pour les variétés tunisiennes relativement anciennes Chili et Inrat 69 et les deux variétés françaises Duriac et Villemur.

Tableau.1. Variation des composantes du rendement en grains dans une population de BD dans la région de Bou Salem (semi-aride supérieur de la Tunisie (campagne 95/96).

Variété	Pl/m^2	Tl/m^2	Ep/m^2	L-Ep
Chili	249	251	337	132
Inrat 69	211	323	318	125
Maghrébi	226	342	323	96
Ben Bachir	213	373	338	109
Razzak	203	355	313	110
Karim	220	289	273	105
Khiar	236	295	271	105
Om Rabiaa 3	218	298	283	112
Duriac*	237	343	293	125
Villemur*	196	339	325	125
ddl (V)**	24	24	24	24
ppds (1%)	NS	NS	NS	6,84
CV%	9,8	15,5	15,1	1,8

* *Variétés françaises*

** *Analyse statistique de tout l'essai*

• *Variation du rendement en grains*

Les résultats (**Figure 2**) n'ont pas permis de déceler des variations significatives entre les variétés au cours de la campagne 94/95. Le coefficient de variation était d'ailleurs anormalement élevé. Au cours de 95/96 la plus productive parmi les variétés tunisiennes s'avère Om Rabiaa 3. La plus productive de toutes étant, en moyenne, Villemur. Celle-ci conserve une nette supériorité par rapport à Duriac malgré les ressemblances des caractéristiques des composantes du rendement des deux variétés. La supériorité de villemur est conservée même en année relativement plus sèche (1995).

• *Les échanges gazeux*

Ils ont été déterminés pour Duriac, Razzak, Karim et Khiar respectivement aux stades début épiaison (Zadok ; 49), et stade laiteux pour les trois autres (Zadok ; 71). Les mesures en quatre répétitions ont été réalisées entre 11h00 et 13h00. Les grandes variations d'ensoleillement ont entraîné des variations importantes des résultats qui restent malgré tout exploitable (**Tableau 3**).

Les résultats montrent essentiellement que les variétés à cycle long (cas de Duriac) conservent tardivement une activité physiologique, en moyenne, plus intense. Ceci les expose plus aux sécheresses de fin de cycle (**Tableau 3**).

Figure 2. Variation du rendement en grains au cours de deux années (95 et 96) chez quelques variétés de blé dur.

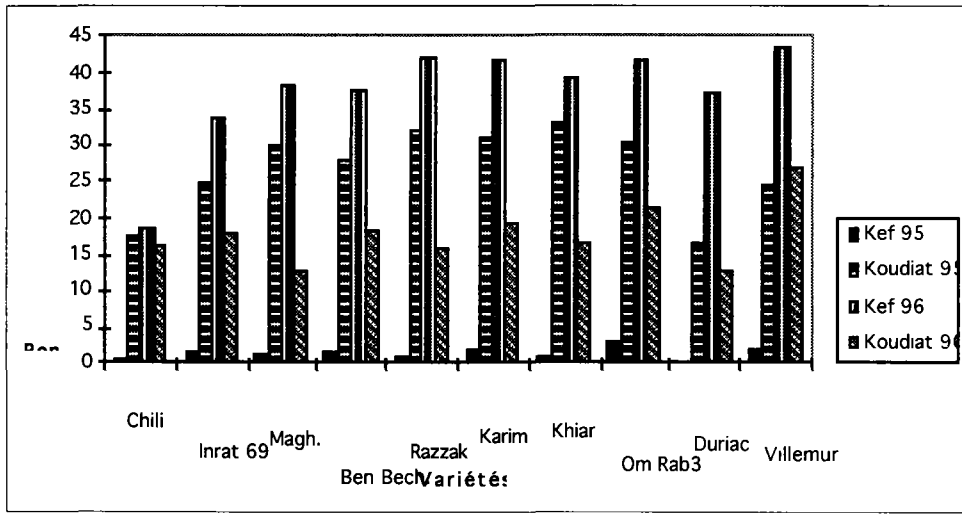


Tableau 2 : Analyse de variance relative aux variations du rendement en grains (Qx.Ha-1).

	Koudiat		Kef	
	94/95	95/96	94/95	95/96
ddl (total)	74	74	74	74
ddl (V)	24	24	24	24
F	3,77	5,28	0,92	6,87
PPDS (1%)	13,36	14,01	NS	16,29
CV%	14,70	21,56	79,00	11,50

Tableau 3 : Variation des échanges gazeux et de l'ensoleillement chez les variétés de blé dur : Duriac, Razzak, Karim et Khiar Bou Salem (semi-aride supérieur de la Tunisie, campagne 95/96).

	Variété			
	Duriac	**Razzak**	**Karim**	**khiar**
Q (µ mol.m-2.s-1)	748	806	664	882
ψh (Mpa)	-1,67	-1,87	-1,86	-19,0
P (µ mol.m-2.s-1)	11,5	9,8	9,7	12,7
T (m mol.m-2.s-1)	2,7	2,3	2,2	2,3
Gs (mol.m-2.s-1)	0,6	0,4	0,3	0,4

Paramètres précoces de sélection pour la résistance à la sécheresse

Ces mesures ont été réalisées pour un choix des paramètres les plus efficients pouvant induire une pression suffisante pour départager un germoplasme donné. Des comparaisons entre les stades précoces et plus tardifs seront réalisés. Des approches avec les résultats de plein champ seront de même nécessaires.

- *Paramètres réalisés au stade de trois feuilles*

- Potentiel hydrique de base et à 10h

Les résultats relatifs à ces mesures montrent des effets significatifs de la variété, du traitement, du temps et de l'interaction temps x variété. (**Tableau 4**).

Nous notons essentiellement une baisse relativement importante du potentiel hydrique foliaire mesuré à 10 h (soit après 2 h d'éclairement) chez les variétés : Cham 1, JK1, JK2 et Karim. Les écarts sont surtout importants quand il s'agit du potentiel hydrique de base. Ceci peut dénoter une capacité plus grande d'extraire l'eau du sol chez ces variétés.

- Indice et fréquence stomatique

Les résultats montrent surtout des différences importantes et significatives entre la face supérieure et inférieure (**Figure 3**). La première étant plus riche en stomates que la seconde. Ces résultats confirment nos résultats antérieurs (Ben Salem, 1988). L'effet de la variété est aussi significatif. La face supérieure de JK1, JK2, Duriac et Villemur étant plus riche en stomates.

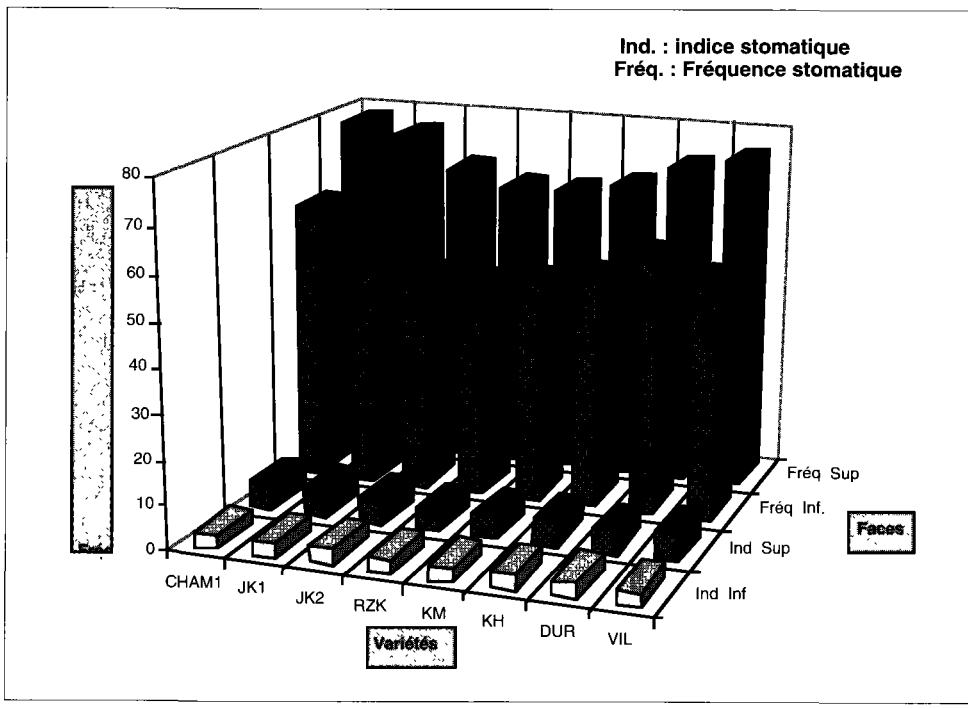
Tableau.4 : Variation du potentiel hydrique foliaire (ψh; Mpa) de base et à 10h. chez huit variétés de BD en fonction de deux traitements, 70 % R.E.U. (Témoin) et 20 % R.E.U. (STR).

Variété	ψhB (Mpa)		$\psi h1Oh$ (Mpa)	
	Témoin	Stressé (STR)	Témoin	Stressé (STR)
Cham 1	- 0,51	- 2,38	- 0,90	- 2,50
JK 1	- 0,63	- 2,40	- 0,71	- 2,55
JK 2	- 0,61	- 2,55	- 0,80	- 2,93
Razzak	- 0,60	- 1,78	- 1,40	-2,10
Karim	- 0,55	- 2,11	- 1,23	-2,16
khiar	- 0,53	- 1,50	- 1,10	-2,20
Duriac	-0,43	- 1,60	- 0,66	-2,10
Villemur	- 0,43	- 1,56	-1,03	-2,03

ppds V	(1%)	3,64
ppds Tps	(1%)	1,82
ppds Tr.	(1%)	1,82
ppds VxTr	(1%)	5,14

Figure 3. Variation de l'indice et de la fréquence stomatiques en fonction des variétés et des faces.

- Stade 3 à 4 feuilles



- *Dessèchement foliaire en fonction du temps.*

. Stade coléoptile (chambre de culture)

L'examen de la **figure 4** montre des chutes significatives et plus grandes de TR chez les deux variétés **Razzak et Duriac.** Les différences sont surtout importantes au niveau de la phase de transpiration cuticulaire.

La variété Villemur qui a montré un comportement divergent au champ par rapport à Duriac, conserve des TR relativement plus élevées durant cette même phase.

. Stade de trois feuilles (chambre de culture)

Les résultats (**Figure 5**) montrent, dans ce cas aussi, un comportement divergent de **Duriac et de JK1** par rapport au reste des variétés. Villemur se classe toujours parmi celles qui conservent des TR élevées en fonction du dessèchement foliaire. **Son comportement divergent par rapport à Duriac est confirmé, aussi, au cours de ce stade.** Nous avons, toutefois, enregistré un renversement du comportement de Razzak.

. Stade montaison (champ)

Les faits saillants qui ressortent de l'examen de la **figure 6** se résument en ce qui suit :

- Même comportement de Duriac qui conserve un comportement divergent par rapport à Villemeur.
- En moyenne une corrélation du comportement variétal entre le stade coléoptile et montaison (sauf le cas de razzak pour lequel nous avons enregistré un renversement de comportement entre les stades coléoptile d'une part et 3 feuilles, montaison d'autre part.

Figure 4. Variation de la teneur relative en eau (Log TR%) en fonction des variétés et du temps - Stade coléoptile.

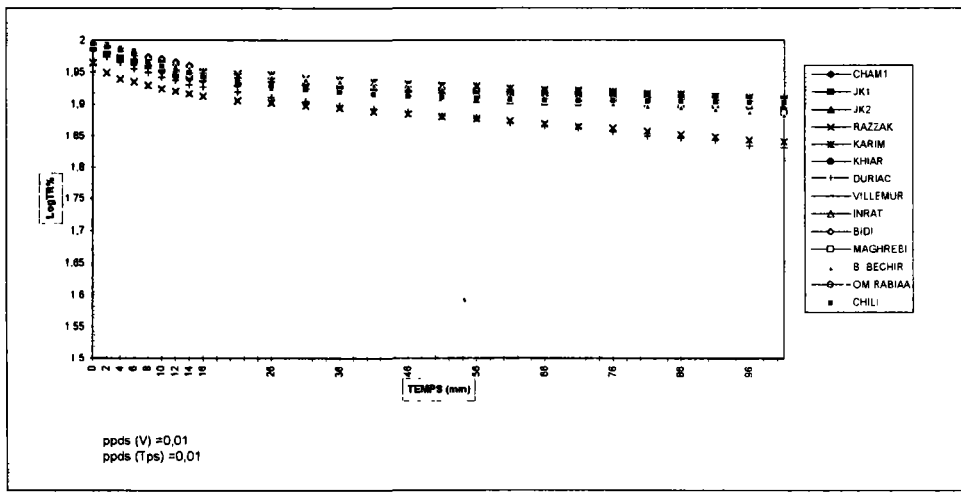


Figure 5. Variation de la teneur relative en eau (Log TR%) en fonction des variétés et du temps - Stade 3 à 4 feuilles.

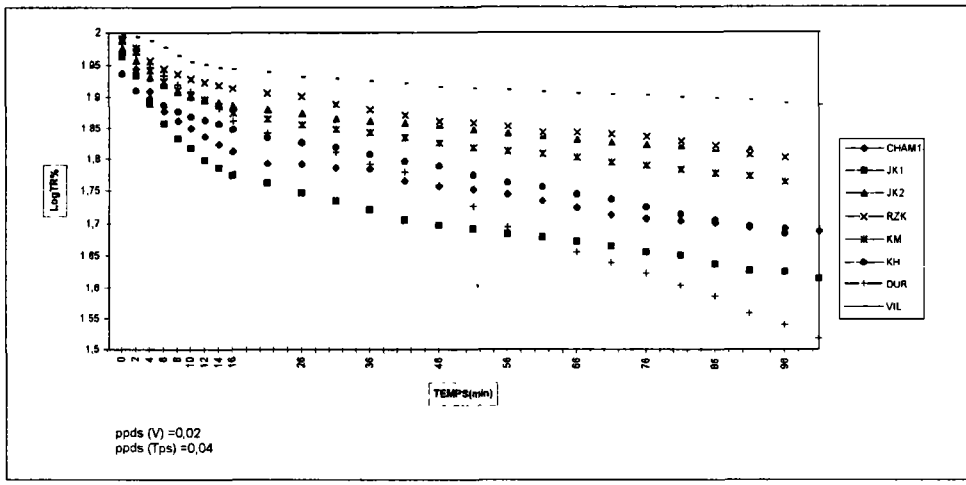
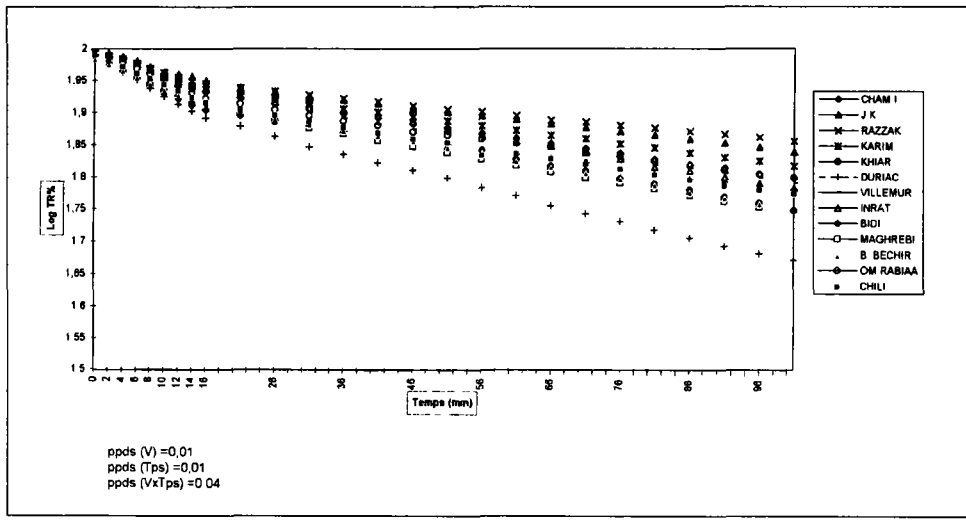


Figure 6. Variation de la teneur relative en eau (Log TR%) en fonction des variétés et du temps - Stade montaison.



- *Intégrité cellulaire*

Les résultats (**Tableau 5**) montrent en moyenne une dispersion des variétés en deux classes : les variétés tunisiennes ou d'Afrique du nord et les deux variété françaises, Duriac et Villemur, qui montrent dans tous les cas une sensibilité plus grande de l'intégrité cellulaire vis-à-vis des deux contraintes appliquées. Ce comportement se répète pour les trois stades de mesure. Cette divergence est probablement due à l'effet de l'itinéraire de sélection, conditionné par l'effet du climat.

Par ailleurs, les variétés Villemur et Duriac conservent le même classement, quel que soit le stade de développement. Par contre les PD sont éq uivalents d'un stade à l'autre.

Tableau 5 : Variation des PD sous l'effet d'un choc osmotique par PEG 6000 (ψs= - 3,2 MPa) et d'un choc calorique (T=50°C), en fonction de la variété et du stade de développement.

	PEG 6000 (ψs= - 3,2 Mpa)			(T=50°C)		
Variété	Coléoptile	3F	Montaison	Coléoptile	3F	Montaison
Cham 1	20,05	18,59	19,71	52,85	73,95	53,03
JK1	18,02	20,38		54,48	59,29	
JK2	14,49	17,45	16,72	51,45	76,36	49,78
Chili	22,76		20,11	59,28		56,30
Inrat 69	25,57		24,86	67,38		61,50
Maghrébi 72	21,91		19,21	55,79		54,93
Ben Bachir	25,02		17,65	63,45		54,61
Razzak	14,77	16,85	15,87	47,63	50,55	40,56
Karim	18,89	22,37	18,24	53,55	47,41	50,92
Khiar	18,23	19,91	17,79	52,31	76,08	51,49
Om Rabiaa 3	16,20		16,49	55,60		48,13
Duriac	55,74*	55,30*	46,23*	77,45*	84,78*	75,29*
Villemur	53,45*	48,08*	45,70*	73,06*	83,84*	72,37*
Moyenne	24,64	27,36	22,90	58,01	69,03	55,54
ppds V (1%)	15,57	7,56	7,10	16,06	19,56	10,55

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Un paramètre de sélection doit être simple à mesurer, reproductible d'un stade à l'autre et doit présenter, autant que possible, une corrélation avec la production en grains de la variété. Nos résultats sont ainsi comparés par rapport au comportement du matériel étudié en conditions contrôlées, semi-contrôlées et en plein champ.

Les mesures des échanges gazeux ont confirmé l'efficience de l'utilisation de la précocité d'épiaison comme critère de sélection pour améliorer les productions dans les zones sèches.

Toutefois, ce résultat peut présenter un risque en cas de pluviosités tardives.

Par ailleurs, les critères utilisés, en conditions contrôlées, au niveau du stade de trois feuilles ont montré la possibilité de leur utilisation pour mettre en évidence des différences variétales. Ainsi, nous avons confirmé et vérifié (Ben Salem, 1988) essentiellement un effet face et un effet variété significatifs concernant la densité et la fréquence somatique. La face supérieure étant plus riche, en stomates, que la face inférieure. Nous avons démontré aussi des différences de ψh foliaire, de base et mesurés après deux heures d'éclairement. Les différences ont été plus grandes chez certaines variétés (cham1, JK1 et JK2). Ceci peut dénoter une capacité plus grande d'extraire l'eau du sol et des potentialités plus importantes d'ajustement osmotique. Néanmoins, ces critères sont soumis surtout en conditions de plein champ à un effet très significatif de l'environnement. Ceci minimise l'importance de leur utilisation comme critères de sélection fiables pour améliorer la résistance à la sécheresse d'un matériel végétal donné.

Les deux critères (PD et dessèchement de feuilles excisées) ont permis de classer les variétés étudiées en deux groupes.

Le premier a permis une classification suivant l'origine géographique en relation probablement avec l'itinéraire de sélection. Ainsi, les deux variétés françaises Duriac et villemur ont présenté

quel que soit le stade une intégrité cellulaire plus sensible aux effets des contraintes hydriques (PEG) et calorique (50°C).

Le deuxième critère a permis de départager le comportement de ces deux variétés. Duriac présentant dans tous les cas une transpiration cuticulaire plus intense que Villemur. Ce résultat semble être bien relié au comportement des deux variétés en plein champ. En effet, malgré une grande ressemblance phénotypique (port végétal, composantes du rendement et cycle de développement) Villemur a présenté une meilleure production en grains au cours d'une année exceptionnellement sèche (94/95) et exceptionnellement humide (95/96). Ce caractère a été utilisé efficacement par Vieira Da Silva (1967) pour classer des variétés de coton selon leur sensibilité à la sécheresse.

Ces deux caractères offrent plusieurs avantages : ils sont simples à mesurer, moins dépendants de l'effet de l'environnement (transpiration cuticulaire). Ils présentent aussi l'avantage d'un jugement quasi stable de la variété en fonction du stade de développement. Les simplifications réalisées concernant le premier critère (2° rapport de l'ARC) permettent de les utiliser efficacement comme paramètres de sélection précoce (stade coléoptile).

Le deuxième critère (moins rapide sur le plan de l'exécution) peut être amélioré par le choix de deux points représentatifs de l'évolution de la transpiration cuticulaire et servant au calcul d'un taux de transpiration relatif cuticulaire.

Bibliographie

1. BEN SALEM, M., DAALOUL A., AYADI A. 1995. Le Blé dur en Tunisie. Options méditerranéennes Série A: Séminaires Méditérranéens. n° 22.
2. BEN SALEM M. 1988. Étude comparative de la résistance à la sécheresse de quelques variétés de blé. Doc. d'état ès sciences.Univ.Paris VII-centre de Jussieu.379p.
3. BLUM A. 1983. Genetic and hysiological relationships in plant breeding for drought resistance Agri. Water Management, 7; 195-505.
4. DEMARLY Y., SIBI M. 1989. Amélioration des plantes et Biotechnologies. Sciences en marche. Ed. John Libbey EUROTEX. AUPELF.
5. ROGNON P., 1996. Sécheresse et aridité: leur impact sur la désertification au Maghreb. Sécheresse 7 : 287-297.
6. SRIVASTAVA J.P. 1984. Durum wheat: its world status and potential in the middle East and North Africa. Rachis, 3(1): 1-9.
7. VIEIRA DA SILVA. 1967. Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse dans le genre Gossypium. Transpiration de feuilles détachées et notion d'un indice de contrôle de la transpiration. Cot. Fib. Trop., Vol. XXII, Fasc. 2; 197-204.

C9 : Application de l'haplodiploïdisation par androgenèse *in vitro* pour l'amélioration de la tolérance aux basses températures chez le riz *(Oryza sativa L.)*

AMSSA M.[1], BOUHARMONT J.[2]

[1] Laboratoire des Biotechnologies Végétales. Fac. des Sc. Meknès. Maroc. [2] Laboratoire de Cytogénétique. Univ. Catholique de Louvain. Croix du Sud 5. Belgique.

L'objectif de cette recherche est la sélection de mutations induites par la culture *in vitro* de cellules haploïdes de riz, pour l'amélioration de la tolérance des plantes aux basses températures. En effet, la culture de cellules est une source importante de variation, que ces cellules proviennent de tissus somatiques (variation somaclonale) ou de microspores haploïdes (variation gamétoclonale). L'utilisation de mutants permet de corriger ponctuellement une

variété déjà sélectionnée, la sélection *in vitro* est utile pour des mutations rares, parce qu'elle s'applique à un grand nombre de cellules, et l'utilisation des cellules haploïdes évite la dominance et conduit à l'isolement de mutants récessifs aussi bien que dominants. La première étape a été un test d'aptitude à la culture d'anthères (induction de cals et production de plantes vertes à partir des microspores). Deux variétés importantes au Maroc ont été choisies pour les expériences. Le niveau de ploïdie des plantes régénérées à partir de cals androgénétiques est variable. La fréquence des haploïdes est la plus élevée pour les anthères prélevées au début du stade microspore uninucléée. La pression de sélection est appliquée soit au moment de l'induction des cals, par culture d'anthères à 13°C, soit par culture à basse température, de cals propagés pendant 40 jours à 25°C. Dans le second cas, les cals sont maintenus pendant 6 mois à 13°C ou pendant 24 à 36 jours à 4°C. Dans ces conditions, les cals cessent de croître et, après un certain temps, la plupart dégénèrent. Quelques-uns seulement poursuivent leur développement. Des plantes ont été régénérées à partir de certains cals survivants. Elles sont toutes diploïdes, elles proviennent des deux variétés et des deux modes de sélection. L'amélioration de la tolérance au froid est évaluée pendant la végétation (fluorescence de la chlorophylle, perte d'électrolytes et taux de survie), et à la floraison (germination du pollen). Trois lignées sont améliorées pour cette tolérance et celle-ci est parfois transmise par voie sexuelle.

C10 : Effets du NaCl et du polyéthylène glycol sur des cals de variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) différant par leurs niveaux de résistance aux stress hydrique et salin

ALMANSOURI M., BAJJI M., KINET J.-M., LUTTS S.
Université catholique de Louvain, Laboratoire de Cytogénétique, Pl. Croix-du-Sud 5, Bte: 13, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique

Le blé est l'une des principales ressources alimentaires pour l'homme. Intensivement cultivé dans des zones arides et semi-arides, il y est fréquemment confronté au problème de salinité. D'après la F.A.O. et l'U.N.E.S.C.O., 10 millions d'hectares de terrains irrigués sont abandonnés chaque année en raison de l'accroissement de leur contenu en sel. Le NaCl induit deux stress : un stress ionique lié à la toxicité des ions Na^+ et Cl^- et un stress hydrique lié à la diminution du potentiel hydrique du sol. Ainsi, le processus de salinisation, à court ou à long terme, engendre un processus de sécheresse et on ne peut concevoir une étude complète des effets de la salinité sans tenir compte de la composante hydrique de ce stress. L'étude comparative du comportement d'un végétal en présence de sel d'une part et en présence d'agents osmotiques tels que le mannitol, le sorbitol ou le polyéthylène glycol (PEG) d'autre part permet de faire la distinction entre les effets de la composante ionique et ceux de la composante osmotique du stress salin. Cependant, malgré l'abondance des travaux se rapportant à ce sujet, la relation entre résistance au stress hydrique et résistance au stress salin n'a pas été clairement établie, ni au niveau cellulaire ni au niveau de la plante entière. Pour une meilleure discrimination entre les effets des deux composantes du stress salin au niveau cellulaire, nous avons comparé le comportement *in vitro* de cals de blé dur en présence de NaCl ou de PEG-6000. Les cals sont issus d'embryons zygotiques matures provenant de 3 variétés de blé dur : Omrabi 5, résistante à la sécheresse ; Belikh, résistante à la salinité et Cando, sensible à la salinité. Ils ont été soumis au stress pendant un mois sur milieu LS modifié contenant du NaCl ou du PEG-6000 à des concentrations iso-osmotiques correspondant à des potentiels osmotiques de 0 ; -0,5 ; -1,0 et -1,5 MPa. La croissance des cals d'Omrabi 5 (résistante à la sécheresse) est la moins affectée

par le PEG tandis qu'en présence de NaCl, la croissance des cals de Cando (sensible à la salinité) est la plus faible. La teneur en eau des cals est plus fortement réduite par le stress osmotique que par le stress salin, néanmoins ce paramètre est affecté de la même manière chez les trois variétés. Un test de viabilité basé sur la réduction des sels de tetrazolium en formazan a mis en évidence le meilleur comportement des cellules des cals de Belikh (résistante à la salinité), que ce soit en présence d'un stress osmotique ou d'un stress salin. Une analyse minérale par spectrophotométrie de flamme en émission est actuellement en cours. Son but est de définir dans quelle mesure les deux stress affectent la teneur des cals en cations, essentiellement en Na^+ et en K^+. Les résultats seront présentés.

C11 : Biotechnologie et protection intégrée à l'égard des virus d'une culture sèche méditerranéenne : le Pois chiche

AZMEH M.F.[1], MAKKOUK K.[2], KAWAS H.[1]

[1]Faculté d'Agronomie, Université de Damas, B.P. 30621, DAMAS. [2]ICARDA, B.P. 5466, Alep SYRIE.

Parmi les légumineuses alimentaires, le Pois chiche (*Cicer arietinum L.*) occupe une place très importante dans les régions s'étendant de la Méditerranée à l'Inde. Si le problème pathologique majeur de cette culture reste l'Anthracnose causé par *Ascochyta rabiei*, elle est attaquée aussi par une trentaine de virus différents causant des dommages variables.

Notre étude a permis d'établir pour la Syrie, l'inventaire des virus du Pois chiche dont celui qui provoque le syndrome de rabougrissement (*Chickpea Stunt*). Il s'agit du virus de la jaunisse de la betterave (BWYV, *Luteovirus*). Le taux d'infection révélé par ELISA atteint son maximum dans la vallée du Ghab (36 %). Le virus de la mosaïque de la luzerne est également répandu.

En plus, la présence du virus de la jaunisse nécrotique de la fève (FbNYV) a été confirmée sur le Pois chiche. Les deux premiers virus ont été purifiés et les anti-sera correspondant obtenus. Ils ont permis un taux de détection expérimentale élevé dans les plantes et les insectes vecteurs.

L'épidémiologie de la souche locale du BWYV a été étudiée. La pathogénicité testée sur 23 espèces végétales appartenant à 6 familles a montré un large spectre de plantes-hôtes comprenant 13 légumineuses cultivées et sauvages, exhibant des symptômes de jaunisse plus ou moins marqués. Cinq hôtes étaient asymptomatiques. Les insectes vecteurs du même virus ont été identifiés. Dans des essais d'inoculation contrôlée, les pucerons les plus efficaces ont été : *Myzus persicae*, *Acryrthosiphon pisum* et *Aphis craccivora*. Nous avons prouvé en outre, que les principaux virus concernés ne sont pas transmis par la semence du Pois chiche, malgré les symptômes éventuels sur celle-ci. Par contre, plusieurs mauvaises herbes accompagnant la culture peuvent constituer un réservoir du virus ou/et héberger des insectes vecteurs. La résistance au BWYV de 254 génotypes comprenant 8 espèces sauvages de *Cicer* a été testée. Soixante-huit accessions ont pu être sélectionnées pour leur tolérance et mises à disposition du programme d'amélioration variétale.

C12 : Effets du stress salin sur la croissance et l'accumulation de solutés inorganiques et organiques chez *Atriplex halimus* L. : étude au niveau des cals cultivés *in vitro* et de plantes en hydroculture

BAJJI M., LUTTS S., KINET J.-M.
Université catholique de Louvain, Laboratoire de Cytogénétique, Pl. Croix-du-Sud 5, Bte : 13, B-1348 Louvain-la-Neuve (Belgique)

Atriplex halimus L. constitue une source importante de fourrage pour les ovins en régions aride et semi-aride, contribuant ainsi à l'alimentation des populations. C'est une plante bien adaptée à l'aridité et permet donc de valoriser les sols marginaux inaptes à la culture traditionnelle. Mais, la mauvaise gestion des parcours des troupeaux a conduit en bien des endroits à la dégradation des Atriplexaies nécessitant la mise en œuvre d'une politique de repeuplement avec des génotypes, à haute production de biomasse et à bonne palatabilité, résistants à la salinité. C'est dans ce cadre que nous avons entrepris une étude dont le but est de définir les mécanismes de résistance à la salinité. La culture *in vitro* de tissus indifférenciés et la culture hydroponique de plantes permettent une approche à la fois aux niveaux cellulaire et de la plante entière. Le stress a été appliqué de façon brutale en utilisant différentes concentrations de NaCl (0, 150, 300, 450 et 600 mM). L'étude au niveau cellulaire a été menée sur des cals initiés à partir de racines ou de feuilles de jeunes plantules et soumis au stress salin durant 30 jours. À 150 mM, le NaCl a un effet bénéfique sur la croissance des cals racinaires. Lorsque la concentration en sel augmente, la croissance des cals est réduite. D'autre part, les résultats obtenus indiquent qu'à l'issue de la période de stress, les concentrations en solutés organiques et inorganiques sont affectées, mais de manière variable selon la nature du soluté considéré. L'étude au niveau de la plante entière a été réalisée sur des individus qui, à l'âge d'un mois, ont été transférés en culture hydroponique durant 15 jours avant d'être soumis au stress salin durant 10 jours. Les analyses ont été effectuées séparément sur les racines et les feuilles, à l'issue de la période de stress. Mise à part une stimulation de la croissance de la partie aérienne en présence de NaCl à 150 mM, la croissance des plantes est d'autant plus réduite que la concentration en sel du milieu augmente. Les teneurs en solutés organiques et inorganiques sont influencées par le stress, leurs variations dépendent de la nature du soluté et de l'organe considéré.

En conclusion, chez *Atriplex halimus* L., les effets de la salinité sur les deux types de cals sont globalement comparables mais certaines différences d'ordre quantitatifs sont notées pour certains paramètres précis, surtout aux plus fortes doses. Ces effets sont, par contre, différents aux niveaux racinaire et foliaire de la plante entière. Les cals n'ont pas le même comportement que les organes dont ils proviennent et la composante cellulaire ne semble donc pas déterminante.

C13 : Sélection *in vitro* et caractérisation de lignées de blé dur (*Triticum durum* Desf.) résistantes à la sécheresse

BAJJI M., ALMANSOURI M., BOUHARMONT J., KINET J.-M., LUTTS S.
Université catholique de Louvain, Laboratoire de Cytogénétique, Pl. Croix-du-Sud 5, Bte : 13, B-1348 Louvain-la-Neuve (Belgique)

À la une des médias lors des catastrophes uniquement, la sécheresse représente cependant une contrainte permanente pour la production agricole dans plusieurs pays en voie de

développement et cause occasionnellement des pertes dans les pays développés. En Afrique du Nord, le déficit hydrique est considéré comme étant la contrainte climatique la plus importante. En effet, la production de plus de 75 % des 94 millions d'hectares cultivés est tributaire essentiellement des précipitations, faibles et irrégulières. Parmi les plantes cultivées pour l'alimentation de l'homme, le blé occupe actuellement la première place en ce qui concerne les surfaces cultivées, et la deuxième, après le riz, pour la quantité d'énergie qu'il procure. Plus de 90 % des surfaces productrices du blé dur dans le monde sont localisées en Méditerranée. Les conditions de culture y sont idéales pour la production de grains de haute qualité qui sont utilisés dans de multiples produits constituant la base de l'alimentation en bassin méditerranéen. Au Maroc, le blé dur entre dans la préparation du pain principalement, mais aussi du couscous, des pâtes alimentaires et d'autres produits traditionnels (Harcha, Crêpes, Bouillies, etc.). L'amélioration de la productivité du blé dur par la création de nouvelles variétés plus performantes et plus résistantes à la sécheresse est donc essentielle. La variation somaclonale liée à la culture *in vitro* constitue en ce domaine un outil novateur, d'autant plus intéressant pour l'améliorateur qu'elle s'applique à un grand nombre de cellules et surtout, qu'elle intervient concomitamment à l'application de pressions sélectives qui peuvent trier, voire même orienter les variations. L'objectif de notre travail est l'amélioration de la résistance à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) en utilisant la variation somaclonale, associée à la sélection *in vitro* , comme source de variation génétique. Trois variétés (Selbera, Sebou et Kyperounda), présentant la meilleure aptitude à la culture *in vitro*, ont été retenues pour la sélection. Trois méthodes de sélection ont été appliquées aux cals en présence de polyéthylène glycol 10 000 (PEG) : (1) une sélection de longue durée (6 mois) durant la phase de callogenèse et (2) durant la phase de régénération (2 mois) en présence de 25 % de PEG, et (3) une sélection de courte durée (1 mois) en milieu liquide (35 % de PEG) durant la phase de callogenèse. Sur les 30 plantules R_0 régénérées à partir des cals survivants, 13 ont montré une amélioration de la résistance par rapport aux variétés d'origine, sur la base de mesures de la fluorescence de la chlorophylle et des pertes d'électrolytes effectuées sur les feuilles soumises à un stress hydrique. L'autofécondation de ces plantes R_0 a donné au total 40 plantes R_1 dont 18 présentent une amélioration du comportement vis-à-vis du stress. Ensuite, 69 parmi 133 plantes R_2 ont été retenues sur base d'une moindre perte d'électrolytes comparées aux variétés de départ. Quatre paramètres d'importance capitale pour la résistance à la sécheresse ont été utilisés pour la poursuite de la caractérisation et le criblage des lignées aux générations R_3 et R_4, à savoir la fluorescence de la chlorophylle, la stabilité membranaire, la résistance stomatique et la précocité. L'amélioration liée à ces 4 paramètres s'est maintenue chez les 2 lignées Sel 36 et Kyp 19 issues respectivement des variétés Selbera et Kyperounda. Des améliorations de 3, 2 et 1 paramètres sont détectées chez 19, 27 et 8 lignées respectivement. Enfin, 2 lignées ne présentent plus d'amélioration par rapport aux variétés de départ. En R_4, Les 2 lignées Sel 36 et Kyp 19 ont été évaluées, sur base des mêmes paramètres, comparativement aux variétés parentales. Tous les tests, mis à part celui de la stabilité membranaire, ont révélé que leur résistance au stress hydrique est toujours supérieure à celle des variétés d'origine.

En conclusion, différentes lignées somaclonales ayant montré une amélioration de la résistance à la sécheresse ont été sélectionnées. Les mécanismes impliqués dans cette amélioration varient d'une variété sur l'autre et sont encore détectables à la génération R_4. Une application du stress hydrique au niveau de la plante entière est nécessaire pour une étude plus approfondie aux niveaux morphologique, biochimique, physiologique et phénologique.

C14 : Effet d'un stress hydrique sur l'accumulation de proline, de chlorophylle et des ARNm qui codent pour la glutamine synthétase chez des variétés de blé dur (*Triticum durum*)

BELABED A., SADKI K., HTAHRI E.
Université Mohamed Premier, Faculté des Sciences, Département de Biologie. Laboratoire d'Amélioration et de Production Végétales, B.P. 524 - 60.000 Oujda - Maroc

L'application d'un stress hydrique prolongé provoque une augmentation significative de la teneur en proline foliaire chez trois variétés de blé dur (TASSAOUT, COCORIT et ACSAD 65). La reprise de l'irrigation après 15 jours de stress entraîne une diminution rapide de cet acide aminé. Parallèlement à l'augmentation de la teneur en proline foliaire, une diminution de la teneur en chlorophylles a été observée chez les plantes ayant subi un stress hydrique ou osmotique par le PEG 6000. Ce qui montre l'étroite relation entre la biosynthèse de la proline et celle de la chlorophylle. Ces deux composés sont en compétition pour leur précurseur commun qui est le glutamate. Le contrôle de l'accumulation de la proline s'effectue également au niveau de l'activité glutamine synthétase (GS), enzyme impliquée avec la glutamate synthase GOGAT dans la biosynthèse du glutamate. En effet cette enzyme voit son activité diminuer sous l'effet d'un stress osmotique.

Par ailleurs, le niveau des transcrits ARNm (A^+) diminue suite a un traitement des plantes par le PEG 6000. Ceci explique en partie la diminution de l'activité GS observée au préalable et montre à quel niveau le stress hydrique peut affecter le métabolisme de la plante et des gènes qui codent pour la GS vraisemblablement impliquée dans la réponse au stress.

C15 : Quelques méthodes traditionnelles simples de lutte contre les attaques de plants en pépinière ou en plantation au Burkina Faso

DA E.S., SARY H.
Centre National de Semences Forestières, 01 B.P. 2682 Ouagadougou 01, Burkina-Faso

Les méthodes chimiques de lutte contre les attaques de plants en pépinière ou en plantation, utilisées de nos jours au Burkina Faso, ne sont pas totalement maîtrisables pour les paysans.

De plus, les produits employés, non seulement ne sont pas à la portée des paysans, du fait de leur coût élevé, mais aussi constituent un réel danger pour la sauvegarde de l'environnement.

Les producteurs du Burkina Faso, pour lutter contre les ennemis des plants en pépinière ou en plantation, font appel à des méthodes traditionnelles mises au point à partir de leur savoir-faire.

Notre étude a consisté à recenser ces méthodes dans le but d'estimer les avantages et les inconvénients qu'elles présentent. Près d'une cinquantaine de méthodes ont été inventoriées parmi lesquelles certaines se sont montrées très efficaces pour lutter contre les attaques d'insectes, de reptiles, de rongeurs, d'animaux et autres champignons pathogènes. C'est le cas d'une plante comme *Azadirachta indica* (Neem) dont l'utilisation permet de limiter sensiblement les dégâts dus aux ennemis des plants.

La présente communication est l'aboutissement d'une enquête menée pendant des années dans plusieurs localités du pays.

La prochaine démarche va consister à comparer les différentes méthodes en vue de sélectionner les plus performantes et de les vulgariser aux producteurs.

C16 : Impact des antiéthylènes, des antigibérellines et des cytokinines dérivées de la diphénylurée sur la régénération de plantes à partir d'embryons immatures de maïs avant et après la sélection *in vitro* sur ABA

DIENG H.[1], COLLIN J.[2], COMEAU A.[3]

[1] Faculté des Sciences et Techniques. Département de Biologie, Université de Nouakchott. B.P. 5026, R.I. Mauritanie. [2] Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation. Département de Phytologie. Université Laval, Québec GIK 7P4, Canada. [3] Centre de Recherche Agriculture et Agro-alimentaire Canada, 2560 Boul. Hochelaga, Ste-Foy, Québec GIV2J3, Canada

Le nombre de plantes régénérées, ayant le caractère recherché et fertile, limite les applications de la sélection *in vitro* à partir des cals d'embryons immatures surtout chez les céréales. La compétence à la régénération dépend en partie de la présence endogène des régulateurs de croissance dont le niveau varie avec l'âge de la plante. Il faut noter d'autre part que la quantité de cal initié et la formation d'embryons somatiques peuvent dépendre de l'environnement gazeux, surtout du niveau de l'éthylène dans les boites de pétri.

Dans le but d'améliorer la régénération, après la sélection *in vitro* de cals résistants à l'ABA, nous avons étudié l'impact de certaines substances sur la morphogenèse *in vitro* en utilisant des embryons et des cals d'embryons immatures de maïs.

Ainsi, vous avons montré que la compétence des cals d'embryons immatures à produire des plantules peut être améliorée en utilisant des antiéthylènes et des antigibbérellines. Le chlorure de cobalt ($CoCl_2$) a été la meilleure substance favorisant la régénération de plantules de maïs à partir des cals d'embryons immatures.

Nous avons également comparé l'influence des doses croissantes de cytokinines dérivées de la diphénylurée sur la régénération des plantules à partir des cals d'embryons immatures de maïs. Le thidiazuron (TDZ), une cytokinine dérivée de la diphénylurée a été efficace pour stimuler la régénération des plantes, mais a diminué l'enracinement des plantes régénérées.

Pour étudier l'impact du TDZ et du $CoCl_2$ sur la régénération avant et après la sélection à l'ABA, nous avons ajouté ces substances dans un milieu de culture en présence ou en absence de l'ABA. Nous concluons que la combinaison TDZ + $CoCl_2$ favorise la régénération surtout si elle est ajoutée dans le milieu précédent la régénération ou dans le milieu de régénération. La combinaison a été moins utile si on l'ajoute avant les deux cycles de sélection. L'ABA comme agent de sélection est peu influencé par la combinaison TDZ + $CoCl_2$.

L'introduction TDZ + $CoCl_2$ au 40^e jour, aux doses choisies, a donné de très bons résultats chez le maïs, avec ou sans ABA. Nous suggérons de combiner le traitement TDZ + $CoCl_2$ avec la sélection *in vitro* à l'ABA.

C17 : Amélioration génétique de la production de l'orge (*Hordeum Vulgare* L.) en zones semi-arides d'Algérie : sélection pour le rendement, la précocité, la biomasse et l'indice de récolte

DJEKOUN A., BOUZERZOUR H.

UFR de génétique et Amélioration des Plantes. Institut des Sciences de la Nature. Université de Constantine, Route Ain El Bey, 25000 Constantine. Algérie

Cette étude menée sur une période de 10 ans et sur 80 lignées fixées et 360 lignées en ségrégation a pour objectif d'étudier les possibilités de sélectionner des génotypes d'orge (*Hordeum vulgare* L.) performants et stables pour les zones semi-arides d'altitude d'Algérie, caractérisées par un climat très instable. Le matériel végétal utilisé comprend des génotypes de races locales, du Moyen Orient, et de l'Europe.

La sélection pour le rendement au niveau de cet étage bioclimatique est confrontée à des interactions G x E très importantes, ayant pour conséquences la réduction du progrès génétique réalisable. Les interactions sont en partie dues à la variabilité du nombre de grains par épis, variabilité causée par le gel tardif. Une stratégie est proposée, pour réduire les effets de ces interactions par une sélection avec adaptation spécifique. Les effets du site de sélection en général et les critères de choix du site les plus favorables à l'identification de génotypes plus adaptés sont aussi discutés.

Suite à la variabilité du rendement des cultivars issus de sélection directe, la sélection indirecte est alors envisagée. Les résultats indiquent que la biomasse et l'indice de récolte peuvent contribuer à l'amélioration et la régularité du rendement, si cette sélection est pratiquée sur du matériel peu variable du point de vue précocité, dont le seuil critique et le témoin standard sont proposés.

Le déterminisme génétique de la biomasse et de l'indice de récolte est étudié. Les résultats montrent qu'il est de nature non additive. Les géniteurs avec une bonne aptitude générale à la combinaison pour ces caractères sont aussi identifiés. Les liaisons de ces deux caractères avec le rendement et entre eux et la nature de leur déterminisme génétique, montrent que l'efficacité de la sélection précoce monocaractère est réduite. Aussi la sélection sur index est proposée comme alternative à appliquer sur du matériel plus âgé, et plus homozygote. Enfin, tenant compte des résultats de cette étude, un schéma de sélection est proposé.

C18 : Réaction des blés marocains (Triticum spp) à l'inoculation par des spores et filtrats de culture de quatre groupes de virulence de *Pyrenophora tritici repentis*

DOUIMI R.[1], JLIBENE M.[2]

[1] Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismaïl, Meknès, Maroc.

[2] Institut National de la Recherche Agronomique, BP 578, Meknès, 50000, Maroc.

La tache bronzée, causée par *Pyrenophora tritici repentis* (stade sexué de *Drechslera tritici repentis*) est une maladie foliaire importante sur le blé, au Maroc. La mise en évidence de

quatre groupes de virulence du champignon et du rôle des toxines dans l'infection, nous a incité à évaluer les variétés marocaines vis-à-vis de ces différents groupes et de leur filtrats de culture.

Quarante-six variétés marocaines de blé (*Triticum aestivum* et *T. durum*) inscrites au catalogue officiel, ont été inoculées par une suspension de spores de quatre groupes de virulence, au stade plantule. La période d'incubation et la surface foliaire nécrosée ont été mesurées. Parmi ces variétés, 12 ont été inoculées à la fois par le champignon et par son filtrat de culture.

Les variétés ont différé significativement dans leur réaction à l'infection. Des variétés à niveau appréciable de résistance aux quatre groupes de virulence ont été identifiées (Kanz, Rajae, Tilila et Karim). La période d'incubation du champignon et la surface foliaire nécrosée étaient indépendantes, cette dernière ayant permis une meilleure discrimination entre les variétés.

Des réactions de chlorose et de nécrose, obtenues après infiltration par les filtrats, ont été fortement corrélées avec la surface foliaire nécrosée obtenue après inoculation par les spores, indiquant que l'infection fait intervenir des substances toxiques. Par contre, les périodes d'incubation du filtrat et du pathogène n'étaient pas corrélées. La possibilité d'utilisation du filtrat de culture dans les travaux de sélection est proposée.

C19 : Hérédité des composantes de la résistance partielle à *Septoria tritici* chez le blé (*Triticum aestivum L*).

EL BOUAMI F.[1], JLIBENE M.[2]

[1] Laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail, BP 4010, 50000 - Meknès, Maroc.

[2] Programme Bour Favorable, Centre Régional de la Recherche Agronomique du Saïs et Moyen Atlas, BP 578, 50000 - Meknès, Maroc.

L'hérédité de quatre composantes de la résistance à *Septoria tritici* : période d'incubation (PI), période de latence (PL), surface foliaire nécrosée (SFN) et densité pycnidiale (DP) a été étudiée. Le test de six générations parent 1, parent 2, F1, F2, BC1 et BC2, de quatre croisements entre génotypes de blé tendre (un sensible et quatre résistants) testées au stade plantule avec deux isolats de *Septoria tritici* a indiqué une simple hérédité Mendelienne de toutes les composantes. La longue période d'incubation (PI) est sous contrôle de deux gènes complémentaires. La longue période de latence (PL) et la faible densité de pycnides (DP) sont contrôlées par un gène dominant. La faible surface foliaire nécrosée (SFN) est contrôlée par un gène dominant ou deux gènes épistasiques selon les génotypes. L'étude des corrélations phénotypiques entre les composantes de la résistance chez les parents et les générations filiales suggère que la PL, SFN et la DP représentent des effets pléiotropiques du même gène, tandis que la PI est indépendante des autres composantes.

C20 : Étude des composantes de la résistance partielle de 16 génotypes de blé (*Triticum aestivum L.*) vis-à-vis de 27 isolats de *Septoria tritici*

EL BOUAMI F.[1], JLIBENE M.[2]

[1] Laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail, BP 4010, 50000 - Meknès, Maroc.

[2] Programme Bour Favorable, Centre Régional de la Recherche Agronomique du Saïs et Moyen Atlas. BP 578, 50000 - Meknès, Maroc.

La période d'incubation (PI), la période de latence (PL), la surface foliaire nécrosée (SFN) et le recouvrement pycnidial (RP) ont été évalués chez seize génotypes de blé tendre inoculés avec vingt-sept isolats de *Septoria tritici*. Des effets génotype, isolat et interaction génotype x isolat ont été observés pour les quatre paramètres, indiquant une interaction différentielle dans le pathosystème *Triticum aestivum-Septoria tritici*. Les génotypes résistants (Nasma*2/14-2, Vee's'/Snb's', Saada et Tegyey) ont eu de longue PI et PL, et des SFN et RP réduits. Le génotype le plus sensible, Nasma, est caractérisé par de courtes PI et PL, des taches nécrotiques larges, coalescentes, et complètement recouvertes de pycnides. Un isolat obtenu à partir d'un blé dur s'est révélé avirulent sur les 16 génotypes de blé tendre.

C21 : Sélection *in vitro* pour la résistance à la fusariose de l'épi chez le blé

EUDES F., COLLIN J., ROUX S., COMEAU A.

Département de Phytologie, Université Laval, G1V 4G6, Québec, Canada, Tél : 1 (418) 656 2395, E-mail : Francois.Eudes@fsaa.ulaval.ca

La fusariose de l'épi chez le blé cause des pertes très importantes dans l'Est du Canada. Les agents responsables sont des champignons du genre *Fusarium* (stade sexué : *Gibberella*). Ils entraînent une perte de rendement et une perte de qualité par l'accumulation d'œstrogènes et de trichothecènes dans les grains. De nombreuses études tendent à montrer que ces trichothecènes, inhibitrices de la synthèse des protéines chez les eucaryotes, sont impliquées dans la pathogenèse bien que parfois les corrélations entre leur concentration et l'importance des symptômes soient faibles. On distingue deux groupes de trichothecènes : les principaux représentants pour le premier groupe sont le déoxynivalenol (DON), l'acetyldéoxynivalenol (ADON) et le nivalenol (NIV); pour le second groupe ce sont la toxine T2, la toxine HT2 et le diacétoxyscirpenol. *In vitro*, nous avons montré que ces métabolites secondaires ont une phytotoxicité très différente : le DON et l'ADON sont les plus toxiques, mais le sont encore moins qu'un filtrat de culture de *Fusarium graminearum*. Un tel filtrat renferme une quantité très importante de métabolites secondaires aux groupements de base parfois très proches de ceux des trichothecènes, mais souvent inconnus. Plusieurs auteurs ont proposé de décomposer la résistance globale à la fusariose en trois composantes, dont une directement lié aux mycotoxines, soit : (1) la résistance à l'infection (pas de résistance génétique connue), (2) la résistance à la propagation du pathogène et (3) la tolérance ou l'aptitude à dégrader les

trichothecènes. L'inoculation de génotypes ayant des sensibilité différente à deux souches de *Gibberella zea*, dont l'une ne produit pas de trichothecènes, nous a permis de confirmer le rôle des mycotoxines dans le développement de la maladie ; mais aussi, de prouver qu'il existe une variabilité génétique pour les résistances de type 2 et de type 3 qui pourraient être utilisées en l'amélioration génétique. Les tests *in vitro* de phytotoxicité de mélanges de trichothecènes permettent de distinguer des génotypes de sensibilités différentes pour la troisième composante de la résistance à la fusariose de l'épi. Les mycotoxines, utilisées en sélection *in vitro* permettent d'éliminer les génotypes de faible résistance de type 3. La méthodologie de sélection *in vitro* est compatible avec les très grandes populations de gamétophytes mâle (microspores) générées par les techniques d'androgenèse. De plus, chaque génotype étant haploïde et représenté par une cellule, toutes les différences génétiques sont exprimées. La sélection *in vitro* des microspores nous permet d'exploiter la variabilité produite par recombinaison génétique.

C22 : Effet de l'application foliaire de IAA et GA_3 et leur interaction sur la croissance du blé (*Triticum durum* Desf. var Leucomilan, AL) en conditions de salinité

GHERROUCHA H.[1], DJEKOUN A.[2]

[1] Laboratoire de Physiologie Végétale, I.S.N. Constantine, Algérie

[2] Laboratoire d'Amélioration des plantes, I.S.N. Constantine, Algérie

Le but de ce travail est de connaître l'effet de l'interaction de l'acide indole acétique (IAA) et de l'acide gibbérelique (GA_3) (200 Ppn) sur le développement, la production et certains caractères physiologiques du blé élevé sous des conditions de salinité (eau de mer diluée à 60 %, 30 %, 10 %) plus le contrôle des résultats obtenus sont les suivants :

1) Une diminution continue du poids frais, du poids sec et de production finale de la plante en fonction de l'augmentation des concentrations du sel pendant le cycle de la plante.

2) Un effet négatif sur le nombre et la surface des feuilles, ainsi que le nombre de tiges.

3) Une augmentation de la teneur en proline en fonction de l'augmentation des concentrations du sel, ce qui veut dire que la plante a une résistance envers la salinité.

4) L'application foliaire et simultanée de phytohormone (IAA, GA_3) entraîne une diminution de l'effet négatif du sel sur le développement.

5) Par ailleurs l'application du GA_3 seule a montré l'effet remarquable sur l'interaction entre les deux hormones.

C23 : Effet du Biobras-6 sur la régénération in *vitro* chez la canne à sucre sous stress hydrique

GONZALES S.[1], DUCREUX G.[2], ERNESTO G.[1], FRANCISCO C.[3]

[1] Lab. De Biotechnologia Vegetal, Dpto. De Biologia Vegetal, Fac de Biologia. Universidad de la Habana, 10400 Cuba.

[2] Université Paris-Sud, Lab. de Morphogenèse Végétale Expérimentale. Bât 360. 91405 ORSAY Cedex, France.

[3] Lab Productor Naturales, Fac. de Quimica, Universidad de la Habana, 10400 Cuba.

La régénération *in vitro* chez la canne à sucre est obtenue à partir de cals cultivés dans les milieux différents supplémentés avec AIA, KIN et Biobras-6. Le Biobras-6 est un analogue de brassinosteroid synthétique qui stimule la régénération et le développement des tiges. Les cals traités avec mannitol (pour les conditions de stress hydrique) ont produit des plantes plus vigoureuses après leur culture dans le milieu avec le Biobras-6.

C24 : Identification et étude de la variabilité des principaux virus du piment en Tunisie

GORSANE F., FAKHFAKH H., MAKNI M., MARRAKCHI M.

Laboratoire de Génétique et de Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences de Tunis. 1060 Tunis. TUNISIE

Les atteintes virales constituent une contrainte sévère sur les cultures maraîchères. Quinze groupes taxonomiques de virus transmis par les insectes, par contact physique ou par le sol ont été identifiés sur le piment et la tomate, considérés parmi les solanacées les plus cultivées. Les virus provoquent des symptômes dont la sévérité dépend de plusieurs facteurs tels que la virulence de la souche virale, l'âge de la plante et son niveau de résistance ainsi que les conditions environnementales. Étant donné les dégâts considérables occasionnés sur les cultures maraîchères, plusieurs stratégies de lutte agissant sur les sources de virus et l'activité des vecteurs ont été adoptées. À côté des moyens de lutte traditionnelle, une stratégie de lutte intégrée pour prévenir les maladies virales a été mise au point par la construction de nouvelles variétés résistantes. Or, le plus souvent, le virus contourne cette résistance et l'apparition de nouvelles souches virales adaptées et plus virulentes rend cette stratégie risquée. C'est pourquoi de nouvelles stratégies basées sur les techniques de génie génétique et qui consistent à créer des plantes transgéniques résistantes sont actuellement de plus en plus utilisées. En effet, des plantes de tabac exprimant le gène de la protéine capside de plusieurs phytovirus montrent une résistance contre toute infection par ces virus. Adopter ces stratégies nécessite évidemment une bonne connaissance du génome viral et des interactions entre le virus et l'hôte.

En Tunisie, l'extension des surfaces irriguées et sous abritées a fait des cultures maraîchères un atout de taille dans l'économie du pays. Le piment constitue l'une des espèces les plus cultivées avec une production annuelle de 190 000 tonnes pour 17 000 hectares (FAO, 1992). Toutefois, le rendement de ces cultures accuse souvent des baisses considérables dues

essentiellement aux maladies virales. L'identification, par les voies biologique et sérologique, des agents viraux appartenant aux familles des Potyvirus, Cucumovirus et Tobamovirus qui sévissent sur les cultures de piment montre la présence des virus communs tels que le PVY (virus Y de la pomme de terre) et le CMV (virus de la mosaïque du concombre) qui sont transmis par les pucerons et le TMV (virus de la mosaïque du tabac) qui est transmis mécaniquement. Contre toute attente, d'autres virus inféodés à d'autres régions tels que le Poty E, le TEV (virus de la gravure du tabac) et le PVMV (virus de la marbrure nervaire du piment) sont identifiés pour la première fois en Tunisie. Les stratégies de lutte devraient par conséquent tenir compte de cette nouvelle donne. Les résultats de l'analyse de la variabilité moléculaire par RT-PCR associée à la RFLP des virus les plus fréquents sera discutée.

C25 : Essai de mise au point d'un test précoce in *vitro* pour évaluer la résistance de la pomme de terre au *Verticillium dahliae* Kleb

JADARI R.[1], ROSSIGNOL M.[2], BIROUK A.[1], SIHACHAKR D.[2], LEGRAND F.[3], CHLYAH H.[4], DUCREUX G.[2]

(1) IAV Hassan II, Laboratoire de Phytogénétique et Biotechnologie Végétale, BP 6202 Rabat, Maroc.

(2) Université Paris XI, Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale Bât. 360, 91405 Orsay France.

(3) Université Paris XI, Laboratoire de Cryptogamie Bât. 400, 91405 Orsay France.

(4) Université Mohamed V, Faculté des Sciences, Laboratoire de Physiologie Végétale, Rabat

L'étude de la résistance de trois variétés de pomme de terre (Désirée, Kathadin et Nicola) a été menée à la fois au champ et *in vitro* pour analyser les corrélations entre les résultats d'expérimentation en plein champ suite à l'inoculation des plantes avec les conidies du champignon *Verticillium dahliae Kleb* et ceux obtenus *in vitro* avec le filtrat du même champignon.

Lors de l'étude au champ, l'impact de l'altération foliaire sur la production a été évalué. La perte est de l'ordre de 48 % chez Désirée, 43 % chez Kathadin et 37 % chez Nicola.

Dans l'essai *in vitro*, le filtrat de *Verticillium dalhiae* a provoqué les mêmes symptômes de la verticilliose chez la pomme de terre que les conidies du champignon au champ. La concentration du filtrat s'est avérée un facteur très important à maîtriser pour bien évaluer la résistance de la pomme de terre au *V. dahliae*. La toxicité du filtrat dépend de la souche, de la variété et de la concentration utilisée. Une bonne corrélation a été établie entre la sensibilité au filtrat *in vitro* et les pertes du rendement en tubercules au champ.

En vue de confirmer ces résultats, 7 clones dihaploïdes de la variété Nicola ont été testés pour leur résistance au Verticillium (filtrat-*in vitro* et conidies-serre). Les dihaploïdes présentent une gamme diversifiée de résistance allant des clones modérément résistants aux clones sensibles.

Mots clés : *S. tuberosum*, *Verticillium dahliae* KLEB, conidie, filtrat, rendement, résistance, *in vitro*, champ, symptômes, foliaires.

C26 : Réaction des blés marocains (Triticum spp) à l'inoculation par des spores et filtrats de culture de quatre groupes de virulence de *Pyrenophora tritici repentis*

JLIBENE M.[1], DOUIMI R.[2]
[1] Institut National de la Recherche Agronomique, BP 578, Meknès, 50000, Maroc.
[2] Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismaïl, Meknès.

La tache bronzée, causée par *Pyrenophora tritici repentis* (stade sexué de *Drechslera tritici repentis*) est une maladie foliaire importante sur blé, au Maroc. La mise en évidence de quatre groupes de virulence du champignon et du rôle des toxines dans l'infection, nous a incité à évaluer les variétés marocaines vis-à-vis de ces différents groupes et de leur filtrats de culture. Quarante-six variétés marocaines de blé (*Triticum aestivum et T. durum*) inscrites au catalogue officiel, ont été inoculées par une suspension de spores de quatre groupes de virulence, au stade plantule. La période d'incubation et la surface foliaire nécrosée ont été mesurées. Parmi ces variétés, 12 ont été inoculées à la fois par le champignon et par son filtrat de culture. Les variétés ont différé significativement dans leur réaction à l'infection. Des variétés à niveau appréciable de résistance aux quatre groupes de virulence ont été identifiées (Kanz, Rajae, Tilila et Karim). La période d'incubation du champignon et la surface foliaire nécrosée étaient indépendantes, cette dernière ayant permis une meilleure discrimination entre les variétés. Des réactions de chlorose et de nécrose, obtenues après infiltration par les filtrats, ont été fortement corrélées avec la surface foliaire nécrosée obtenue après inoculation par les spores, indiquant que l'infection fait intervenir des substances toxiques. Par contre, les périodes d'incubation du filtrat et du pathogène n'étaient pas corrélées. La possibilité d'utilisation du filtrat de culture dans les travaux de sélection est proposée.

C27 : Hérédité de la résistance à *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter (*Septoria tritici* Rob. ex Desm.) chez le blé tendre

MAZOUZ H.[1], SAADAOUI El M.[2], JLIBENE M.[3]
[1] Faculté des Sciences et Techniques d'Errachidia, Université Moulay Ismaïl, Maroc.
[2] Faculté des Sciences, Université Moulay Ismaïl, Meknès, Maroc.
[3] Institut National de la Recherche Agronomique, Meknès, Maroc.

La spécialisation physiologique de *Septoria tritici* a été étudiée et signalée dans plusieurs pays dont le Maroc. Le présent travail a pour objectif d'étudier la génétique de la relation entre huit groupes de virulence de *S. tritici*, identifiés au Maroc, et neuf génotypes de blé tendre utilisés comme différentielles. La réaction des plantes des populations : parents, F1, BC1, BC2 (croisements en retour avec les deux parents) et F2 de 29 croisements a été étudiée. Les plantes des populations F1 des croisements entre génotypes hôtes résistants et sensibles ont une réaction qui se rapproche de celle de l'un des parents. La résistance des génotypes de blé tendre à *S. tritici* est sous un contrôle génétique simple (intervention d'un ou de deux gènes). Le nombre de gènes et leurs interactions varient d'un génotype à l'autre. L'effet maternel a été mis en évidence chez certains génotypes hôtes.

C28 : Quelques analyses concernant la physiologie des plantes régénérées dans des conditions de sélection *in vitro* chez le blé tendre

MIHAMOU A.Z.[1], BELABED A.[1], IBRIZ M.[3], MONNEVEUX P.[3], PICARD E.[2]

[1]Faculté des Sciences, Département de Biologie, Laboratoire d'amélioration et de production végétales. 60000 Oujda Maroc. [2]Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bat 360 F 91405 Orsay France. [3]ENSAM/INRA, 2 Place Viala 34060 Montpellier France

Les plantules androgénétiques régénérées dans les conditions de sélection *in vitro* au stade anthère, à 35°C/3h, 40°C/3h et dans les conditions témoins ont fait l'objet de deux tests physiologiques.

Le premier test est le dosage de la teneur en proline foliaire suite à un choc thermique de 40°C/6 h. Ceci a permis de constater que la pression de sélection *in vitro* ne provoque aucun effet significatif sur la teneur en proline foliaire chez les plantules issues des lignées fixées. Par contre, chez les plantules issues des hybrides F1, la teneur en proline foliaire varie en fonction de la température de sélection *in vitro*. Dans ce dernier cas, la teneur en proline augmente avec l'augmentation de la température de sélection *in vitro*.

Le deuxième test utilisé est la mesure de la fluorescence chlorophyllienne continue suite à un choc thermique de 40°C/15 h. Comme pour le dosage de la proline, ce test révèle un effet significatif de la sélection *in vitro* uniquement dans le cas des hybrides F1. Les plantules issues de la condition de pression de sélection *in vitro* de 40°C/3h semblent être les moins affectées par le choc thermique de 40°C/15h appliqué avant la mesure de la fluorescence chlorophyllienne continue.

Mots clés : Sélection *in vitro*, tests physiologiques, teneur en proline foliaire, fluorescence chlorophyllienne continue, choc thermique.

C29 : Application des hautes températures comme pression de sélection au cours de l'androgenèse *in vitro* chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.)

MIHAMOU A.Z.[1], PICARD E.[2], BELABED A.[1], EL JAAFARI S.[3]

[1] Faculté des Sciences, Département de Biologie, Laboratoire d'amélioration et de production végétales. 60 000 Oujda Maroc

[2] Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bat 360 F 91405 Orsay France

[3] Faculté des Sciences, BP 4010 Beni M'hamed Meknès Maroc

Ce travail porte sur l'étude des réactions du blé tendre (*Triticum aestivum L.*) aux températures élevées appliquées au cours de l'androgenèse *in vitro*. L'objectif est de contribuer à la mise au point de conditions de pression de sélection *in vitro* dans le cas de lignées résistantes et sensibles aux hautes températures et certains de leurs hybrides F1. Les deux stades androgénétiques utilisés sont le « **stade anthère** » après un jour de culture *in vitro* et le « **stade embryon androgénétique** ».

STADE ANTHÈRE

À ce stade, les conditions de pression de sélection sont 35°C/3h, 40°C/3h, 45°C/3h, 45°C/30 mn, 45°C/60 mn et 45°C/90 mn. La condition 45°C/3h s'est avérée létale pour les microspores. Pour les conditions témoins ainsi que 35°C/3h et 40°C/3h, la tendance générale est à la diminution du pourcentage d'embryons en fonction de l'augmentation de la température de sélection *in vitro*.

STADE EMBRYON ANDROGÉNÉTIQUE

L'application des températures de 35°C/3h, 40°C/3h et 45°C/3h à des embryons androgénétiques a permis d'améliorer significativement leur aptitude à la régénération chlorophyllienne et particulièrement dans le cas de la température de 45°C/3h.

C30 : Composition isotopique du carbone et efficacité d'utilisation de l'eau chez le blé *

MOKHTARI F.[1], DELEENS E.[2], EL JAAFARI S.[1]

[1] Laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismaïl, BP 4010 Béni M'hamed, 50000-Meknès, MAROC.

[2] Institut de Biotechnologie des Plantes, URA 1128, groupe « Structure et Métabolisme des Plantes », Bat 630, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 91405 Orsay Cedex, FRANCE.

Tout le long de son développement, le blé a des besoins en eau qui varient de 450 à 650 mm selon le climat et la longueur du cycle végétatif. Un déficit hydrique, en particulier durant les périodes de formation des composantes du rendement, peut provoquer des baisses très importantes des rendements en grains et du rapport grain/paille. La caractérisation d'une variété vis-à-vis de sa capacité à produire de la matière pour une quantité d'eau fournie (Efficacité d'Utilisation de l'Eau : EUE) est nécessaire pour améliorer les techniques de production et accroître les rendements.

Le critère EUE est intéressant à déterminer précocement au cours des programmes de sélection afin de gagner un temps précieux dans le choix des génotypes. Aussi, le test basé sur la composition isotopique naturelle du carbone, traduisant l'EUE par une valeur isotopique, commence à être utilisé. La composition isotopique du C fixé par la photosynthèse dépend de la teneur en CO2 atmosphérique et du fractionnement isotopique du C lors de cette fixation : on va la mesurer soit sur des temps courts (échelle instantanée), soit pendant des périodes de développement plus ou moins longues en fonction de la durée de vie de l'organe (échelle intégrée).

Dans un premier temps, nous développerons brièvement quelques considérations théoriques de base concernant la discrimination 12C/13C, les échanges gazeux et l'EUE. Dans un deuxième temps, nous présenterons les résultats d'une étude, réalisée chez 4 variétés de blé (*Triticum aestivum L., Triticum durum Desf.*), de la relation entre fractionnement isotopique et EUE mesurée également au niveau 1) des échanges gazeux foliaires (échelle instantanée) et 2) par la biomasse totale de la partie aérienne (échelle intégrée). Le but de ce travail étant d'établir et de tenter d'expliquer les variations de compositions isotopiques des grains chez le blé (échelle maximale d'intégration) en relation avec l'alimentation hydrique et l'EUE. Nous discuterons également les possibilités d'utilisation du paramètre EUE en sélection et la nécessité de faire un choix entre la demande en rendement, les possibilités d'alimentation en eau et la réponse des plantes à cette limitation.

* Recherches réalisées dans le cadre de la convention CNR (Maroc) - CNRS (France) entre le Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (FSM, Université Moulay Ismaïl - Meknès) et le Groupe Structure et Métabolisme des Plantes (IBP, Orsay) : convention SLVIE 03/96.

C31 : Apport des biotechnologies dans l'amélioration de la tomate pour la résistance au flétrissement bactérien

NSIKA MIKOKO E.
Laboratoire de Phytopathologie, Faculté des Sciences, B.P. Brazzaville, Congo

Dans l'amélioration génétique de la tomate au Congo et particulièrement dans la recherche d'une variété tolérant le flétrissement bactérien provoqué par *Pseudomonas solanacearum*, les méthodes classiques utilisées (hybridation, greffage) ont permis d'obtenir des résultats temporaires.

Avec le succès enregistré dans l'exploitation de la variation somaclonale en vitroculture, il a été envisagé le recours à cette voie en y introduisant une pression de sélection exercée par l'inoculation des bactéries dans les cals avant la régénération des plantules.

Des plantes présentant une nouvelle caractéristique « celle de tolérer la maladie » après inoculation ont été obtenues. Après autofécondation des plantes régénérées, leurs descendances ont été suivies au cours de deux cycles de culture dans des conditions telles que la maladie pouvait se manifester (sol contaminé après une primoculture infestée en plus des inoculations artificielles sur le terrain).

La nouvelle caractéristique (tolérance à la maladie) s'est maintenue alors que la variété de départ était sensible. La voie biotechnologique pourrait être un moyen de lutter efficacement contre certaines maladies bactériennes (ici le flétrissement chez la tomate) : en ce sens que cette fois les caractéristiques nouvellement acquises se maintiennent après deux générations de reproduction sexuée.

C32 : Multiplication *in vitro* du macabo et analyse des péroxydases acides dans la recherche des marqueurs de résistance vis-à-vis de *Pythium myriotylum*

OMOKOLO NDOUMOU D., TSALA NDZOMO G.
Département des Sciences Biologiques, Laboratoire Associé Francophone (LAF 314)
École Normale Supérieure, Université de Yaoundé
I.B.P. 47 Yaoundé (Cameroun) *tél./fax: (237) 22 86 74*

Des méthodes de culture *in vitro* ont été adaptées pour la multiplication rapide et en grandes quantités du macabo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). Les essais portaient sur les trois cultivars disponibles au Cameroun. À savoir : les cultivars blanc et rouge qui sont productifs mais, sensibles à la pourriture racinaire et le cultivar jaune résistant mais, peu productif. Les explants sont constitués d'apex : méristème + deux ébauches foliaires. Les cultures sont établies sur milieu de Murashige et Skoog (MS) contenant 30 g/l de saccharose et 3 g/l d'agar. Après deux semaines, ils sont transférés sur milieu MS additionné de benzylaminopurine à 5 mM. Une prolifération de bourgeons est obtenue après trois semaines. Le nombre de bourgeons par explant augmente avec le nombre de sous-cultures. Les bourgeons néoformés sont alors individualisés et transférés sur milieu MS sans phytohormone. Des plantes entières sont régénérées après trois semaines. L'acclimatation des plants se fait sur substrat terre/vermiculite (1/2) pendant environ un mois. Pour l'étude de la sensibilité à l'infection, ces plants sont alors

infectés avec une suspension de zoospores de *Pythium myriotylum*. Au bout de 12 jours, les résultats ont montré que le cultivar blanc est le plus sensible, suivi du cultivar rouge ; alors que le cultivar jaune est peu affecté. Les activités péroxydasiques dans les racines ont été mesurées dans les fractions solubles et ioniquement liées. Les résultats ont montré qu'au cours de l'infection, les activités enzymatiques augmentent sauf dans la fraction soluble du cultivar blanc où une baisse est mesurée. Les profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en conditions natives des isopéroxydases acides solubles ont été analysés. Cette analyse est intervenue deux jours après l'infection. Deux bandes d'activité péroxydasique (A1 et A2) sont présentes dans les racines des trois cultivars. Une bande (A3) de mobilité électrophorétique moyenne n'apparaît que lorsque les plantes sont infectées ; elle est commune aux trois cultivars. La bande A4 est spécifique au cultivar jaune ; cependant, elle n'apparaît que dans les conditions d'infection. Les résultats présentés dans cette communication sont une première étape vers 1) l'identification des protéines liées à la tolérance du macabo vis-à-vis de *Pythium myriotylum* et 2) la recherche d'un test précoce d'infection. Ces informations sont déterminantes dans les programmes d'amélioration du macabo. Elles constituent en effet, une étape vers la production de génotypes transformés.

C33 : Évolution des paramètres de stress hydrique du blé suite à la pulvérisation d'huile de lin

PAUL R.[1], BOURHANZOUR A.[1], BENNACEUR M.[2], EL JAAFARI S.[3]

[1] Unité de Biologie végétale, Faculté des Sciences agronomiques, 5030 Gembloux, Belgique.

[2] Département de Physiologie végétale, INRAT, Ariana, Tunisie.

[3] Département de Biologie, Université Moulay Ismaïl, Meknès, Maroc

Cette étude a porté sur l'effet de la pulvérisation d'une émulsion de lin sur des plantes de blé soumises au déficit hydrique.

L'effet de l'antitranspirant a été évalué par la mesure, au cours du temps, des paramètres hydrique (potentiels hydrique et osmotique, contenu relatif en eau, hydratation) et teneur en proline.

L'application d'huile de lin s'est traduite par une moindre sensibilité au stress des paramètres hydriques et par une teneur plus faible en proline chez les plantes traitées.

Un meilleur maintien de la croissance a aussi été observé chez ces dernières.

C34 : Infrastructures simplifiées pour la production de variétés d'agrumes indemnes de maladies de type viral par microgreffage d'apex *in vitro*

RIZQI A., NADORI El B.

Direction des Domaines Agricoles, Unité de Contrôle des Plants Km 7,5 Avenue Imam Malik Dar Es Salam RABAT

Cette communication a pour objet de présenter des équipements simplifiés utilisés à l'UCP pour la réalisation de la régénération des variétés d'agrumes par la technique de microgreffage d'apex associée à la thermothérapie.

Il s'agit essentiellement de :

- une enceinte de thermothérapie installée dans une serre à ambiance contrôlée,
- un placard de culture vitré de deux à trois étagères, muni d'équipement permettant de maintenir une température de 28°C ± 1 et d'un éclairage de 16 heures par jour,
- un abri entomologique simplifié par la conservation du matériel végétal sain,
- réalisation possible du microgreffage en l'absence d'une hotte à flux laminaire.

C35 : Description des aspects pratiques de production de variétés d'agrumes indemnes de maladies de type viral par microgreffage d'apex *in vitro*

RIZQI A., NADORI El B., ANEJJAR M., BANI-AAMEUR O.
Direction des Domaines Agricoles, Unité de Contrôle des Plants Km 7,5 Avenue Imam Malik Dar Es Salam RABAT

L'Unité de Contrôle des Plants de la Direction des Domaines Agricoles au Maroc, est en train de réaliser un vaste programme de production de variétés d'agrumes indemnes de maladies de type viral, utilisant la technique de microgreffage d'apex *in vitro* associée à la thermothérapie. Ce programme porte sur trois types de matériel végétal : les variétés commerciales locales, celles d'intérêt commercial introduites de l'étranger et les variétés mises en collections depuis plusieurs décennies. Les étapes pratiques de production de matériel végétal sain, détaillées dans cet article, concernent les données recueillies au cours de la régénération de quarante variétés d'agrumes, pendant une durée des travaux au laboratoire d'à peine deux mois. Ces étapes sont les suivantes :

- réception de variétés sous forme de quelques baguettes,
- préparation sous serre isolée, de plants destinés à subir le traitement de thermothérapie,
- thermothérapie des plants dans une enceinte placée sous serre,
- réalisation du microgreffage d'apex *in vitro* selon deux méthodes,
- entretiens différents des plants obtenus selon la méthode de microgreffage utilisée,
- surgreffage des plants *in vitro* sous serre selon une technique qui permet d'obtenir en 2 à 3 mois des plants suffisamment développés pour entamer le contrôle sanitaire et la multiplication,
- conservation du matériel végétal sain à l'abris des contaminations.

C36 : Amélioration de la vigne par voie biotechnologique : le cas de l'eutypiose

ROUSTAN J.-P., DALMAYRAC S., COLRAT S., DESWARTE C., FALLOT J.
Laboratoire des Industries Alimentaires, UA INRA, École Nationale Supérieure Agronomique, 145 Avenue de Muret, 31076 TOULOUSE cedex, France

L'amélioration de la vigne par hybridation ou par sélection clonale pose de nombreux problèmes. Aussi, les méthodes offertes par les biotechnologies végétales apparaissent prometteuses et très intéressantes pour la vigne. Nous présentons les stratégies mises en œuvre

pour étudier l'eutypiose et développer des moyens de lutte. L'eutypiose est une maladie de dépérissement de la vigne due à un champignon parasite *Eutypa lata*. C'est actuellement la plus grave des maladies de la vigne : elle est présente dans de nombreux vignobles à travers le monde ; elle a un impact économique important, et il n'existe pas de moyens de lutte curatifs. Le champignon parasite se développe dans le tronc des souches et détermine à distance des symptômes caractéristiques sur les parties herbacées par l'intermédiaire d'une substance toxique que nous avons identifiée, l'hydroxy-4 (méthyl-3-butène-3-ynyl-1)-3 benzaldéhyde, appelée eutypine [1,2]. L'eutypine pénètre dans les cellules de vigne par diffusion passive et s'accumule dans le cytoplasme sous forme ionisée par un système de piégeage d'acide [3]. Au sein des membranes biologiques, elle joue le rôle de transporteur mobile de protons, provoquant notamment le découplage de la phosphorylation oxydative des mitochondries, l'inhibition des transporteurs membranaires [4]. Ce mécanisme peut, à lui seul, rendre compte des altérations physiologiques provoquées par l'eutypine. De plus, dans les tissus cultivées *in vitro*, l'eutypine est métabolisé en un dérivé hydroxylé, l'alcool hydroxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-3 benzylique, appelé eutypinol. Ce composé ne présente pas de toxicité à l'égard de la vigne. De plus, la capacité de métabolisation de l'eutypine par les variétés sensibles telles que le Cabernet Sauvignon est inférieure à celle du Merlot, variété considérée comme tolérante. Ces résultats permettent aujourd'hui de développer des stratégies pour développer des moyens de lutte contre cette molécule en vue de limiter l'expression des symptômes de la maladie.

Bibliographie

1. MAURO M.C., VAILLANT V., TEY RULH P., MATHIEU Y., FALLOT J. 1988. *Am. J. Enol Vitic* 39 200-204.
2. TEY-RULH P., PHILIPPE I., RENAUD J.M., TSOUPRAS G., DE ANGELIS P , FALLOT J , TABACCHI R 1991. *Phytochem.* 30 : 471-473.
3. DESWARTE C., CANUT H., KLAEBE A., ROUSTAN J.P., FALLOT J 1996 *J. Plant Physiol.* 149 : 336-342
4. DESWARTE C., EYCHENNE J., DAVY DE VIRVILLE J., ROUSTAN J.P., MOREAU F., FALLOT J 1996 *Archives of Biochemistry and Biophysics* 334 : 200-205

C37 : Bases physiologiques d'adaptation des blés oasiens à la sécheresse : ajustement osmotique et photosynthèse

SABOUR I.[1], EL JAAFARI S.[1], MONNEVEUX Ph.[2]

[1] Laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences Université Moulay Ismaïl, BP 4010 Béni M'hamed, 50000-Meknès, MAROC.

[2] GAP, ENSA-INRA, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex1, FRANCE.

Si l'amélioration des systèmes culturaux oasiens constitue un enjeu de première importance, la prospection, l'évaluation et l'exploitation des ressources génétiques de ces zones (et en particulier des ressources céréalières) ne semblent pas moins essentielles dans la mesure où elles sont susceptibles de déboucher sur des progrès génétiques, intéressant non seulement la zone saharienne elle-même, mais également les zones semi-arides voisines, progrès portant à la fois sur le potentiel productif, et sur les caractéristiques d'adaptation au milieu.

Compte tenu des contraintes environnementales sévères auxquelles les blés des oasis ont eu à faire face (alimentation en eau aléatoire, hautes températures, salinité des eaux et du sol), on

peut s'attendre à rencontrer dans le matériel prospecté des caractères intéressants d'adaptation à ces contraintes.

Sur une collection de 15 blés oasiens issus du Tafilalet (Maroc) et du Touat et du Gourara (Algérie), choisis sur base d'une première évaluation morphologique et électrophorétique, nous avons réalisé une étude des bases physiologiques d'adaptation à la sécheresse liées au statut hydrique, à l'ajustement osmotique et à la photosynthèse. La photosynthèse est étudiée au moyen de l'analyse des cinétiques d'induction de la fluorescence chlorophyllienne modulée. Le statut hydrique ainsi que l'aptitude à réaliser un ajustement osmotique actif sont évalués au moyen de la teneur relative en eau (TRE), de la perte relative en eau (PRE), du potentiel osmotique (P) et des relations entre les variations simultanées de ces différents paramètres.

Des comportement types ont été identifiés chez les blés étudiés et des mécanismes intéressants d'adaptation à la sécheresse ont été caractérisés chez des génotypes. L'utilisation de tels génotypes comme géniteurs dans un programme de création variétés destinées aux zones semi-arides voisines (hautes plaines du Maroc et de l'Algérie) est discutée.

C38 : Proposition d'une méthodologie de l'utilisation de la proline comme critère de sélection variétale et son application dans la recherche d'osmo-inducteurs influençant la réactivité du blé tendre au stress hydrique

TAHRI E.H.

Faculté des Sciences d'Oujda Laboratoire d'Amélioration et Production Végétales Rue Sidi Maâfa 60 000 Oujda Maroc Tél : (6) 74 47 46 Fax : (6) 74 47 49

Ce travail a été consacré à l'étude de l'accumulation de proline par des plantules de blé tendre, de 3 semaines, sous l'effet d'un stress hydrique appliqué par arrêt d'arrosage en conditions contrôlées. Six variétés, marocaines, ont été utilisées : Jouda, Kanz, Marchouch, Mouna, Nasma et Saba. Le comportement phénotypique, la réduction des matières fraîches (MF) et sèches (MS)*, le déficit relatif en eau**, et la teneur en proline ont été suivis au cours de l'application du stress. Le comportement phénotypique, de chacune des 6 variétés face au stress, a permis de les classer selon le degré croissant de résistance suivant : Jouda, Nasma, Marchouch, Mouna, Kanz et Saba.

Les teneurs en proline, accumulées au cours du stress par les systèmes foliaires, ne pouvant être corrélées au degré de résistance des différentes variétés, une étude des cinétiques d'accumulation de proline en fonction de l'évolution de la réduction des matières fraîches et sèches, sous l'effet du stress, a été réalisée. Deux types de cinétiques ont été enregistrées : type michaelien et type allostérique. Par analogie aux cinétiques enzymatiques de type michaelien, la détermination, par la relation des doubles inverses de Lineweaver et Burk, des valeurs des paramètres Vm (quantité maximale de proline que peut, théoriquement, accumuler une variété sous l'effet du stress hydrique) et Km (valeur de la réduction de la MF ou de la MS induisant une accumulation de proline dont la teneur est égale à la moitié de Vm), nous a permis de constater :

1- l'absence de corrélation entre les valeurs Vm et Km enregistrées chez les différentes variétés,

2- l'absence de corrélation entre les valeurs Vm et Km, d'une part, et le degré de résistance au stress des différentes variétés, d'autre part.

3- toutefois, une corrélation, mais négative, a été notée entre le degré de résistance au stress et les valeurs des déficits hydriques relatifs conduisant à une réduction des matières fraîches et sèches induisant une accumulation de proline dont la teneur est égale à Vm. Les écarts entre les valeurs de ces déficits hydriques relatifs, ainsi déterminés, refléteraient le degré de résistance des différentes variétés au stress. La résistance, contrairement à la sensibilité, au stress se traduit par une forte réactivité se manifestant par une accumulation de proline dont la teneur peut atteindre la moitié de Vm et ceci pour de faibles valeurs de déficit hydrique relatif.

La recherche de molécules physiologiques, conduisant à l'augmentation de la réactivité au stress hydrique, et en application de la méthodologie proposée (Détermination de Vm et de Km), nous a permis de constater, chez 2 variétés, Achtar et Mouna, que le saccharose (100 mM) et les chlorures d'ammonium (20 mM) conduisent, chacun, à l'augmentation de cette réactivité par baisse de la valeur du potentiel osmotique du milieu devant induire une accumulation de proline dont la teneur est égale à la moitié de Vm. La combinaison, de ces 2 molécules osmo-inductrices, améliore, encore plus, la réactivité de ces 2 variétés au stress que lorsqu'elles sont utilisées séparées.

* (MF ou MS des plantules stressées/MF ou MS des plantules témoins) x 100.

** $\frac{\text{(Eau/MS) des plantules témoins - (eau/MS) des plantules stressées}}{\text{(Eau/MS) des plantules témoins}}$ x 100.

C39 : Amélioration de l'embryogenèse somatique et de la tolérance à la salinité des plantes régénérées

ZAIR I., CHLYAH A., CHLYAH H.

Université Mohammed V, Faculté des sciences, Département de Biologie, Avenue Ibn Battouta, B. 1014, Rabat, Maroc

Les capacités embryogènes ainsi que le pourcentage de régénération des cals initiés à partir d'embryons immatures de blé ont été significativement améliorés par la fragmentation longitudinale de l'embryon zygotique.

Des pressions de sélection ont été ensuite appliquées de deux manières différentes afin d'améliorer la tolérance à la salinité des plantes régénérées. Pour ce faire, les cals sont initiés à partir de moitiés d'embryons immatures, soit en absence de sel puis transférés sur un milieu contenant NaCl, soit directement sur un milieu contenant l'agent sélectif.

Dans le premier cas, les cultures montrent une forte réduction de leur pouvoir de régénération avec l'augmentation de la concentration en NaCl du milieu de culture mais surtout avec l'allongement de la durée de culture.

Dans le second cas, bien que les compétences embryogènes diminuent avec l'augmentation de NaCl, des plantules ont été régénérées à partir de cals initiés sur 10 et 15 g/l chez la plupart des variétés. Le test de fluorescence de la chlorophylle a montré que les plantes régénérées sont significativement plus tolérantes que les plantes mères.

SECTION D

Marquage moléculaire, biodiversité et sélection

Communications orales D1 à D11

D1 : Qu'avons nous appris en analysant le génome d'*Arabidopsis thaliana* ?

DELSENY M.

Université de Perpignan, Laboratoire de Physiologie et Biologie Moléculaire des plantes - UMR 5545 du CNRS, 66 860 - PERPIGNAN Cedex. Tél. : 33 4 68 66 88 48 - Fax : 33 4 68 66 84 99. e-mail : delseny@univ-perp.fr.

INTRODUCTION

Le choix d'*Arabidopsis thaliana*, comme espèce végétale modèle pour analyser le génome des plantes est justifié par la petite taille de son génome, 120 Mbp environ répartis en cinq paires de chromosomes, l'un des plus petits décrits chez les plantes. La plante est essentiellement autogame et se prête bien à l'analyse génétique, aussi bien classique que reverse. De plus, elle se développe rapidement sans exiger beaucoup de place ni de soin, ce qui en fait un objet d'étude particulièrement intéressant dans un contexte académique (1). Depuis 1989, la recherche sur *Arabidopsis thaliana* est coordonnée au niveau mondial et depuis 1992, plusieurs projets, principalement européens ont permis d'envisager le séquençage complet du génome de cette plante. Cet exposé sera limité à ce que nous avons appris du séquençage systématique.

En fait, ces projets de séquençage, comprennent deux grands volets : le séquençage rapide et partiel des gènes exprimés, sous la forme d'étiquettes ADNc ou EST (*Expressed Sequence Tags,* terme anglais signifiant étiquetage d'une séquence transcrite), et le séquençage génomique complet. Fin 1991, moins de 200 séquences (ADNc, gènes ou protéines) étaient connues chez *Arabidopsis*. La première tâche entreprise fut de séquencer systématiquement des ADNc de façon à dresser un catalogue des gènes exprimés. Cette tâche a été partagée entre un consortium français et un consortium américain. La seconde tâche entreprise fin 1993 par le programme Européen ESSA (European Scientists Sequencing Arabidopsis) a consisté à analyser la séquence de grands morceaux d'ADN chromosomique.

Le séquençage d'EST (*Expressed Sequence Tags*)

Une EST est une séquence de 300-400 pb, déterminée une seule fois, portant sur l'extrémité 5' ou 3' d'un clone ADNc. En séquençant en aveugle un grand nombre d'EST on obtient une représentation de la population d'ARNm dans un tissu ou un stade de développement donné.

Les stratégies américaines et françaises ont été légèrement différentes. Les américains ont réalisé une banque d'ADNc unique à partir de mélanges d'ARNm préparés à partir des différents tissus de la plante, alors que les français ont réalisé des banques spécialisées correspondant à leur centre d'intérêt biologique. Les américains n'ont séquencé que l'extrémité 5' des clones, alors que de très nombreux ADNc ont été séquencés aux deux extrémités par les français. Alors que le programme européen n'a financé que les séquences nouvelles, aucune contrainte de redondance n'a été imposée aux collègues américains.

L'effort conjoint des deux consortiums a ainsi permis d'obtenir près de 30 000 étiquettes en moins de cinq ans. Du fait de la redondance on peut estimer qu'au moins la moitié des quelques 20 000 gènes du génome d'*Arabidopsis* ont ainsi été étiquetés (2).

Le séquençage en lui-même constitue une opération facile. La difficulté est de déchiffrer le message ainsi obtenu. La première analyse réalisée consiste à traduire la séquence de l'ADNc dans chacune des six phases de lecture possibles et à comparer la traduction aux séquences protéiques engrangées dans les bases de données. Les logiciels FASTA, BLAST et quelques autres permettent ce travail. Ainsi, si l'on ne considère que les séquences non redondantes, on peut observer que près de 40 % d'entre elles présentent une homologie significative avec une protéine déjà connue chez un autre organisme. Cela signifie que près de 60 % des clones séquencés et non redondants sont sans fonction connue. Ainsi par simple séquençage partiel on a pu obtenir une information de séquence et proposer une fonction potentielle pour près du quart des gènes d'*Arabidopsis*. Ces résultats sont des résultats moyens sur l'ensemble du programme et peuvent varier d'un tissu à l'autre.

Que peut-on faire avec les EST ?

Le premier renseignement tiré des EST est bien sûr la connaissance et l'identification potentielle d'un gène. Les premières applications mises en place par nos laboratoires ont concerné surtout la biologie. Chaque EST peut constituer une sonde pour analyser l'expression d'un gène. Lorsque les EST révèlent l'existence de familles multigéniques, il devient possible d'analyser leur expression différentielle et d'en rechercher les mécanismes de contrôle. Le nombre de gènes appartenant à des petites familles multigéniques a constitué l'une des surprises majeures du programme.

Une deuxième application des EST a été de les utiliser pour faire de la cartographie du génome d'*Arabidopsis*. La première stratégie utilisée a été la technique classique par RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), mais on peut aussi utiliser les informations de séquences pour définir des marqueurs PCR. Cette stratégie a été particulièrement utile pour typer des clones YAC (*Yeast Artificial Chromosome*), définir quelles EST étaient communes à plusieurs YAC, et aussi définir des contigs et réaliser la carte physique des chromosomes. Celle-ci est maintenant quasiment achevée pour trois des cinq chromosomes et en voie de l'être pour les deux autres (3).

On doit se poser la question de savoir combien de gènes avons-nous réellement identifié. Cette question est abordée en regroupant toutes les EST qui présentent des régions chevauchantes identiques ou très proches de façon automatique. Ainsi les 30 000 EST peuvent être regroupées en 13 000 contigs (4), ce qui est sans doute une surestimation du nombre réel de gènes, puisque deux contigs peuvent correspondre à un même gène s'il n'y a pas, par exemple, d'EST dans la région centrale du gène chevauchant avec celles de la partie 5' ou de la partie 3'.

Nous avons essayé de préciser la situation dans le cas des EST correspondant à des protéines ribosomiques cytoplasmiques : nous avons ainsi reconstitué 106 ADNc distincts correspondant à 50 types de protéines différentes (5).

Une dernière application des EST est le repérage des gènes et en particulier des bordures entre exons et introns.

Le séquençage génomique

Le séquençage génomique, dans le cadre du programme ESSA 1 a porté sur environ 2,5 Mpb dont 1,8 Mpb d'un seul tenant autour du locus *FCA*, un gène contrôlant la précocité de la floraison situé sur le chromosome 4.

Au total près de 450 gènes ont été entièrement séquencés (6, 7).

Le programme a rencontré plusieurs types de difficultés. La première a été l'obtention de clones prêts à séquencer. Il a fallu d'abord organiser les contigs de phages ou de

cosmides, dont le sous-clonage orienté est laborieux avec un chevauchement minimal. Il a fallu apprendre à travailler d'une autre façon, quasi-industrielle et surtout, il a fallu être capable de repérer les gènes et leurs limites dans les séquences obtenues car de très nombreux gènes sont beaucoup plus morcelés que l'on ne s'y attendait.

L'obtention préalable de 30 000 EST d'*Arabidopsis*, et l'utilisation d'EST humaines ou du nématode *Caenorhabditis elegans* ont grandement facilité la tâche et l'isolement d'ADNc complets correspondant aux gènes séquencés a permis d'améliorer les programmes de prédiction de gène. Selon les régions séquencées de 40 à 60 % des gènes prédits présentent une identité de séquence avec une EST ce qui confirme bien que le programme EST a probablement repéré environ la moitié des gènes.

Les principaux enseignements sont que la densité de gène est très élevée (1 gène tous les 4-5 kpb) ce qui ne laisse pas la place pour plus de 20 000 gènes. Ces gènes ne sont pas groupés de façon fonctionnelle évidente, même si l'on observe des groupes de fonctions analogues. Les gènes sont morcelés avec souvent des exons de très petite taille. L'analyse détaillée de quelques gènes révèle l'existence de mécanismes d'épissage alternatif et de bordures d'introns atypiques, ce qui laisse entrevoir de nouvelles possibilités de régulation. Enfin, le séquençage génomique a révélé de nouveaux éléments transposables ainsi que des courtes duplications qui devraient être riches d'enseignement sur un mode d'évolution du génome.

CONCLUSION

Les cinq années écoulées ont vu se mettre en place une formidable machine technologique qui a fait faire un bond fulgurant à notre connaissance du génome d'*Arabidopsis*. Trois grandes orientations se dégagent maintenant :

- Achever le plus vide possible le séquençage complet du génome. Ce travail devrait être terminé en 2003, c'est-à-dire dans six ans (8).
- Développer les méthodologies d'identification de fonction des gènes d'*Arabidopsis*. Il n'y a malheureusement pas de méthode miracle. Les stratégies vont de la comparaison régulière des séquences encore inconnues avec les bases de données en croissance exponentielle à la création de collections de mutants d'insertion, en passant par un retour à la biochimie classique. Cette tâche nécessitera le travail de plusieurs générations de biologistes.
- Transférer au plus vite les acquis obtenus sur un génome modèle aux plantes d'intérêt économique. Cela va de l'utilisation directe de sondes d'*Arabidopsis* lorsqu'elles sont suffisamment conservées, à la mise en œuvre de stratégie PCR ou de cartographie comparée. Du point de vue des biotechnologies les principaux apports du programme de séquençage d'*Arabidopsis* ont été de permettre un accroissement considérable de la connaissance des gènes de plantes et la mise à disposition, dans le domaine public, d'informations permettant de repérer près de la moitié d'entre eux. Les séquences publiées sont ainsi maintenant utilisables pour aller rechercher les gènes homologues chez les espèces cultivées et s'en servir pour faire du génie génétique ou pour évaluer, au travers de l'étude de la variabilité génétique, les relations séquence-fonction pour certains gènes importants. De façon générale, ces programmes d'analyse du génome d'une espèce modèle a permis de faire faire un bon en avant considérable dans l'analyse de grandes fonctions telles que la floraison, les régulations hormonales ou la perception et la transduction des signaux de l'environnement. Ces connaissances nouvelles constituent le tremplin sur lequel les biotechnologies végétales devraient prendre un nouvel essor.

Enfin, le principal enseignement de ces programmes est l'émergence d'une nouvelle façon de travailler et de faire de la biologie en utilisant les informations contenues dans des bases de données largement publiques. On peut prévoir que l'existence de toutes ces séquences va révolutionner nombre de domaines de la biologie en changeant les stratégies expérimentales et en mettant sur le marché des nouveaux outils de diagnostic et de sélection.

Bibliographie

1. SOMERVILLE, C.R., MEYEROWITZ E.M. (1994). In *Arabidopsis* (Somerville C.R. Meyerowitz E.M. Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA.
2. DELSENY M., COOKE R., RAYNAL M., GRELLET F. (1997). FEBS Lett. 403, 221-224.
3. Schmidt R., West J., Love K., Leecham Z., Lister C., Thomson H., Bouchez D., Dean C. (1995). Science 270, 480-483.
4. RUNSLEY S., GLODEK A., SUTTON G., ADAMS M.D., SOMERVILLE C.R., VENTER J.C., KEERLAVAGE A.-R. (1996). Plant Physiol. 112, 1177-1183.
5. COOKE R., RAYNAL M., LAUDIÉ M., DELSENY M. (1997). Plant J. 11, 1127-1140.
6. Bevan M. (1977) Pip Newsletter 12, 5-8.
7. CHALWATZIS N. (1977) Pip Newsletter 12, 12-24.
8. BEVAN M., ECKER J., THEOLOGIS S. et al. (1997). Plant Cell 9, 476-478.

D2 : Utilisation des marqueurs moléculaires RFLP pour la caractérisation de la diversité génétique

LALAOUI-KAMAL M., ASSALI N.E.
Adresse : Dépt. Écologie Végétale, I.A.V. Hassan II, BP. 6202, Rabat-Instituts, Maroc.

INTRODUCTION

Le genre Medicago renferme 34 espèces annuelles et 21 espèces pérennes. Ces espèces peuvent être diploïdes ou tétraploïdes, allogames ou autogames. Les Medicago annuelles ou « medics » présentent un intérêt agro-économique du fait de leur excellente qualité fourragère et de l'enrichissement de la fertilité du sol qu'elles assurent grâce à leur capacité de fixation de l'azote atmosphérique. Ils peuvent être donc exploités dans le système « Ley-farming » (rotation céréale/légumineuse).

La première évaluation génétique des medics à l'échelle nationale, a réalisée en utilisant les marqueurs isoenzymatiques comme moyen d'identification et de caractérisation génétique (El Mousadik, 1991). L'étude de 15 espèces à l'aide de 4 systèmes enzymatiques a révélé l'existence de 5 loci monomériques polymorphes qui ont permis de lever la difficulté d'identification de certaines espèces et d'évaluer les niveaux de variabilité génétique interspécifiques et des intraspécifiques. Cependant, le nombre de systèmes enzymatiques et d'allèles étudiés, souvent limité, ne permet pas d'obtenir un polymorphisme suffisamment important pour caractériser l'ensemble des variétés.

Les marqueurs moléculaires, basés sur le polymorphisme de la longueur de fragments de restriction d'ADN (RFLP), semblent être le meilleur outil pour remédier aux limites des marqueurs phénotypiques et enzymatiques. Leur puissance réside dans le fait qu'ils ne sont pas soumis aux conditions environnementales, aux relations Épistasies ou pleiotropiques. Ils peuvent être exploités non seulement dans l'identification variétale et la conservation des ressources phylogénétiques mais aussi dans la cartographie des loci affectant des caractères quantitatifs ainsi que leur suivi dans des programmes d'introgression-sélection (Primard, 1985).

Dans cette étude nous avons utilisé des sondes appartenant à des unités ribosomiques nucléaires (unité ribosomique entière 8.2 Kb du lin et le gène 18S du tournesol) pour analyser la variabilité génétique au sein de 6 espèces annuelles du genre Medicago. Les unités ribosomiques ont été largement utilisées pour évaluer le polymorphisme interspécifique et intraspécifique. Le haut degré de répétition de ces unités ribosomiques a facilité l'établissement des relations phylogénétiques pour un grand nombre d'espèce (Kabbaj et al., 1995 ; Faivre-Rampant et al., 1992 ; Zeboudg et al., 1994 et Jeandroz et al., 1995).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel végétal

Le matériel végétal comprend six espèces annuelles du genre Medicago représentées par dix écotypes locaux et deux cultivars étrangers (**tableau 1**). La majorité du matériel végétal étudié provient des collections conservées à l'Institut National de la Recherche Agronomique (station Guich-Rabat) et au Centre de Production des Semences Pastorales (Direction de l'Élevage CPSP El Jadida). Quatre individus de chaque Écotype ont été analysés.

Tableau 1 : Liste, désignation et origine géographique des espèces étudiées

Espèce	Écotype ou cultivar	Origine	Désignation
M. aculeata	GR 229	Maroc	I.1
	GR 109	Maroc	I.2
M. ciliaris	GR 372	Maroc	1.1
	GR 841	Maroc	1.2
M. intertexta	GR 371	Maroc	2.1
	GR 372	Maroc	2.2
M. murex	zodiac	Australie	3.1
	GR 170	Maroc	3.2
M. polymorpha	GR 154	Maroc	4.1
	MA 144	Maroc	4.2
M. truncatula	GR 76	Maroc	Tr.1
	jemalong	Australie	Tr.1

Préparation de l'ADN total

La technique d'extraction d'ADN utilisée dérive de celle mise au point par Dellaporta et al. (1983). La quantité et la qualité d'ADN génomique obtenu est estimée par spectrophotométrie et coloration au bromure d'Ethidium après électrophorèse.

Restriction enzymatique, électrophorèse et transfert d'ADN sur membrane

L'ADN génomique total (10 (g) est digéré séparément par les enzymes Eco RI et Rsa I pendant au moins 1 heure à la température optimale d'activité recommandée pour chaque enzyme. Les fragments de restriction sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8 %). L'ADN séparé sur gel est dépuriné, dénaturé puis transféré sur membrane de Nylon (Hybond N+) selon la méthode décrite par Southern (1975). La fixation de l'ADN sur la membrane se fait par cuisson à 80°C pendant 2 h (Boehringer Mannheim Biochemica, 1993).

Marquage des sondes

Les sondes utilisées ont été marquées de deux façons différentes: radioactive et non radioactive. Le marquage radioactif a été réalisé au 32P dCTP par la procédure d'amorçage aléatoire. La sonde marquée est purifiée par chromatographie à travers un gel de Sephadex G-50. Le marquage non radioactif a été réalisé par l'utilisation de la digoxygénine selon le protocole de Boehringer Mannheim. Les révélations des

hybridations ont été réalisées en utilisant un substrat chimiluminescent (Lumigen) (Boehringer Mannheim Biochemica, 1993 et Karcher, 1994).

Hybridations moléculaires

Les membranes de Nylon sont préhybridées à 65°C pendant une nuit dans du 6 x SSC, 5 x Denhardt, 0,1 % SDS et 1 mg/ml d'ADN du sperme du saumon. L'hybridation s'effectue pendant au moins 8 heures dans une solution semblable additionnée de la sonde marquée (20 ng/ml).

Détection des signaux

Pour détecter les signaux radioactifs, les filtres, légèrement séchés, sont exposés à 0°C au film Kodack XAR en utilisant un écran intensificateur. Le protocole de la détection chimiluminescente dérive de celui de Boehringer Mannheim (Bierwerth et al., 1992).

Estimation des distances génétiques et construction des arbres phylogénétiques

Pour l'estimation des distances génétiques, nous avons utilisé la méthode décrite par Nei (1972). Les arbres phylogénétques ont été construits suivant la méthode UPGMA (Sneath et Sokal, 1973).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Analyse des profils des hybridations

Les hybridations moléculaires issues du marquage radioactif et du marquage non radioactif couplé à la chimioluminescence ont donné les mêmes résultats.

L'hybridation des profils de restriction Eco RI avec la sonde 8,2 Kb a révélé 17 fragments : un fragment majeur commun aux 12 Écotypes (E1) et plusieurs fragments polymorphes qui peuvent être propres à un seul Écotype ou commun à deux ou à plusieurs Écotypes. Par ailleurs, l'hybridation des profils de restriction Rsa I avec la même sonde a révélé 26 fragments. 6 d'entre eux sont communs à tous les Écotypes : 5 majeurs (R1, R22, R23, R25, R26) et 1 mineur (R24). Les autres fragments polymorphes sont propres à un seul Écotype ou communs à 2 ou à plusieurs Écotypes.

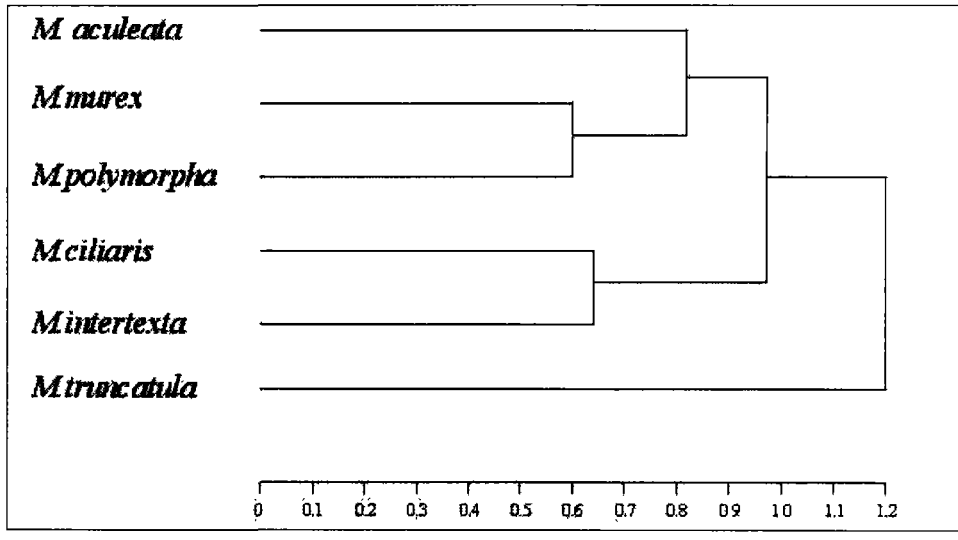
L'hybridation des profils de restriction Eco RI avec la sonde 18S a révélé 21 fragments: 1 fragment majeur commun à tous les Écotypes (E9) et plusieurs fragments polymorphes parmi lesquels on peut différencier des fragments propres à un ou à plusieurs Écotypes. L'hybridation des profils de restriction Rsa I avec la sonde 18S a révélé 15 fragments. 5 fragments sont communs à tous les cotypes : 4 majeurs (R1, R25, R23 et R22) et 1 mineur (R24). Parmi les dix fragments polymorphes on peut distinguer ceux qui sont propres à un ou à deux Écotypes et ceux qui sont communs à plusieurs Écotypes.

Analyse de la variabilité génétique au niveau des espèces:

Le polymorphisme RFLP, détecté par les sondes d'ADNr 8,2 kb et 18S chez les 6 espèces annuelles du genre Medicago, nous a permis d'estimer les distances génétiques séparant les différentes espèces prises 2 à 2. Les matrices des distances génétiques ont été calculées pour les quatre combinaisons principales (8,2 kb/EcoRI, 8,2 kb/Rsa I, 18S/Eco RI et 8,2 kb/Rsa I) ainsi que leurs combinaisons simultanées ([8,2 kb/Eco RI et 8,2 kb/Rsa I], [18S/Eco RI et 18S/Rsa I], [8,2 kb et 18S]).

La classification par dendrogramme **(figure 1),** basée sur la combinaison des données du gène 18S et de l'unité ribosomique 8,2 Kb, révèle l'individualisation de toutes les espèces (les nœuds sont situés au-delà de l'indice d'agrégation 0.6) bien qu'elles forment des groupements. On souligne ainsi l'isolement de l'espèce M. truncatula (section pachyspireae) à un niveau très précoce (nœud 1.19) alors que les autres espèces se scindent en deux groupes. Le premier groupe rassemble les espèces de la section intertexteae (*M. intertexta* et *M. ciliaris*) tandis que le second, isole l'espèce M. aculeata (section *pachyspireae*) de la classe formée par les espèces *M. polymorpha* (section *leptospireae*) et *M. murex* (section *pachyspireae*).

Figure 1. Dendrogramme correspondant au classement des espèces calculé sur la base de la matrice globale des deux sondes.



L'analyse des profils d'hybridation moléculaire des ADNs ribosomiques révèle une grande variabilité interspécifique au sein du genre Medicago. L'utilisation d'une seule combinaison enzyme/sonde s'avère suffisante pour caractériser chacune des espèces étudiées. Chaque espèce présente en effet des profils caractéristiques susceptibles de la discriminer des autres espèces. Par ailleurs, le dendrogramme Établi sur la base des données des 2 sondes ribosomiques 8,2 Kb et 18S est très partiellement en accord avec la classification botanique (Lesins et Lesins, 1979). Cependant, il concorde avec les données isoenzymatiques obtenues par El Mousadik (1991) au niveau des affinités intergroupes (cas du regroupement de l'espèces *M. murex* de la section *Pachyspireae* avec *M. polymorpha* de la section *Leptospireae*) et au niveau du regroupement des espèces de la même section (cas des espèces *M. intertexta* et *M. ciliaris* qui appartiennent à la section *Intertexteae*).

Les écotypes de chaque espèce étudiée ont été choisis arbitrairement. La plupart des Écotypes sont locaux et spontanés. Deux uniquement sont des cultivars étrangers (*M. murex* zodiac et *M. truncatula jemalong*). Cette diversification dans les origines des Écotypes nous a permis d'analyser d'une part l'influence des facteurs éco-géographiques sur les divergences entre les populations sauvages et d'autres part l'impact de la sélection artificielle sur la diversité génétique intraspécifique. L'exemple type de l'influence éco-géographique est illustré par l'espèce *M. aculeata*. En effet, les profils d'hybridation des ADN ribosomiques ont révélé un large polymorphisme

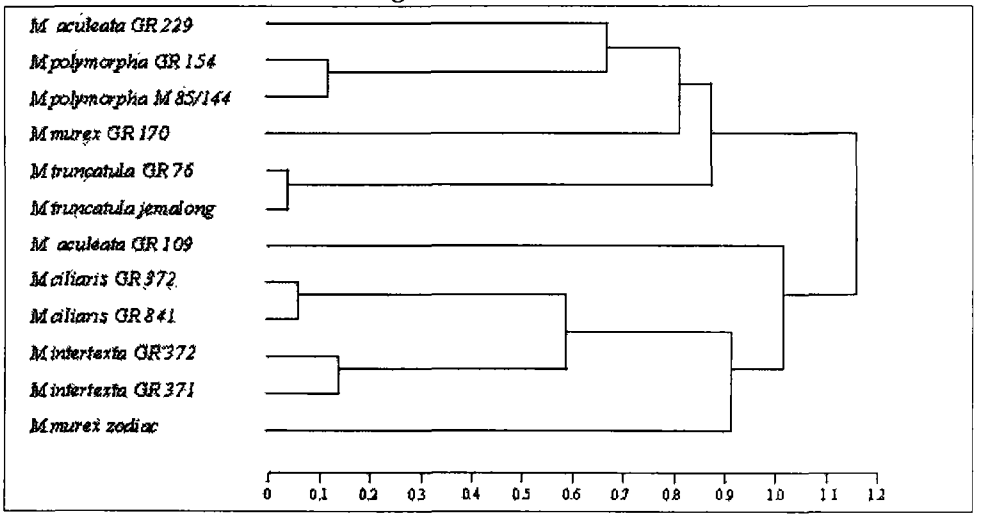
intraspécifique. Chaque écotype présente 1 ou 2 profils (selon la sonde) caractéristiques et sans analogues au sein de l'autre écotype.

En ce qui concerne l'influence de la sélection artificielle, elle peut être élucidée par l'espèce *M. murex*. En effet, l'écotype étranger zodiac (2n=16) montre 2 types de profils avec l'enzyme Eco RI (un profil plus représenté que l'autre). L'écotype local GR170 (2n=14) présente quant à lui 2 autres profils. Il n'y a aucune identité entre les 4 profils présentés par les deux écotypes. La diversité génétique intraspécifique est alors très importante.

Analyse de la variabilité au niveau des populations

Les matrices de distances génétiques inter-populations propres aux mêmes combinaisons étudiées à l'échelle spécifique ont été calculées. Le dendrogramme synthétique **(figure 2)** permet de souligner la forte ressemblance entre les Écotypes de la même espèce (*M. truncatula*, *M. ciliaris*, *M. intertexta* et *M. polymorpha*). Cependant, les espèces *M. aculeata* et *M. murex* marquent des divergences intraspécifiques importantes à cause de certains allèles caractéristiques. Leurs Écotypes correspondants se trouvent ainsi séparés et isolés chacun dans un groupe.

Figure 2. Dendrogramme correspondant au classement des populations calculé sur la base de la matrice globale des deux sondes.



CONCLUSION

Les profils RFLP, en plus de leur exploitation dans l'analyse de la variabilité génétique, peuvent être utilisés pour identifier et cartographier des loci affectant des caractères quantitatifs d'intérêt agronomique. Aussi, la relation existante entre le comportement de divers Écotypes aux facteurs édapho-climatiques et leurs origines géographiques peut être exploitée pour développer et sélectionner des cultivars adaptés aux différentes régions. Il est, par ailleurs, possible de réaliser des hybridations intraspécifiques (cas des Écotypes spontanés de *M. aculeata*) et interspécifiques (*M. truncatula x, M. littoralis*). Ces croisements favorisent le maintien de la diversité génétique et le transfert de gènes de résistance.

Sur le plan technique, l'utilisation du marquage non radioactif à la chimiluminescence est une très bonne alternative pour palier les inconvénients du marquage radioactif.

Bibliographie

1. BIERWERTH S., KAHL G., WEIGAND F., WEISING K., 1992 : Oligonucleotide fingerprinting of plant and fungal genomes: a comparison of radioactive, colorigenic and chemiluminescent detection methods. Electrophoresis, 13: 115-122.
2. BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA, 1993 : The DIG system user's guide for filter hybridization: 90 p.
3. DELLAPORTA S.L., WOOD J., HICKS J.B., 1983 : A plant DNA minipreparation: version II. Plant Mol. Biol. Rep., 1: 19-21.
4. EL MOUSADIK A., 1991 : Analyse de la variabilité génétique des Écotypes marocains du genre Medicago, implication en gestion des ressources phylogénétiques. Thèse option génétique. Fac. Sci. Rabat.
5. FAIVRE-RAMPANT P., BODERGAT R., BERVILLÉ A., 1992 : Une méthode moléculaire de classement des clones de peupliers (Populus) dans les sections Tacamahaca, Aigeiros, Leuce et leucoïdes par des fragments de restriction des unités ribosomiqes. C.R. Acad. Sci. Paris, t. 315, Série III : 133-138.
6. JEANDROZ G., FAIVRE-RAMPANT F., PUGIN A, BOUSQUET J., BERVILLÉ A., 1995 : Organization of nuclear ribosomal DNA and species-specific polymorphism in closely related Fraxinus excelsior and F. Oxyphylla. Theor Appl. Genet., 91: 885-892.
7. KARCHER S.J., 1994 : Non radioactive nucleic acid detection systems. Plant Molecular Biology Manual, F3: 1-25.
8. KABBAJ A., ZEBOUDJ F., PELTIER D., TAGMOUNT A., TERSAC M., DULIEU H., BERVILLÉ A., 1995 : Variation and phylogeny of the ribosomal DNA unit types and 5S DNA in Petunia jussieu. Genetic Recources and Crop Evolution, 42: 311-325.
9. LESINS K.A., LESINS I., 1979 : Genus Medicago (Leguminoseae). A taxogenetic study. Dr. W. Junk, the hague Boston. London.
10. NEI M., 1972 : genetic distance between populations. Am. Nat., 106 : 283-292.
11. Primard C., 1985: Divergences morphologiques et divergences moléculaires: estimation des divergences au niveau des molécules d'ADN. Dans « Les distances génétiques. Estimations et applications ». Eds. Lefort-Boson M. et De Vienne D., : 81-105.
12. SNEATH P.H.A., SOKAL R.R., 1973 : Numerical taxonomy, San Fransisco : Free-man.
13. SOUTHERN E.M., 1975 : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 98: 503-517.
14. ZEBOUDJ F., KABBAJ A., SOSSEY ALAOUI K., PELTIER D., TAGMOUNT A., RAQUIN C., DARMENCY M., MAIZONNIER D., DULIEU H., BERVILLÉ A., 1994 : Variation of ribosomal DNA and inheritance of polymorphisms in 6 Petunia hybrida hort lines. Agronomie, 14: 485-495.

D3 : Applications des marqueurs moléculaires à l'étude de la résistance aux virus de la mosaïque jaune et de la jaunisse nanisante chez l'orge

BENSALAH B.[1,2,3], STEYER S.[1], FROIDMONT F.[1], JACQUEMIN J.M.[1]

[1] Centre de Recherches Agronomiques de l'Etat- Gembloux, Belgique; [2] Faculté des Sciences Agronomiques- Gembloux, Belgique; [3] SCSP (DPVCTRF), Rabat, Maroc.

INTRODUCTION

Chez l'orge, les virus de la mosaïque jaune (VMJO = virus de la mosaïque jaune et VMMO = virus de la mosaïque modérée) et le virus de la jaunisse nanisante (VJNO) retiennent particulièrement l'intérêt tant des chercheurs que des agriculteurs. Ces virus sont responsables de maladies présentant une incidence économique majeure pour la culture de l'orge. La jaunisse nanisante peut causer des dégâts importants chez toutes les céréales cultivées, tandis que la mosaïque jaune représente l'une des plus importantes maladies des orges d'hiver en Europe et en Asie du Sud-Est (Kaiser et Friedt, 1992).

Les virus concernés possèdent une grande complexité, eu égard à la variabilité des souches, ainsi qu'à la diversité des relations avec leurs vecteurs de transmission et leurs hôtes. La mosaïque jaune de l'orge, transmise par *Polymyxa graminis* Led. et spécifique du genre *Hordeum* (Adams *et al.*, 1988), est causée par deux virus distincts (Adams *et al.*, 1987 ; Laing et Coutts, 1988 ; Huth et Adams, 1990 ; Kashiwazaki *et al.*, 1989): le virus de la mosaïque modérée (VMMO ou BaMMV) et le virus de la mosaïque jaune (VMJO ou BAYMV). Des études récentes effectuées dans plusieurs pays d'Europe, ont montré l'existence de nouvelles souches virales, capables de surmonter le gène ym4 exploité jusqu'ici en Europe (Huth, 1991; Hariri et *al.*, 1990 ; Froidmont et *al.*, 1993 ; Kummert, 1993 ; Steyer *et al.*, 1995). Ce gène de résistance ym4, localisé sur le bras long du chromosome 3 (Friedt *et al.*, 1990 ; Kaiser et Friedt, 1992) est utilisé depuis plusieurs années avec succès en sélection. Une sonde MWG 10 marque ce gène et permet de différencier les plantes sensibles des résistantes (Graner et Bauer 1993).

Le virus de la jaunisse nanisante de l'orge, décrit par Oswald et Houston en 1951, est transmis par plusieurs espèces de pucerons. Bien que limité aux graminées, le VJNO, grâce à l'amplitude de sa gamme d'hôtes, ainsi qu'à leur diversité, peut se multiplier sous diverses conditions environnementales. La jaunisse nanisante constitue l'une des maladies des céréales les plus difficiles à étudier à cause des interactions biologiques complexes existant entre la plante-hôte, le virus et les pucerons vecteurs (Qualset, 1984). Un gène Yd2, localisé sur le chromosome 3 de l'orge (Schaller et *al.*, 1964) et conférant la tolérance à ce virus, est largement utilisé en sélection.

La recherche de génotypes d'orge résistants à ces virus, constitue l'une des mesures de contrôle les plus intéressantes par ses aspects économique et écologique. Le développement des marqueurs moléculaires et leur application à la sélection permet de mettre ces résistances en évidence, indépendamment des interactions du milieu. Une étape de recherche de liaisons entre ces marqueurs moléculaires et des gènes à valeur agronomique est cependant nécessaire. Le présent travail a, en effet, pour objet de caractériser par des marqueurs moléculaires des gènes de résistance à la jaunisse nanisante et à la mosaïque jaune de l'orge.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal, virus et vecteur de transmission

Dans le cas de la mosaïque jaune de l'orge (MJO), 26 génotypes d'orge ont été caractérisés par hybridation moléculaire de type « Southern blot », à l'aide de la sonde MWG10. La descendance F2, issue du croisement entre la lignée résistante 'L 541' et la variété sensible 'Travelling', ainsi que les parents ont été semés au champ à Gembloux et à Huccorgne, infectés respectivement par le VMMO, le VMJO et par ces deux derniers et le nouvel isolat VMJO-EH (souche VMJO, isolée à Huccorgne (H) à partir de la variété 'Express').

L'évaluation du polymorphisme entre les lignées 'CF 91.51', '5607.042', '6258.002' et la variété 'Puffin', choisies parmi le matériel végétal de la Station d'Amélioration des Plantes de Gembloux pour leur résistance ou leur sensibilité au VJNO et pour leur valeur brassicole, a été réalisée. 'CF 91.51' et '6258.002' représentent les lignées parentales résistantes au VJNO. La descendance F_2, composée de 88 plantes et issue du croisement « CF91.51 » x « 5607.042 », a été utilisée dans l'étude de la ségrégation pour la résistance au VJNO-PAV et à l'analyse de liaison.

Le vecteur *Rhopalosiphum padi* a servi, dans ce travail, pour la transmission de la souche VJNO-PAV, isolée à Gembloux.

Clones RFLP et analyse de liaison

Trente-trois clones, hybridant à des loci sur le groupe de liaison 3 des *triticeae* et fournis par différents laboratoires, ont été utilisés comme sondes pour identifier des loci RFLP liés au gène Yd2. Ces clones sont issus de différentes banques d'ADN génomique (ABG, et MWG) ou de banques ADNc (BCD, ABC, CDO) d'orge et d'avoine. D'autres clones (WG, PSR) proviennent de banques génomiques de froment.

L'analyse de liaison dans la descendance F_2 du croisement 'CF51.91' x '5607.042' a été réalisée à l'aide du logiciel Mapmaker version II (Lander *et al.*, 1987). Les valeurs de recombinaison sont converties en centimorgans par l'application de la fonction Kosambi (Kosambi, 1944).

Extraction de l'ADN génomique de l'orge, digestion et hybridation moléculaire

Chaque échantillon de 0.5 à 1 g de feuilles, est broyé dans de l'azote liquide et resuspendu dans 10 ml de tampon d'extraction (100 ml Tris-HCl, 100 ml NaCl, 50 ml EDTA, SDS 2 %, pH 8,0). Après une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25 : 24 : 1), l'ADN est précipité à l'isopropanol (0,6 vol). Il est resuspendu dans du tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) et incubé pendant 1 H à 37 °C en présence de RNase A (25 µg/ml). Une autre extraction au phénol-chloroforme est réalisée, suivie d'une extraction au chloroforme. L'ADN est mis en solution dans du TE et conservé à 4°C.

L'ADN génomique (10 µg) des différentes variétés-parents ainsi que celui des plantes F_2 (7-10 µg) est mis à digérer dans un volume de 50 µl en présence de 35 à 50 unités de l'enzyme de restriction appropriée et à la température requise. Après électrophorèse sur gel de 0,8 % d'agarose et traitement du gel, le transfert southern des fragments d'ADN est effectué par capillarité en 20x SSC sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond N^+, Amersham). L'ADN est fixé irréversiblement sur la membrane en traitant cette dernière avec une solution NaOH 0.4 M.

Le fragment d'ADN à utiliser comme sonde est isolé de son plasmide et marqué en présence de 40 µCi d'α^{32}PdCTP (3000 µci / mmole) selon la méthode de marquage par élongation d'amorces aléatoires (protocole du « Random Primed DNA Labeling Kit » de Boehringer). L'hybridation est réalisée dans 5x SSC pendant 16 H à 65 °C et les filtres sont lavés successivement en 2x SSC, 0,1 % SDS, en 1x SSC, 0,1 % SDS et finalement mis en autoradiographie durant 8-10 jours.

RÉSULTATS

Mosaïque jaune de l'orge

• *Analyse des génotypes d'orge résistants au VMMO, au VMJO et au VMJO-EH par marquage moléculaire*

Une évaluation de la résistance chez 26 génotypes d'orge d'origine différente vis-à-vis du complexe des virus de la mosaïque jaune a été effectuée au champ, dans deux localités (Huccorgne et Gembloux). Les résultats portant sur notre analyse de ces différents génotypes par hybridation moléculaire, ainsi que leur statut de résistance ou sensibilité dans les deux sites d'essai sont synthétisés au tableau 1. À Huccorgne, seulement 5 cultivars et/ou lignées présentent des réactions sérologiques avec les anticorps monoclonaux dressés contre le VMMO et le VMJO ; 12 cultivars extériorisent des symptômes de mosaïque tandis que 9 autres cultivars et/ou lignées ne montrent pas de symptômes.

En effet, les cultivars et lignées « L541 », « RDA72.49 », « Jochiweon covered », « Comte de Serres », « Marne », « Escourgeon de Champagne », « Super Champenois », « Ile de Ré » et « Mushinchiang 3 » sont résistants au VMMO, VMJO et au nouvel isolat VMJO-EH, tandis que « Neger » et « Mielmont » étaient sensibles à ce complexe de virus, montrant des réactions similaires à celles présentées par les témoins sensibles « Gerbel », « Arton » et « Truitel ». Les cultivars « Express », « L 28.28 », « Bison », « Franka », « Torrent », « Mélusine », « Target », « Nordic », « Énergie », « Turkey524 », « Gaulois » et « Hatif de Grignon » sont résistants aux souches communes (VMMO et VMJO) présentes à Gembloux mais sont sensibles à Huccorgne au VMJO-EH.

L'ADN extrait de ces différents génotypes d'orge et digéré par l'enzyme BamH1, a été hybridé à la sonde MWG10. Comme l'ont observé Graner et Bauer (1993), la sonde MWG10 détecte chez les génotypes portant le gène ym4 (« Express », « Franka »...) une bande à 1,8 kb, caractérisant le phénotype résistant, tandis qu'une bande située à 2,2 kb est observée chez les variétés sensibles telles que « Truitel », « Arton » ou « Gerbel ».

Les résultats obtenus lors de l'analyse des différents génotypes par hybridation moléculaire (figure 1) confirment ceux de Graner et Bauer. Ils montrent, en effet, que chez les génotypes « Express », « Mélusine », « Target », « L 28.28 », « Bison », « Gaulois », « Torrent », « Nordic », « Franka » et « Énergie », la sonde MWG10 détecte une bande à 1.8 kb, caractérisant les génotypes portant le gène ym4.

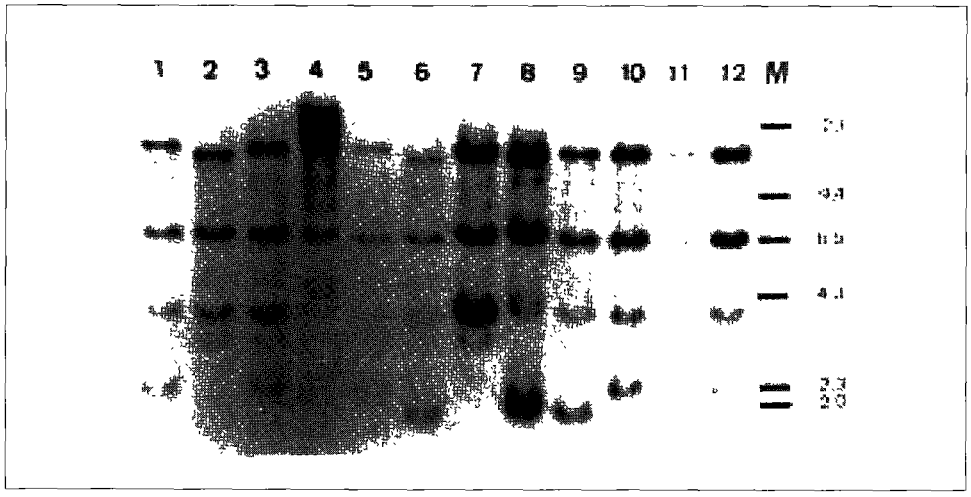
En outre, nous avons mis en évidence chez les génotypes « Jochiweon covered », « L541 » et « RDA72.49 », la présence d'une nouvelle bande située à 2,7 kb, avec absence de la bande de 1,8 kb. La bande située à 2,7 kb doit donc correspondre à l'allèle de résistance vis-à-vis des types viraux de la mosaïque jaune présents à Gembloux et à Huccorgne, chez ces trois génotypes.

La sonde MWG10 détecte aussi chez les anciennes variétés « Comte de Serres », « Marne », « Escourgeon de Champagne », « Super Champenois », « Ile de Ré » et « Mushinchiang 3 » résistantes aux virus VMMO et VMJO et à la souche VMJO-EH,

une bande à 2,2 kb indiquant la présence de l'allèle de sensibilité au locus ym4, mais ne met pas en évidence de bande particulière susceptible de correspondre au gène responsable de la résistance chez ces variétés, laquelle résistance serait dès lors distincte de celle conférée par ym4. Des résultats analogues ont été obtenus pour les variétés « Hâtif de Grignon » et « Turkey 524 », résistantes aux souches communes VMMO et VMJO.

Par ailleurs, nous avons observé chez « RDA72.49 » la présence de 2 allèles, celui de sensibilité (2,2 kb) et celui de résistance (2,7 kb), indiquant un état hétérozygote.

Figure 1. Autoradiographie après analyse Southern par la sonde MWG10 de l'ADN de variétés d'orge digéré par BamHI.



1 : Turkey 524 ; 2 : Jochiweon Covered ; 3 : RDA 72 49 ; 4 : Ile de Ré ; 5 : Escourgeon de Champagne ; 6 : L 28-28 ; 7 : L 541 ; 8 : Franka ; 9 : Express ; 10 : Travelling ; 11 : Truitel ; 12 : Gerbel ; M . marqueur : ADN digéré Hind III.

• *Analyse de la descendance F_2 issue du croisement 'L 541' (Pr) x 'travelling' (Ps)*

Pour identifier le mode d'hérédité du nouveau caractère de résistance aux virus de la mosaïque jaune de l'orge, nous avons analysé la descendance F_2 du croisement entre « L541 » (parent résistant) et « Travelling » (parent sensible). La descendance F_2 a été testée en champ infecté par les souches communes (VMMO, VMJO) à Gembloux et en champ infecté par ces mêmes souches communes et la nouvelle souche VMJO-EH à Huccorgne, avec évaluation des symptômes et quantification sérologique des virus par le test Elisa.

Sur base des symptômes, le taux global d'infection est semblable à Gembloux et à Huccorgne (≈ 74 %) : nos résultats montrent que la ségrégation observée, aussi bien à Gembloux qu'à Huccorgne, est compatible avec le rapport 1R: 3S, impliquant un gène unique et récessif (χ^2 = 0.013 à Gembloux et 0.012 à Huccorgne).

Les résultats obtenus en Elisa indiquent qu'à Gembloux, 65,7 % et 38,2 % des plantes F_2 sont infectées respectivement par le VMMO et le VMJO, tandis que le taux des infections mixtes est de 34,3 %. L'infection par l'un ou l'autre virus, correspond à un taux de 69,6 % des 102 plantes testées.

À Huccorgne, il résulte des tests sérologiques que 15,1 % et 36,8 % des plantes F_2 sont respectivement infectées par VMMO et VMJO et seulement 6,6 % des plantes

montrent une infection mixte par les souches communes VMMO et VMJO. 45,3 % des plantes F_2 sont infectées à Huccorgne par le VMMO ou leVMJO ou par les deux virus.

Du fait de l'absence de réaction sérologique chez 28 plantes (26,4 %) présentant des symptômes de mosaïque, le mode d'hérédité de la résistance au complexe viral de la mosaïque jaune, à Huccorgne, ne peut être déterminé sur la base du test Elisa tant qu'un antisérum dressé contre l'isolat viral VMJO-EH n'est pas disponible.

Pour comparer les observations des symptômes au champ et les résultats des tests sérologiques effectués sur la descendance F_2 (à Gembloux et à Huccorgne) à l'analyse moléculaire, nous avons réalisé l'hybridation de la sonde MWG10 à l'ADN de chaque plante F_2 des 2 populations testées à Gembloux et à Huccorgne. Sur base de l'analyse de ségrégation du marqueur MWG10 dans la F_2 ségrégeant pour la résistance au complexe viral de la mosaïque jaune de l'orge, nos résultats montrent qu'à Gembloux, 20.6 % des plantes F2 ont le génotype du parent résistant ('L 541'), 22,5 % ont celui du parent sensible ('Travelling') et 56.8 % sont des recombinants. Sept plantes (6,9 %) sont hétérozygotes, bien que sur base des symptômes et des tests sérologiques, elles ont été notées résistantes. A Huccorgne, 24,5 % ont le gène de résistance identifié par la bande de 2,7 kb, 28,4 % ont l'allèle de sensibilité et 47,1 % sont des hétérozygotes. 4,9 % des plantes (5 plantes) classées comme résistantes, étaient aussi hétérozygotes. La ségrégation observée est compatible avec le rapport 1 : 2 : 1 (χ^2= 0,67 à Huccorgne et 2,0 à Gembloux à p = 0,05) indiquant que la résistance aux souches communes (VMMO et VMJO), ainsi qu'au VMJO-EH à Gembloux et à Huccorgne est sous contrôle d'un gène récessif unique.

Tableau 1 : Réactions des différentes lignées ou variétés d'orge à Huccorgne et à Gembloux ; taille du fragment spécifique obtenu après digestion de l'ADN génomique par BamHI et hybridation avec la sonde MWG010.

Variétés et lignées testées	Huccorgne	Gembloux	taille du fragment spécifique (kb)
JOCHIWEON COVERED	R	R	2.7
MUSHINCHIANG 3	R	R	2.2
TURKEY 524	S	R	2.2
EXPRESS	S	R	1.8
MELUSINE	S	R	1.8
TARGET	S	R	1.8
L28.28	S	R	1.8
HATIF DE GRIGNON	S	R	2.2
MARNE	R	R	2.2
BISON	S	R	1.8
ILE DE RE	R	R	2.2
ESCOURGEON DE CHAMPAGNE	R	R	2.2
GAULOIS	S	R	1.8
COMTE DE SERRES	R	R	2.2
FRANKA	S	R	1.8
L541	R	R	2.7
ARTON	S	S	2.2
RDA72.49	R	R	2.7-2.2
NEGER	S	S	2.2
TORRENT	S	R	1.8
GERBEL	S	S	2.2
TRUITEL	S	S	2.2
MIELMONT	S	S	2.2
NORDIC	S	R	1.8
ENERGIE	S	R	1.8
SUPER CHAMPENOIS	R	R	2.2

R = résistant. S = Sensible.

Jaunisse nanisante de l'orge

La recherche de liaisons génétiques entre des marqueurs de type RFLP et le gène Yd2 de résistance au virus de la jaunisse nanisante de l'orge (VJNO), localisé sur le chromosome 3, est entreprise par l'étude de ségrégation pour la résistance au VJNO et de ces marqueurs au sein d'une population F_2

• *Sondes détectant un polymorphisme de restriction entre les lignées du croisement 'CF91.51' x '5607.042'*

L'ADN génomique des variétés et lignées constituant les différents croisements réalisés a été clivé par 34 enzymes de restriction (EcoRI, HindIII, EcoRV, DraI, BglII, PvuII, SacI, XbaI, BamHI, SspI, ApaI, KpnI, PstI, ScaI, NdeI, XhoI, SmaI, BclI, HpaI, ClaI, StuI, SmaBI, PmaC1, EcoRII, NheI, PvuI, SpeI, ApaLI, NcoI, NsiI, BsiMI, BspM90I, Bsp119I, SpHI) et hybridé à 33 sondes.

L'hybridation de ces sondes à l'ADN génomique de 4 variétés/lignées parentales de deux croisements, après restriction, a mis en évidence des profils d'hybridation spécifiques pour ces variétés /lignées étudiées.

Pour l'orge, espèce diploïde, les sondes à « copie unique » présenteront en « Southern blot » un profil d'hybridation à l'ADN constitué d'un seul signal correspondant au génome de cette espèce. Ainsi, parmi les sondes testées, la presque totalité sont soit à « copie unique », soit « peu répétées » et trois sondes seulement sont des sondes « multicopies » (KSUA3C, KSUF2B, PSR56) présentant des profils complexes difficiles à interpréter.

Au total, 17 sondes (51,5 %) montrent respectivement des fragments d'ADN polymorphes entre les parents du croisement 'CF91.51' x '5607.042' avec au moins une enzyme de restriction. Les sondes, révélant du polymorphisme entre les couples de lignées considérées, sont en majorité constituées de fragments d'ADN génomique d'orge (70,6 %).

Les sondes polymorphes sont hybridées à l'ADN de 88 plantes F_2, issues de ce croisement et à celui des parents, digérés par l'enzyme adéquate. La ségrégation des signaux obtenus au sein de cette population F_2 est analysée.

• *Ségrégation pour la résistance au VJNO dans la descendance F2 issue du croisement 'CF91.51' x '5607.042'.*

L'infection a été effectuée en conditions contrôlées sous serre sur les plantes F_2 du croisement « CF91.51 » x « 5607.042 ». La transmission de l'isolat PAV par le vecteur *R. padi* aux plantes F_2 et aux 2 parents, au stade 2-3 feuilles, a permis de vérifier l'expression phénotypique du gène Yd2 de résistance au VJNO sur ces plantes. Les résultats obtenus avec le test Elisa, effectué sur racines, 14 j après inoculation de ces plantes, ainsi que l'observation des symptômes permettent de différencier les plantes résistantes et les plantes sensibles.

Il ressort des résultats obtenus en Elisa que les valeurs moyennes sont de 0,142 pour la descendance F_2, de 0.018 pour le parent résistant (« CF91.51 ») et de 0,132 pour le parent sensible (« 5607.042 »). Ces valeurs montrent, en effet, des différences significatives entre les 2 parents ainsi qu'au niveau de la descendance F_2. En effet, l'analyse de la population F_2 par sérologie présente respectivement des minima de 0,001 et des maxima de 0,573, indiquant un étalement des valeurs Elisa et mettant en évidence une ségrégation de la résistance au VJNO au sein de la population F_2.

Le pourcentage de plantes infectées a été calculé sur la base du test Elisa (au seuil de A405 = 0,054) : dans le cas de la population F_2, celui-ci est de l'ordre de 67,9 %. Il est de 5,3 % pour le parent résistant et de 97,1 % 0,054 pour le parent sensible.

L'analyse par le test χ^2 aussi bien sur base des symptômes (χ^2=1,44 à p= 0,05) que sur base du test Elisa (χ^2= 2,68 à p = 0,05) montre qu'on peut attribuer la résistance à l'action d'un gène récessif puisque, pour cette population F_2, la ségrégation observée est compatible avec le rapport 1R : 3 S. Ainsi, le contrôle génétique de la résistance apparaît monogénique et récessif chez la lignée ' CF91.51'. Le bon comportement de résistance de cette lignée lors des infections implique une résistance à la multiplication du VJNO-PAV car les plantes contrôlées montrent une faible concentration en virus.

• *Analyse de ségrégation des marqueurs dans la descendance F_2 issue du croisement 'CF91.51' x '5607.042' et distances génétiques*

Les clones mettant en évidence du polymorphisme entre les parents du croisement 'CF91.51' x '5607.042' sont utilisés dans l'analyse « Southern » de l'ADN de 88 plantes F_2 pour l'étude de ségrégation. La figure 2 montre la ségrégation du marqueur ABG453 dans la descendance F_2 ségrégeant pour la résistance au VJNO.

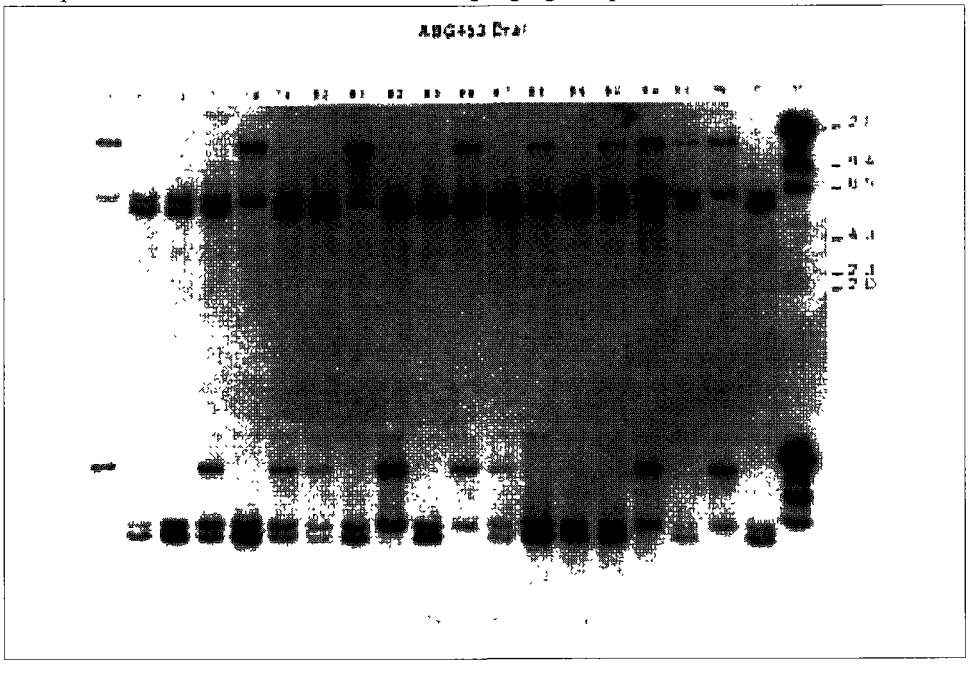


Figure 2. Ségrégation du marqueur ABG 453 dans la descendance F2.
Pr : parent résistant ; Ps : parent susceptible ; 12-113 : plantes.

Le test χ^2 a été utilisé pour déterminer le meilleur ajustement des données de ségrégation au rapport théorique 1:2:1 attendu. Huit des 13 loci montrent une déviation vis-à-vis du rapport attendu ($p < 0.05$). La plupart de ces loci ont un excès de l'un ou l'autre parent, alors que les autres loci ont un nombre d'hétérozygotes en excès (tableau 2). Ces loci présentent donc des profils de ségrégation déviés. Le gène Yd2 de résistance au VJNO ségrège comme caractère monogénique et ne dévie pas du rapport théorique 1:3 attendu.

Tableau 2. Ségrégation du gène Yd2 et de 12 marqueurs dans la descendance F_2 issue du croisement « CF91.51 » x « 5607.042 ».

Population F_2 du croisement « CF 91.51 » x « 5607.042 »									
		A	B	H	'-'	Rapport théorique	χ^{22}	P	N
Yd2-E	Test Elisa	24	64	0	0	1-3	0.24	0.60-0.70	88
Yd2-S	Symptomatologie	27	61	0	0	1-3	1.23	0.20-0.30	88
Marqueurs/ enzyme	MWG595/XbaI	23	21	42	2	1-2-1	0.15	0.90-0.95	86
	MWG582/XbaI	24	23	40	1	1-2-1	0.59	0.70-0.80	87
	BCD828/BamHI	29	14	27	18	1-2-1	10.08	0.001-0.005	70
	ABG453/DraI	38	12	28	10	1-2-1	23.54	<0.0005	78
	MWG973/ApaLI	35	20	18	15	1-2-1	24.92	<0.0005	73
	MWG803/NcoI	29	24	30	5	1-2-1	6.98	0.025-0.05	83
	ABG396/HindIII	28	33	20	7	1-2-1	21.38	<0.0005	81
	KsuA3C/DraI	33	14	32	9	1-2-1	11.99	0.001-0.005	79
	Dor 4 /ApaLI	22	22	39	5	1-2-1	0.34	0.80-0.90	83
	WG110 /DraI	31	15	33	9	1-2-1	8.62	0.005-0.01	79
	PSR394 /SacI	25	24	18	21	1-2-1	14.37	0.0005-0.001	67
	MWG584 /EcoRV	55	6	22	5	1-2-1	76.18	<0.0005	83

Yd2-S = ségrégation du gène Yd2 de résistance au VJNO dans la population F_2 sur base de la symptomatologie
Yd2-E = ségrégation du gène Yd2 sur base du test Elisa.

• *Distances génétiques et établissement de la carte de liaison à partir de la ségrégation des marqueurs dans la descendance F2 du croisement 'CF91.51'x'5607.042'*

Les tests de liaison entre marqueurs et leur localisation les uns par rapport aux autres ont été réalisés à l'aide du programme Mapmaker en comparant les données phénotypiques recueillies dans le cas du gène Yd2 à celles des RFLP.

- Distances génétiques

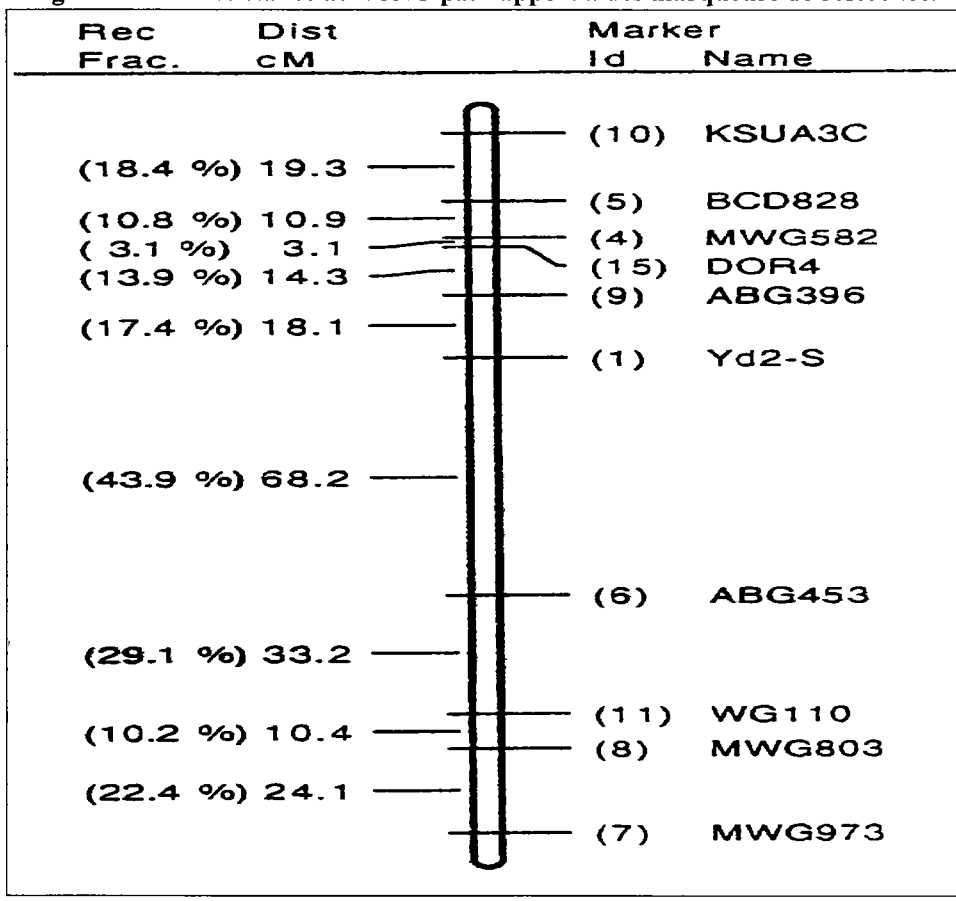
L'analyse « deux points » nous a permis de déterminer la fraction de recombinaison θ et le lodscore associés aux couples de marqueurs liés. Les loci sont considérés non liés si le lodscore est < à 3,0 (une vraisemblance < à 1000 contre 1) et un θ ≥ à 0,4.

L'ordre le plus probable et la localisation des 13 loci les uns par rapport aux autres ont été établis par une analyse multipoints. Cette dernière considère tous les loci et détermine l'ordre des loci compatibles avec les résultats obtenus dans l'analyse « trois points ».

- Établissement de la carte de liaisons génétiques

Sur base de l'analyse multiple de liaison du programme Mapmaker, la carte de liaison génétique pour les marqueurs RFLP et le locus Yd2, ségrégeant au sein de la population F_2 issue du croisement 'CF91.51' x '5607.042', a été dressée (figure 3). Sur cette carte, le gène Yd2 de résistance au VJNO est situé dans la région centromérique proche du marqueur ABG396.

Figure 3. Carte de liaison génétique du chromosome 3 de l'orge avec localisation du gène Yd2 de résistance au VJNO par rapport à des marqueurs de référence.



DISCUSSION

L'utilisation de la sonde MWG10 nous a permis de mettre en évidence un marqueur lié au gène récessif de résistance chez 3 génotypes résistants au complexe viral de la mosaïque jaune de l'orge (« L 541 », « RDA 72.49 » et « Jochiweon covered ») tout en montrant pour d'autres génotypes résistants (« Comte de Serres », « Marne », « Mushinchiang 3 », « Turkey 524 », « Hâtif de Grignon », « Escourgeon de Champagne », « Ile de Ré », « Super Champenois »), une hérédité de la résistance sous contrôle d'un déterminisme génétique différent de celui détecté par la sonde MWG10.

Notre étude confirme les résultats de Graner et Bauer (1993). L'analyse RFLP, utilisant la sonde MWG10, a montré une parfaite discrimination entre les génotypes résistants et sensibles, corrélée avec le phénotype des cultivars testés. À Huccorgne, les résultats des tests Elisa ne sont pas corrélés à l'observation des symptômes, du fait de la présence de l'isolat particulier VMJO-EH vis-à-vis duquel on ne dispose pas encore d'anticorps pour la détection sérologique. Des symptômes de mosaïque, correspondant vraisemblablement à la souche 'Express', ont été observés sur 28 plantes (26,4 %), en l'absence de réactions sérologiques.

Le VMJO est présent dans des proportions similaires dans les deux essais de Gembloux et de Huccorgne (38,2 % et 36,8 %). Le taux des infections mixtes (VMMO et VMJO) est significativement plus élevé à Gembloux (34,3 %) qu'à Huccorgne (6,6). Le faible nombre de plantes où la présence simultanée des 2 virus a été décelée pourrait être dû à un faible inoculum en VMMO au moment de prélèvement des échantillons (fin avril), du fait qu'il s'agit d'un virus thermophile, mis en évidence plus tardivement que le VMJO dans les plantes virosées.

Actuellement, la résistance chez les cultivars adaptés est principalement basée sur le gène ym4 qui est efficace vis-à-vis uniquement du VMMO et du VMJO. La lignée 'L 541', immune aux trois souches virales et qui porte le gène identifié par la bande 2,7 kb et localisé au locus ym4 sur le chromosome 3L, pourrait être utilisée en tant que géniteur de résistance dans un programme de sélection.

À côté des schémas classiques d'amélioration des plantes, la sélection assistée par marquage moléculaire pourra sans doute donner naissance à de nouvelles stratégies de sélection pour la résistance vis-à-vis des virus des mosaïques de l'orge. La très grande majorité des géniteurs de résistance est, en effet, composée de génotypes peu adaptés aux conditions de culture de l'Europe de l'Ouest. Ce sont des variétés locales ou des variétés asiatiques de type printemps, très sensibles au froid, à la verse et aux maladies (en particulier *Rhynchosporium secalis*). Le marquage de ces gènes de résistance devrait permettre d'accélérer leur introgression dans des génotypes adaptés aux conditions de culture de l'Europe.

La mise en évidence de nouveaux gènes (Graner *et al.*, 1995) indique une large diversité génétique pour la résistance au complexe viral de la mosaïque jaune de l'orge, mais également une spécificité vis-à-vis de ces différents virus ou souches virales. Les marqueurs moléculaires liés à ces gènes de résistance au complexe viral de la mosaïque jaune, offre l'opportunité de combiner efficacement ces gènes dans des variétés performantes sensibles à ces virus, par le déploiement pyramidal.

Sur base de la symptomatologie et du test Elisa effectué sur racines, nous avons identifié une descendance F_2 issue du croisement 'CF91.51' x 5607.042' pour laquelle la ségrégation pour la résistance au VJNO a été nettement observée. Nous avons réalisé une carte RFLP du chromosome 3 de l'orge à partir de cette descendance F_2, avec localisation du gène Yd2 par rapport à des marqueurs RFLP de référence. Sur les 33 sondes testées, 17 sont analysées pour la ségrégation, alors que les autres produisent soit des profils de bandes complexes soit sont monomorphes et ne sont donc pas cartographiées. La recherche de marqueurs RFLP, AFLP plus étroitement liés au gène Yd2 est en cours.

Bibliographie

1. ADAMS M.J., SWABY A.G., JONES P. (1987) Occurrence of two strains of barley yellow mosaic virus in England. Plant Pathol **36**, 610-612.
2. ADAMS M.J., JONES P., SWABY A.G. (1988) The effect of cultivar used as host for *Polymyxa graminis* on the multiplication and transmission of barley yellow mosaic virus (BaYMV). *Ann. Appl. Biol.* 110, 321-327.
3. FRIEDT W., ORDON F., GÖTZ R. and KAISER R. (1990) Bodenbürtige Krankheiten, eine fortdauernde Herausforderung für die Pflanzenzüchtung-beleuchtet am Beispiel der Gelbmosaik-virose der Gerste. *Ber Arbeitstag Saatzuchtl Gumpenstein* 40, 27-38.
4. FROIDMONT F., MAROQUIN C., STEYER S. (1993) La sélection d'orges résistantes à la mosaïque. *Parasitica* 49 (3-4), 107-114.
5. GRANER A., BAUER E. (1993) RFLP mapping of the ym4 virus resistance gene in barley. Theor Appl Genet 86, 689-693.
6. GRANER A., BAUER E., KELLERMANN A., PROESELER G., WENZEL G., ORDON F. (1995) RFLP analysis of resistance to the barley yellow mosaic virus complex. Agronomie 15, 475-479.
7. HARIRI D., FOUCHARD M., LAPIERRE H. (1990) Resistance to barley yellow mosaic virus and barley mild mosaic virus in barley. (Proc. 1st Symp. Intern. Working Group Plant Viruses with fungal vectors, Braunschweig, August 21-24, 1990, 109-112). Phytoma - La Defense des végétaux 429, Juin 1991.
8. HUTH W. (1991) Verbreitung der gelbmosaikviren, BaYMV, BaMMV and BaYMV-2 und Screening von Gerstensorten auf Resistenz Gegenüber BaYMV-2. Nachrichtenbl. Deutscher Pflanzenschutzdienst 43, 233-237.
9. HUTH W., ADAMS M.J. (1990) Barley Yellow Mosaic Virus (BaYMV) and BaYMV-M : two different viruses. Intervirology 31, 38-42.
10. KAISER R., FRIEDT W. (1992) Gene for resistance to barley mild mosaic virus in German winter located in chromosome 3L. *Plant Breeding* 108, 169-172.
11. KASHIWAZAKI S., HAYANO Y., MINOBE Y., OMURA T., HIBINO H., TSUCHIZAKI T. (1989) Nucleotide sequence of the capsid protein gene of barley yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 70, 3015-3023.
12. KOSAMBI D.D. (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12, 172-175.
13. KUMMERT J. (1993) Viroses transmises par Polymyxa. Le diagnostic des agents viraux : techniques immunologiques et hybridation moléculaire.I: Diagnostic et caractérisation des agents de la mosaïque jaune de l'orge par le test sérologique ELISA. Parasitica 49 : 69-87.
14. LAING K.G., COUTTS R.H.A. (1988) The occurrence of two strains of barley yellow mosaic virus in England. *Neth. J. Pl. Path.* 94, 221-224.
15. LANDER E.S., GREEN P.G. ABRAHAMSON J., BARLOW A., DALY M.J., LINCOLN S.E., NEWBURG L. (1987) MAPMAKER: An interactive computer package for construction primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1, 174-181.
16. QUALSET C.O. (1984) Evaluation and breeding methods for barley yellow dwarf resistance, 72-80. In : Barley yellow dwarf, a proceedings of the workshop. P. A. Burnett ed. CIMMYT, Mexico, D.F., Mexico. 209 pp.
17. SCHALLER C.W., QUALSET C.O., RUTGER J.N. (1964) Inheritance and linkage of the Yd2 gene conditioning resistance to the barley yellow dwarf virus disease in barley. *Crop Sci.* 4, 544-548.
18. STEYER S., FROIDMONT F., KUMMERT J. (1995) Characterization of a resistance-breaking BaYMV isolate from Belgium. Agronomie 15, 433-438.

D4 : Étude de la variabilité d'*Helianthus annuus* sauvages

SERIEYS H., QUILLET M.C., KAAN F., BERVILLÉ A.

INRA, Unité de Recherches 380, Génétique et Amélioration des Plantes, 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France. Correspondance F.Kaan : téléphone 33 4 99 61 22 33, fax 33 4 67 54 04 15. Courrier électronique kaan@ensam.inra.fr

INTRODUCTION

Le genre *Helianthus* compte 49 espèces toutes originaires d'Amérique du nord (Schilling et Heiser, 1981). Il contient 4 sections : Chaque section contient des espèces dites diploïdes (2n=34) dont l'origine amphiploïde est en cours de validation (Sossey-Alaoui *et al.* 1994).

Section Ciliares : 6 espèces pérennes de petit développement originaires de l'Ouest de l'Amérique du Nord (génomes CC).

Section Atrorubentes : 31 Espèces pérennes originaires de toute l'Amérique du Nord dont *Helianthus tuberosus*, le topinambour hexaploïde (génomes CD).

Section Agrestes : 1 espèce annuelle isolée.

Section Helianthus : 11 espèces annuelles de toute l'Amérique du Nord (génomes CH) dont *Helianthus annuus* sauvage et sa forme cultivée *Helianthus annuus macrocarpus*, le tournesol.

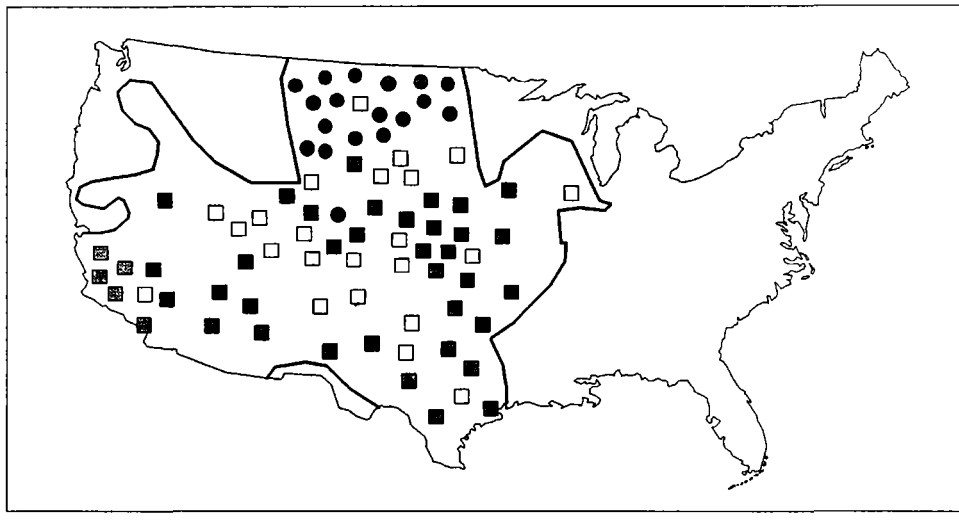
Les formes sauvages de l'espèce *H. annuus* sont originaires de l'Ouest de l'Amérique du Nord (États-Unis, Mexique, Canada) (figure 1). Comparées aux formes domestiques, les formes sauvages sont caractérisées par une forte ramification, les plantes portent de nombreux petits capitules de diamètre inférieur à 10 cm, les semences sont petites (poids de 1000 grains inférieur à 10 g). Physiologiquement, la différence la plus marquante entre sauvages et cultivés réside dans la germination. Les semences d'*H. annuus* sauvages sont dures et ne germent qu'après scarification et traitement hormonal. La biologie florale est caractérisée par l'entomophilie et une autostérilité presque complète, confirmée dans notre étude.

Les espèces annuelles d'*Helianthus* sont sympatriques des *H. annuus* sauvages d'Amérique du Nord. Des hybridations et introgressions sont probablement fréquentes. Elles ont pu donner naissance à des espèces hybrides telles *H. anomalus* (Rieseberg *et al.*, 1995).

Les conditions et le ou les lieux de domestication restent hypothétiques. Heiser (1985) a suggéré que *H.annuus* sauvage a été utilisé par les premiers américains comme aliment, puis est devenu une plante qui accompagnait l'homme dans ses campements, et a été ainsi introduite de l'Ouest vers la partie centrale des États-Unis. La dormance des semences permet également à ces formes adaptées à la cueillette d'avoir précédé les premiers Américains dans leurs campements au retour de leurs déplacements. La domestication proprement dite aurait eu lieu au centre des Etats Unis. De nombreuses formes d'*H. annuus* ont été trouvées dans des sites archéologiques datant de 4000-5000 ans (Asch and Asch, 1985; Watson, 1985). Ces formes se rencontrent dans le centre et l'Est des États-Unis alors que seuls des types sauvages ont été trouvés dans les sites du Sud-Ouest des États-Unis et au Mexique. L'objectif de l'étude que nous

présentons est d'acquérir quelques informations sur la structuration de la variabilité des populations sauvages, pour une valorisation à court et moyen terme, mais aussi et surtout pour mieux la gérer en orientant les prospections à venir, enfin pour disposer d'éléments pour entreprendre l'étude et l'évaluation d'éventuelles introgressions d'espèces voisines.

Figure 1. Distribution de l'espèce *H. Annuus* sauvage et localisation des écotypes étudiés dans ce travail.



Peu d'études sur la variabilité des *H.annuus* sauvages ont été réalisées (Seiler, 1984). Par contre, la variabilité génétique de ces populations a déjà été utilisée, d'abord pour rechercher des facteurs de restauration de la stérilité mâle cytoplasmique PET-1 de *H. petiolaris* par P. Leclercq (1969). Ces facteurs ont été largement utilisés dans le matériel restaureur utilisé en sélection. Des facteurs de résistance au mildiou (*Plasmopara halstedi*) (Fick *et al.*, 1975) ont également été trouvés à plusieurs reprises et permettraient de faire face à l'ensemble des races de mildiou actuellement présentes. La ramification apicale récessive de la plupart des lignées restauratrices permet un bon échelonnement de la pollinisation au cours de la production de semences hybrides. Elle trouve son origine chez les types sauvages. La grande vigueur et le fort enracinement de nombreuses populations d'*H. annuus* sauvage sont probablement à l'origine d'un progrès génétique en aptitude à la combinaison et en tolérance au stress hydrique des composants d'hybrides actuellement cultivés, tels RHA 274 (Fick *et al.*, 1975) et HA 335. Certains caractères trouvés chez *H. annuus* sauvages pourraient faire l'objet d'une exploitation en sélection. Quatre types de stérilité mâle cytoplasmique à déterminisme génétique différent ont été trouvées dans des écotypes sauvages (Serieys, 1994), ainsi que plusieurs gènes de résistance à la rouille (*Puccinia Helianthi*)(Quresh *et a.*, 1993).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Quatre-vingt-une populations représentant un bon échantillonnage de l'aire de répartition de l'espèce (figure 1) ont été étudiées.

Elles proviennent de prospections anciennes et de 2 prospections récentes : MPHE 383, 386, 519, 654, Arizona ; 646, Arkansas ; 410, 421, 435, 437, 446, 458, 468, 833, California ; 363, 660, 980, 989, 996, 1147, 1148, Colorado ; 211, Illinois ; 665, 829,

Iowa ; 733, 997, 998, 999, 1000, 1007, 1011, Kansas ; 351, Missouri ; 943, 945, 948, 954, 1150, Montana ;1012, 1016, 1018, 1023, 1030, Nebraska ; 775, Nevada ; 461, 463, 649, 661, 928, 929, 931, 933, 939, 1151, North, Dakota ; 651, 662, Oklahoma ; 378, 388, 970, 1042, 1047, 1055, 1136, South Dakota ; 209, 509, 511, 647, 648, 650, 652, 734, Texas ; 658, 774, 822, 826, 1149, Utah ; 358, 361, 955, 963, 966, 974, 975, Wyoming.

Elles ont également été choisies sur la base d'évaluations anciennes pour des contrastes sur les caractères de croissance, de développement des différents organes, et de qualité (teneur en huile).

Cinq plantes de chaque population ont été étudiées au champ en 1996. L'autostérilité a été vérifiée par ensachage de toutes les plantes. Toutes les populations ont été croisées avec succès avec 3 lignées de tournesol cultivé.

Les caractères mesurés sont :

• Des caractères de croissance et de développement des organes mesurés de manière quantitative :

- latitude et longitude de prospection ;
- hauteur de plante ;
- longueur du plus long axe axe latéral ;
- longueur maximale du limbe et du pétiole de la feuille ;
- intensité de ramification basale ;
- intensité de ramification médiane ;
- intensité de ramification apicale ;
- date d'anthèse ;
- diamètre des capitules ;
- longueur d'akène ;
- largeur d'akène ;
- poids de 1000 grains ;
- teneur en huile.

• Le deuxième type de caractères est constitué par des caractères de forme et de couleur notés de manière qualitative :

- forme des feuilles 6 classes; anthocyane feuille 4 classes; denture feuille (3 classes) ; section de la feuille (2classes) ; ondulation des feuilles (3 classes) ;
- port du Capitule (4 classes) ; anthocyane de la fleur (3 classes) ;
- présence ou absence de stérilité mâle ;
- couleur de fond de l'akène (7 classes) ; striure akène (absence ou présence) ;
- moucheture de l'akène (absence ou présence) ;
- largeur de la bractée (8 classes) ; longueur de la bractée (2 classes) ; forme de la bractée (2 classes) ; pic des bractées (5 classes).

RÉSULTATS

Le polymorphisme intra et interpopulation est très important ; Par exemple, la taille de plante peut varier de 1 à 4 mètres. Les résultats ont été regroupés par échantillon de chaque population.

Pour les caractères de croissance et de développement, ainsi que de dimension et teneur en huile des akènes, nous avons fait une analyse en composantes principales en considérant que ces caractères présentaient une variation continue. une forte structuration se dégage de cette analyse. 60 % de la variation est décrit par 2 axes principaux (**Figure 2**). Le premier est lié à une taille élevée, une anthèse tardive, une latitude basse : c'est un axe lié à la longueur du cycle de croissance et de

développement en relation avec la latitude, ou plus simplement un axe de précocité. le second axe est corrélé à une faible ramification basale médiane et apicale, un fort diamètre de capitule, un poids de 1000 grains élevé. C'est donc un axe lié aux forces de domestication.

L'analyse des caractères de forme et de couleur a été réalisée sur la moyenne des individus de chaque population, en considérant la variation comme discontinue, chaque population appartenant ou non à une classe déterminée. Cette mise en forme des résultats permet une analyse qualitative l'analyse factorielle de correspondances. Les résultats montrent une faible structuration. Les 4 premiers axes ne rendent compte que de 30 % de la variation (**figure 3 et 4**). L'examen des nuages de points fait apparaître des distributions très condensée, avec quelques hors types qui se différencient souvent pour des caractères très spécifiques et se rapprochent parfois du phénotype d autres espèces sauvages.

Figure 2. Analyse en composantes principales pour les caractères quantitatifs. Répartition des écotypes selon les 2 axes majeurs. Chaque point est représenté par l'abréviation de l'état ou la prospection a été réalisée.

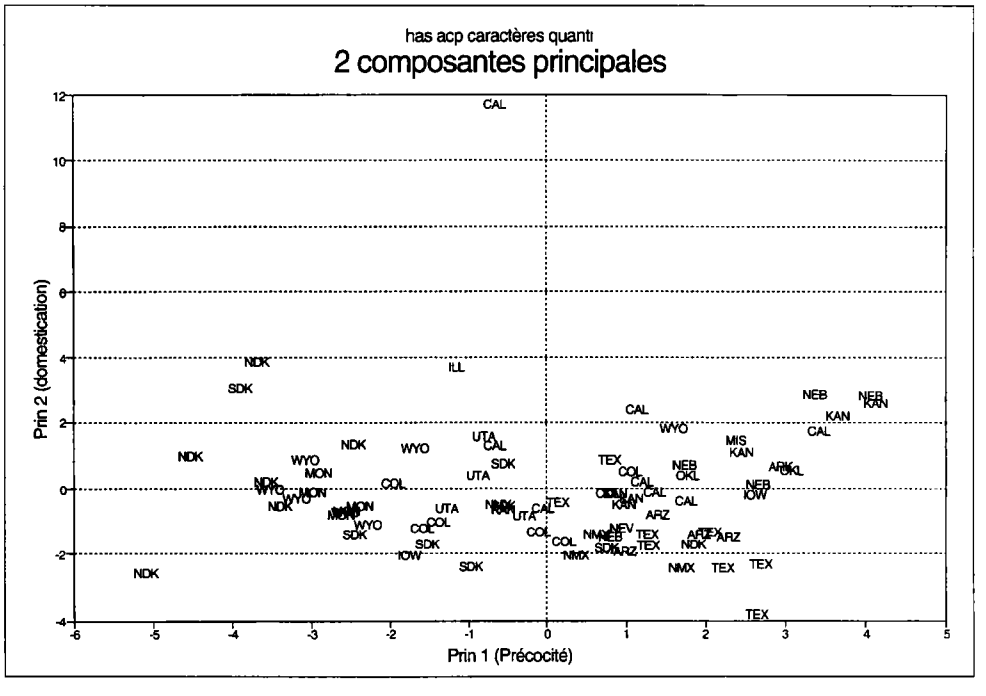


Figure 3. Analyse factorielle des correspondances pour les caractères qualitatifs. Représentation des 2 premiers axes. Chaque point est représenté par le numéro d'introduction de l'INRA Montpellier.

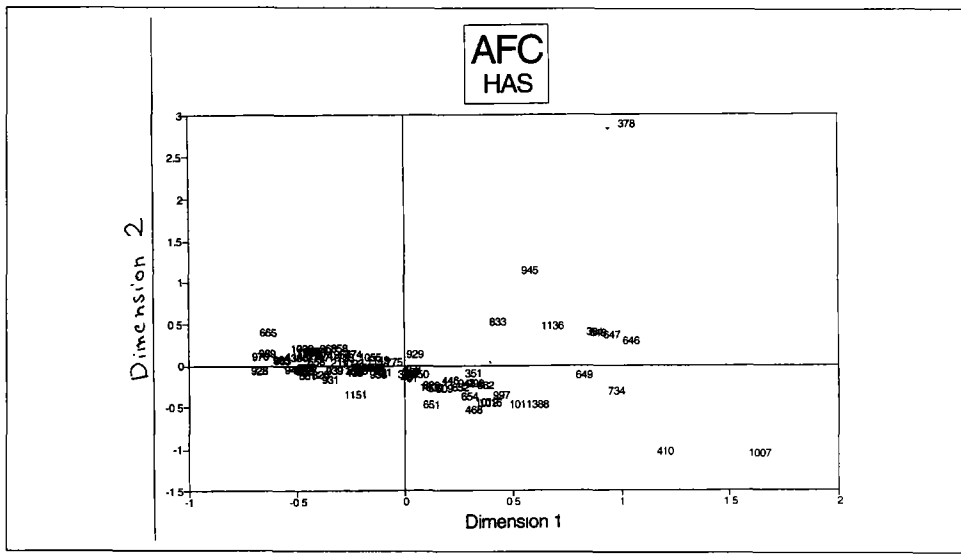
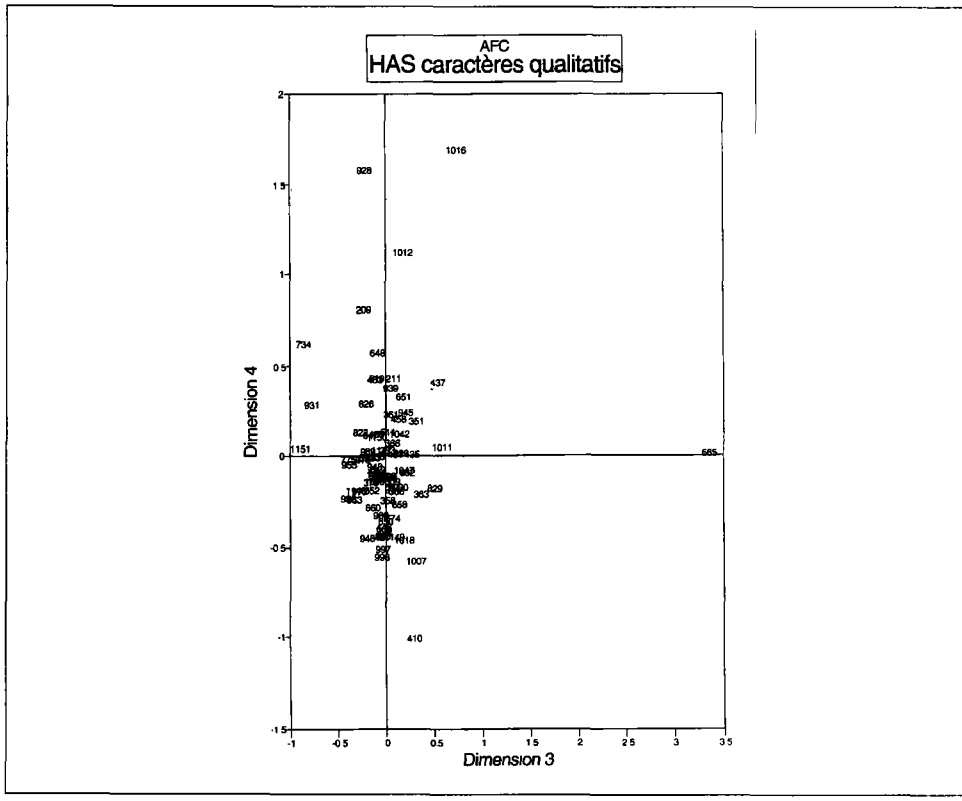


Figure 4. Analyse factorielle des correspondances pour les caractères qualitatifs. Représentation des 3e et 4e axes.



DISCUSSION

L'interprétation des résultats de la variation de croissance et de développement quantitative des organes, est *a priori* plus soumise aux facteurs de sélection que la variation qualitative de forme et de couleur. Les caractères quantitatifs sont de fait dans cette étude beaucoup mieux structurés en relation avec les forces de sélection liées à la durée du cycle (latitude) d'une part, et les forces de domestication d'autre part. Cependant, l'effet des forces de domestication est ambigu dans la mesure ou des flux de gènes ont pu intervenir dans les 2 sens entre compartiments sauvages et cultivés pour façonner la variabilité étudiée. Des types intermédiaires issus d'une pré-domestication de plantes qui accompagnaient les premiers américains et étaient utilisées en cueillette peuvent également avoir contribué à façonner la variabilité des populations que nous avons reçues et qui seraient dans cette hypothèse redevenues sauvages ou adventices.

La faible structuration de la variabilité pour les caractères qualitatifs peut également s'expliquer en partie par les migrations ou le nomadisme des premiers américains qui auraient utilisé cette espèce. Les hors types peuvent être associés à des introgressions sans doute fréquentes en raison de la sympatrie avec d'autres espèces annuelles qui se croisent facilement avec *H.annuus*. La constitution cytogénétique de ces espèces est cependant bien différente de celle d'*H. annuus*. Par exemple, l'espèce *H. argophyllus* considérée comme la plus proche d'*H.annuus* présente au moins 2 translocations qui l'en distinguent (Quillet et al. 1995), Un fort déficit de viabilité pollinique est observé chez les hybrides interspécifiques. Les résultats préliminaires de l'examen d'hybrides entre toutes les populations étudiées et 3 testeurs lignées indiquent de fait une viabilité pollinique inférieure chez un grand nombre d'individus.

Ce déficit ne doit pas être confondu avec les très nettes ségrégations d'individus complètement mâles stériles observées dans notre étude sur 5 populations et liées dans tous les cas déjà étudiés à une interaction génocytoplasmique. Ces interactions ont été décrites chez des hybrides interspécifiques (Leclercq, 1969)), mais également chez 4 écotypes d'*H. annuus* sauvages. Ces sources de stérilité mâle cytoplasmiques dénommées ANN-1 à ANN-4 sont clairement différenciées par la génétique de leur restauration (Serieys, 1994). Elles peuvent représenter une alternative à l'utilisation industrielle exclusive de la source PET-1 de P. Leclercq.

Un réservoir de variabilité considérable, peu ou mal exploité, mais encore disponible par prospection existe donc chez cette espèce sauvage. L'orientation de prospections futures peut valoriser la diversité de ces ressource *in situ*, en tenant compte des éléments de structuration qui apparaissent dans cette étude : précocité et domestication pour certains caractères, introgression avec des espèces sympatriques dont la répartition est relativement bien connue (Schilling et Heiser, 1981.) par ailleurs. Les progrès génétiques à en attendre concernent l'aptitude générale et spécifique à la combinaison, l'adaptation au stress hydrique, la résistance aux maladies.

Bibliographie

1. ASCH and ASCH, 1985 149-204 *in* Prehistoric food production in North America. Anthrop. Paper 75. Museum of Anthropology, Univ. Of Michigan, Ann Arbor.
2. FICK G.N., KINMAN M.L., ZIMMER D.E., 1975. Crop Sci. 15 106.

3. HEISER (1985) 57-72 in Prehistoric food production in North America. Anthrop. Paper 75. Museum of Anthropology, Univ. Of Michigan, Ann Arbor.
4. LECLERCQ (1969). Ann. Amél. Pl. 19 99-106.
5. QUILLET, MADJIDIAN, GRIVEAU, SERIEYS ,TERSAC, LORIEUX, BERVILLÉ. 1995 6
6. QURESH JAN GULYA., 1993 Plant Breeding 110 297-306.
7. RIESEBERG, VAN FOSSEN, DESROCHERS., 1995 Nature 375 313-316.
8. SCHILLING, HEISER, 1981 Taxon 30 393-403.
9. SEILER, 1984 Helia 7 29-33.
10. SERIEYS, 1994 Helia **17**(21) 94-102.
11. SOSSEY-ALAOUI, SERIEYS, TERSAC, LAMBERT, BERVILLÉ 1994. 9-21. *in : The Royal Botanic Gardens, Kew. Caligari, P.D.S. and Hind, D.J.N. editors.* Compositae: Biology and Utilization. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994. (D.J.N. Hind, editor-in Chief).
12. WATSON, 1985 99-148 in Prehistoric food production in North America. Anthrop. Paper 75. Museum of Anthropology, Univ. Of Michigan, Ann Arbor.

D5 : L'arganier : un candidat à la domestication

BANI-AAMEUR F.

Laboratoire de Recherche sur la Variabilité Génétique, Université Ibnou Zohr, Faculté des Sciences, B.P. 28/s, 80 000 Agadir, Maroc

Argania spinosa L. Skeels est l'unique espèce du genre *Argania,* famille des sapotacées (Baehni, 1948 ; Ehrig, 1974). Cet arbre forestier endémique poussant sur 830 000 ha au Maroc, semble être un reliquat de l'ère tertiaire. L'arganier a une valeur écologique indéniable étant très résistant aux conditions arides. Traditionnellement, il est producteur d'huile (Ehrig, 1974 ; Fairchild, 1930 ; Jaccard, 1926 ; Chimi et al., 1994), de fourrage (Fellat-Zarrouk et al., 1987) et de bois (M'hirit, 1989). Sa valeur potentielle est actuellement à la hausse parce que de nouveaux usages sont apparus. La demande pour l'huile est en augmentation pour de usages diététiques du fait qu'elle renferme jusqu'à 80 % d'acide gras insaturés (Ksir et al 1995). Ses composants insaponifiables sont intéressants pour l'industrie des cosmétiques (Boukhoubza and Pichon Prum 1988). Les saponines du bois et du tourteau, résultat de l'extraction de l'huile, ont des usages médicaux (Alaoui et al 1995). Les stérols triterpèniques (Farines et al. 1981) et les flavinoïdes des feuilles et de la pulpe du fruit, qui renferme aussi de la gutta percha, peuvent présenter des intérêts pour différentes industries (Sandret, 1957 ; Fellat-Zarrouk et al. 1987).

Actuellement l'arganier est un arbre forestier endémique à l'état sauvage situé au Sud-Ouest du Maroc. Il est soumis à des prélèvements irrationnels et abusifs de rameaux, de feuilles, de bois et de fruits qui détruisent les arbres et ne laissent aucune chance à la régénération naturelle. L'aridité du milieu et la difficulté de produire des plants forment une barrière au rétablissement de l'arganier par reboisement. Donc, bien que sa longévité et sa résistance à l'aridité de son milieu soient phénoménales, il reste menacé de déperdition.

Le recensement et la caractérisation des réserves naturelles de l'arganier, selon des critères botaniques, génétiques, écologiques, géographiques et économiques est un impératif pour l'élaboration d'une stratégie globale de la protection des sites géographiques bien déterminés, et pour leurs reboisements à partir des arbres «plus ». La propagation de ces arbres sélectionnés permettrait de conserver la diversité existante, et d'améliorer le niveau de vie des populations riveraines en améliorant la productivité des arbres exploités dans un cadre de développement durable. Cette conservation serait d'autant plus efficace qu'elle s'établirait à partir de matériel végétal bien identifié. Par la même occasion, l'installation de parcelles expérimentales à partir des descendants d'arbres « plus » serait un premier pas vers la création de vergers de pieds-mères semenciers de l'arganier.

Notre recherche s'est d'abord attelée à décrire l'arganier pour constituer une gamme de descripteurs permettant de décrire la variabilité phénotypique et génétique disponible. Cette gamme de caractères couvre aussi bien les caractères morphologiques que les caractères d'intérêt économique. L'approche adoptée permet de caractériser le potentiel écologique et physiologique, de déterminer les mécanismes d'adaptation de l'espèce à son environnement, le potentiel producteur en terme de biomasse et de fruits, et la caractérisation moléculaire pour pouvoir marquer les génotypes les plus intéressants, et les propager. Les résultats de nos recherches en biotechnologie ont des applications potentielles par l'aménagiste de la forêt aussi bien

pour le reboisement par l'arganier à court terme à partir de provenances des régions délimitées, à moyen terme à partir de populations améliorées, et à long terme par sa domestication éventuelle en tant qu'arbre oléicole.

CONDITION DE PRODUCTIVITÉ

Trois populations identifiées dans trois localités géographiques écologiquement distinctes, Ait Melloul (AM), Argana (AR) et Ait Baha (AB) sont l'objet de nos observations depuis 1989 (Ferradous et al., sous presse). Tous les arbres ne fleurissent pas et ne fructifient pas sous les mêmes conditions (Ferradous 1995). Certains résistent mieux à la sécheresse que d'autres. Dans ce contexte Ait Baha, la station la plus aride, se remarque comme la station pilote pour tester la résistance des arganiers au stress hydrique d'une part, et comme une provenance privilégiée du matériel destiné au reboisement et à la lutte contre la désertification.

Globalement, il suffit de 100 mm de pluie en automne pour que tous les arbres fleurissent et fructifient et que les fruits atteignent un poids optimal (Ferradous et al., sous presse). Tous les rameaux fleurissent, mais seules les branches maîtresses et les rameaux de plus de deux années d'âge fructifient, la deuxième catégorie étant privilégiée en période de sécheresse (Zahidi et Bani-Aameur 1996 b). Considérant l'évolution du poids du fruit, de la pulpe, de la coque et des amandes, Ait Melloul, la station la plus océanique, est la plus précoce suivie par Argana et par Ait Baha (Belmouden et Bani-Aameur 1996 b).

Les rendements des arbres sous des conditions raisonnables varient de 1 à 24 kg de fruits desséchés (Bani-Aameur et al. in review b). Si on ignore les autres composantes du fruit dont l'intérêt n'est pourtant pas négligeable, ces rendements correspondent à un rendement de 0,05 à 1,2 Kg d'amandes (Belmouden et Bani-Aameur 1996 b) ou encore 0,03 à 0,6 Kg d'huile. Avec le peuplement actuel de 40 arbres à l'hectare, le rendement en huile n'est que de 24 litres d'huile dans le meilleur des cas. En réalité, il est beaucoup moins que 24 litres. Considérons maintenant la perspective plus optimiste de l'exploitation d'un clone sélectionné planté à 200 arbres à l'hectare (densité classique d'une plantation d'agrumes). Même en supposant qu'on ne puisse pas dépasser les 24 kg par arbre, ce qui est peu probable, le rendement à l'hectare serait de 4 800 Kg et le rendement en huile serait de 120 litres.

L'arganier associe un intérêt écologique indéniable pour les zones arides, à une valeur économique actuelle et potentielle qui n'est plus à démontrer. L'étude de la ramification de la floraison et de la fructification que nous poursuivons permettrait d'établir les bases scientifiques pour des techniques de taille sylvicole et fruitière. Celles ci permettront d'accroître la production fruitière tout en fournissant aux utilisateurs un bois d'œuvre ou de chauffage dont le prélèvement incontrôlé jusqu'à présent menace la forêt de disparition surtout en zone montagneuse.

MISE AU POINT DES DESCRIPTEURS

Caractérisation du fruit et du noyau

Six formes de fruit (fusiforme, ovale, ovale apiculée, goutte, arrondie et globuleuses) et trois formes de noyau (fusiforme, ovale et arrondie) ont été décrites (Bani-Aameur et al, 1997 ; Bani-Aameur et al., a, in review). La forme ovale du fruit est la plus fréquente (40 % environ), la forme goutte est la plus rare (2,5 %). La forme ovale du noyau est la plus fréquente (55 %) et la forme fusiforme est la plus rare (16 %).

La composante génétique de 11 caractères morphologiques mesurables du fruit et du noyau était remarquable dans la mesure où plus de 40 % de ces caractères avaient une forte héritabilité.

Après hiérarchisation, il s'est avéré que les caractères les plus discriminants entre les arbres sont le poids du fruit et sa longueur, le poids du noyau et sa longueur (Ferradous, 1995). À partir de ces donnes, la dispersion des types morphologiques entre les stations d'étude s'était avérée chevauchante. Ainsi pour les caractères mentionnés ci-dessus du fruit et du noyau, les populations d'arganier ne correspondent pas à des écotypes adaptés à des niches écologiques définis, mais à une population d'individus similaires dispersés entre les stations étudiées. Ce résultat est un premier jalon dans la réflexion à entamer sur le modèle de conservation *in situ*. A priori, une seule population suffisamment large suffirait au lieu de plusieurs populations comme ça aurait été le cas s'il s'agissait de plusieurs écotypes, mais ces conclusions restent à préciser en tenant compte d'autres caractères, notamment les caractères adaptatifs.

La floraison

Quatre phases phénologiques de la fleur sont déterminées : (le bouton floral de 1 à 2 mm, le bouton floral avec le style apparent de 2 à 3,15 mm, la fleur épanouie de 2 et 3,15 mm et le fruit noué de 2 mm (Louali et al., 1994 ; Louali, 1994, Louali et al 1995). L'anthèse a lieu au stade bouton floral dès que le style commence à pointer (Belmouden et al. 1995). Le pollen presente entre deux et six pores, son diamètre variant entre 17 et 33 µm (Belmouden et Bani-Aameur 1996). Il reste viable après une conservation au froids de six mois (Belmouden et Bani-Aameur 1995). Les études de la fleur et du pollen permettent d'élucider la mode de reproduction de l'arganier, qui reste encore méconnu, et sur lequel nous continuons les recherches. D'autre part, ces études préparent la pollinisation artificielle en vue de la réalisation des croisements dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique.

Étude de la feuille

Il y a deux types de feuilles chez l'arganier, les feuilles simples portées par les rameaux jeunes et les feuilles groupées portées par les rameaux âgés (Zahidi et al. 1994, Zahidi 1994, Zahidi et al 1995). La position de la feuille sur le rameau est une source de variation des dimensions (Zahidi et Bani-Aameur 1996 a, Zahidi et Bani-Aameur in review a). La longueur de la feuille au même titre que le produit de la longueur par la largeur, était un indicateur efficace de l'importance de la surface foliaire. Quatre types morphologiques de feuilles ont été recencés dans les populations étudiées (obovale, lancéolée à sommet mucroné, lancéolée à sommet aigu, et spatulée) (Bani -Aameur et al 1997c).

Architecture de l'arbre et de la plantule

Cinq types morphologiques d'arbres sont caractérisés par rapport à la ramification et à la présence des épines. Contrairement à l'idée véhiculée jusqu'à présent de l'existence de deux types, le type dressé épineux et le type pleureur inerme, on a pu distinguer le type I très épineux et très ramifié (10 %), le type II épineux ramifié (16,7 %), le type III épineux peu ramifié (31,1%) ; le type IV moins épineux peu ramifié (23,3 %), et le type V inerme peu ramifié (18,8 %) (Zahidi et al 1995).

La domestication de l'arganier en tant qu'arbre fruitier oléicole, passe par la production de plants accessibles aux techniques culturales telles que la taille et la récolte. Ces techniques seraient plus aisées avec des plants raisonnablement ramifiés et peu épineux. La variabilité génétique inter et intra-familiale de 20 caractères de la

ramification de la tige et de la racine des plantules âgées d'un an élevées en pépinière était remarquable (Zahidi et Bani-Aameur 1997 b et c). Les moyennes des hauteurs des tiges variaient entre 69,3 et 6,5 cm, et les longueurs des racines entre 138,4 et 10,7 cm. Toutes les tiges n'étaient pas ramifiées. Les héritabilités au sens stricte du nombre de feuilles simples étaient les plus élevées (0,65). La plus faible héritabilité (0,06) était observée pour le nombre de rameaux secondaires. Les héritabilités de la longueur de la tige, la longueur de la racine et de leur rapport sont respectivement de 0,38, 0,25 et 0,31.

PHÉNOLOGIE

L'évolution de la phénologie de l'arganier en fonction des changements climatiques est importante à connaître pour l'établissement des techniques d'exploitation de la forêt. Ainsi le cycle fleur-fruit dure entre 9 et 16 mois selon les génotypes et les conditions du milieu (Bani-Aameur et al. in review b). Pour les feuilles, une distinction s'est faite entre les feuilles simples et les feuilles groupées (Ferradous et al. sous presse, Zahidi et al., 1994, Zahidi 1994, Zahidi et al., 1995). Les premières qui n'apparaissent que sur les rameaux de l'année sont persistantes dans une grande proportion. Elles ne tombent que sous l'effet d'une sécheresse prolongée, quand l'arbre se dégarnit complètement. Les feuilles groupées sont par contre caduques. Cependant l'intensité des phénomènes décrits varie énormément d'un arbre à un autre. Ainsi, la phénologie de la feuille, élément essentiel de la biomasse de l'arbre est aussi un indicateur de la réaction de l'arbre au stress hydrique (Zahidi et Bani-Aameur 1996 a).

Nous continuons ces études en intégrant l'apparition et la croissance des rameaux et des feuilles en liaison avec l'architecture de l'arbre. Notre objectif est de proposer un système d'exploitation sylvicole propre à l'espèce dans les conditions arides de son milieu. L'arganier évite les fortes températures et les longues sécheresses en rentrant en repos (Ferradous et al. sous presse). Il perd progressivement feuilles, fleurs et fruits au fur et à mesure que les conditions du milieu se détériorent. Après une sécheresse prolongée, la production de la biomasse est presque nulle.

MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE D'ÉLEVAGE DES PLANTULES

La régénération naturelle ou artificielle de l'arganier est pratiquement absente. L'échec ainsi constaté a été expliqué par la difficulté de l'établissement des plantules après transplantation soit par l'aridité du milieu soit par l'attaque de prédateurs. Dans le passé, il n'a jamais été lié - à notre connaissance - aux attaques des plantules par les agents pathogènes. Récemment nous avons identifié certains agents pathogènes responsables de la fonte de semis en pré-émergence et en post-émergence dont le plus important est le *Fusarium oxysporum* (Zahidi et Bani-Aameur 1996c, d, 1997 a, sous presse). La température, les conditions de stockage et le génotype pour le premier type de fonte de semis ; le génotype et le micro-climat pour le deuxième type, sont des facteurs hautement significatifs. Nous avons eu aussi l'occasion de constater que les modalités de conservation ainsi que les conditions de germination et d'élevage des plantules ne sont pas encore au point. Ainsi nous avons pu démontrer que vu les sensibilités différentielles des génotypes aux pathogènes, le risque existe d'établir un fort gradient de sélection à effet réducteur sur le pool génétique de l'arganier.

UTILISATION DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES

Nous avons opté pour l'utilisation de la méthode RAPD (Ramdom Amplified Polymorphic DNA) pour l'amplification de l'ADN comme source de marqueurs génétiques pour estimer la diversité génétique de l'arganier, et pour caractériser les sources de germplasm. Nous avons mis au point la méthode d'isolement de l'ADN (Bani-Aameur et Hilu 1995, 1996). La méthode RAPD a été testée sur un échantillon d'arbre avec succès. Elle est actuellement en cours d'exploitation pour étudier la diversité génétique des marqueurs moléculaires de l'arganier grande échelle dans l'aire de dispersion de l'arganier.

PERSPECTIVES

L'arganier lance un défi à la biotechnologie. Pour le relever, nous avons d'abord œuvré et nous continuons à construire une base de données biologiques et écologiques, notamment par une prospection de la variabilité phénotypique, et par une étude de la diversité génétique couvrant l'étendue de l'aire de répartition de l'espèce. Dès le départ, il s'est avéré qu'il faut avoir une meilleure connaissance du comportement de cette essence forestière xérophyte et thermophile sous climat aride pour exploiter au mieux son potentiel d'arbre forestier et fruitier oléicole, en le valorisant et en le protégeant. Ainsi, il peut servir de modèle d'étude pour de nombreuses espèces d'arbres et arbustes des zones arides et semi-arides, et développer des synthèses méthodologiques pour assurer un transfert efficace des connaissances. L'étape actuelle consiste à mettre en marche les recherches en biotechnologie pour valoriser cette espèce.

Bibliographie

1. ALAOUI K., ABIDA A., BOUROUD H ., CHARROUF Y.Z., HASSAR M ., AMAROUCH H , ROQUEBERT J. 1995. Activités pharmacologiques des saponines. Colloque International. La Forêt Face à la Désertification : Cas des arganeraies. Faculté des Sciences d'Agadir 26- 28 Oct. 1995 p. 61.
2. BAEHNI C. 1948. Mémoires sur les Sapotacées. 1. Système de classification. Candolea 7 394-476.
3. BANI-AAMEUR F. 1994. Variabilité génétique du fruit et de la graine de l'arganier. Deuxièmes journées de l' arbre : Marrakech le 20-21 Avril 1994. (Abstract).
4. BANI-AAMEUR F., HILU K.W., 1995. Amplification de l'ADN de l'arganier par la methode RAPD. Colloque international : La forêt face à la d_sertification . cas des Arganeraies. Agadir, Maroc. 26, 27, et 28 octobre 1995.
5. BANI-AAMEUR F., HILU K.W., 1996. Use of DNA from Argan leaves for RAPD analysis. Conference on Plant Taxonomy, Barcelone 19-22 September 1997. (Abstract) p 89.
6. BANI-AAMEUR F., FERRADOUS A., DUPUIS P., in review, a. Typology of *Argania spinosa* (Sapotaceae) fruits and stones. Am. J. Bot.
7. BANI-AAMEUR F., LOUALI L.' DUPUIS P.. In review, b. Maturation et chute des fruits de l'arganier. *Actes* Inst Agron. Vét. *(Maroc).*
8. BANI-AAMEUR F., FERRADOUS A., ZAHIDI A., LOUALI L., BELMOUDEN S., DUPUIS P. (1997) Typology studies of *Argania spinosa* (Sapotaceae). 13 th Symposium Morphology, Anatomy and Systematics, Leuven 6- 11 avril 1997.
9. BANI-AAMEUR F., 1997. Diversité, phénologie, régénération et conservation de l'arganier. Séminaire sur l'amélioration, la conservation et l'utilisation des ressources génétiques forestières marocaines. 8-10 Mai, ENFI, Salé.

10. BELMOUDEN S., BANI-AAMEUR F., 1995. Contribution à l'étude de l'anthèse et à la viabilité du grain de pollen. Colloque international : La forêt face à la désertification.: cas des arganeraies. Agadir, Maroc. 26, 27, et 28 octobre 1995 (Poster).
11. BELMOUDEN S., BANI-AAMEUR F., DUPUIS P., 1995. Distribution de glomérules fructifères selon le type de rameaux de l'arganier. Colloque international : La forêt face à la désertification.: cas des arganeraies. Agadir, Maroc. 26, 27, et 28 octobre 1995 (Poster).
12. BELMOUDEN S., BANI-AAMEUR F. 1996 a. Dimension, nombre de pores et viabilité du pollen de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels). Premières Rencontres Nationales des étudiants chercheurs en Biologie. Marrakech 17-19 décembre 1996.
13. BELMOUDEN S., BANI-AAMEUR F. 1996 b. Évolution du poids du fruit de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels). Premières Rencontres Nationales des étudiants chercheurs en Biologie. Marrakech 17-19 Décembre 1996.
14. BOUKHOUBZA M., PICHON PRUM N . 1988. L'arganier ressource économique et médicinale pour le Maroc. Phytoterapy 27: 21-26.
15. CHIMI H., CILLARD J., CILLARD P. 1994. Autooxydation de l'huile d'argan *Argania spinosa L.* du Maroc. Science des aliments 14: 117-124.
16. EHRIG F.R. 1974. Die arganie charakter, okologie und wirtschaftliche Bedeuntung eines tertiarreliktes in Morokko. Ptermanns geographistche Mitteilungen 118 (2):117-125.
17. FAIRCHILD D. 1930. Exploring For Plants. Mc Millan Company. N.Y. : 168-185.
18. FARINES M., CHARROUF M., SOULIERJ. 1981. The sterols of *Argania spinosa* seed oil. Phytochemestry 20: 2038-2039.
19. FELLAT-ZARROUK K., SMOUGHEN S., MAURIN R. 1987. Étude de la pulpe du fruit de l'arganier (*Argania spinosa)* du Maroc. Matiere grasse et latex. Actes Inst. Agron. Vet. 7: 17-21
20. FERRADOUS A., BANI-AAMEUR F., DUPUIS P. 1994. Diversité génétique de l'arganier : cas du fruit et de la graine. Séminaire National "Ressources Phytogénétiques et développement durable". IAV Hassan II, Rabat, du 24 au 26 octobre 1994.
21. FERRADOUS A., BANI-AAMEUR F., DUPUIS P. 1995. Phenologie et fructification de l'arganier. Colloque International : La Forêt Face à la Désertification : Cas des arganeraies. Faculté des Sciences d'Agadir. p. 32.
22. FERRADOUS A. 1995. Diversité génétique de quelque caractères du fruit et de la graine d' *Argania spinosa* (L.) Skeels. Thèse de Diplôme des études supérieures de 3e cycle. Faculté des Sciences, Université Ibnou Zohr Agadir. 190p.
23. FERRADOUS A., BANI-AAMEUR F., DUPUIS P. 1996. Climat stationnel, phénologie et fructification de l'arganier *Argania spinosa* L. Skeels. Actes de l'Institut Agronomique et Vétérinaire (In press).
24. JACCARD, P. 1926. L'arganier sapotacée oléagineuse du Maroc. Pharma. Acta. Helvetiae 11: 203-209.
25. KSIR M., MAURIN R., FELLAT-ZARROUK K. 1995. De la structure des acides gras et des triglycrides de l'huile d'argan « *Argania spinosa* » du Maroc. Colloque International : La Forêt Face à la Désertification : cas des arganeraies. Faculté des Sciences d'Agadir. p. 105.
26. LOUALI L. BANI-AAMEUR F., DUPUIS P. 1994. Diversité génétique de l'Arganier : cas du système reproducteur. Séminaire National « Ressources Phytogénétique et développement durable ». IAVH2, Rabat, du 24 au 26 Octobre 1994.
27. LOUALI L., 1994. Variabilité de la floraison et de la fructification de l'arganier.Thèse de CEA Environnement. Faculté des Sciences, Université Ibnou Zohr Agadir. 80 p.
28. LOUALI L., BANI-AAMEUR F., DUPUIS P. 1995. Caractérisation et évolution des stades de floraison de l'arganier. Colloque international : La forêt face à la désertification : cas des arganeraies. Agadir, Maroc. 26, 27, et 28 octobre 1995.
29. LOUALI L., DUPUIS P., BANI-AAMEUR F. 1995. Évolution de la chute des fruits de l'arganier. Colloque international : La forêt face à la désertification : cas des arganeraies. Agadir, Maroc. 26, 27, et 28 octobre 1995.
30. M'HIRIT O. 1989. L'arganier, une espèce fruitière forestière à usage multiple. Formation Forestière Continue, thème « l'arganier », Station de Recherches Forestière, Agadir, 13-17 mars: 31-57.
31. SANDRET F. 1957. La pulpe d'argan : composition chimique et valeur fourragère, variation au cours de la maturation. Annales de la Recherche Forestière 4: 153-177.
32. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F., DUPUIS P. 1994. Diversité génétique de l'arganier : cas de la feuille. Séminaire National « Ressources Phytogénétiques et développement durable ». IAV Hassan II, Rabat, du 24 au 26 octobre 1994.
33. ZAHIDI A. 1994. Variabilité du rameau et de la feuille de l'arganier. Thèse de CEA Environnement. Faculté des Sciences, Université Ibnou Zohr Agadir. 80 p.

34. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F., DUPUIS P. 1995. Caractérisation de la ramification de l'arganier. Colloque International : La Forêt Face à la Désertification : cas des arganeraies. Faculté des Sciences d'Agadir. p. 32.
35. ZAHIDI A., FERRADOUS A., BANI-AAMEUR F. 1996. Morphological diversity of three Argan populations (*Argania spinosa* (L.) Skeels). Conference on Plant Taxonomy, Barcelone 19-22 September 1997. (Abstract) p 82.
36. ZAHIDI A., FERRADOUS A., BANI-AAMEUR F. (in review). Morphological diversity of three Argan populations (*Argania spinosa* (L.) Skeels).
37. ZAHIDI A., F. BANI-AAMEUR 1996 a. Effet de la position sur les dimensions des feuilles des rameaux de l'arganier. Premières Rencontres Nationales des étudiants chercheurs en Biologie. Marrakech 17-19 December 1996.
38. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. 1996 b. La ramification fructifère de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) Premières Rencontres Nationales des étudiants chercheurs en Biologie. Marrakech 17-19 décembre 1996.
39. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. 1996 c. Conditions de germination et de survie des amandons d'arganier (Argania spinosa (L.) Skeels). Premières Rencontres Nationales des étudiants chercheurs en Biologie. Marrakech 17-19 décembre 1996.
40. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. 1996. Germination et survie des amandes de l'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels) : effet de l'âge, de la date de semis et du génotype. Annales de la Recherche Forestière 30. In press.
41. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. (1997). Germination and seedlings survival of argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) : combined effects of environment and genotype. Rencontres Internationales Ressources génétiques des plantes en Afrique des Savanes. Bamako, 24 - 28 février 1997.
42. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. 1997. Variabilité génétique des caractères de la ramification des plantules d'arganier. Les sixièmes Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies-Génie Génétique des plantes de l'AUPELF.UREF. Centre Universitaire d'Orsay de l'Université Paris Sud XI. 30 juin-3 juillet 1997.
43. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. 1997. Argan genetic diversity of root and shoot characters. Botanical Society of America Annual Meetings, 3 - August, 1997, Palais des Congrès, Montréal, Québec.
44. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. (In review). Une méthode d'échantillonnage des feuilles d'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels). Annales de la Recherche Forestière du Maroc.
45. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. (In review). Argan seedling dumping off : effects of genotype, age and kernel origin. Ecologia Mediterranea.

D6 : Structure génétique de l'arganier *Argania spinosa* L. Skeels

EL MOUSADIK A.
Université Ibnou Zohr, Faculté des Sciences, BP 28/S. Agadir

INTRODUCTION

L'arganier du Sud-Ouest marocain est une ressource génétique forestière endémique à vocation agro-sylvo-pastorale. Son rôle environnemental se manifeste clairement dans son ambiance aride et pré-saharienne où aucune essence n'a pu le remplacer à l'état spontané. Cependant, l'état actuel de la santé de l'arganier n'est plus satisfaisant devant son rythme de dégradation accompagné d'une absence quasi totale de sa régénération naturelle sous l'effet de pressions multiples et répétitives subies par les différents écosystèmes. Il en résulte une perte certaine de la diversité génétique existante, d'où la nécessité d'une politique visant la sauvegarde d'une façon rationnelle de la diversité génétique disponible. En effet, l'analyse et l'évaluation de la diversité génétique vient en amont avant tout aménagement forestier. Par ailleurs, notre but est de mettre au point une gamme de marqueurs utilisant le polymorphisme génétique afin de décrire comment l'arganier est structuré aux niveaux intra et interpopulations d'une part, et de ressortir les méthodes et les implications pour la conservation d'autre part.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Douze populations d'arganier ont été échantillonnées en fonction de leurs disparités éco-géographiques (**Tableau 1**).

La collecte des fruits a porté sur des populations du littoral (représentées par des échantillons des populations *Tensift, Tamanar* et *Sidi-Ifni*, de la Plaine de Souss (*Ademine*), de la limite du plateau de Chichaoua (*Mijji*) et finalement des populations d'altitude provenant du Haut Atlas (*Argana* et *Tizint'est*), de l'Anti Atlas (*Ait Baha, Tafraout*) et du début du Sahara (*Guelmim*). À titre comparatif, deux populations isolées de l'aire principale de l'arganier ont été aussi analysées. Il s'agit d'un échantillon prélevé sur le versant sud de la haute vallée de *l'Oued Grou* (sud-est de Rabat) et sur les collines de *Beni-Snassen* (nord-est de Oujda).

Pour chaque site, la surface d'échantillonnage varie entre 1 à 2 hectares sauf dans la population de Guelmim où il a fallu prospecter dans une surface de 200 m/5 000 m (vu la rareté des pieds d'arganier).

On a utilisé des feuilles jeunes et fraîches pour l'électrophorèse des isozymes. Les plants d'arganier sont issus des germinations d'amandes après concassage. La germination a été réalisée à l'étuve (25°C) sur du papier imbibé dans des boîtes de Pétri. L'effectif par population varie de 20 à 50 à raison d'une graine par arbre. Le nombre total de plantules analysées est de 332.

Le protocole expérimental est basé sur trois étapes principales : l'extraction des enzymes solubles dans un tampon Tris HCl, ensuite la migration sur gel de polyacrylamide et enfin la révélation spécifique de l'activité enzymatique (EL MOUSADIK, 1997).

Neuf systèmes enzymatiques ont été choisis (*Aap, Adh, Amy, Est, Got, Lap, Mnr, Skd* et *Sod*). L'interprétation des zymogrammes a permis d'étudier le polymorphisme de

12 locus (**Tableau 2**). De plus, trois autres loci monomorphes (*Sod-1*, *Sod*-2 et *Sod*-3) ont été pris en compte afin de pouvoir comparer la diversité génétique de l'arganier à celle des autres espèces ligneuses (Hamrick *et al.*, 1992).

L'analyse des données a été réalisée à l'aide des programmes établis par Swoffrd & Selander (1989), Ritland (1989) et Pons & Chaouche (1995). D'autre part, afin de mieux valoriser les données isozymiques obtenues dans un but de conservation, nous avons caractérisé précisément chaque population à l'aide de paramètres génétiques décrits plus loin, dont certains sont inédits.

Tableau 1 : Liste et coordonnées des populations étudiées.

Populations	Abré-viation	Situation géographique	Longitude (Ouest)	Latitude (Nord)	Altitude (m)	Bioclimat
Ademine	AD	Plaine du Souss	9°22'	30°20'	90	Aride
Aït Baha	AB	Versant Nord de l'Anti Atlas	9°12'	30°06'	550	Aride
Argana	AR	Versant Sud du Haut Atlas	9°11'	30°47'	600	Aride
Beni-Snassen	BS	Nord-Est d'Oujda	2°36'	34°51'	260	Aride
Guelmim	GO	Limite nord du Sahara	10°04'	28°58'	530	Aride
Mijji	MI	Plateau de Chichaoua	9°19'	31°33'	350	Aride
Oued Grou	OG	Sud Est de Rabat	6°35'	33°43'	400	Semi aride
Sidi Ifni	SI	Côte Atlantique	10°07'	29°26'	20	Aride
Tafraout	TA	Versant Nord de l'Anti Atlas	8°58'	29°46'	1150	Aride
Tamanar	TM	Côte Atlantique	9°36'	31°06'	170	Semi aride
Tensift	TE	Côte Atlantique	9°25'	31°54'	110	Semi aride
Tizint'est	TT	Versant sud du Haut Atlas	8°22'	30°50'	1200	Aride

Tableau 2 : Description des systèmes enzymatiques utilisés.

Enzyme (Nombre EC)	Loci	Structure	Allèles
Aap			
(EC 3.4.11.1.)	*Aap-1*	monomérique	2
Adh			
(EC 1.1.1.1.)	*Adh-3*	dimérique	2
Amy			
(EC 3.2.1.2.)	*Amy-1*	monomérique	5
Est	*Est-1*	monomérique	3
(EC 3.1.1.6)	*Est-2*	„	5
Got	*Got*1	dimérique	2
(EC 2.6.1.1.)	*Got-2*	„	5
	Got-3	„	5
Lap	*Lap-1*	monomérique	3
(EC 3.4.11.1.)	*Lap-2*	„	2
Mnr-1			
(EC 1.6.99.2.)	*Mnr-1*	tétramérique	2
Skd			
(EC 1.1.1.25.)	*Skd-1*	monomérique	2
Total	12		38

RÉSULTATS

Structure génique et génotypique intrapopulation

Au niveau génique, 38 allèles ont été dénombrés chez les 12 loci polymorphes (Tableau 2). Le nombre moyen d'allèles par locus polymorphe après raréfaction (cf. El Mousadik et Petit, 1996a) est assez variable (Tableau 3), il va de 1,4 (isolat de l'Oued Grou) à 2,2 chez la population du versant sud du Haut Atlas (Tizint'est). Notons que les populations de Tafraout et Ademine sont également assez riches. Néanmoins, quelle que soit la population, le nombre moyen d'allèles observé est toujours largement en dessous du nombre théorique 3,16. Quatre loci parmi 12 (*Amy-1*, *Est-2*, *Got-2* et *Got-3*) présentent un taux d'hétéroallélisme très élevé (cinq allèles par locus). D'autre part cinq allèles (*Est-1*B, *Got-2*E, *Got-3*A,*Got-3*C et *Got-3*D) ne figurent qu'à l'état rare, leur fréquence moyenne étant inférieure à 5 %.

Tableau 3 : Paramètres génétiques des populations et contribution à la diversité totale.

Pop	*He*	*Ho*	F_{IS}	$R_{[40]}$	D_{ST}	G_{ST}	Ct*H*Tot	Ct*H*Div	Ct*H*Dif	Ct*R*Tot	Ct*R*Div	Ct*R*Dif
AB	0,258	0,246	0,046	1,8	0,065	0,27	-0,3	**-0,5**	0,2	-0,9	0,2	**-1,1**
AD	0,328	0,296	0,098	2,1	0,052	0,22	0,8	**1,4**	-0,6	0,6	**1,6**	-1,0
AR	0,299	0,275	0,080	1,8	0,048	0,23	-0,2	0,6	**-0,8**	-0,3	0,2	-0,5
BS	0,305	0,271	0,111	1,7	0,148	0,29	5,8	0,7	**5,1**	6,1	-0,8	**6,9**
GO	0,223	0,157	0,296	1,8	0,071	0,27	-0,9	**-1,5**	0,6	3,9	0,2	**3,8**
MI	0,300	0,250	0,167	1,7	0,040	0,22	-0,6	0,6	**-1,3**	-0,8	**-0,8**	0,0
OG	0,170	0,172	-0,012	1,4	0,073	0,31	-2,2	**-2,9**	0,7	-1,6	**-2,6**	1,0
SI	0,236	0,217	0,080	1,7	0,045	0,24	-2,1	**-1,1**	-1,0	-2,0	-0,8	**-1,2**
TA	0,331	0,319	0,036	2,1	0,047	0,18	0,5	**1,4**	-0,9	1,4	**2,0**	-0,6
TE	0,232	0,217	0,065	1,6	0,046	0,26	-2,1	**-1,2**	-0,9	-2,0	**-1,4**	-0,6
TM	0,305	0,254	0,167	1,8	0,054	0,24	0,3	**0,7**	-0,4	2,3	-0,3	**2,6**
TT	0,340	0,307	0,097	2,2	0,051	0,21	1,1	**1,7**	-0,6	5,4	2,5	**2,9**
Mo	**0,277**	**0,248**	**0,102**	**1,8**	**0,062**	**0,18**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**0,0**	**1,0**
|Mo|								**1,0**	**1,1**		**1,1**	**1,9**

N.B. ***He*** *hétérozygotie attendue sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg ;* ***Ho*** *hétérozygotie observée ,* F_{IS} *indice de fixation ;* $R_{[40]}$ *nombre moyen d'allèles différents après raréfaction à un effectif de 40 gènes ;* D_{ST} *différenciation absolue de la population k avec l'ensemble des autres ;* G_{ST} *différenciation relative de la population k avec l'ensemble des autres ;* ***CtH*** *contribution à la diversité totale de la population k (exprimé en pourcentage de* H_T*) ,* CtH_{DIV} *et* CtH_{DIF}*, fraction de la contribution dues à la diversité et à la différenciation (*$CtH_{tot} = CtH_{DIV} + CtH_{DIF}$*) ;* ***CtR*** *contribution à la richesse allélique totale de la population k.* ***Mo*** *moyenne (le* G_{ST} *moyen est obtenu en divisant la moyenne des* D_{ST} *par la diversité totale).* ***\|Mo\|*** *moyenne des valeurs absolues.*

Au niveau génotypique, 57 génotypes ont été observés pour l'ensemble des populations. Le nombre de génotype varie selon les loci de 3 (*Lap-2*, *Adh-3*, *Skd-1*, *Mnr-1*, *Aap-1*, et *Got-1*) à 9 (*Amy-1*). Certains ***allèles*** n'apparaissent qu'à l'état hétérozygote : *Est-1* A***B***, *Est-2* A***B***-***AC***-D***C***-D***E*** ; *Got-2* B***E***-***A***D, *Got-3* E***C***-E***D*** et *Amy-1* A***C***.

L'hétérozygotie moyenne observée varie de 0,17 (Oued Grou et Guelmim) à 0,3 (Tizint'est, Ademine et Tafraout). Cette variation d'hétérozygotie est accompagnée alors d'une variation de l'indice de fixation *F*. Ce dernier indique, pour l'ensemble des loci, un déficit généralisé d'hétérozygotie : $F_{IS} = 0,1$ (Tableau 3). Le test de χ^2 pour chaque locus par population, montre un écart significatif par rapport à la panmixie dans 26 % des cas.

Structure génétique interpopulations

L'indice de fixation à l'intérieur des populations ($F_{IS} = 0,085$) est très faible par rapport à l'indice de fixation de la population totale ($F_{IT} = 0,265$) ; cette différence reflète

l'ampleur de la différenciation entre les populations analysées : F_{ST} = 0,197. La différenciation est plus marquée pour les loci *Got-1*, *Got-3*, *Lap-1*, *Lap-2* et *Adh-3* (Tableau 4). Notons que le déficit en hétérozygotes sur l'ensemble des populations (F_{IT}) est dû principalement à l'hétérogénéité des fréquences alléliques entre les populations (effet Wahlund). Cela signifie que les flux géniques sont limités entre les populations, comme l'indique l'estimation du nombre de migrants par génération : Nm = 1,0, ou 0,9 après correction. Si on se base sur la moyenne des fréquences des allèles « privés » (Slatkin, 1985), le nombre estimé de migrants devient élevé (Nm = 11,9). Ceci est dû au fait que ces allèles uniques n'apparaissent que dans deux populations (Tizint'est : *Got-2*E et *Got-3*A ; Tafraout : *Got-3*C et *Got-3*D).

Tableau 4 : *F*-statistiques.

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
Est-1	0,085	0,150	0,071
Est-2	0,102	0,215	0,126
Got-1	0,378	0,896	0,833
Got-2	0,058	0,212	0,163
Got-3	0,082	0,419	0,367
Amy-1	0,064	0,251	0,199
Lap-1	0,292	0,496	0,288
Lap-2	0,068	0,417	0,375
Adh-3	-0,029	0,600	0,611
Skd-1	0,138	0,193	0,064
Mnr-1	-0,038	0,057	0,092
Aap-1	0,253	0,375	0,163
Moyenne	0,085	0,265	0,197

Critères d'identification de populations particulières sur la base des marqueurs moléculaires

Pour comparer les différentes populations entre elles, nous avons non seulement utilisé des paramètres classiques tels que la diversité génique, l'hétérozygotie observée, le déficit en hétérozygotes, la richesse allélique (après raréfaction ; El Mousadik et Petit, 1996a), mais aussi des paramètres nouveaux, destinés à mieux évaluer l'intérêt pour la conservation des différentes populations (ils sont *en italique*) :

1) Hétérozygoties observées $\boldsymbol{Ho}$ et attendues $\boldsymbol{He}$,

2) Indice de fixation $\boldsymbol{F_{IS}}$,

3) Richesse allélique corrigée, standardisée à 40 : $\boldsymbol{R'_{[40]} = R_{[40]} - 1}$,

4) *Différenciation absolue entre la population et l'ensemble des autres populations :*

$\boldsymbol{D_{STk} = H_{Tk} - H_{Sk}}$,

5) *Différenciation relative avec l'ensemble des autres populations :*

$\boldsymbol{G_{STk} = D_{STk}/H_{Tk}}$,

6) *Contribution à la diversité totale de la population* $\boldsymbol{k}$: $\boldsymbol{CtH = (H_T - H_{T\text{-}k})/H_T}$,

où $\boldsymbol{H_{T\text{-}k}}$ est la diversité totale en excluant la population k,

7) *Contribution à la richesse allélique totale de la population* $\boldsymbol{k}$:

$$\boldsymbol{CtR_{[40]} = (R'_{T[40]} - R'_{T\text{-}k[40]})/R'_{T[40]}},$$

Par ailleurs, les deux contributions à la diversité totale **C t*H*** et **C t*R*** ont été décomposées en deux termes, la contribution due à la diversité de la population, Ct_{DIV}, et la contribution due à la différentiation de la population, Ct_{DIF}.

Les résultats sont donnés dans les tableaux 3 et 5. Enfin, nous avons calculé l'importance des corrélations entre les mesures classiques et celles nouvellement proposées (Tableau 6).

La plus forte diversité génique *He* se rencontre dans les deux populations d'altitude Tizint'est et Tafraout, suivies de la population d'Ademine. L'isolat de Oued Grou a de loin la plus faible diversité (deux fois moins que Tizint'est), tandis que les deux populations du sud, Sidi Ifni et Guelmim, ont également une diversité génétique réduite. L'hétérozygotie observée *Ho* est très corrélée à la diversité théorique *He* ($r = 0,93$). Toutefois, elle est en moyenne plus faible, le déficit d'hétérozygotes (F_{IS}) étant presque toujours positif, sauf pour l'isolat de Oued Grou ($F_{IS} \sim 0$). La richesse allélique (standardisée à un échantillon de 40 gènes par locus) est fort corrélée à la diversité *He* ($r = 0,77$). Les populations les plus riches sont également Tizint'est, Tafraout et Ademine. Oued Grou à la plus faible richesse allélique, mais Tensift et Mijji (en limite nord de l'aire de distribution), ainsi que le deuxième isolat (Beni-Snassen) montrent également une richesse allélique réduite.

Les paramètres D_{ST} et G_{ST} permettent de repérer les populations les plus divergentes, indépendamment de leur diversité propre (le D_{ST} n'est pas corrélé aux deux mesures de diversité, tandis que le G_{ST} leur est négativement corrélé, $r = -0,74$ et $-0,75$). Le concept de divergence, ou différenciation, est aussi important pour évaluer l'intérêt d'une population que la diversité. Le paramètre D_{ST} permet d'estimer la différenciation absolue d'une population par rapport aux autres ; il s'agit d'une distance génétique, proche de la distance de Nei qui a servi à établir les dendrogrammes des figures 1 et 2. Cette distance génétique dépend, dans les modèles de génétique des populations, de l'effet combiné de la dérive dans des populations de taille finie, et de la mutation. Par contre, le G_{ST}, obtenu après normalisation par la diversité totale, est relié à la dérive mais aussi aux flux de gènes. La plus forte divergence, et de très loin, est trouvée pour la population isolée des Beni-Snassen ($D_{ST} = 0,148$). L'autre isolat (Oued Grou) arrive en deuxième position, avec la population sub-saharienne de Guelmim ($D_{ST} = 0,073$ et $0,071$). Pour le G_{ST}, obtenu après pondération de D_{ST} par la diversité totale, ce sont toujours les deux isolats, mais Oued Grou en tête, qui ont la plus forte valeur.

Une population, l'isolat de Beni-Snassen, contribue nettement plus à la diversité totale H_T que les autres, comme le montre la nouvelle mesure CtH = 5,8 % relativement à H_T. C'est dû essentiellement à sa grande différenciation (*cf.* son D_{ST} très élevé, ce qui se traduit par une part importante de sa contribution CtH liée à la différenciation : CtH_{DIF} = 5,1 %. Elle est d'autre part caractérisée par une diversité à peine plus élevée que la moyenne (CtH_{DIV} = 0,7 %). À l'autre extrême, on trouve l'autre isolat de Oued Grou. Bien que cette population soit également bien différenciée des autres populations ($CtH_{DIF} > 0$), sa diversité nettement inférieure à la moyenne engendre une contribution nette à la diversité totale négative (CtH = -2,2 %). Les populations du nord de l'aire, à la fois peu différenciées et peu variables, contribuent également à faire diminuer la diversité totale, mais on imagine mal que sa valeur soit négative. Les résultats concernant la contribution à la richesse allélique sont assez similaires, mais néanmoins complémentaires. C'est de nouveau l'isolat de Beni-Snassen qui contribue le plus à la richesse allélique totale. Toutefois, il est suivi de peu par la population du Haut-Atlas, Tizint'est. La population de Guelmim est également mise en relief par ce critère. On retrouve les mêmes populations du nord pour les plus faibles contributions.

Il faut noter que la fraction de la contribution due à la différenciation est plus élevée en moyenne que celle due à la diversité (cf. dernière ligne du tableau 3). Globalement d'ailleurs, la richesse allélique totale calculée sur 12 populations est plus élevée (de 1 %) que celle basée sur 11 populations, alors que la diversité H reste inchangée quand on passe de 11 à 12 populations.

Tableau 5 : Classement par ordre croissant des populations en fonction de leur contribution à la diversité intrapopulation et interpopulation.

Pop.	$R_{[40]}$	*Ho*	*He*	F_{IS}	Ct($R_{[n]}$)	Ct(H)	D_k	D_{STk}	G_{STk}
AB	5	8	8	3	9	7	3	4	4
AD	3	3	3	8	6	3	6	6	9
AR	4	4	7	6	7	6	8	8	8
BS	10	5	4	9	1	1	1	1	2
GO	6	12	11	12	3	9	2	3	3
MI	9	7	6	11	8	8	12	12	10
OG	12	11	12	1	10	12	4	2	1
SI	8	10	9	5	12	10	11	11	7
TA	2	1	2	2	5	4	9	9	12
TE	11	9	10	4	11	11	10	10	5
TM	7	6	5	10	4	5	5	5	6
TT	1	2	1	7	2	2	7	7	11

Tableau 6 : Matrice de corrélation entre les différents paramètres de diversité génétique.

	He	*Ho*	F_{IS}	$R_{[40]}$	D_{ST}	G_{ST}	CtH
Ho	0,93***						
F_{IS}	0,09	-0,28					
$R_{[40]}$	0,77**	0,73**	0,11				
D_{ST}	-0,06	-0,09	0,06	-0,26			
G_{ST}	-0,75**	-0,74**	0,01	-0,75**	0,63*		
CtH	0,61*	0,54	0,11	0,30	0,76**	0,01	
Ct$R_{[40]}$	0,47	0,30	0,46	0,46	0,57	-0,02	0,77**

N.B. *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$*

DISCUSSION

Structure génétique intra et interpopulations

Il est difficile en fait de savoir pour une telle étude ce qui limite la précision des paramètres de diversité. Nei (1976) considère qu'un nombre faible d'individus analysés n'est pas un inconvénient si le nombre de locus est élevé (plus de 50 !). Mais, pour

plusieurs raisons on se trouve généralement loin de l'effectif souhaité en marqueurs. Pons et Petit (1995) ont montré à la fois analytiquement et empiriquement, à l'aide de techniques de rééchantillonnage (*bootstrap*) qu'il est préférable d'augmenter le nombre total de populations plutôt que l'effectif des populations, pour les estimations en un locus donné, et ceci d'autant plus que la différenciation est forte, ce qui est le cas chez l'arganier.

L'organisation de la diversité génétique est mieux décrite à l'aide de plusieurs paramètres complémentaires, puisque tout paramètre, même synthétique, a ses limites théoriques et pratiques, les concepts sous-jacents à la diversité étant multiples. Les résultats obtenus sur l'arganier montrent que le nombre d'allèles (richesse allélique) est assez corrélé à la diversité de Nei. Toutefois, cette corrélation n'est pas systématique (Nevo *et al.*, 1981 ; El-Kassaby et Ritland, 1996 ; Kjaer et Siegismund, 1996). De plus, une meilleure description de la diversité génétique doit être menée sur la base des fréquences alléliques et génotypiques (Ouazzani, 1993 ; Fineschi *et al.*, 1994). En effet, la distance de Nei, par exemple (basée uniquement sur les fréquences alléliques), ne tient pas compte des différences locales du système de reproduction (des populations de composition génotypique très différente peuvent avoir des fréquences alléliques identiques).

Jusqu'à présent, les seules données disponibles sur la structuration des populations d'arganier ont été obtenues à partir des caractères du fruit et de la graine (Ferradous, 1995). Cette étude a porté sur 30 arbres de trois stations (Argana, Ait Baha et Ademine). Les résultats ont montré une grande similitude entre les trois stations pour les caractères étudiés (poids, longueur, largeur et rapport (L/l) de la graine et fruit). Avec les allozymes, ces trois stations (AR, AD et AB) ont également montré un niveau de ressemblance assez élevé ($d < 0{,}038/12$ loci, El Mousadik, 1997) tout en étant significativement différenciées. Cette confrontation des données morphologiques et enzymatiques mérite d'être développée. Il serait pour cela intéressant de disposer des valeurs additives d'un nombre de caractères mesurés dans des tests de provenances et de descendances. De tels tests restent à installer chez l'arganier.

À propos des relations entre distance génétique et distribution géographique, nous avons constaté chez les populations d'arganier que le degré de ressemblance est en gros compatible avec l'isolement géographique (El Mousadik, 1997), bien que le nombre de populations soit trop faible pour tester rigoureusement l'isolement par distance. Chez les arbres forestiers, des corrélations entre distance géographique et génétique ont été trouvées (Lundkvist, 1979 ; Liengsiri *et al.*, 1995 ; Gibson et Wheelwright 1995 ; Michaud *et al.*, 1995). D'autres ont au contraire montré l'absence d'une telle liaison entre distance génétique et géographique (Alden et Loopstra, 1987 ; Berg et Hamrick, 1993 ; Goncharenko *et al.*, 1994 ; Khasa *et al.*, 1994).

Dans la littérature, c'est surtout le G_{ST} qui est utilisé pour mesurer le degré de différenciation entre populations. On trouve généralement chez les espèces à large distribution, que les flux géniques sont très élevés. Le G_{ST} chute souvent à moins de 4 % (cas des chênes (*Quercus robur*, Zanetto *et al.* 1994 ; *Q. ilex* Michaud *et al.*, 1995) et de Douglas (Hoffmann et Geburek, 1995). À l'inverse, de fortes différenciations entre populations ont été enregistrées chez des espèces à aire de répartition morcelée ou à distribution discontinue (*Pinus torreyana*, $G_{ST} = 1{,}00$, Ledig et Conkle, 1983 ; *P. halepensis*, $G_{ST} = 0{,}30$, Schiller *et al.*, 1986 ; *P. maritima*, $G_{ST} = 0{,}17$, Petit *et al.*, 1995 ; *P. brutia*, $G_{ST} = 0{,}16$, Conkle *et al.*, 1988) ou bien chez des provenances d'*Eucalyptus* de Hawaï ($G_{ST} = 0{,}21$, Aradhya et Phillips, 1993).

Il faut parfois être prudent avec ces estimations de différenciation génétique quand elles sont basées sur un faible nombre de locus et de populations. En effet, pour des

espèces proches, selon l'échantillonnage des loci, des populations et des régions géographiques, des résultats assez différents ont été trouvés (El-Kassaby, 1991). Ainsi, chez *Racosperma mangium*, Moran *et al.* (1989) ont trouvé un G_{ST} de 0,31 (avec19 loci et 11 populations), alors que Khasa *et al.* (1994) ont trouvé une valeur de 0,09 (avec 16 loci et 13 populations). Chez *Acacia auriculiforme*, le G_{ST} obtenu par Wickneswari et Norwati (1993) était de 0,27 pour 10 loci et 18 populations; alors qu'il n'était que de 0,18 d'après ; Khasa *et al.* (1994) pour 14 loci et 13 populations.

Hamrick *et al.* (1992) ont fait une synthèse portant sur 322 espèces ligneuses ; ils ont comparé les résultats de diversité intrapopulation (*en incluant les loci monomorphes*) et interpopulation. Ils concluent notamment que la distribution géographique de l'espèce est un bon prédicteur de la variation génétique entre populations (aire endémique, régionale ou continentale). Par contre, les espèces à large distribution ont un pourcentage de locus polymorphe et une diversité intrapopulation plus élevés.

Afin de pouvoir effectuer une comparaison avec les valeurs moyennes des arbres forestiers (**Tableau 8**), notons tout d'abord que l'arganier possède un système de reproduction supposé de type allogame, une dissémination des graines par les animaux et une distribution limitée. On remarque que l'arganier possède une diversité (*He* = 0,217) plus élevée que la moyenne des Angiospermes (*He* = 0,143), mais aussi supérieure à celle rencontrée pour les espèces à distribution limitée ou *a fortiori* endémique, quelle que soit leur distribution en zone tempérée ou tropicale, ou leur mode de pollinisation ; par contre, cette diversité élevée est du même niveau que celle rencontrée chez les espèces dont les graines sont ingérées par des animaux. En ce qui concerne la différenciation (G_{ST}), elle est chez l'arganier plus élevée que chez toutes les autres catégories d'espèces d'arbres forestiers étudiées. Notons que chez l'arganier, en tant qu'Angiosperme à distribution limitée et à pollinisation entomophile, une différenciation plus élevée que la moyenne pouvait être prédite, d'après les résultats décrits au tableau 8. Toutefois, la valeur élevée obtenue n'est pas entièrement expliquée par l'appartenance aux différentes catégories du tableau.

Tous les facteurs évolutifs étudiés par Hamrick *et al.* (1992) peuvent influencer le niveau et l'organisation génétique des populations naturelles. Le coefficient de différenciation varie en particulier d'une façon considérable selon le mode de reproduction et l'importance des flux de graine et de pollen. Du fait de l'absence de flux géniques par le pollen, la différenciation G_{ST} est très élevée chez les espèces strictement autogames (exemple, *Bromus tectorum* G_{ST} = 0,48, Novak et al., 1991). Chez les allogames, les espèces à pollinisation entomophile sont généralement plus différenciées que les espèces à pollinisation anémophiles : par exemple, le G_{ST} a été estimé à 21 % chez l'Eucalyptus (Aradhya et Phillips, 1993) et à seulement 6 % chez les conifères anémophiles (Hamrick et Godt, 1990).

En outre, on sait que les facteurs écologiques influençant la floraison, non considérés par Hamrick *et al.* (1992), peuvent aussi partiellement expliquer le niveau de structuration génétique des populations (Young et al., 1993). Chez l'arganier, une première étude au niveau de trois stations géographiquement proches mais écologiquement différentes (Belmouden et al., 1995), a montré un effet hautement significatif de la localité sur le nombre de glomérules florifères, le pic de floraison étant séparé d'un mois environ entre les trois stations (Argana, Ademine et Ait Baha). Un tel décalage ne favorise pas les flux de gènes entre populations. Cela pourrait donc expliquer le niveau de différenciation élevé des populations d'arganier, outre l'isolement et l'éloignement géographique de certaines stations.

Tableau 7 : Diversité génétique intra et interpopulation des arbres forestiers (d'après Hamrick *et al.*, 1992), comparés à l'arganier

Catégories	*N*	*L*	*P*	*A*	*He*	G_{ST}
Taxon						
Gymnospermes	8,9	17,3	53	1,8	0,151 (0,008)	0,073 (0,010)
Angiospermes	*9,5*	*18,9*	*45*	*1,7*	***0,143** (0,010)*	***0,102** (0,012)*
Distribution						
Endémique	8,5	21,8	26	1,5	0,056 (0,010)	0.141 (0,049)
Limitée	*5,3*	*21,1*	*44*	*1,6*	***0,143** (0,010)*	***0,124** (0,016)*
Large distribution	5,4	14,0	74	2,6	0,228 (0,003)	0,033 (0,009)
Distribution						
Tempérée	12,2	17,7	49	1,8	0,145 (0,008)	0.092 (0.010)
Tropicale	*2,9*	*21,3*	*40*	*1,5*	***0,125** (0,012)*	***0,119** (0,025)*
Pollinisation						
Entomophile	*4,6*	*19.5*	*48*	*1,7*	***0,163** (0,011)*	***0,099** (0,017)*
Anémophile	11,3	17,51	53	1,8	0,154 (0,008)	0,077 (0,009)
Dissémination des graines						
Ingestion	*21,0*	*41*	*60*	*1,9*	***0,208** (0,022)*	***0,051** (0,010)*
Vent	8,4	18,3	51	1,8	0,149(0,008)	0,076 (0,009)
Argania spinosa	*12*	*15*	*48*	*1,7*	***0,217** (0,063)*	***0,197** (0,073)*

N : Nombre de populations , L : nombre de locus ; P . proportion de locus polymorphes : A · Nombre moyen d'allèles par locus.

Chez l'arganier, le degré de différenciation obtenu par les isozymes et l'ADNcp (G_{STn} = 20 %, G_{STc} = 60 %, El Mousadik et Petit, 1996b) a été comparé avec les valeurs observées chez d'autres arbres forestiers (**Tableau 7**). L'espèce *Eucalyptus nitens* montre la plus grande similitude avec l'arganier à la fois pour les données isozymiques et pour celles de l'ADNcp. Notons que l'eucalyptus est considéré comme étant un arbre entomophile avec un mode de dissémination des graines qui n'est pas clairement déterminé (Byrne et Moran, 1994). Dans tous les cas rapportés au tableau 8, comme on s'y attendait sur des bases théoriques (Petit *et al*, 1993a), le degré de subdivision de la diversité obtenu avec l'ADNcp est plus important qu'avec les isozymes (marqueurs nucléaires). Cependant, cette différence est beaucoup plus forte chez des espèces comme le hêtre et le chêne. Dans certaines conditions, le G_{ST} nucléaire et cytoplasmique peuvent être reliés pour estimer les taux de migration par graine et par pollen (Petit, 1992 ; Petit *et al.*, 1992, 1993a ; Ennos, 1994). En l'absence de données confirmant la transmission maternelle de l'ADNcp chez l'arganier, nous avons retenu cette hypothèse puisqu'à priori c'était le cas général des angiospermes (Neale et Sederoff, 1989). Le rapport des taux de migration (5) assez faible chez l'arganier est relativement proche de celui enregistré chez l'eucalyptus (1,8) et le douglas (7) (conifère avec dissémination éolienne du pollen et des graines). Tandis qu'il est très fort chez l'hêtre et le chêne où la dissémination des graines se fait par les oiseaux et

celle du pollen par le vent. Chez l'arganier, la connaissance des trajets parcourus et la reconstitution de l'histoire du mode de dissémination des graines après ingestion par les animaux (caprins, camelins, antilopes et autres) sera intéressante pour mieux comprendre comment les populations d'arganier sont structurées. D'autre part, bien que les valeurs semblent comparables à celles d'autres espèces entomophiles, il est nécessaire de confirmer cette hypothèse pour comprendre l'ensemble des facteurs biologiques régissant la structuration géographique de l'arganier.

Tableau 8. Comparaison de la différenciation génétique obtenue par des marqueurs nucléaires (isozymes) et des marqueurs cytoplasmiques (ayant une hérédité maternelle) chez des espèces forestières.

Espèces	G_{STn}	Référence	G_{STc}	Référence	m_p / m_s
Argania spinosa	20 %	cette étude	60 %	El Mousadik & Petit 1996b	5
Eucalyptus nitens	30 %	Moran, 1992	62 %	Byrne & Moran, 1994	1.8
Fagus sylvatica	5.4 %	Comps *et al.*, 1990	83 %	Demesure *et al.* 1996	84[a]
Pinus contorta	9 %	Wheeler & Guries, 1982	72 %[b]	Dong & Wagner, 1993	24
Pseudotsuga menziesii	24 %	Li & Adams, 1988	73 %[c]	Aagaard *et al.* 1995	7
Quercus petraea	2.4 %	Zanetto *et al.*, 1994	90 %	Petit *et al.*, 1993b	500
Quercus robur	3.2 %	Zanetto *et al.*, 1994	92 %	Petit *et al.*, 1993b	286

[a] Dans ces espèces le mode de transmission de l'ADNcp est inconnu, mais l'hérédité est supposée du type maternel

[b] Il s'agit ici de l'ADN_{mt} [c] Estimation obtenue avec des fragments RAPD hérités maternellement (probablement ADNmt).

Au niveau intrapopulation, l'analyse des structures génotypiques de l'ensemble des individus du sud ouest marocain a mis en évidence une déviation significative par rapport à la panmixie avec une tendance générale vers un déficit d'hétérozygotes (El Mousadik et Fakir, 1995). Hartl et Clark (1989) ont considéré qu'un léger déficit d'hétérozygotie est fréquemment dû à l'effet Wahlund, qui apparaît lorsque les populations échantillonnées sont elles-mêmes subdivisées en groupes d'individus caractérisés par des fréquences hétérogènes. Brown (1979) a expliqué qu'un déficit généralisé d'hétérozygotes se retrouve chez les espèces préférentiellement allogames (Paradoxe de l'hétérozygotie). Dans la littérature, un surplus d'homozygotes a été souvent rencontré chez des espèces allogames très longévives. C'est le cas par exemple chez *Fagus sylvatica* (Gregorius et al., 1986 ; Comps et al., 1990), *Quercus petraea* et *Q. robur* (Bacilieri et al., 1994) et *Ocotea tenera* (Gibson et Wheelwright, 1995). Ces derniers auteurs suggèrent qu'une dispersion limitée du pollen et/ou des graines donne lieu à un tel déficit. En effet, des différenciations génétiques importantes apparaissent alors sur des petites distances. Prat (1995) explique que le déficit d'hétérozygotie chez *Pseudotsuga menziesii* est dû probablement aux croisements qui ont lieu principalement entre les quelques arbres voisins.

Finalement, dans la zone d'étude (Sud-Ouest marocain), la discontinuité génétique observée entre la population d'altitude de Tafraout, caractérisée par la présence d'allèles rares, et celle d'Ait Baha, pourrait être liée à l'absence de flux de gènes entre des populations séparées par des zones d'altitude supérieure à 1200 mètres où l'arganier ne pousse pas. L'isolement de la population de Guelmim contribuerait également à sa forte différenciation génétique. Pour mettre en évidence de tels phénomènes, il faudrait envisager une étude détaillée de la distribution spatiale des formes alléliques d'isozymes ou d'autres marqueurs, en échantillonnant intensivement des populations sur l'ensemble de l'aire. L'analyse des autocorrélations spatiales

pourrait alors être effectuée pour tester l'existence et mesurer l'échelle de la structuration géographique (Sokal et Oden, 1978).

Diversité génétique et implications pour la conservation

Le calcul de la contribution de chaque population à la diversité totale (diversité génique de Nei, ou richesse allélique, grâce à la technique de raréfaction), et sa décomposition en deux composantes dues à la diversité et à la différenciation de la population par rapport au reste, constitue une nouvelle approche méthodologique adaptée à la conservation. Les particularités de chaque population peuvent ainsi être mises en évidence. Une population ayant une forte diversité n'est pas nécessairement la plus différenciée génétiquement des autres populations : les deux composantes de la contribution à la diversité peuvent être de signe égal ou opposé (cf. Tableau 3). Nous avons vu que les populations, comparées deux à deux, montrent parfois des différences extrêmes. Les populations isolées (Beni-Snassen surtout), marginales (Guelmim) ou de haute altitude, sont souvent singulières, malgré une diversité réduite (sauf pour les populations d'altitude, qui sont de plus très variables). Leur perte serait donc dommageable. Des populations comme Ademine ou Argana, bien représentatives et relativement variables, sont également intéressantes à un autre point de vue. Enfin, certaines populations du nord de l'aire (Tensift, Mijji) mais aussi du sud (Sidi Ifni), à la fois peu variables et peu différenciées, pourraient être considérées comme moins intéressantes. En fait, les résultats obtenus au chapitre suivant, à l'aide de l'ADN chloroplastique, montrent que c'est la population de Tensift qui est la plus originale, puisqu'elle est fixée pour un variant chloroplastique qui n'a été retrouvé nulle part ailleurs ! De tels résultats justifient bien l'importance d'examiner le comportement de chaque population, en fonction du marqueur étudié, avant de décider toute politique de conservation. On obtient de cette façon un maximum d'informations permettant une utilisation rationnelle des données acquises, et susceptibles de faciliter les échantillonnages futurs. Il est cependant très souhaitable de compléter nos données avec un nombre de loci et de populations plus élevé, et éventuellement des effectifs plus élevés par population, afin d'identifier plus d'allèles rares. Une étude de simulation visant à maximiser la richesse allélique dans des collections a montré l'influence du nombre de loci (neutres) pris en compte sur l'efficacité de la conservation, évaluée d'après la richesse allélique à des locus sélectionnés (Bataillon *et al.*, 1996).

Dans une étude similaire à la notre, réalisée sur le Douglas (avec 17 locus polymorphes et 49 populations), El-Kassaby et Ritland (1996) ont calculé les corrélations de différents paramètres génétiques (richesse allélique $\boldsymbol{A}$ (non standardisée, malgré des effectifs variables par population), diversité génétique $\boldsymbol{H}$ et divergence $\boldsymbol{D}$ (autre estimation proche de notre D_{ST} de la différenciation entre chaque population et l'ensemble des autres populations), et leur rôle pour la conservation. Malgré une différenciation quasi inexistante entre leurs populations, comparé au cas de l'arganier, ils concluaient qu'il serait dangereux d'en déduire que quelques populations suffisent à représenter le tout : il existe en effet toujours des allèles qu'on ne trouve que dans un sous-ensemble des populations, et qui pourraient facilement être perdus si on écarte *a priori* certaines populations. Yang et Yeh (1992) concluent différemment, mais leur approche est limitée à l'étude de quelques paramètres pour chaque population.

Finalement, à la lumière des données actuelles (richesse allélique, structuration génétique intra et interpopulations), la stratégie de conservation des ressources d'arganier devrait viser à un maintien d'une organisation spatiale de la diversité

génétique des populations sur l'ensemble de la distribution naturelle de l'espèce. Cette approche devrait considérer la variabilité génétique déjà existante, et préserver la dynamique évolutive de l'ensemble, en évitant un morcellement trop prononcé des populations. En effet, il ne faut pas perdre de vue l'importance des flux de gènes par pollen dans la conservation génétique des plants ; Elistrand (1992) a discuté l'effet bénéfique des flux de gènes par pollen pour atténuer la dépression liée à la consanguinité des populations de petite taille. Chez le Douglas, Prat (1995) a étudié les modalités de dispersion du nuage pollinique en utilisant les marqueurs isozymiques. Il a constaté notamment l'influence des vents dominants dans la dissémination du pollen. Enfin, combiner les données moléculaires et celles issues des caractères adaptatifs ne peut être que bénéfique pour la gestion des ressources génétiques d'arganier, la forte différenciation mise en évidence pour les caractères moléculaires pouvant être encore plus forte pour des caractères adaptatifs si les différences dans les conditions environnementales sont très marquées.

Remerciements

Nos sincères remerciements sont adressés aux responsables de la collaboration franco-marocaine (cadre *PRC*) et germano-marocaine par le biais du Coordinateur du Projet *Conservation et Developpement de l'Arganeraie*.

Bibliographie

1. AAGAARD J.E., VOLLMER S.S., SORENSEN F.C., STRAUSS S.H. 1995. Mitochondrial DNA products among RAPD profiles are frequent and strongly differentiated between races of Douglas-fir. *Molecular Ecology*, 4: 441- 447.
2. ARADHYA K.M., PHILLIPS V.D. 1993. Genetic Variability in fourteen provenances of Eucalyptus species in Hawaii. *Silvae Genetica*, 42: 9-15.
3. BACILIERI R., LABBE T., KREMER A. 1994. Intraspecific genetic structure in a mixed population of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl and *Quercus robur*. *Heredity*, 73: 130-141.
4. BATAILLON T.M., DAVID J.L., SCHOEN 1996. Neutral genetic markers and conservation genetics: Simulated germplasm collections. *Genetics (in press)*.
5. BELMOUDEN S., BANI AAMEUR F.,DUPUIS P. 1995. Distribution des glomérules florifères selon le type de rameau de l'arganier. Poster dans : Collogue International : *La foret face à la désertification « cas des arganeraies »*. Agadir 26-28 octobre. p 82.
6. BROWN A.H.D. 1979. Enzyme polymorphisms in plant populations. *Theor. Pop. Biol.*, 15:1-42.
7. BYRNE M., MORAN G.F. 1994. Population divergence in the chloroplast genome of *Eucalyptus nitens*. *Heredity*, 73: 18-28.
8. COMPS B.,THIÉBAUT B., PAULE L., MERZEAU D., LETOUZEY J. 1990. Allozymic variability in beech woods (*Fagus sylvatica* L.) over central Europe : Spatial differenciation among and within populations. *Heredity*, 65: 407-417.
9. CONKLE M.T., SCHILLER G.,GRUNWALD C. 1988. Electrophoretic analysis of diversity and phylogeny of *Pinus Brutia* and closely related taxa. *Syst. Bot.*, 13: 411-424.
10. DEMESURE B., COMPS B., PETIT R.J. 1996. Phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europ inferred by restriction studies of PCR-Amplified chloroplast DNA fragments. *Evolution, (in press)*.
11. DONG J., WAGNER D.B. 1993. Taxonomic and population differentiation of mitochondrial diversity in *Pinus banksiana* and *Pinus contorta*. *Theor. Appl. Genet.*, 86: 573-578.
12. EL KASSABY Y.A., 1991. Genetic variation within and among conifer populations : review and evaluation of methods. In *biochemical markers in the population genetics of forest trees.*

Ed. by S. Fineschi, M.E. Malvoti, F. Cannot and H.H. Hattemer, S.P.B. Acad. Pub. The Hague, pp 61-76.

13. EL KASSABY Y.A., RITLAND K. 1996. Genetic variation in low elevation Douglas-fir of British Columbia and its relevance to gene conservation. *Biodiversity and conservation*, 5: 779-794.
14. EL MOUSADIK A., 1997. Organisation de la diversité génétique de l'arganier *Argania spinosa* L. Skeels. Apport des marqueurs nucléaires et cytoplasmique. Thèse Doct. d'Etat. Univ. Ibnou Zohr Agadir. pp112.
15. EL MOUSADIK A., PETIT R.J. 1996a. High level of genetic differenciation for allelic richeness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* L. Skeels) endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 832-839.
16. EL MOUSADIK A., PETIT R. 1996b. Chloroplast DNA Phylogeography of the argan tree of Morocco. *Molecular Ecology*, 5: 547-555.
17. EL MOUSADIK A., FAKIR S. 1995. Analyse de la variabilité génétique des populations endémiques d'arganier (*Argania spinosa*). Comm. sous presse dans : Colloque international. *La forêt face à la désertification « cas des arganeraies »*. Agadir, 26 au 28 octobre.
18. ELISTRAND N.C. 1992. Gene flow by pollen : implications for plant conservation genetics *Oikos*, 63: 77-86.
19. ENNOS R.A. 1994. Estimating the relative rate of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, 72: 250-259.
20. FERRADOUS A. 1995. Diversité génétique de quelques caractères morphologiques du fruit et de la graine d'arganier. (*Argania spinosa* L. Skeels). Thèse de 3e cycle Université Ibnou Zohr. Agadir, pp 189.
21. FINESCHI S., MULVOLTI M.E., MORGANTE M., VENDRAMIN G.G., 1994. Allozyme variation within and among cultivated varieties of Sweet chestnut (*Castanea sativa*). *Can. J. For. Res.*, 24: 1160-1165.
22. GIBSON J.P., WHEELWRIGHT N.T. 1995. Genetic structure in a population of a tropical tree *Ocotea tenera* (Lauraceae) : influence of avian seed dipersal. *Œcologia*, 103: 49-54.
23. GREGORIUS H.R., KRAUHANSEN J., MULLER-STRACK G. 1986. Spatial and temporal genetic differenciation among the seeds in a stand of *Fagus sylvatica* L. *Heredity*, 58: 255-262.
24. HAMRICK J.L., GODT M.J.W. 1990. Allozyme diversity in plant species : In Brown A.H.D , Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. (eds) Plant population genetics, breeding and genetics resources. Sinauer, Sunderland, pp 43-63.
25. HAMRICK J.L., GODT M.J.W., SCHERMAN-BRAYLESS S.T. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest*, 6: 95-124.
26. HARTL D.L, CLARCK A.G. 1989. Principles of population genetics. 2nd ed. Sinauer, SunderLand.
27. HOFFMANN C., GEBUREK T. 1995. Allozyme variation of indigenous Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesi* (Mirb.) Franco] populations and their descendants in Germany. *Silvae Genetica*, 44: 222-225.
28. KHASA P.D., CHELIAK W.M., BOUSQUET J. 1994. Genetic variation in 26 populations of *Racosperma auriculiforme* and *Racosperma mangium* using allozymes. *Can. J. For. Res.*, 24: 1123-1132.
29. KJÆR E.D, SIEGISMUND H.R. 1996. Allozyme diversity in two Tanzanian and two Nicaraguan landraces of teak (*Tectona grndis* L.). *Forest Genetics*, 3 (1): 45-52.
30. LEDIG F.T., CONKLE M.T. 1983. Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic. Torrey pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr.). *Evolution*, 37: 79-85.
31. LIENGSIRI C., YEH F.C., BOYLE T.J.B. 1995. Isozyme analysis of a tropical forest tree, *Petrocarpus macrocarpus* Kruz. in Thailand. *For. Ecol. Manage* , 74: 13-22.
32. LUNDKVIST K. 1979. Allozyme frequency distributions in four Swedisch populations of Norway spruce (*Picea abies* K.). *Heriditas*, 90: 127-143.
33. MICHAUD H., TOUMI L., LUMARET R., ROMANE T.X LI., DI GUSTO F. 1995. Effect of geographical discontinuity on genetic variation in *Quecus ilex* L. (Holm oak). Evidence from enzyme polymorphism. *Heredity*,74: 590-606.
34. MORAN G.F. 1992. Patterns of genetic diversity in Australian tree species. *New Forests*,6: 49-66.
35. MORAN G.F., MUONA O., BELL J.C. 1989. *Acacia mangium*: A tropical forest tree of the coastal lowlands with low genetic diversity. *Evolution*, 43 (1): 231-235.
36. NEALE D.B., SEDEROFF R.R. 1989. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in Loblolly pine. *Theor. Appl. Genet.*,77. 212-216.

37. NÈGRE R. 1962. Petite flore des régions arides du Maroc Occidental. Centre National de la Recherche Scientifique. Paris.
38. NEI M. 1976. *F*-Statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Human Genet.*, 41: 225-233.
39. NEVO E., BAR-EL C., BAR Z., BEILES A. 1981. Genetic Structure and climatic correlates of desert landsnails. *Oecologica*, 48: 199-208.
40. NOVAK SJ, MACK R.N., SOLTIS D.E. 1991. Genetic variation in *Bromus tectonum* (*Poaceae*). Population differenciation in its north American range. *Am. J. Bot* 78 (8). 1150-1161
41. OUAZZANI N. 1993. Étude de la variabilité et les ressources génétiques de l'olivier (*Olea europea* L.) à l'aide du polymorphisme enzymatique. Thèse Docteur es-sciences I A. V Hassan II. Rabat. pp 70 + annexes.
42. PETIT R.J. 1992. Polymorphisme de l'ADN chloroplastique dans un complexe d'espèces. les chênes blancs européens. Approche de génétique des populations. Thèse, Univ. Paris XI. pp 115 + Annexes.
43. PETIT R.J., KREMER A., WAGNER D.B. 1993a. Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theor. Appl. Genet*, 87: 122-128.
44. PETIT R.J., KREMER A., WAGNER D.B. 1993b. Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. *Heredity*, 71: 630-641.
45. PETIT R.J., KREMER A., BACILIERIE R., DUCOUSSO A., ZANETTO A. 1992. Structuration génétique chez les chênes blancs européens. In : complexe d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes, pp. 155-163 Bureau des Ressources Génétiques Eds, Lavoisier, Cachan.
46. PONS O., CHAOUCHE K. 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. II. Diploid locus. *Theor Appl Genet*, 91:122-130.
47. PONS O., PETIT R.J. 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity I Haploïd locus. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 462-470.
48. PRAT D. 1995. Mating system in a Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco) Seed orchrd). II Effective pollen dispersal. *Ann. Sci. For.*, 52: 213-222.
49. SHILLER G., CONKLE M.T., GRUNWALD C. 1986. Local differenciation among Mediterranean populations of Allepo pine in their isoenzyms. *Silvae Genetica*, 35: 11-19.
50. SLATKIN M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39: 53-65.
51. SOKAL R.R., ODEN N.L. 1978. Spatial autocorrelation in Biology. 1; *Methodology. Biol J. Linn.*, 10: 199-228.
52. SWOFFORD D.L., SELANDER R.B. 1989. Biosys I: A computer programm for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics user manuals. Univ. of Illinois, Urbana.
53. WHEELER N.C., GURIES R.P. 1982. Population structure, genic diversity, and morphological variation in *Pinus contorta* Dougl. *Can. J. For. Res.*, 12: 595-606.
54. WICKNESWARI R., NORWATI M. 1993. Genetic diversity of natural populations of *Acacia auriculiformis*. *Aust. J. Bot.*, 41: 65-77.
55. YANG R.C., YEH F.C. 1992. Genetic Consequences of in situ and ex situ conservation of forest trees. *For. Chron.*, 68: 720-729.
56. YOUNG A.G., WARWICK S.I., MERIAM H.G. 1993. Genetic variation and structure at three spatial scales for *Acer saccharum* (*Sugare maple*) in Canada and the implications for conservations. *Can. J. For. Res.*, 23: 2568-2578.
57. ZANETTO A., ROUSSEL G., KREMER A. 1994. Geographic variation of inter-specific differentiation between *Quercus Robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Forest Genetics*, 1(2): 111-123.

D7 : Analyse de la diversité et des potentialités de fixation d'azote d'une collection locale de *Rhizobium* nodulant le haricot

MHAMDI R., AOUANI M.E., JEBARA M., GHRIR R., MARS M.
Laboratoire de Biochimie Végétale et Symbiotes, INRST. B.P. 95 2050 Hammam-Lif, Tunisie.

INTRODUCTION

Les *Rhizobium* sont des bactéries du sol capables de fixer l'azote atmosphérique. Ces bactéries sont d'une importance considérable en agriculture à cause de leur capacité d'améliorer le rendement de culture des légumineuses chez lesquelles elles forment des structures spécialisées : les nodosités racinaires au niveau desquels l'azote moléculaire est réduit en ammoniac qui constitue une forme assimilable par la plante.

Parmi ces légumineuses, le haricot, par ses graines riches en protéines : 18 à 30 % du poids sec de la graine (Mutschler & Bliss, 1981) est considéré parmi les plus importantes. Cependant, il est classé parmi les légumineuses les moins cultivées en Tunisie. En effet, la production nationale du haricot est encore loin de satisfaire les besoins de la consommation en hausse, d'où le recours à l'importation.

Cette faible productivité peut être expliquée, entre autres, par une mauvaise exploitation des potentialités de la fixation symbiotique de l'azote qui pourrait être due à : (i) une absence totale de *Rhizobium* spécifiques, (ii) une faible infectivité des souches indigènes de *Rhizobium*, (iii) une mauvaise efficience des souches existantes. Par ailleurs, l'utilisation de nouveaux cultivars et de nouvelles aires de culture rend l'inoculation indispensable pour l'amélioration des rendements de cette légumineuse.

Chez les *Rhizobium* les gènes essentiels pour la nodulation (gènes nod) et pour la fixation d'azote (gènes nif et fix) sont généralement localisés sur des plasmides géants dits plasmides symbiotiques (pSym). À coté de ces plasmides symbiotiques, les *Rhizobium* hébergent également d'autres plasmides cryptiques (Prakasch & Atherley, 1986).

Les bactéries symbiotiques du haricot sont très diversifiées. En effet, plusieurs taxons ont été caractérisés. L'utilisation des approches moléculaires (hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN, PCR-RFLP) a permis de les classer en trois espèces : (i) *R leguminosarum* biovar (bv.) *phaseoli* (Jordan, 1984), (ii) *R. tropici* (Martinez-Romero *et al.*, 1991), (iii) *R. etli* biovar *phaseoli* (Segovia *et al.*, 1993). Les deux premières espèces (*R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* et *R. etli* bv. *Phaseoli*) nodulent typiquement *Phaseolus vulgaris* et possèdent des copies multiples du gène *nif* H codant pour la nitrogénase (Quinto *et al.*, 1982; Martinez *et al.*, 1985).

La troisième espèce, *R. tropici* se distingue par sa capacité de noduler *Phaseolus vulgaris* , mais également la légumineuse tropicale *Leucaena spp. Rhizobium tropici* possède une seule copie du gène *nif* H (Martinez *et al.*,1985 ; Martinez *et al.*,1988).

Récemment, d'autres espèces génomiques ont été isolées des sols français (Géniaux *et al.*, 1993 ; Laguerre *et al.*, 1993).

Dans le cadre d'un programme d'étude de l'apport de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique pour le développement de la culture du haricot en Tunisie, nous avons entrepris un travail d'évaluation des populations locales des *Rhizobium* nodulant cette

plante. Ce travail a pour objectifs de : i) Constituer une collection locale de *Rhizobium* du haricot, ii) Evaluer l'efficience symbiotique des isolats de cette collection, iii) Examiner le niveau de diversité génétique par analyse des profils plasmidiques et par RFLP en utilisant des sondes plasmidiques (*nifH*, *nodB*).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel végétal

Deux variétés de haricot, *Phaseolus vulgaris*, (Coco et Royalnel) ont été utilisées pour la récupération des isolats de *Rhizobium*. La variété Coco a été utilisée pour l'évaluation de l'efficience symbiotique des isolats.

Matériel bactérien

Les souches de référence suivantes ont été utilisées : La souche CIAT 899 (*Rhizobium tropici*) est utilisée comme témoin de l'efficience symbiotique. Les souches SU 47 (*Rhizobium meliloti*) et PD 67 (*Agrobacterium tumefaciens*) sont employées pour leurs plasmides comme marqueur de taille. SU47 héberge deux plasmides de 1650 Kb et 1500 Kb (Burkardt & Burkardt, 1984, Burkardt et *al.*, 1987) et PD 67 héberge des plasmides de 267, 177, 117 et 35 MDa (Bromfield *et al.*, 1987).

Les souches ATCC10004^T (*R. leguminosarum* bv. *viciae*), R602 (*R. sp.*), CFN 42 (*R. etli* bv. *phaseoli*) et CFN 299 (*R. tropici*) sont employées pour des analyses RFLP.

Les isolats de la collection locale sont extraits des nodules (Vincent, 1970) des plantes de haricot cultivées sur des échantillons de sols prélevés de différents sites de deux régions de la Tunisie connues par la culture du haricot.

Milieux de culture

Les *Rhizobium* sont cultivés sur milieu YEM (Vincent, 1981) ou YEMA (YEM + agar 15 g/l et rouge congo 0,025 g/l) pour la propagation des cultures ou sur milieu TY (Beringer, 1974) ou HP (Hynes *et al.*, 1985) pour l'analyse des profils plasmidiques.

Les plantes de haricot sont cultivées sur milieu de Broughton et Dilworth (1971).

Test de nodulation

Le test de nodulation est effectué comme décrit par Beck *et al.*, 1993. Après huit semaines de culture, les plantes sont déracinées et examinées pour la nodulation.

Test de l'efficience symbiotique

L'expérience est conduite dans des pots en plastique (une plante par pot) sur un support de gravier stérile. L'inoculation est effectuée avec 1 ml d'une suspension bactérienne de 10^9/ml. Douze répétitions sont réalisées pour chaque isolat. Des témoins sont inclus dans l'essai.

Après huit semaines, les plantes sont récupérées et l'efficience symbiotique est estimée par mesure du poids de matière sèche de la partie aérienne et par dosage de l'azote total selon la méthode de Kjeldahl. Les résultats sont soumis à une analyse de variance (système SAS).

Caractérisation des profils plasmidiques

La visualisation des plasmides a été effectuée selon la méthode d'Eckhardt (1978) modifiée par Hynes (Hynes *et al.*, 1985 ;1986) et Espuny *et al.* (1987).

L'électrophorèse est conduite pendant 30 min à 0,8 V/cm puis pendant 5 heures à 5 V/cm dans un tampon TBE. Chaque isolat de *Rhizobium* est testé dans quatre gels séparés.

Analyse RFLP

L'ADN bactérien total est extrait comme décrit (Laguerre *et al.*, 1992). Un échantillon d'ADN est digéré par l'enzyme de restriction et aux conditions appropriées. Le produit de digestion est soumis à l'electrophorèse en gel d'agarose à 0,9 % dans un tampon TAE (40 mM Tris, 4 mM Na acétate, 1mM EDTA, pH 7,9). Après transfert sur filtre de nitrocellulose (southern blot) l'ADN digéré est hybridé avec la sonde non radioactive marquée à la dUTP-Digoxygenine (Boehringer Mannheim, Allemagne) et la détection est effectuée selon les recommandations du fournisseur. Les sondes utilisées sont : p15b (gène *nif* H) et p42d-7 (gène *nod* B). Le fragment d'ADN utilisé comme sonde est extrait du gel d'agarose sur papier DEAE-cellulose selon Sambrook *et al.* (1989).

RÉSULTATS

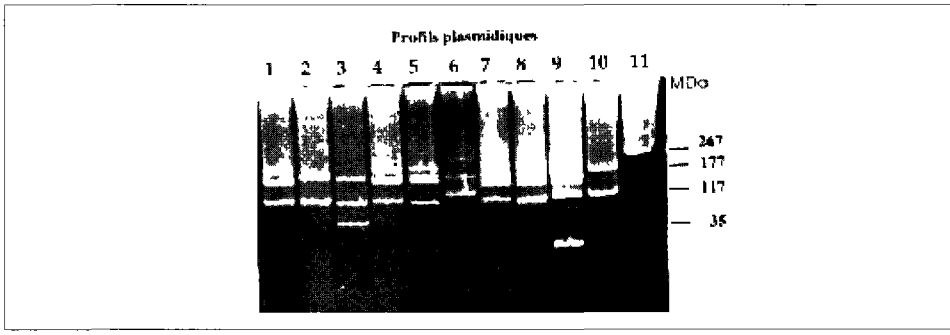
Constitution d'une collection locale de *Rhizobium* nodulant le haricot

Des prospections ont été menées dans deux régions connues par la culture du haricot au Nord-Ouest (Nord) et Nord-Est (Cap Bon) de la Tunisie. Des échantillons de sols ont été ramenés de trente neuf sites différents de ces régions. Deux variétés d'haricot (Coco et Royalnel) ont été cultivées sur ces sols et ont servi à l'isolement de *Rhizobium* à partir des nodules de ces plantes. Ainsi, une collection de 290 isolats a été établie. Ces isolats ont été authentifiés par la suite par leur aptitude à la nodulation dans des conditions bactériologiques contrôlées.

Caractérisation des profils plasmidiques

L'analyse des profils plasmidiques de 168 isolats de la collection locale de *Rhizobium* du haricot a été effectuée. Après electrophorèse en gel d'agarose, du lysat brut bactérien, des bandes ont été observées. À première vue, une hétérogénéité remarquable est notée (**figure 1**).

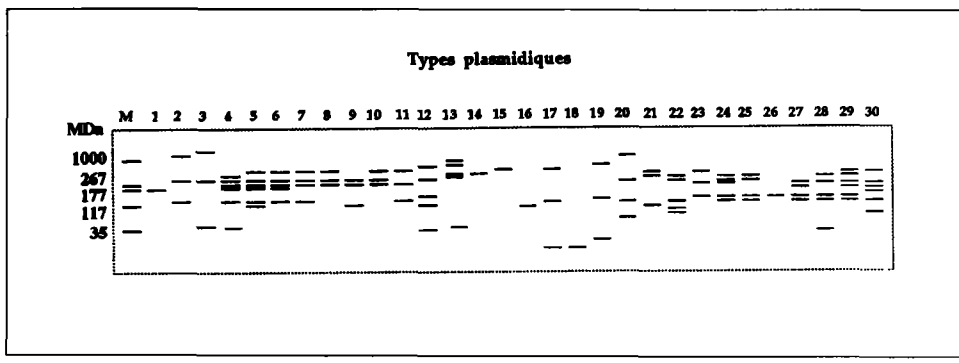
Figure 1. Exemple de profils plasmidiques de *Rhizobium* de haricot en Tunisie: Les profils ont été obtenus après électrophorèse en gel d'agarose 0,7% (voir matériels et méthodes).



1 à 11 différents isolats, les tailles indiquées sont celles des plasmides de la souche PD 67

La recherche de similarité totale entre profils plasmidiques a permis de faire des regroupements. Ainsi, 30 types plasmidiques ont été identifiés (**figure 2**).

Figure 2. Représentation schématique des différents types plasmidiques : Le regroupement des différents profils en types plasmidiques a été réalisé : chaque type plasmidique représente l'ensemble des profils entièrement identiques. 1 à 30 : différents types plasmidiques, M : marqueur de taille (plasmides des souches de référence PD67 et SU47).



Le nombre de bandes plasmidiques par profil varie de un à six. Le nombre le plus rencontré est de 3 plasmides (33 % des isolats) et le plus rare est de 1 plasmide (7 % des isolats). La taille des plasmides est variable, de moins de 35 MDa à plus de 1 000 MDa.

L'analyse de la distribution géographique des différents types plasmidiques a montré que chaque région est associée à des types plasmidiques distincts. Un seul type plasmidique s'est avéré commun au régions du Cap Bon et du nord. Ce type majoritaire (25 % des isolats) s'est également montré identique à celui de la souche commerciale CIAT 899. En outre, les profils plasmidiques des isolats des différents sites ont montré des homologies partielles entre eux ainsi qu'avec celui de la souche commerciale CIAT899.

Évaluation de l'efficience symbiotique des isolats

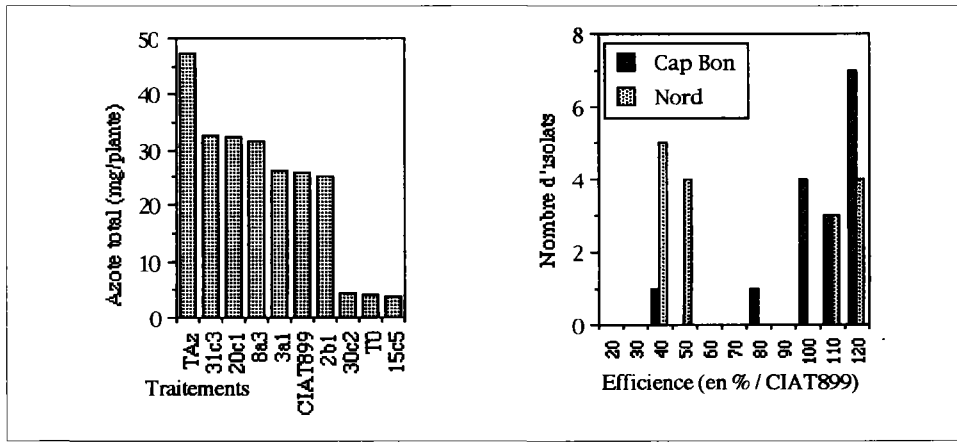
L'efficience symbiotique, se traduisant par la capacité des *Rhizobium* de fixer l'azote atmosphérique en symbiose, a été évaluée par analyse de la croissance végétale en estimant le poids de matière sèche et l'azote total. L'étude a été menée sur 32 isolats représentatifs de la majorité des types plasmidiques.

L'analyse statistique de ces résultats (test de Duncan) a permis de classer les moyennes en trois groupes homogènes (efficients, non efficients et à efficience intermédiaire).

L'efficience la plus élevée est celle enregistrée par un isolat du Cap Bon, soit 120 % de la souche commerciale, ce qui représente un bon rendement, significativement supérieur à celui de CIAT 899.

L'analyse comparative de l'efficience symbiotique des isolats des deux régions (nord et Cap Bon) a montré que ceux du Cap Bon sont significativement non différents de CIAT899, alors que ceux du nord se situent dans un groupement à efficience symbiotique intermédiaire entre celle de CIAT 899 et celle du témoin négatif ne recevant pas d'inoculum (**Figure 3**).

Figure 3. Efficience symbiotique des isolats de *Rhizobium* du haricot en Tunisie.



a Rendement en azote de la partie aérienne de quelques isolats représentatifs des trois groupes d'efficience Taz témoin azoté, TO · témoin non inoculé b Nombre d'isolats et pourcentage d'efficience, par rapport à la souche de référence CIAT 899, pour chacune des deux régions.

L'analyse des relations possibles entre efficience symbiotique et profils plasmidiques n'a permis d'établir aucune corrélation entre le type de profil, le nombre de plasmides ou leur taille globale et le degré d'efficience.

Analyse par RFLP

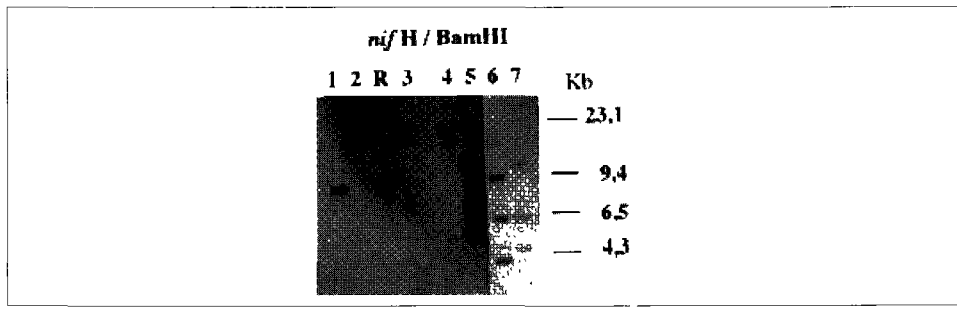
L'analyse du polymorphisme de la taille des fragments de restriction (RFLP) a été conduite sur 33 isolats locaux et 5 souches de références (CFN42, CFN299, R602, ATCC10004, CIAT899) représentant différentes espèces de *Rhizobium* nodulant le haricot.

L'analyse a été conduite avec deux sondes spécifiques des plasmides symbiotiques (*nifH* et *nodB*).

• *Utilisation de la sonde* nif H

L'hybridation avec la sonde *nifH* a permis de révéler 7 types de profils différents. Chaque type de profil est distinct des autres soit par le nombre des bandes ou leurs tailles. Un exemple de profils est montré sur la figure 4.

Figure 4. Analyse par RFLP en utilisant la sonde *nifH*. L'ADN génomique total des isolats de *Rhizobium* a été digéré avec l'enzyme de restriction BamHI, transféré sur filtre de nitrocellulose puis hybridé avec la sonde *nifH*.



Les tailles indiquées (en Kb) correspondent aux fragments de restriction de l'ADN du phage digéré par HindIII. 1 à 7 : différents isolats, R : souche de référence R602

Dix-neuf des 33 isolats testés présentent une seule copie du gène *nif* H (une seule bande est observée). Tous les types de profils de ces isolats sont différents de ceux des souches de référence CIAT 899 et CFN299 qui sont également caractérisées par la présence d'une copie unique du gène *nif*H.

L'examen des différents types de profils a permis de faire la subdivision en 4 sous-groupes (par la taille de la bande observée) : i) un 1er sous-groupe est représenté par 4 isolats (3 originaires du nord et 1 du Cap Bon) qui possèdent la propriété de pousser sur milieu LB. Cette propriété les distingue de tous les autres isolats, ii) un 2e sous-groupe est représenté par 8 isolats originaires du nord (2 isolats) et du Cap Bon (6 isolats). Le type de profil de ces isolats est identique à celui de la souche de référence R602, iii). Les deux derniers sous-groupes sont représentés par 1 et 6 isolats.

Des profils présentant trois copies du gènes *nifH* ont été également identifiés. Ces profils sont répartis en trois sous types de profils dont un profil identique à celui de la souche de référence *R. etli* CFN42. Onze isolats sont classés dans ce groupe.

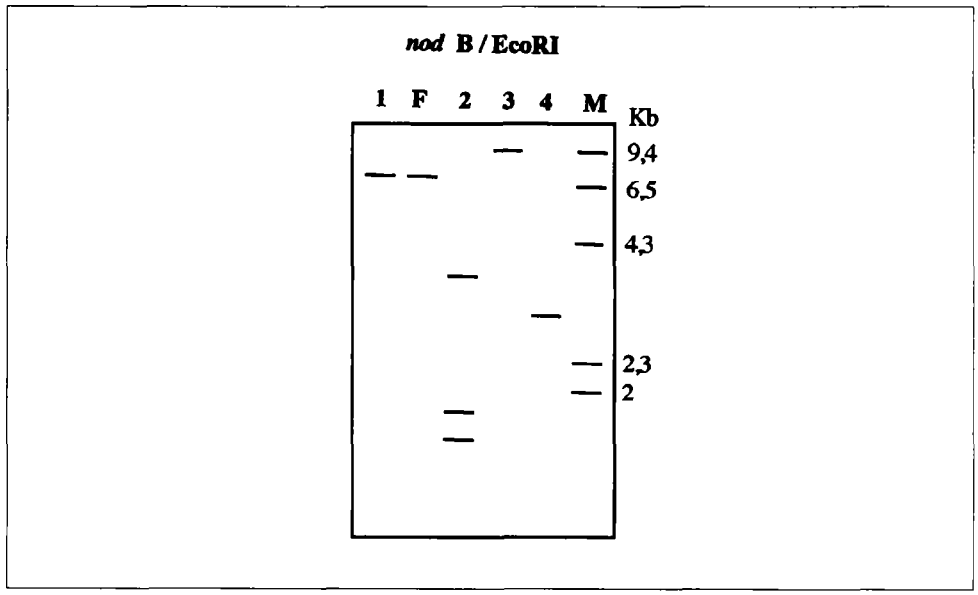
Trois des 33 isolats analysés n'ont pas répondu, à forte stringence, à la sonde *nifH* (« zéro » copie de *nif* H). Il s'agit d'isolats non efficients.

• *Utilisation de la sonde* nodB

Le gène *nod*B semble être spécifique des espèces de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli et Rhizobium etli* biovar *phaseoli*. L'utilisation du gène *nodB* comme sonde a permis de révéler, après hybridation avec l'ADN génomique total digéré par l'enzyme de restriction EcoRI, 4 types de profils différents (fig. 5).

Seuls des isolats à trois copies de *nifH* donnent une réponse positive à forte stringence. Toutefois, un des 3 isolats à « zéro » bande *nifH* a répondu positivement à la sonde *nodB*.

Figure 5. Représentation schématique des différents types de profils obtenus de l'analyse par RFLP, de l'ADN génomique total des isolats de *Rhizobium* digéré par EcoRI en utilisant la sonde *nod* B.



1 à 4 : les 4 types de profils. M : marqueur de taille · les tailles indiquées (en Kb) correspondent aux fragments de restriction de l'ADN du phage digéré par HindIII. F : souche de référence CFN42

Les différents types de profils observés peuvent être classés (selon la taille ou le nombre des bandes) en quatre groupes distincts : i) Un premier groupe, présentant une seule bande, est représenté par 6 isolats. Le profil montré par ces isolats présente une homologie parfaite avec celui de la souche de référence de *Rhizobium etli* CFN42, ii) Deux autres groupes de profils à une seule bande sont représentés chacun par un seul isolat. Ces deux types sont différents de celui de CFN42, iii) Le dernier groupe est représenté par deux isolats dont le profil est caractérisé par la présence de 3 bandes.

• Utilisation de l'ADN génomique des souches de référence comme sonde

L'ADN génomique de chacune des 5 souches de référence (CIAT899, CFN42, ATCC10004, R602 et CFN299) a été utilisé comme sonde pour la recherche d'homologie entre les différents isolats et ces souches de références. Les résultats obtenus ne montrent aucun isolat local qui répond positivement à l'ADN génomique des souches CIAT 899 et CFN299. Treize isolats répondent, à forte stringence, à l'ADN génomique de la souche R602. Neuf isolats répondent positivement à la sonde correspondant à l'ADN génomique de la souche de référence ATCC10004 et 5 isolats donnent une réponse positive avec la souche CFN42. Six des 33 isolats testés ne répondent avec aucune des sondes employées.

Test de nodulation de *Leucaena leucocephala*

Certaines espèces de *Rhizobium* nodulant le haricot sont caractérisées par leur capacité de noduler la légumineuse tropicale *Leucaena leucocephala.* Il s'agit du groupe de *R. tropici.* ainsi que des deux espèces génomiques R602 et H152. En vue de tester la réponse de nos isolats locaux, préalablement caractérisés par RFLP pour ce caractère, ce test a été effectué.

Sur l'ensemble des 33 isolats testés, seulement 13 se sont avérés capables de noduler *Leucaena.* Tous les isolats nodulant *Leucaena* sont à une seule copie *nif* H. Tous les isolats ayant 3 copies de *nifH* ne nodulent pas *Leucaena.* Par ailleurs, il est à remarquer que tous les isolats nodulant *Leucaena* ont une efficience symbiotique élevée sur le haricot, exception faite d'un seul isolat.

DISCUSSION

Une collection de 290 isolats locaux de *Rhizobium* nodulant le haricot a été constituée.

L'évaluation de la diversité génétique par analyse de la composition plasmidique de 168 isolats a permis de dégager 30 types plasmidiques différents. Un seul type (majoritaire) s'est avéré commun aux deux régions prospectées.

L'analyse de l'efficience de 32 isolats représentant la majorité des types plasmidiques a permis d'observer une variabilité remarquée ; d'une part, entre les isolats d'un même site ; d'autre part, entre les isolats du nord et les isolats du Cap Bon. Ainsi, la majorité des isolats du Cap Bon sont efficients, alors que seulement 50 % des isolats du nord sont efficients. Certains isolats voient leur efficience dépasser celle de la souche commerciale CIAT 899.

La diversité observée, aussi bien au niveau des profils plasmidiques, qu'au niveau de l'efficience, est en parfait accord avec les résultats décrites dans la littérature (Laguerre *et al.*, 1992 ; Harrison *et al.*, 1988 ; Mozo *et al.*, 1988).

L'analyse de la diversité génétique des isolats de cette collection, par RFLP, en utilisant des sondes plasmidiques a permis de tirer les conclusions suivantes : i) Un ensemble de 19 isolats présentent une seule copie du gène *nif* H. 13 de ces isolats sont capables de noduler la légumineuse tropicale *Leucaena leucocephala.* Ces isolats

constituent un groupe homogène. Ils sont répartis en 2 profils avec la sonde *nif* H dont un est identique à celui de la souche de référence R602. Par ailleurs, tous ces isolats sont regroupés dans les deux types plasmidiques 2 (majoritaire) et 20 qui possèdent 3 plasmides en commun et ne diffèrent que par une bande supplémentaire chez le type 20. En outre, ces isolats donnent une réponse négative avec la sonde *nodB*. Ils ne semblent pas donc appartenir aux espèces de *R. leguminosarum,* biovar *phaseoli* ni *de R. etli.* biovar *phaseoli.* Leur appartenance à l'espèce génomique R602, qui n'a été décrite que dans des sols français (Laguerre *et al.*, 1993), pourrait donc être suggérée, ii) 10 des 33 isolats testés avec la sonde *nodB* répondant positivement. Tous ces isolats sont à 3 bandes *nifH* . Ils hybrident, à forte stringence, avec l'ADN génomique, de l'une ou l'autre des souches de référence CFN42 ou ATCC10004, utilisé comme sonde. Ces résultats laissent soupçonner leur appartenance aux espèces *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* ou *R. etli* biovar *phaseoli.*

En se basant sur les critères utilisés dans cette étude (RFLP avec les sondes plasmidiques *nifH* et *nodB* , le test de nodulation de *Leucaena leucocephala*) ainsi que sur d'autres résultats (résistance à l'acide nalidixique, résistance à la streptomycine et la croissance à pH acide, croissance sur certains substrats carbonés) une partie des isolats de notre collection locale ne peuvent être classés dans les espèces génomiques déjà connues de *Rhizobium* nodulant le haricot (Amarger *et al.*, 1994, Jordan, 1984, Laguerre *et al.*, 1993, Martinez-Romero *et al*, 1991, Segovia *et al.*, 1993).

L'analyse de la répartition géographique des différents isolats semble montrer que les isolats rapprochés à R602 sont originaires des deux régions prospectées. Au contraire, les isolats pouvant être considérés comme *R. etli* sont tous originaires de la région nord et à l'inverse les isolats classés comme *R. leguminosarum* sont tous originaires du Cap Bon.

Le reste des isolats non identifiées prennent leurs origines de l'une ou l'autre des régions.

Ces résultats montrent ainsi la grande diversité des populations locales de *Rhizobium* nodulant le haricot en Tunisie. La confirmation de ces résultats et une meilleure compréhension de l'appartenance des isolats locaux aux différentes espèces de *Rhizobium* nodulant le haricot nécessite certainement l'utilisation d'autres marqueurs, dont notamment la PCR, en utilisant comme sonde l'ADNr 16 S ou la séquence intergénique des ADN r 16S - ADNr 23 S.

Par ailleurs, ces résultats soulignent l'importance considérable qui réside dans la caractérisation et l'évaluation de cette population et ses retombées sur les programmes de développement de la culture du haricot.

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de la Fondation Internationale pour la Science (Bourse de Recherche C/2237-1, M. MARS) et à l'AUPELF.UREF (Laboratoire Associé Francophone, LAF 310).

Nous remercions vivement les professeurs : - E.S.P. Bromfield (Canada) de nous avoir fourni les souches de référence SU47 et PD67, - N. AMARGER (INRA Dijon, France) de nous avoir fourni les souches de références CFN42, CFN292, les espèces génomiques R602 et H152 ainsi que les sondes comportant les gènes *nifH* et *nodB*, B.D. EARDLY (USA) pour les souches de références CFN42 et CFN299. Nos remerciements vont également au Prof. B. DREYFUS (ORSTOM, Sénégal) et le Service graines (Institut des Forêts, Tunisie) qui nous ont fourni les graines de *leucaena.*

Bibliographie

1. AMARGER N., BOURS M., REVOY F., ALLARD M. R., LAGUERRE G. (1994). *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. Plant and soil. **161**: 147-156.
2. BECK D.P., MATERON L.A. , AFANDI F. (1993). Practical *Rhizobium*- Legume Technology Manual. I.C.A.R.D.A. Box 5466, Aleppo, SYRIA.
3. BERINGER J.E. (1974). R-factor transfer in RHizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol. **84**: 188-198.
4. BROMFIELD E.S.P., THURMAN N.P., WHITWILL S.T., BARRAN L.R. (1987). Plasmids and symbiotic effectiveness of representative phage types from two indigenous populations of *Rhizobium meliloti*. J. Gen. Microbiol. **133**: 3457-3466.
5. BROUGHTON W.J., DILWORTH M.J. (1971). Control of leghemoglobin synthesis in snakebeans. Biochem. J. **125**: 1075-1080.
6. BURKARDT B., BURKARDT H.J. (1984). Visualization and exact molecular weight determination of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid. J. Mol. Biol. **175**: 213-218.
7. BURKARDT B., SCHILLIK D., PUHLER A. (1987). Physical characterization of *R. meliloti* megaplasmids. Plasmid **17**: 13-25.
8. ECKHARDT T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid **1**: 584-588.
9. ESPUNY M.R., OLLERO F.J., BELLOGIN R.A., RUIZ-SAINT J.E., PEREZ-SILVA J. (1987). Transfer of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* symbiotic plasmid pRtr5a to a strain of *Rhizobium sp.* that nodulates on *Hedysarum coronarium*. J. Appl. Bacteriol. **63**: 13-20.
10. GENIAUX E., LAGUERRE G., AMARGER N. (1993). Comparison of geographically distant populations of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. Mol. Ecol **2** 295-302.
11. HARRISON S.P., JONES D.G., SCHUNMANN D.H.D., FORSTER J.W., YOUNG J.D.W. (1988) Variation in *R. leguminosarum* bv. *trifoli* symbiotic plasmids and the association with effectiveness of nitrogen fixation. J. Gen. Microbiol. **134**: 2721-2730.
12. HYNES M.F., SIMON R., PUHLER A. (1985). The developement of plasmid free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pAtC58. Plasmid **13**: 99-105.
13. HYNES M.F., SIMON R., MULLER P., NIEHANS K., LABES M., PUHLER A. (1986). THe two megaplasmids of *R. meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. Mol. Gen. Genet. **202**: 356-362.
14. JORDAN D.C. (1984) Family III. Rhizobiaceae. in : Krieg N.R., Holt J.G. (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. **1**, pp. 234-242. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
15. LAGUERRE G., GENIAUX E., MAZURIER S.I., CASARTELLI R.R., AMARGER N. (1993). Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv *trifolii* and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. Can. J. Microbiol. **39**: 412-419.
16. LAGUERRE G., MAZURIER S.I., AMARGER N. (1992). Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae in field populations. FEMS Microbiol. Ecol. **107**: 17-26.
17. MARTINEZ E., FLORES M., BROM S., ROMERO D., DAVILA G. PALACIOS R. (1988). *Rhizobium phaseoli*: A molecular genetics view. Plant and soil. **108**: 179-184.
18. MARTINEZ E., PARDO M.A., PALACIS R., CEVALLOS M.A. (1985). Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity to *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. J. Gen. Microbiol. **131**: 1779-1786.
19. MARTINEZ-ROMERO E., SEGOVIA L., MERCANTE F.M., FRANCO A.A., GRAHAM P., PARDO M.A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L beans and *Leucaena sp.* trees. Int. J. Syst. Bacteriol. **41**: 417-426.
20. MOZO T., CABRERA E., RUIZ-ARGUESO T. (1988). Diversity of plasmid profils and conservation of symbiotic nitrogen fixation genes in newly isolated *Rhizobium* strains nodulating sulla (*Hedysarum coronarium* L.). Appl. Environ. Microbiol. **54**: 1262-1267.
21. MUTSCHLER M.A. ,BLISS F.A. (1981) Inheritance of bean seed globulin content and its relationship to protein content and quality. Crop Science **21**: 289-295.
22. PRAKASCH R.K., ATHERLY A.G. (1986). Plasmids of *Rhizobium*, their role in symbiotic nitrogen fixation (review). Int. Rev. Cytol. **104**: 1-24.

23. QUINTO C., DE LA VEGA H., FLORES M., FERNANDEZ L., BALLADO T., SOBERON-CHAVEZ G., PALACIOS R. (1982). Reiteration of nitrogen fixation genes sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature (London) **299**: 724-726.
24. SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, N.Y.
25. SEGOVIA L., YOUNG J.P.W., MARTINEZ-ROMERO E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* type I strains in a new species, *Rhizobium etli sp.* nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **43**: 374-377.
26. VINCENT J.M. (1970). A Manual for the Practical Study of the Root nodule Bacteria. IBP handbook No. 15. Blakwell, Oxford.
27. VINCENT J.M. (1981). The genus *Rhizobium*. In the Procaryotes Vol. I. Academic Press.

D8 : La détection des sérotypes de deux potyvirus des légumineuses (CABMV et B1CMV) dans des plantes adventices au Togo

ATISSIME K.[1] et Y.E., DIBAHOMA S.[1], GUMEDZOE M.Y.D.[1], AKPAGANA K.[2]

Universite du Bénin. (1) École Supérieure d'Agronomie. Laboratoire de Virologie Végétale. (2) Faculté des Sciences, Département de Botanique, B.P. 1515 Lomé, Togo, Fax (228) 218595.

INTRODUCTION

Le niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp.), légumineuse à graine est confrontée sous les tropiques à plusieurs contraintes parmi lesquelles les maladies virales occupent une place de choix. Parmi ces dernières, celles causées par le virus de la mosaïque niébé transmis par pucerons (CABMV) et celui de la mosaïque du niébé à yeux noirs (BlCMV) entraînent souvent des pertes considérables de rendement (30 à 87 % et parfois plus) (1,2). Plusieurs travaux font état également de l'existence du BlCMV et du CABMV sur des espèces végétales spontanées, généralement dans des plantes adventices diverses qui joueraient un rôle important dans la distribution et le déclenchement des épidémies virales dans les cultures de niébé (1,3,).

Les deux Potyvirus (BlCMV et CABMV) ont été identifiés au Togo (3, 4) mais leurs sérotypes n'ont pas encore été déterminés, de plus, leurs réservoirs dans la nature ne sont pas connus. Nous avons donc décidé de procéder à l'inventaire des sérotypes des deux virus dans les plantes adventices couramment rencontrées dans les cultures du niébé au Togo (Figure 1). Les résultats obtenus font l'objet du présent article.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

• *Le matériel végétal*

Les graines de la plupart des plantes tests ainsi que celles des variétés de niébé utilisées ont été fournies par l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA ; IBADAN, NIGERIA). Les graines sont semées dans des pots en plastique de 8,5 cm x 10 cm remplis de terreau stérilisé. Après le semis, les pots sont gardés dans des cages grillagées, à l'abri des insectes, jusqu'à l'obtention de jeunes plants prêts à être inoculés. Les plantes tests utilisées sont : *Nicotiana benthamiana, N. rustica, N. glutinosa, N. tabacum Samsum, Vigna unguiculata* (L.) Walp.

LES ANTICORPS UTILISÉS

Nous avons utilisé :

- un anticorps monoclonal universel pour la détection des virus du groupe des Potyvirus (anticorps commercialisé par Agdia Inc. USA) ;

- deux anticorps polyclonaux Ab^rH_3 (à la concentration 1mg/ml) et Ab^rH_4 (à la concentration plaques 2mg/ml) pour la détection du BlCMV et du CABMV ;
- les anticorps monoclonaux 16G5 et 15E6 couplés au 10G5 Biot. permettant la détection respectivement des sérotypes A, et B du BlCMV. Les sérotypes C, D, E F et G du CABMV ont été identifiés en utilisant respectivement les couples d'anticorps (IF5-IF5 Biot ; 5H5-7D9 Biot ; 12F9-6C10 Biot et 5H5-5H5 Biot).(5,6)

MÉTHODES

La collecte des échantillons

Les feuilles des plantes virosées ou non ont été récoltées dans diverses localités des Préfectures d'Amou, de l'Ave, de Danyi, du Golfe, de Kloto, de Tchaoudjo, de Tone, et du Zio (Figure 1). Nous avons aussi récolté des graines de certaines de ces adventices que nous avons utilisées lors des tests biologiques. Les échantillons sont conservés au froid dans une glacière jusqu'au laboratoire où ils sont gardés au congélateur jusqu'à leur utilisation pour les inoculations et pour les tests sérologiques.

Identification des sérotypes du BlCMV et du CABMV

L'identification du BlCMV, du CABMV et leurs sérotypes a été réalisée par la méthode immuno-enzymatique ELISA en utilisant soit des anticorps polyclonaux (produits par l'IITA), soit des anticorps monoclonaux (produits à la station de Recherche de l'Agriculture Canada à Vancouver) soit une association des deux types d'anticorps. Les différentes étapes de cette technique et leurs conditions de réalisation ont été précédemment décrites dans d'autres publications (5,6).

Symptomatologie sur des plantes indicatrices et évaluation de cultivars de niébé à l'égard des isolats 23-27 et 12-496/94 du CABMV.

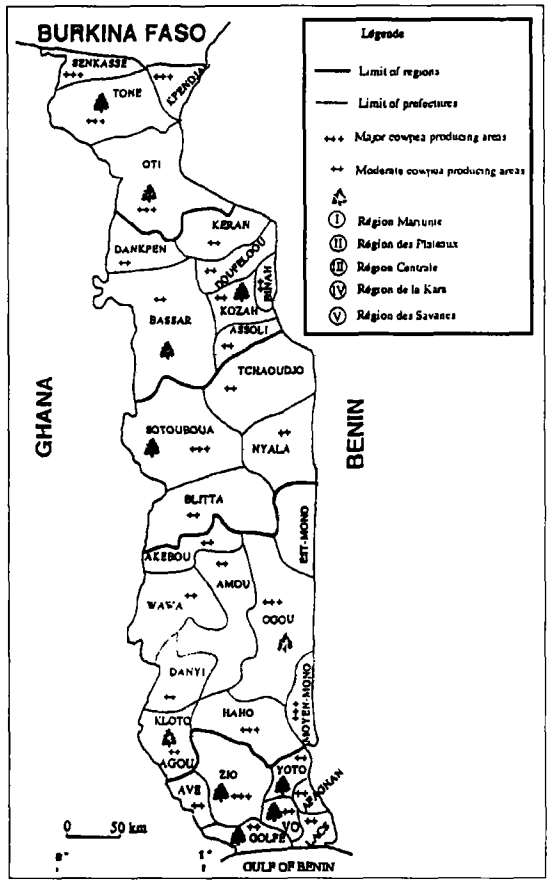
Nous avons procédé à l'inoculation mécanique de 31 et 21 cultivars de niébé respectivement avec les isolats clonés 23-27 et 12-496/94 du CABMV tous deux appartenant au sérotype C.

L'isolat 23-27 a été prélevé sur du haricot vert à Sotouboua-Ville ; l'isolat 12-496/94 a été récolté à la ferme agro-pédagogique de l'Ecole Supérieure d'Agronomie (ESA) à Lomé sur une plante adventice très commune au Togo, *Pupalia lappaceae* (**Amaranthaceae**). Les plants inoculés et les témoins sont gardés séparément dans différentes cages grillagées à l'abri des insectes pendant 4 à 6 semaines.

Les critères d'évaluation ont porté sur la présence ou l'absence de symptôme, le nombre de plants infectés et la croissance des plants, suivant une échelle de 1 à 5 : (1 : pas de symptôme visible ; 5 : mosaïque très sévère suivie d'un retard de croissance avec 75 à 100 % des plants infectés).

Les plants ne présentant pas de symptôme de virose (note 1) et vérifiés par le test ELISA et par inoculation mécanique à des niébés sensibles, sont déclarés résistants si les deux tests sont négatifs.

Figure 1. Carte du Togo indiquant les zones de production majeures (+++) et moyennes (++) du niébé et les localités où les deux Potyvirus (CABMV et BlCMV) ont été identifiés.



RÉSULTATS

Principaux sérotypes du CABMV et du BlCMV détectés dans les plantes adventices

Parmi les 185 échantillons collectés (plantes adventices et niébé) et soumis au test ELISA (DAS-ELISA et ACP-ELISA), 102 ont réagi positivement à l'égard de l'antisérum universel des Potyvirus parmi lesquels 40 et 68 étaient identifiés respectivement comme étant du CABMV et du BlCMV.

Les sérotypes des deux virus se répartissent de la façon suivante : sérotype A (46), sérotype B (28), sérotype C (32), sérotype D (9), sérotype E (5) sérotype F (3), sérotype G (2). Le sérotype A est celui qui est le plus fréquemment retrouvé dans les échantillons collectés, suivi du sérotype C et enfin du sérotype B. Les sérotypes identifiés étaient souvent retrouvés en mélange. Les principaux sérotypes des deux virus (BlCMV et CABMV) détectés dans les adventices sont repris au **Tableau 1**. En particulier l'espèce *Pupalia lappaceae* est une plante réservoir pour les deux virus, et la plupart de leurs sérotypes ont été identifiés chez cette espèce.

Les sérotypes du BlCMV et du CABMV ont été également détectés dans les feuilles de *Acanthospermum hispidum*. Ces plantes adventices constituent donc des réservoirs pour ces deux Potyvirus et/ou probablement pour leurs vecteurs dans les cultures de niébé. Ces Potyvirus sont signalés pour la première fois au Togo sur ces adventices.

Symptomatologie sur les plantes indicatrices

Parmi les isolats viraux du CABMV, nous en avons sélectionné deux, 23-27 et 12-496/94 qui appartiennent au **sérotype C**. Ils ont été clonés (par transferts successifs de lésions locales) et ils ont servi pour les études sur la gamme différentielle de plantes hôtes et au criblage des cultivars de niébé.

L'inoculation de jeunes plants de *Pupalia lappacea* avec l'isolat 12-496/94 (sérotype C provenant de cette même plante) a induit des symptômes de mosaïque chez ceux-ci. Cet isolat a également infecté des cultivars de niébé suivants : Ife Brown, VITOCO et KN1. Ce même isolat viral a infecté d'autres cultivars de niébé lorsqu'il est inoculé artificiellement à ceux-ci. Les symptômes induits par l'isolat 23-27 du CABMV sur une gamme de plantes indicatrices (**Tableau 2**) révèlent que *Nicotiana glutinosa* et *N. rustica* ne sont pas infectés par le CABMV. Les cultivars de niébé sensibles produisent des symptômes de mosaïque légère à sévère avec rabougrissement des plants et présence de liseré des nervures (*veinbanding*) sur certaines feuilles.

Tableau 1 : Lise des espèces végétales sur lesquelles du CABMV et du BlCMV et leurs sérotypes ont été identifiés.

Espèces végétales	Familles végétales	Utilités	Virus et sérotypes identifiés
Pupalia lappacea	**Amaranthaceae**	Médicinales	CABMV (C, D, E, F, et G) BlCMV (B)
Cassia occidentalis	**Caesalpiniaceae**	Médicinales	BlCMV (A et B)
Passiflora foetida	**Passifloraceae**	Fruits comestibles	CABMV (C et D)
Desmodium tortuosum	**Fabaceae**	Fourragères	CABMV (C et D)
Acanthospermum hispidum	**Compositae**	Médicinales	CAMV (F et G) BlCMV (B)
Abutilon mauritianum	**Malvaceae**	Médicinales	CABMV (C et E)
Centrosema pubescens	**Fabaceae**	Fourragères	CABMV (C, F et G)
Vigna unguiculata	**Fabaceae**	Feuilles et graines comestibles	CABMV (C à G) BlCMV (A et B)

Figure 2 : Photographie d'un plant virosé (infection naturelle) de Pupallia lappaceae (Amaranthaceae)

Évaluation de cultivars de niébé

L'évaluation de 31 cultivars de niébé avec l'isolat 23-27 du CABMV (sérotype C) révèle (**Tableau 3**) que 18 cultivars sont sensibles au CABMV (soit 52 % des cultivars). Les cultivars résistants ou tolérants sont au nombre de 13 (soit 48 %).

Le cultivar 58-146 largement diffusé dans les régions productrices de cette légumineuse au Togo est très sensible à ce sérotype du CABMV. Par contre les cultivars VITOCO et Tvx1850-01E en voie de vulgarisation sont résistants à ce sérotype C du CABMV. L'évaluation de 21 cultivars de niébé avec l'isolat 12-496/94 a indiqué que les cultivars de niébé sont aussi résistants à ce sérotype.

Tableau 2 : Réactions induites par l'isolat 23-27 du CABMV (sérotype C) sur quelques plantes tests.

Plantes tests	nombre de plants inoculés	Nombre de plants infectés	Symptômes
Nicotiana rustica	15	0	-
Nicotiana benthamiana	15	13	Mild Mo
Nicotiana tabacum cv Samsum	15	5	NLL
Nicotiana glutinosa	15	0	-
Vigna unguiculata			
- cvs Tvu 3629 (Ife Brown)			
- cv TVX3671-14C-01D	30	21	STN, Sev.Mo
- cv Vita 7	20	8	Sev.Mo
- cv Locale Blanche	20	15	Vb, Sev.Mo
	15	5	Sev.Mo

Signification des symboles : - : pas de symptôme ; Mild mo . mosaïque faible ; NLL : lésions locales nécrotiques , STN : nanisme ; Sev.Mo : mosaïque sévère ; Vb : liseré des nervures

Tableau 3 : Réactions de trente-et-un cultivars de niébé à l'égard de l'isolat 23-27 du CABMV (sérotype C).

Cultivars de niébé	Nombre de plants inoculés	Nombre de plants infectés	Lésions Réact. locales systémiques	Notes
1- IT83S-818	9	0	- -	1
2- IT86D-1056	8	4	LL Mo	3
3- IT82E-18	10	0	- -	1
4- IT82E-885	10	0	- -	1
5- IT82E-16	11	0	- -	1
6- IT81D-889	6	0	- -	1
7- IT82D-786	14	1	NLL Mo	2
8- IT81D-1007	5	0	- -	1
9- IT84E-124	8	4	- Mo	3
10-IT85F-2505	6	0	- -	1
11- IT82E-32	6	0	- -	1
12- IT84S- 2246-4	5	0	- -	1
13- IT82D-703	8	7	- Vb, Sev.Mo	5
14- IT82D-889	8	0	- -	1
15- IT84E-108	10	8	- Sev.Mo, Vb	5
16- TVX3236- 01G	6	4	- Mo	4
17- TVX3671- 14C-01D	5	3	- Sev.Mo	5
18- TVX1193-9F	13	2	NLL Mo	2
19- TVX1850- 01E	14	0	- -	1
20- TVu410	5	0	- -	1
21- TVu19	8	0	- -	1
22- TVu3629	13	12	- STN, Sev.Mo	5
23- KN1	12	4	LL Mo	3
24- DIAPAGA	7	2	LL Mo, STN	3
25- LOCALE BLANCHE	7	4	- sev.Mo	4
26- VITA 5	5	2	CLL -	3
27- VITOCO	12	0	- -	1
28- VITA 7	10	10	- Vb, Sev.Mo	5
29- AFAGNAGAN	7	4	- Vb	4
30- 58-146	12	12	- Sev.Mo	5
31- LOC. GLEI	6	3	LL Mo	3

LL : lésions locales ; NLL : lésions locales nécrotiques ; CLL : lésions chlorotiques . Vb : liseré des nervures . Mo mosaïque ; Sev.Mo : mosaïque sévère ; STN : nanisme.

DISCUSSION

Les mauvaises herbes constituent souvent une source non négligeable de dissémination des virus. Ainsi il a été signalé la présence du BlCMV et du CABMV dans différentes plantes sauvages (1, 3). Nos résultats prouvent aussi l'importance des espèces suivantes : *Pupalia lappaceae*, *Cassia occidentalis*, *Passiflora foetida*, *Desmodium tortuosum*, *Acanthospermum hispidum*, *Abutilon mauritianum*, *Centrosema pubescens* dans le déclenchement des épidémies virales causées par BlCMV et CABMV dans les cultures de niébé. Parmi les sérotypes identifiés des deux Potyvirus, **le sérotype A** du BlCMV semble être le plus fréquent. Ce dernier est le plus souvent détecté dans les échantillons de plantes adventices et dans ceux du niébé. Les sérotypes des deux virus sont souvent retrouvés en mélange dans les infections

mixtes, probablement ceci serait à la base des difficultés rencontrées par différents auteurs pour séparer les deux virus (7, 8). Les résultats obtenus indiquent que le BlCMV est très répandu tant dans les zones majeures que mineures de production du niébé au Togo.

L'infection *du Centrosema pubescens* par BlCMV ou CABMV a été également signalée dans d'autres pays (1, 3). De même, la présence de particules du CABMV dans des échantillons foliaires de *Nauclea latifolia*, une autre espèce végétale très importante de la médecine traditionnelle africaine (3) a été rapportée. Compte tenu des résultats ainsi obtenus, il serait indiqué d'intensifier et de poursuivre les travaux d'identification de ces virus tant dans les plantes adventices que dans les cultures de niébé en vue de mieux comprendre la dynamique du déclenchement des épidémies virales dans les cultures de cette légumineuse, de rechercher et de développer des variétés résistantes du niébé à l'égard de ces virus et de leurs sérotypes les plus virulents.

Remerciements

Le premier auteur exprime sa profonde gratitude à la Fondation Internationale pour la Science (IFS), Stockholm, Suède, pour son appui financier à travers la bourse de recherche C/1143-2 qui lui a été octroyée. Les auteurs adressent également leurs sincères remerciements aux autorités de l'Université du Benin et à l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA, IBADAN, NIGERIA) pour les ressources financières et matérielles mises à leur disposition pour la réalisation de ces travaux de recherches.

Bibliographie

1. BEHNCKEN G.M., MALOEVSKY L. Detection of cowpea aphid-borne mosaic virus in Queensland. Australian J. fo Exp. Agriculture and Animal Husbandry 1977 ; 17 · 674-678.
2. CHANG C.A., KUO, COWPEA Y.J. aphid-borne mosaic virus and its effects on the yield and quality of asparagus bean. J. Agric. Res. China (Taiwan) 1983 ; 32 : 270-278.
3. GUMEDZOE M.Y.D. Major virus diseases of medicinal plants in West Africa Acta Horticulturae 1993 ; 331 : 307-310. Ann. appl. Biology 1981 ; 99 : 195 - 209.
4. GUMEDZOE, M.Y., SUNU, D.Y., THOTTAPPILLY G., ASSELIN A. Importance du virus de la marbrure du niébé et du virus de la mosaïque jaune du niébé au Togo. Phytoprotection 1990 ; 85-91.
5. HUGUENOT C., FARNEAU M.T., THOTTAPPILLY G., ROSSEL H.W., HAMILTON R.I. Evidence that cowpea aphid-borne mosaic and blaceye mosaic are deux different Potyviruses. J. Gen Virol. 1993 ; 74 : 335-340.
6. THOTTAPPILLY G. *et al.* Indentification of cowpea viruses and their strains in tropical Africa- an International Pilot project. FAO Plant Prot Bull 1993 ; volume 41/2, p 65-72.
7. DIJKSTRA J., BOS L., BOOUWMEESTER H.J., HADIASTONO T., LOHUIS H. Identification of blackeye cowpea mosaic virus from germplasm of yard-long-bean and from soyabean, and the relationships between blackeye cowpea mosaic virus and cowpea aphid-borne mosaic virus. Neth. J. Plant Path. 1987 ; 93 : 115-133.
8. TAIWO M.A., GONSALVES D., PROVIDENTI R., THURSTON H.D. Partial characterization and grouping of isolates of blackeye cowpea mosaic and cowpea aphid-borne mosaic viruses. Phytopathology 1993 ; 72 : 590-596.

D9 : Utilisation des marqueurs génétiques pour l'identification et l'évaluation de la diversité génétique de l'Olivier (*Olea europaea* L.)

OUAZZANI N.[1], LUMARET R.[2], VILLEMUR P.[3]

[1] Département d'Arboriculture, Unité de Génétique, École Nationale d'Agriculture, B.P. S.40, Meknès, Maroc. [2] Département de Biologie des populations, CEFE-CNRS, Montpellier, France. [3] Laboratoire d'Arboriculture, INRA-ENSA, Montpellier, France

INTRODUCTION

Pour une majorité du grand public, la conservation des ressources génétiques consiste avant tout en la protection d'espèces menacées de disparition. Si cette préoccupation est légitime, il convient de ne pas mésestimer l'intérêt pour des espèces non menacées, de conserver chez elles l'essentiel de leur variabilité génétique naturelle garante d'une meilleure adaptation. Dans ce contexte, l'exploitation rationnelle de cette diversité pour la conservation et la valorisation suppose une bonne connaissance de la diversité génétique disponible aussi bien chez les formes cultivées, que chez les formes sauvages apparentées susceptibles d'être des sources de diversité exploitable. Ceci est particulièrement important pour une espèce comme l'Olivier (*Olea europaea* L.) pour laquelle on compte plus d'une centaine de variétés inféodées souvent à une région donnée, dans chacun des principaux pays oléicoles du Bassin Méditerranéen (Tous et al. 1990, Rugini et Lavee 1992). Les plus anciennes résulteraient de croisements naturels et successifs entre les variétés ancestrales et/ou les formes spontanées ou sous-spontanées locales (Zohary et al. 1975). Les variétés d'Olivier présentent une variabilité morphologique importante pour la taille du fruit et de la feuille ainsi que la teneur en huile (Ruby 1918, Rugini et Lavee 1992), de sorte que la caractérisation reste encore mal définie pour de nombreuses variétés, à l'exception de celles étudiées dans des collections avec des clones similaires (Scaramuzzi et Roselli 1986, Caballerro et al. 1990). En outre, un nombre important de variétés sont considérées comme « variété population » car elles renferment de nombreux types ou clones présentant des différences morphologiques et/ou agronomiques, plus au moins importantes (Morettini 1972). Par exemple dans le cas du Maroc, par l'absence d'études systématiques du patrimoine oléicole, l'assortiment variétal marocain est communément considéré comme étant limité à une seule "variété population" dénommée « Picholine marocaine » (Ouazzani et al. 1996). Par ailleurs, aucune information précise n'existe sur la variabilité génétique intra et interpopulations (ou peuplements) sur l'origine des variétés cultivées, ainsi que sur les relations phylogénétiques qui peuvent exister entre les différentes espèces ou sous-espèces apparentées à l'*Olea europaea*, qui ont probablement contribué à l'évolution de la culture de l'Olivier, comme en témoigne certaines études paléontologiques (Green et Wickens 1989, Zohary et Hopf 1993). Compte tenu de l'ensemble de cette situation et afin de contribuer à la connaissance de la diversité génétique de l'Olivier, notre travail s'est basé sur l'utilisation des marqueurs génétiques, notamment enzymatiques (marqueurs nucléaires codominants) et depuis peu moléculaires (variation de l'ADN

chloroplastique par exemple). Les marqueurs enzymatiques sont largement utilisés pour l'identification variétale et l'étude de la distribution spatiale de la diversité génétique. En outre, les relations phylogénétiques entre l'Olivier et les autres espèces apparentées sont également étudiées par le polymorphisme de la variation de l'ADN chloroplastique (ADNcp). Nous abordons dans cette communication l'état de nos travaux, notamment le point sur les marqueurs enzymatiques, à travers une synthèse des résultats obtenus sur les principales variétés méditerranéennes et les peuplements de l'Olivier cultivé au Maroc où l'extrême variabilité des conditions écologiques et l'histoire de la culture de l'Olivier constituent un matériel de choix pour cette étude.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel végétal

Pour l'identification variétale, le matériel végétal utilisé est constitué de 47 variétés, les plus couramment utilisées, originaires des principaux pays producteurs et représentent une large distribution de l'Olivier dans le Bassin Méditerranéen. Pour l'évaluation de la diversité génétique de l'Olivier cultivé au Maroc et afin d'obtenir le meilleur reflet possible de la diversité génétique existante, notre étude a porté exclusivement sur les anciens peuplements traditionnels. Dix peuplements représentatifs des principales aires écologiques de l'Olivier au Maroc, ont été échantillonnés selon un transect nord-sud allant du Pré-Rif à l'Anti-Atlas ; soit quatre peuplements dans la région nord (Chefchaouen, Ouazzane, Moulay-Idriss, Meknès), deux dans le centre (Marrakech, Amizmiz) et quatre dans la région sud (Imouzzer, Taroudant, Tazmourt, Igherm). La stratégie d'échantillonnage a été basée sur des observations sur le terrain et des enquêtes auprès des agriculteurs. Pour chaque peuplement et en fonction de l'importance de la variabilité observée, 30 à 40 individus ont été repérés et marqués afin d'effectuer ultérieurement les observations, les prélèvements et les analyses. Pour l'Olivier sauvage, l'étude a été réalisée (et en cours) sur diverses populations d'oléastres et sous-espèces apparentées à *l'Olea europaea,* échantillonnés dans différentes régions du Bassin Méditerranéen.

Analyse génétique

L'ensemble des variétés et individus a été analysé par électrophorèse enzymatique sur gel d'amidon à partir d'extraits protéiques des feuilles. Les techniques d'extraction des protéines à partir des feuilles fraîches, de migration et de révélation des enzymes, et le déterminisme génétique des systèmes enzymatiques utilisés sont celles décrites par Ouazzani et al.(1993). L'analyse a porté sur 9 loci polymorphes sur les 11 loci étudiés : des leucine aminopeptidases, E.C.3.4.11.1. (locus LAP1), des estérases, E.C.3.1.1.2. (loci EST1 et EST2), des alcool déshydrogénases, E.C.1.1.1.1. (locus ADH1), des malate déshydrogénases, E.C.1.1.1.37. (locus MDH2), des phosphoglucose isomérases, E.C.5.3.1.9. (PGI1-2, loci dupliqués présentant les mêmes allèles), des phosphoglucomutases, E.C.5.3.1.9. (locus PGM2), et des péroxidases, E.C.1.11.1.7. (locus PX1). Les loci PGM1 et MDH1, sont monomorphes dans nos conditions expérimentales.

Analyse des données

Les génotypes décrits aux 9 loci étudiés ont été regroupés en génotype multiloci pour l'identification de chaque variété ou individu. La matrice de distance du Chi-2 pondérée (Benzecri 1973) est utilisée pour la classification ascendante hiérarchique (CAH) des variétés étudiées.

L'évaluation de la diversité génétique de l'Olivier au Maroc est illustrée par le nombre de génotypes multiloci observés et le degré d'hétérogénéité intra-peuplement estimé par l'indice de diversité génotypique relative « DG » proposé par Pielou (1969) :

$$DG = 1 - \sum [ni (ni-1) / N (N-1)]$$

Où ni est le nombre d'individus avec le génotype i et N est le nombre total d'individus analysés.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Identification variétale

La discrimination entre les variétés analysées, est basée sur leurs génotypes observés aux 9 loci étudiés. Trente-huit génotypes multiloci différents ont été observés pour les 47 variétés analysées. Ces 38 génotypes ont permis l'identification de 35 variétés, ce qui donne un pourcentage d'indétermination de 25 %, avec une discrimination plus importante pour les systèmes enzymatiques PGI, EST, LAP, MDH (Ouazzani et al. 1995). La classification ascendante hiérarchique (CAH) des 38 génotypes multiloci observés a mis en évidence 6 groupes de variétés. Dans la plupart des groupes, les variétés possèdent des origines géographiques diversifiées. Seul un groupe, composé uniquement de variétés originaires de France, fait exception. Ce résultat peut s'expliquer par les diverses migrations humaines qui ont favorisé la dispersion de l'olivier cultivé depuis la plus haute antiquité sur l'ensemble du pourtour de la Méditerranée (Chevalier 1948, Ciferri 1950). Par ailleurs, les 10 des 11 variétés originaires d'Afrique du Nord ont été observées dans un même groupe avec une forte ressemblance génotypique entre certaines de ces variétés (variétés Sigoise, Picholine marocaine, et Bouchouika) (Ouazzani et al. 1995). Ce résultat laisse supposer une différenciation commune et originale d'une partie des variétés de cette région comme l'ont suggéré Chevalier (1948) et Ciferri (1950). Par ailleurs, on remarque que la majorité des variétés diffère par l'identité des allèles seulement à 1 ou 2 loci. Cette ressemblance génotypique laisse supposer que la plupart des variétés d'olivier, notamment les plus anciennes, auraient une origine commune et présenteraient, quelle que soit l'origine géographique de la variété, une forte proportion d'ancêtres communs. Cette hypothèse a été confirmée par les premiers résultats de l'analyse de la variation de l'ADNcp qui a montré que 95 % des variétés analysées ont le même chlorotype. Signalons que l'hérédité maternelle de ce marqueur moléculaire cytoplasmique a été vérifiée en analysant la descendance F1 d'un croisement contrôlé (Lumaret et al., en préparation).

Évaluation de la diversité génétique de l'olivier au Maroc

L'identification génétique du matériel prospecté au Maroc a permis de définir 68 génotypes multiloci différents sur les 328 individus analysés. La classification de ces individus sur la base de leur génotype multiloci a mis en évidence 4 groupes dont un regroupe les génotypes des principales variétés traditionnelles (tableau I) les plus connues et répandues au Maroc (Picholine, Dahbia, Meslala, Bouchouika, Hamrani). Les génotypes des autres groupes sont à 72 % « locaux » (propres à une région géographique ou peuplement) ; nord, centre, ou sud) et rares (observés au plus 2 fois). Sur les 68 génotypes mis en évidence, 59 génotypes sont propres au Maroc, en comparaison avec les génotypes multiloci des variétés méditerranéennes analysées (Ouazzani et al. 1993 et 1994). La présence de ces 9 génotypes pourrait correspondre à des traces d'introduction d'Olivier cultivé au Maroc, au gré de pratiques commerciales et/ou lors des diverses migrations humaines. Le nombre de génotypes par peuplement

varie entre 2 et 22 avec une valeur moyenne de 10,7 (tableau 2). La comparaison des peuplements des 3 régions géographiques du nord (peuplements 1 à 4), du centre (peuplements 5 et 6), et du sud (peuplements 7 à 10) (tableau 2) montre que le nombre de génotypes augmente en allant du nord au sud du Maroc. Il passe de 22 pour le Nord, à 29 pour le Centre et 39 pour le Sud. La diversité génotypique moyenne (DG) intra-peuplement est de 0,63 (minimum 0,07 ; maximum 0,93) (Tableau II). Une analyse comparative par région (Tableau II), montre que la DG augmente du nord au sud de 72 % (nord DG=0,50 ; centre DG=0,74 ; sud DG=0,86), dans le même sens que le nombre de génotypes. Analysée sur l'ensemble des peuplements, la décomposition de la diversité génotypique se répartit ainsi : DG (intra) : 0,63 ; DG totale : 0,72 ; DG (inter) : 0,09. La composante intra-peuplement contribue donc à la majeure partie (87,5 %) de la diversité totale observée.

Tableau 1 : Génotypes multiloci de 7 variétés marocaines d'olivier cultivées au Maroc, pour 9 loci analysés.

Variétés	Locus							
	LAP1	EST1	EST2	ADH1	MDH2	PGI1-2	PGM2	PX1
Picholine (a)	33	11	12	22	12	1112	11	22
Dahbia	33	11	22	22	12	1112	11	22
Bouchouika	33	11	12	22	22	1112	11	22
Meslala	33	11	22	22	22	1112	11	22
Hamrani	33	11	12	12	12	1112	12	22

(a) Haouzia et Menara ont le même génotype que le type Picholine marocaine dénommé « Zit » ou « Zitoun » par les agriculteurs.

Tableau 2 : Diversité génotypique (DG) intrapeuplement chez 10 peuplements d'olivier cultivés au Maroc.

Peuplement et région géographique (1)	Nb de génotypes multiloci	DG (2)
1. Chefchaouen	8	0.59
2. Ouazzane	2	0.07
3. Moulay-Idriss	10	0.65
4. Meknès	9	0.56
5. Marakkech	21	0.82
6. Amizmiz	11	0.60
7. Imouzzer	22	0.93
8. Taroudant	6	0.55
9. Tazmourt	10	0.76
10. Igherm	8	0.76
Nord	22	0.50
Centre	29	0.74
Sud	39	0.86
Moyenne	**10,7**	**0,63**

(1) Peuplements regroupés par région géographique, nord (1 à 4), centre (5 et 6) et sud (7 à 10). (2) DG Diversité génotypique intra-peuplement.

L'identification génétique du matériel prospecté a révélé l'originalité de certains individus (et peuplements), une proportion élevée de génotypes locaux ainsi qu'une forte diversité génotypique intra-peuplement, sous-estimée jusqu'à présent, de l'olivier cultivé au Maroc. Une caractéristique principale de ces résultats est l'existence de plusieurs génotypes multiloci sous la même dénomination « Zitoun Beldi » ou « Zit ». Ces résultats rejettent l'idée selon laquelle l'assortiment variétal marocain est considéré comme étant limité à une seule « variété population » dénommée « Picholine marocaine » et témoignent de la complexité de la structure génotypique-variétale de l'olivier au Maroc (Ouazzani et al. 1996). Cette diversité a été aussi soulignée par Maestratti (1922) qui a rapporté qu'avant les années 1920, des tribus

montagnardes cultivaient l'Olivier sous des dénominations différentes. Une dizaine de ces variétés ont été repérées lors de prospections récentes et sont en cours d'analyse. Par ailleurs, nous avons constaté que cette diversité génotypique importante est rencontrée dans les régions où les conditions écologiques (pluviométrie et types de sols notamment) permettent l'existence d'oliviers sauvages qui présentent une forte variabilité génétique (Ouazzani et al. 1993). Il semble, d'après nos résultats (Ouazzani et al. 1993, Lumaret et al. 1997, Ouazzani et Lumaret, en préparation) que les populations d'oléastres de ces régions ne peuvent pas être constituées uniquement d'arbres « ensauvagés » dérivés de la germination des noyaux issus des variétés cultivées, comme cela a été parfois relaté dans la littérature (Turrill 1951). Il existe bien une composante sauvage, avec un allèle diagnostique au niveau des estérases, plus particulièrement évidente dans le sud du Maroc (Ouazzani et Lumaret, en préparation). Cette hypothèse est aussi confirmée par l'analyse de la variation de l'ADNcp qui a révélé 2 chlorotypes propres au matériel sauvage échantillonné au Maroc (Lumaret et al., en préparation). Ces résultats montre que la diversité mise en évidence chez l'olivier cultivé au Maroc est favorisée par le régime préférentiellement allogame de cette espèce et la coexistence dans ce pays de trois formes interfertiles de la même espèce : l'olivier sauvage spontané et abondant dans certaines régions de montagnes (cas de l'*Olea marrocana*, sud du Maroc), l'olivier ensauvagé (issu de croisements entre variétés cultivées ou entre arbres cultivés et sauvages) et de l'olivier cultivé. Cette situation pourrait engendrer un enrichissement génétique de l'olivier cultivé au Maroc qui s'est maintenue jusqu'à nos jours, vraisemblablement grâce à la faible pression de sélection humaine dans certaines régions, surtout dans les peuplements où l'intensité de culture est faible. C'est le cas des peuplements des montagnes du Sud du Maroc où la culture de l'olivier se limite à la récolte.

Les résultats obtenus dans le cadre de nos travaux sur l'identification variétale et l'évaluation de la diversité génétique de l'olivier par les allozymes des feuilles sont encourageants, comme cela a été trouvé chez d'autres arbres fruitiers (Torres 1989, Weeden 1989). Ces marqueurs enzymatiques, mis au point dans nos travaux, peuvent constituer un outil précieux et précoce d'étude de variabilité afin d'établir des programmes d'amélioration variétale. Ils devraient permettre, par exemple, à un stade précoce, de contrôler l'origine de la descendance, de détecter le pollen illégitime lors des croisements contrôlés, ainsi que d'orienter le choix des croisements, en exploitant l'hétérozygotie observée dans le but d'augmenter la variabilité. L'adjonction de marqueurs polymorphes supplémentaires et l'étude d'autres marqueurs moléculaires en plus de l'ADNcp (marqueurs RAPDs par exemple) pourraient conduire à une étude génétique plus détaillée de l'olivier afin de constituer une base de connaissance solide pour une meilleure valorisation des ressources génétiques de cette espèce et son amélioration variétale. Ceci est d'une grande importance pour l'olivier qui joue par sa culture un important rôle alimentaire et socio-économique dans de nombreuses régions agricoles du bassin Méditerranéen.

Bibliographie

1. BENZECRI J.P. (1973). L'analyse des données. II. L'analyse des correspondances. Paris, Dunod.
2. CABALLERO J.M., DEL RIO C., EGUREN J. (1990). Further agronomical information about a world collection of olive cultivars. *Acta Hort;* 286 : 45-48.
3. CHEVALIER A. (1948). L'origine de l'Olivier cultivé et ses variations. *Rev Int Bot Appl Agric Trop;* 28 : 1-25.

4. CIFERRI R. (1950). Éléments pour l'étude de l'origine et de l'évolution de l'olivier cultivé. *Act XIII Congrès International d'oléiculture;* 1 : 189-194.
5. GREEN P.S., WICKENS G.E. (1989). The *Olea europaea* complex. In : The Davis and Hedg Festschrifts (Kit Than eds), Edinburg University Press, Edinburg, 287-299.
6. LUMARET R., OUAZZANI N., MICHAUD H., VILLEMUR P. (1997). Cultivated olive and oleaster : two very closely conneted partners of the same species (*Olea europaea*) : Evidence from eunzyme polymorphism. Bocconea 7 : 39-42.
7. LUMARET R., AMANE M., OUAZZANI N., HANY V., DEBAIN C. (en préparation). Chloroplast DNA variation in wild and cultivated olive and related *Olea* species.
8. MAESTRATTI J. (1922). L'oléiculture dans la région de Fez. Acte V Congrès International d'oléiculture, 96-119.
9. MORETTINI A. (1972). *L'olivicoltura, 2nd ed.* Roma, Ramo Editoriale degli Agricoltori.
10. OUAZZANI N., LUMARET R., VILLEMUR P., DI GIUSTO F. (1993). Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europaea* L.). *J Hered;* 84 : 34-42.
11. OUAZZANI N., LUMARET R., VILLEMUR P. (1994). An evaluation of approach the genetic variability of olive tree (*Olea europaea* L) using enzymatic markers. *Acta Hort,* 356 : 91-94.
12. OUAZZANI N., LUMARET R., VILLEMUR P. (1995). Apport du polymorphisme alloezymatique à l'identification variétale de l'olivier (*Olea europaea* L.). *agronomie;* 15 : 31-37.
13. OUAZZANI N., LUMARET R., VILLEMUR P. (1996). Genetic variation in olive tree (*Olea europaea* L.) cultivated in Morocco. Euphytica 91 : 9-20.
14. OUAZZANI N., LUMARET R. (en préparation). Genetic resources of Moroccan olive tree (*Olea europaea* L.) : allozyme variation in wild and cultivated materails.
15. PIELOU E.C. (1969). An introduction to mathematical ecology. New York, Wiley-Interscience.
16. RUBY J. (1918). Recherches morphologiques et biologiques sur l'olivier et sur les variétés cultivées en France. Paris, Thèse Faculté des Sciences.
17. RUGINI E., LAVEE S. (1992). Olive. In : Hammerschlag FA, Litz RE, eds. *Biotechnology of Perennial fruit crops.* Cambridge, Cambridge University Press, pp. 371-382.
18. SCARAMUZZI F., ROSELLI G. (1986). Olive genetic improvement. *Olea;* 17 : 1-17.
19. TORRES A.M. (1989). Isozyme analysis of tree fruits. In : Soltis DE, Soltis PS, eds. *Isozymes in plant biology.* Portland, Oregon, Dioscorides Press, pp. 192-205.
20. TOUS J., ROMERO A., BARRONCO D. (1990). Olive cultivars in Catalonia (Spain). *Acta Hort;* 286 : 129-132.
21. TURILL W.P. (1951). Wild and cultivated olives. Kew Bull 3 : 137-140.
22. WEEDEN N.F. (1989). Applications of isozymes in plant breeding. In : Janick J, ed. *Plant breeding reviews.* Portland, Oregon,Timber Press, pp. 11-54.
23 ZOHARY D., HOPF M. (1993). Domestication of plants in the world (2nd edition). Oxford University Press. 280pp.
24. ZOHARY D., SPIEGEL-ROY P. (1975). Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science;* 187 : 319-327.

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre du Projet PRAD « Olivier » ENA Meknès et INRA-ENSA et le CNRS de Montpellier (1995-1997) et dans le cadre d'une Bourse de Recherche IFS N° D/2615 en 1997.

D10 : Étude de la régulation de la synthèse de l'amidon de maïs à l'aide de la génétique quantitative

SÈNE M., THÉVENOT C., LEONARDI A.[1], CAUSSE M.[2], PRIOUL J.-L.
Institut de Biotechnologie des Plantes, Bâtiment 630, UPS, 91405 Orsay Cedex.
[1] Station de Génétique Végétale, La Ferme du Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette.
[2] Station d'Amélioration des Plantes Maraîchères, INRA, BP 94, 84143 Montfavet.

INTRODUCTION

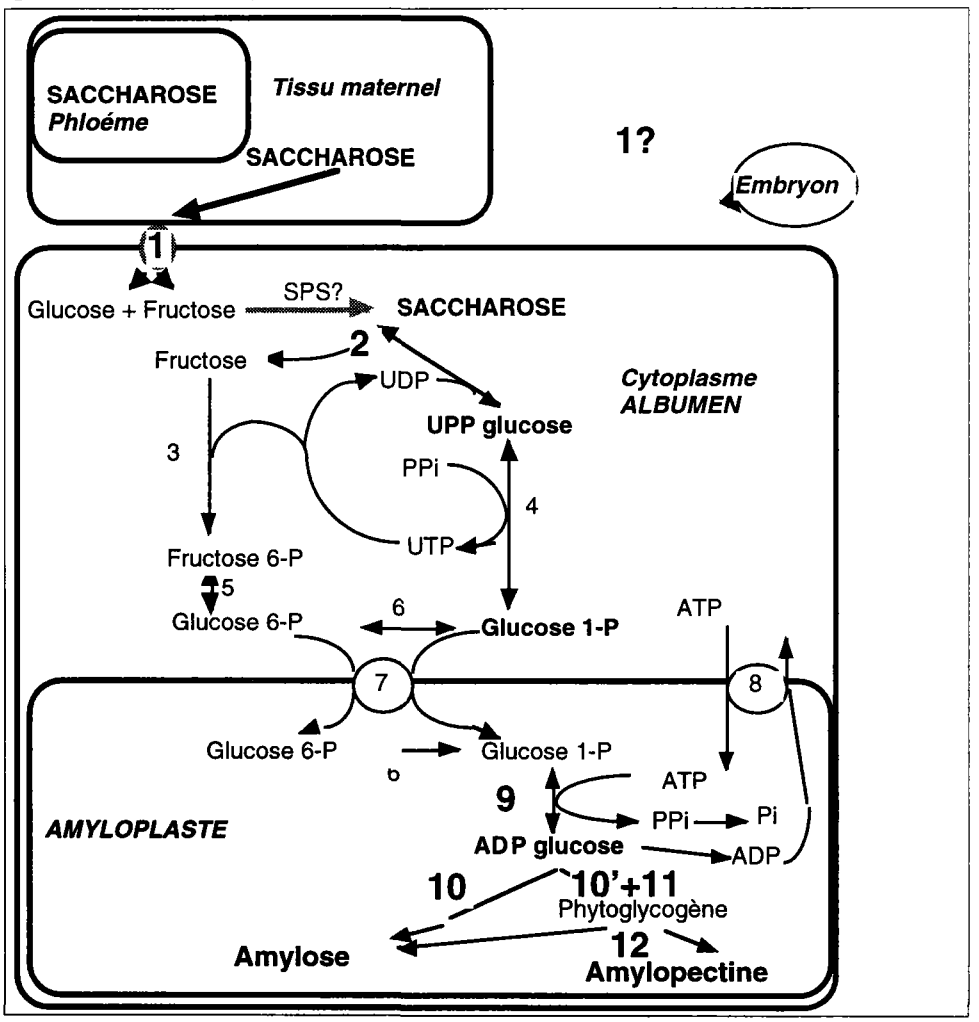
L'amidon constitue de 72 à 75 % de la masse sèche des grains de maïs à maturité, alors que les protéines et les lipides n'en représentent respectivement que 9,5-10,5 % et 4,3 % (moyenne 1983-1992 pour la production française, source ONIC-AGPM). Outre son utilisation dans l'alimentation humaine et animale, l'amidon trouve de très nombreux débouchés dans l'industrie, que ce soit à l'issue de la préparation par la voie « humide » (amidonnerie) ou par la voie sèche (semoulerie). Dans tous ces domaines, ses propriétés physiques et rhéologiques sont importantes. Elles sont largement conditionnées par la composition en amylose et amylopectine, les deux constituants essentiels de l'amidon. L'amylose qui représente 20 % environ du total, est constitué de longues chaînes linéaires de 2 000 monomères de glucose, avec quelques branchements. Il a la propriété de former spontanément des gels, grâce aux nombreux ponts hydrogènes qui s'établissent entre les chaînes. L'amylopectine, constituant essentiel (70-80 %) présente au contraire une structure avec de courtes chaînes (40-50 monomères de glucose) très ramifiées. Ces ramifications forment des grappes très régulières qui donnent l'alternance de couches cristallines et amorphes, caractéristiques des grains d'amidon. Sous l'effet de la chaleur et en milieu aqueux ("empesage"), l'amidon passe en solution. En absence d'amylose, la solution d'amylopectine est plus visqueuse, ce qui en fait un « épaississant » intéressant dans beaucoup d'applications.

L'amélioration de la teneur en amidon et de sa composition passe par une meilleure connaissance des voies de biosynthèse et des points régulateurs, pour aboutir à une sélection raisonnée des gènes favorables. La voie de synthèse de l'amidon dans les grains, à partir du saccharose importé des feuilles, est complexe (figure 1). Le saccharose, déchargé du phloème dans la zone placento-chalazale, est hydrolysé par une invertase localisée dans les cellules basales de l'albumen. Puis, le saccharose est resynthétisé, avant d'être clivé par une saccharose synthase qui fournit des hexose-phosphates aux amyloplastes. À ce niveau, l'ADPglucose pyrophosphorylase synthétise l'ADPglucose qui sera utilisé ultérieurement par les amidon synthases pour former les chaînes linéaires de l'amylose et de l'amylopectine. Plusieurs enzymes de branchements et enfin une enzyme débranchante permettent la synthèse de l'amylopectine dans sa forme finale.

Dans cette voie de synthèse complexe, la contribution relative de chaque étape dans la réalisation de la composition et la quantité finale de l'amidon est difficile à établir à l'aide des méthodes physiologiques et biochimiques classiques basées sur des

recherches de corrélation entre la vitesse d'une étape donnée (activité enzymatique) et l'accumulation du produit final (amidon). De même, l'utilisation de mutants qui, en général, entraîne des réponses de type « présence/absence », ne permet pas d'évaluer la contribution qu'avait, dans le type sauvage, l'étape mutée dans la régulation de la voie de biosynthèse de l'amidon. Une des possibilités de réponse à cette dernière question nous est offerte par la génétique quantitative associée à la biologie moléculaire et appliquée à des caractères physiologiques et biochimiques. Cette approche permet la détection et la localisation chromosomique de locus qui contrôlent la variation de caractères quantitatifs, les QTL « Quantitative Trait Loci ».

Figure 1. Voie simplifiée de biosynthèse de l'amidon dans les grains de maïs. Les enzymes les plus importantes sont numérotées en caractère gras. Elles sont en général associées à des mutations caractéristiques de la forme ou du contenu des grains (*noms en italiques*)



1 : **Invertase** *mn1*, 2 : **Saccharose-synthase** *sh1*, 3 Fructokinase, 4 : UDPGlucose-PPase, 5 Phosphoglucoisomérase, 6 : Phosphoglucomutase, 7 . Hexose-P transporteur, 8 : Adenylate translocator *bt1?*, 9 : **ADPglucose-PPase** *sh2, bt2*, **10 . Amidon synthase liée** *waxy*, **10' : Amidon synthase soluble, 11 Enzyme branchante** *ae1*, **12 Enzyme débranchante** *su1* (d'après Prioul 1996, modifié)

MATÉRIEL ET MÉTHODES

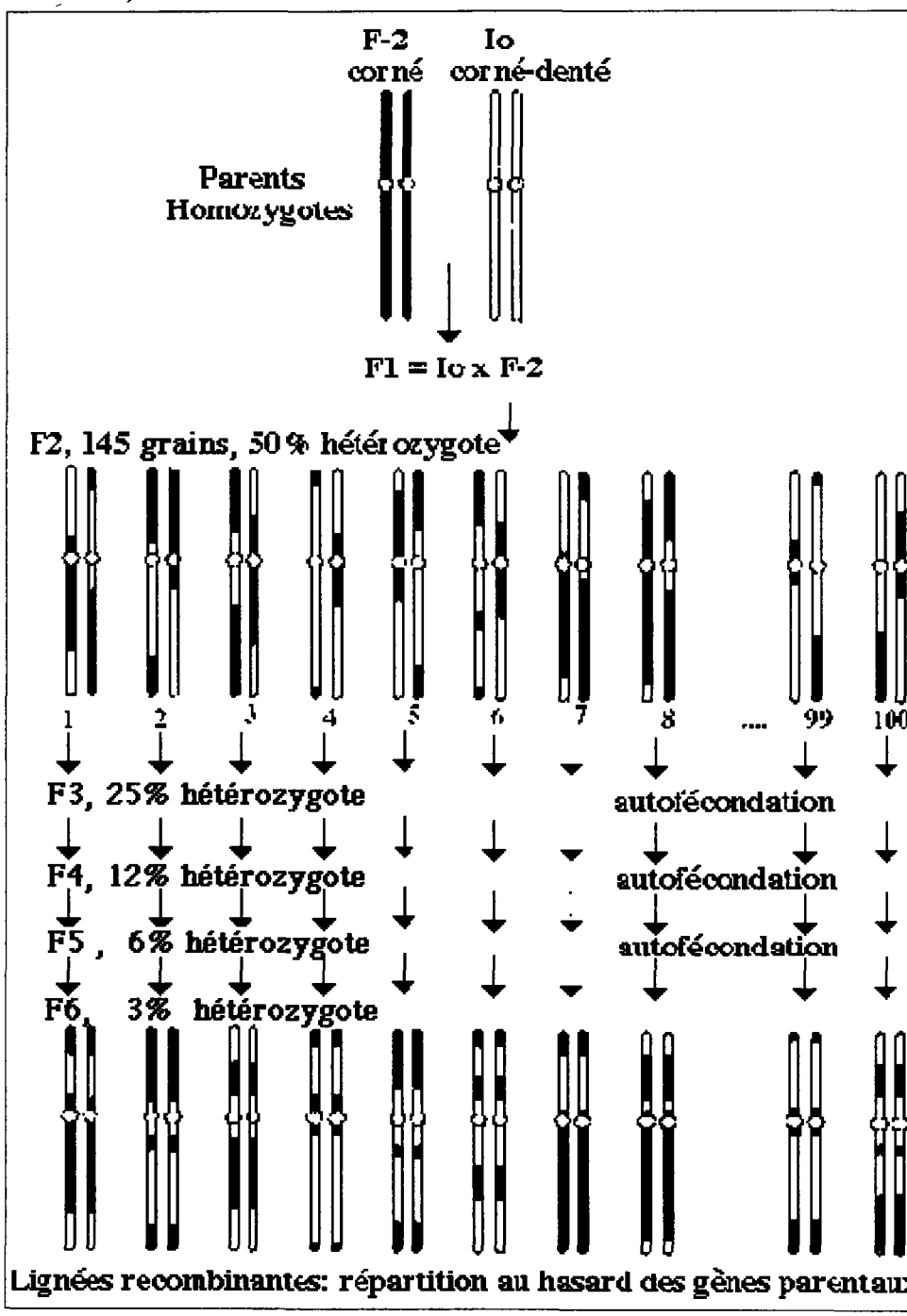
Principe de la recherche de QTL

Trois conditions sont nécessaires pour la recherche de QTL : 1) l'existence d'une descendance en ségrégation pour les caractères étudiés et comprenant un grand nombre d'individus (au moins une centaine), 2) la présence d'un polymorphisme des caractères mesurés, 3) la disponibilité d'une carte génétique saturée. Les marqueurs utilisés pour la carte génétique sont maintenant de type moléculaire. Les plus utilisés sont basés sur le polymorphisme de longueur de fragments d'ADN génomique, coupés par une enzyme de restriction (RFLP, « restriction fragment length polymorphism »). Chaque type de fragment est reconnu par hybridation avec une sonde spécifique. Cette sonde, très souvent anonyme, est choisie sur la base du faible nombre de bandes obtenues (une si possible) et de son polymorphisme d'une lignée à l'autre. Chaque combinaison de bandes est caractéristique d'un individu. Si l'on croise deux individus homozygotes, on va observer dans la descendance une recombinaison des marqueurs qui sera d'autant plus probable que les marqueurs sont plus éloignés sur les chromosomes. C'est grâce à ces fréquences de recombinaison que l'on peut établir une carte génétique des marqueurs. La carte est saturée quand le nombre de groupes de liaison est égal au nombre de chromosomes. Il faut 100 à 150 marqueurs pour obtenir ce résultat. La carte peut alors être utilisée pour localiser de nouveaux gènes (= caractères qualitatifs), en particulier les gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse à laquelle on s'intéresse. Mais une autre utilisation, plus riche, porte sur des caractères quantitatifs ; elle permet de localiser les locus contrôlant la valeur de ces caractères : ce sont les QTL (« quantitative trait loci » ou gènes à effet quantitatif). Leur détection nécessite un matériel génétique en ségrégation : les lignées recombinantes représentent souvent un matériel de choix (voir discussion, Prioul *et al* 1997). Elles sont obtenues par descendance graine à graine, à la suite du croisement de deux lignées parentales homozygotes.

À partir de la sixième génération d'autofécondation, chaque lignée obtenue est quasi-homozygote et elle contient une redistribution au hasard des gènes des deux parents (Burr & Burr 1991, figure 2). Cette répartition individuelle est déterminée sur chacune des 100 lignées à l'aide des marqueurs RFLP déjà cartographiés chez les parents. Ainsi, à chaque locus de chacune des 100 lignées, on connaît le génotype qui, dans les lignées recombinantes, ne peut être que celui du parent 1 ou celui du parent 2 (les éventuels hétérozygotes sont éliminés).

La recherche des QTL est effectuée en mesurant sur chaque lignée les caractères quantitatifs choisis (ex. nombre, longueur des feuilles, rendement, quantité d'amidon, activités enzymatiques), puis en cherchant, par des méthodes statistiques, l'association entre le génotype à un locus marqueur et la valeur moyenne du caractère. La méthode la plus simple est l'analyse de variance : si, à un locus donné, la valeur moyenne du caractère est significativement différente, selon que le génotype est de type parental 1 ou 2, on peut dire qu'au voisinage de ce locus se trouve un gène qui agit sur la valeur du caractère. C'est par définition un QTL. Trois méthodes ont été utilisées : analyse de variance (ANOVA) à un facteur (le génotype à chacun des marqueurs), la cartographie d'intervalle simple qui utilise conjointement l'information sur les 2 marqueurs flanquants (logiciel MAPMAKER/QTL de Lander & Botstein, 1989) et la cartographie d'intervalle composite qui teste simultanément l'existence de plusieurs QTL, en prenant tous les marqueurs de la carte (logiciel MQTL de Tinker & Mather, 1995). La carte établie par Causse *et al.* (1996) pour la famille de lignées utilisées comprend 145 marqueurs dont plus de la moitié correspond à des fonctions connues.

Figure 2. Obtention de lignées recombinantes avec représentation schématique de la redistribution des gènes parentaux au cours des générations (d'après Burr & Burr 1991).



Plantes : les lignées recombinantes

Le matériel végétal comprend des grains de 100 lignées recombinantes issues du croisement des lignées « F-2 » (génotype d'origine française à grain corné) et « Io » (génotype américain de type Iodent, à grain corné-denté). Cette population a été développée par Charcosset *et al.*(1994) et cartographiée par Causse *et al.* (1996). L'analyse préalable des deux parents montre des différences importantes dans la structure du grain, en particulier dans les proportions d'albumen corné et farineux. Les teneurs en amidon, amylose et amylopectine sont également différentes. Les plantes ont été cultivées sur les parcelles d'expérimentation de la Station de Génétique Végétale (INRA, UPS, CNRS) du Moulon (Gif-sur-Yvette) en deux blocs complets équilibrés, en 1994 puis en 1995.

Prélèvements

La recherche de QTL concerne à la fois des grains mûrs, pour mesurer l'accumulation finale d'amidon, d'amylose et d'amylopectine (en 1994 et 1995) et des grains en développement (en 1994), pour effectuer des mesures d'activités enzymatiques au cours du remplissage des grains. En effet, les enzymes de biosynthèse de l'amidon disparaissant à maturité, il faut rechercher leur maximum d'expression au cours du remplissage. Une campagne de prélèvements des grains, des 100 lignées recombinantes, aux stades 15, 25 et 35 jours après pollinisation a été réalisée en 1994. Vingt et un grains ont été prélevés sur 3 épis par lignée, dans chaque bloc, et conservés dans l'azote liquide. Pour le stade 15 jours, les mesures d'activité ADPglucose pyrophosphorylase, invertase et saccharose synthase sont terminées, ainsi que les contenus en glucides solubles (saccharose, glucose, fructose) et en amidon. Ceci a permis une première recherche de QTL dans les grains en développement (voir résultats). Le reste des analyses est en cours.

Mesure des activités enzymatiques, des glucides solubles et de l'amidon dans les grains en développement

Six grains, prélevés sur 3 épis différents, ont été broyés dans un volume de tampon d'extraction égal à quatre fois leur masse puis les activités ADPglucose pyrophosphorylase, saccharose synthase et invertase et les contenus en glucides solubles et en amidon ont été mesurés selon les protocoles décrits par Pelleschi *et al.* (1997).

Mesure des teneurs en amidon, amylose et amylopectine des grains mûrs

Les teneurs en amylose et amylopectine ont été mesurées par une méthode basée sur la différence de coloration par l'iode de ces deux composés : l'amylose se colore en bleu et l'amylopectine en rouge. Le spectre d'absorption en présence d'iode va varier selon les proportions relatives du mélange. Une analyse spectrophotométrique à 6 longueurs d'ondes a été adapté au maïs par Sène *et al.* (1997). Elle présente l'avantage d'être suffisamment rapide pour permettre le traitement du grand nombre d'échantillons correspondant aux 100 lignées recombinantes.

Parallèlement les teneurs en amidon total ont été déterminées par une méthode de référence qui consiste à digérer complètement, par l'amyloglucosidase, l'amidon préalablement solubilisé. Le glucose formé est dosé par des enzymes de couplage qui conduisent à la réduction du NADH (système Boehringer, voir Sène *et al* 1997 pour plus de détails).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

QTL d'activités enzymatiques liées à la synthèse d'amidon. Co-localisation avec des gènes de structure

La recherche de QTL pour les mesures effectuées le 15^{e} jour après fécondation montre des localisations sur les chromosomes 1, 4, 5 et 9 (figure 3). Certains QTL de quantité de substrat sont localisés au niveau de QTL d'une activité enzymatique : saccharose (S) ou glucose (G) et saccharose synthase (SUSY) sur le chromosome 5, glucose (G) et ADPglucose pyrophosphorylase (ADPG) sur le chromosome 9. Par ailleurs, les QTL 'G' et 'F' (glucose et fructose) sont au voisinage du même marqueur sur le chromosome 4. Ces co-localisations de QTL des quantités de substrat ou de produits et d'activités enzymatiques correspondantes ont déjà été signalées par Causse *et al.* (1995). Ce sont de bons arguments en faveur de la pertinence de ces QTL et du rôle de régulation de ces enzymes *in vivo*. Il est également frappant de constater que plusieurs QTL d'activité se trouvent proches des locus de gènes de structure d'enzyme de la voie de biosynthèse. Le cas le plus typique est celui du QTL 'ADPG', sur le chromosome 4, qui se trouve au niveau du marqueur gsy60a-bt2 codant pour la petite sous-unité de l'isoforme s'exprimant spécifiquement dans l'albumen. Une confirmation de ce résultat conduirait à faire de ce **gène un candidat** expliquant la variabilité génétique de l'activité *in vivo* (voir plus loin).

Les autres co-localisations entre QTL d'activités et gènes de structures - gsy59c-sh2 et invertase (INV) sur le chromosome 1, gsy66-sh1 et ADPG sur le chromosome 9 - sont d'un type différent, car le gène ne code pas pour l'enzyme dont l'activité est mesurée. Cependant, comme ces enzymes appartiennent à la même voie de biosynthèse, on peut imaginer que le niveau d'expression de l'une joue sur l'autre et donc sur son activité. Ces premiers résultats seront ultérieurement comparés à ceux obtenus à 25 et 35 jours après fécondation, afin de vérifier les hypothèses formulées et d'examiner la stabilité des QTL trouvés. Cependant, on peut dès maintenant comparer ces résultats avec les variations de teneur en amidon dans les grains mûrs.

QTL de teneur en amidon et de composition en amylose et amylopectine dans les grains mûrs. Effet « année »

De nombreux QTL sont obtenus dont, cependant, la position varie avec l'année de récolte (tableau). La comparaison des localisations montre néanmoins deux QTL, dits généralistes, qui sont observés en 1994 et 1995. L'un pour l'amylose (AM), sur le chromosome 10, près de la sonde gsy348a, qui code une invertase soluble des grains, et l'autre pour l'amylopectine (AP), sur le chromosome 3 au site gsy406a qui correspond au gène de la 6-PGDH (6-phosphogluconate déshydrogénase), enzyme du métabolisme oxydatif du glucose.

Si l'on considère maintenant chaque année séparément, on peut, en 1994, faire des comparaisons avec les mesures effectuées sur les mêmes génotypes au cours du remplissage (cf. § précédent) et pour les deux années, rechercher d'éventuelles co-localisations proches des gènes de structure des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de l'amidon.

- Une seule localisation commune apparaît entre des QTL pour la phase de remplissage et le stade grain mûr mais elle est triple ; les QTL de l'activité enzymatique (ADPG) et du produit dérivé de la réaction, l'amylopectine (AP), se trouvent, sur le chromosome 4, au niveau du marqueur gsy60a-bt2 qui est un gène candidat, puisqu'il code pour la petite sous-unité de l'enzyme (figures 3 et 4). En ce qui concerne AP, il faut aussi signaler la présence du marqueur adjacent gsy315-su1

(figure 4) qui code pour une enzyme de débranchement nécessaire à l'achèvement de la molécule.

- Au stade grain mûr en 1995, la région gsy403-pal du chromosome 5, où l'on trouve des QTL 'AP' et 'AM/AP' est très proche d'un gène d'enzyme de branchement ae1 (tableau et figure 1).

Figure 3. Cartes des chromosomes 1, 4, 5 et 9 où des QTL sont obtenus, par au moins 2 méthodes, dans les grains au stade 15 jours après pollinisation (récolte 1994), pour les activités invertase acide soluble (INV), ADPglucose pyrophosphorylase (ADPG), saccharose synthase (SUSY), et les niveaux en amidon (A), glucose (G), fructose (F) et saccharose (S). Les noms des QTL sont portés à droite des chromosomes et ceux des marqueurs RFLP les plus proches sont notés à gauche, éventuellement en gras s'ils correspondent à un gène de structure de la voie de biosynthèse de l'amidon. Seuil de détection $\alpha = 0{,}005$ pour l'ANOVA et LOD = 2 pour MAPMAKER/QTL. Longueur des chromosomes en cm.

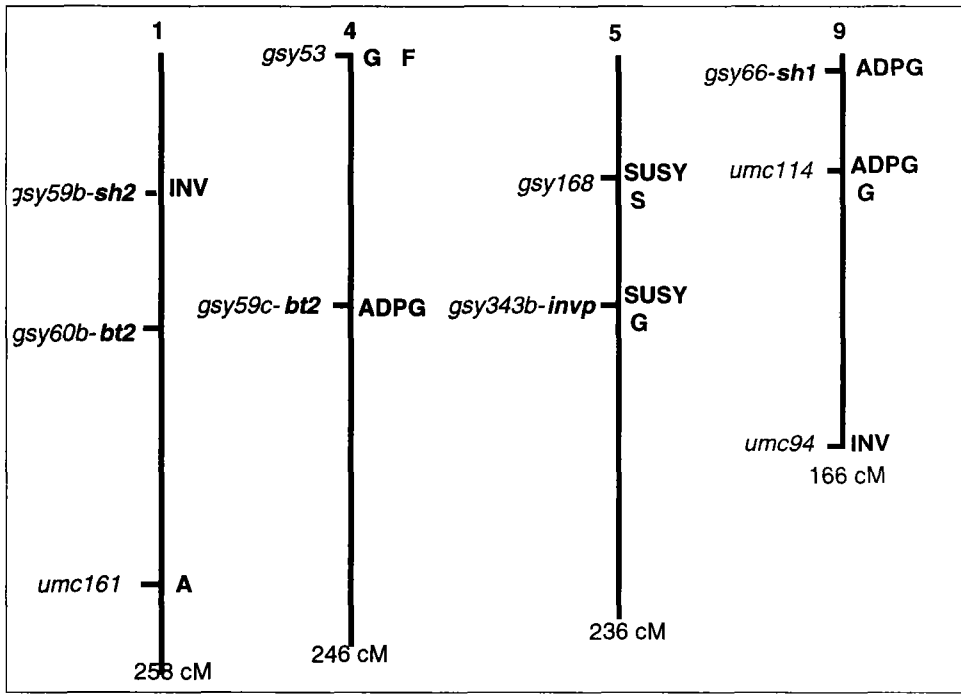


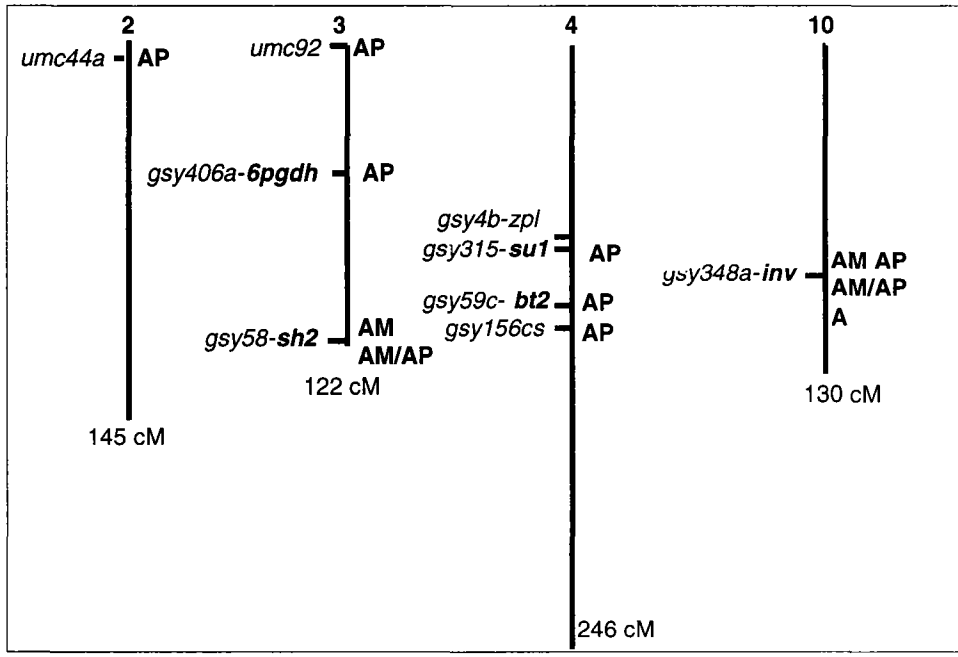
Tableau. Comparaison des QTL détectés aux loci marqueurs, par ANOVA (seuil α = 0,01), dans une population de 100 lignées recombinantes, pour deux années successives 1994 et 1995.

Caractères	1994 Proba	1994 Effet allèle	1994 R^2	Chromosomes et locus marqueurs	1995 Proba	1995 Effet allèle	1995 R^2
AM				1 gsy271-P	0,0032	- 0.76	0.093
				3 umc10	0,0089	- 0.70	0.079
				3 gsy406A-6pgdh	0.0003	-1.01	0.154
	0,0046	0,72	0,094	3 gsy58-sh2			
	0,0014	**0,82**	**0,127**	**10 gsy348 A-inv**	***0,028**	**0,57**	**0,062**
	0,0067	0,68	0,081	10 gsy54A-RP			
AP				3 umc10	0,0058	1.94	0.087
	0,0090	**1,20**	**0,086**	**3 gsy406A-6pgdh**	**0,0089**	**1,99**	**0,084**
				5 gsy403-PAL	0,0083	1.77	0.077
	0,0079	- 1,14	0,086	6 umc65			
	0,0101	-0,96	0,07	10 umc130			
AM/AP				1 gsy271-P	0,0036	- 0.03	0,090
				3 umc10	0,0029	- 0.03	0.101
				3 gsy406A-6pgdh	0,0006	- 0.04	0.141
	0,0025	0,02	0,106	3 gsy58-sh2			
				5 gsy403-PAL	0,0083	- 0.02	0.077
	0,0009	0,02	0,138	10 gsy348A-inv			

(Proba : probabilité de l'hypothèse nulle ; Effet allèle : la plus forte valeur du caractère est apportée par l'allèle parental F-2 si le signe est positif et par l'allèle parental lo si le signe est négatif ; R^2 : pourcentage d'explication de la variation phénotypique totale du caractère au QTL. (*) pour ce QTL la probabilité dépasse le seuil de 0.01, mais cette localisation est confirmée par une autre méthode (MQTL).

- Au stade grain mûr en 1994, d'autres co-localisations intéressantes apparaissent entre gènes de structure et composition de l'amidon (figure 4) : outre la 6-PGDH et l'invertase soluble sur les chromosomes 3 et 10, le gène sh2 (gsy58) à l'extrémité du chromosome 3, codant pour la grande sous-unité de l'ADPG-PPase, se situe au voisinage de QTL d'amylose (AM) et du rapport AM/AP. Cette dernière observation est intéressante, car elle confirme deux faits tendant à montrer le rôle important du gène sh2 dans la régulation de la synthèse *in vivo* de l'amidon. Le premier est une co-localisation de sh2 avec la teneur en amidon, mentionnée par Goldman *et al.* (1993), sur un matériel génétique très différent puisqu'il s'agissait de lignées issues d'une sélection divergente pour de faibles ou de fortes teneurs en protéines, ce qui revient à obtenir des fortes et des faibles teneurs en amidon. Le second est issu d'une démarche assez différente. Il s'agissait de comparer les produits de réversion après mutation du gène sh2 par des éléments transposables. L'excision des transposons se faisant de façon plus ou moins « propre », la séquence du révertant est fréquemment modifiée par rapport au type sauvage. Parmi ces revertants Giroux *et al.* (1996) ont montré que l'un d'eux présentait une masse de grains plus élevée et que cette particularité était due à une modification ponctuelle de la séquence de sh2 dans sa région 3' régulatrice.

Figure 4. Cartes des chromosomes 2, 3, 4 et 10 où des QTL sont obtenus, par au moins 2 méthodes, dans les grains mûrs (récolte 1994), pour les niveaux en amylopectine (AP), amylose (AM), amidon (A) et pour le rapport amylose/amylopectine (AM/AP). Les noms des QTL sont portés à droite des chromosomes et ceux des marqueurs RFLP les plus proches sont notés à gauche, éventuellement en gras s'ils correspondent à un gène de structure de la voie de biosynthèse de l'amidon. Seuil de détection α = 0,01 pour l'ANOVA, LOD = 1,5 pour MAPMAKER/QTL et seuil >1 pour MQTL. Longueur des chromosomes en cm.



Globalement, si l'on compare les QTL contrôlant les teneurs en amylose et en amylopectine on note qu'ils ne coïncident pas, en général. Ceci est conforme à ce que l'on sait de la relative indépendance des voies de biosynthèse de ces deux produits (cf. figure 1). Cette particularité peut d'ailleurs conduire à une interprétation de l'effet « année ». On sait, en effet, que certaines enzymes de la synthèse d'amidon ont une sensibilité différente aux facteurs externes, la température en particulier. Ainsi plusieurs auteurs ont montré chez le blé d'abord, et chez le maïs ensuite (Keeling *et al.* 1994) que l'amidon synthase soluble, qui joue un rôle dans l'élongation des chaînes d'amylose, est fortement inhibée par des températures supérieures à 30 °C. Il se trouve que la plus faible teneur en amidon des grains récoltés en 1995 est due principalement à un défaut d'amylopectine plutôt que d'amylose (Sène 1996). Un examen des relevés météorologiques de ces deux années montre qu'elles sont assez dissemblables, avec en particulier deux périodes plus chaudes, pendant le remplissage, en 1995.

CONCLUSION

La recherche de QTL pour les composantes des grains s'avère praticable aussi bien avec des caractères de composition qu'avec des caractères situés plus en amont tels que les activités enzymatiques de la voie de biosynthèse. Cette première étape

débouche sur le repérage de régions du génome impliquées dans l'explication de la variabilité génétique de ces caractères. Des caractères de nature différente, mais liés à la même fonction (produit/substrat et enzyme), présentent des QTL fréquemment localisés au même endroit (Causse *et al.* 1995). Néanmoins une variabilité inter annuelle est observée qui amène à postuler l'existence de QTL dit généralistes, présents dans toutes les conditions, et de QTL dits spécialistes, qui se manifestent selon que tel ou tel facteur est limitant pour une étape donnée. Le caractère non contingent de ces derniers tend à être prouvé par le fait qu'ils sont fréquemment situés en regard de gènes de structure qui sont d'excellents candidats à l'explication de la variance du caractère. La validation de ces gènes candidats doit être envisagée dans une seconde étape en examinant, dans un matériel génétique très diversifié où le déséquilibre de liaison est minimal, la constance de la liaison entre le polymorphisme fin du gène et la variabilité du caractère. Une autre possibilité est de faire de la cartographie fine dans un matériel quasi-isogénique sauf pour le gène en question (Touzet *et al.* 1995). À cette démarche fondamentale peut s'ajouter un objectif appliqué qui utilisera les marqueurs identifiés comme critère de sélection. Dans ce cas, on a le choix entre des marqueurs anonymes, mais liés au caractère recherché dans toutes les situations (comme les QTL généralistes) et des marqueurs qui représentent le gène qui code pour le caractère lui-même ou pour des gènes de régulation de ce caractère.

Bibliographie

1. BURR B., BURR F.A. (1991). Recombinant inbreds for molecular mapping in maize : theoretical and practical considerations. Trends in Genetics, 7 : 55-60.
2. CAUSSE M., ROCHER J.P., HENRY A.M., CHARCOSSET A., PRIOUL J.L., DE VIENNE D. (1995). Genetic dissection of the relationship between carbon metabolism and early growth in maize, with emphasis on key-enzyme loci. Molecular Breeding, 1: 259-272.
3. CAUSSE M., SANTONI S., DAMERVAL C., MAURICE A., CHARCOSSET A., DEATRICK J., DE VIENNE D. (1996). A composite map of expressed sequences in maize. Genome, 39 : 418-432.
4. CHARCOSSET A., CAUSSE M., MOREAU L., GALLAIS A. (1994). Investigation into the effect of genetic background on QTL expression using three interconnected maize recombinant inbred lines (RIL) populations. *In* Biometrics in Plant Breeding : application of molecular markers. J.W. van Ooijen and J.J. Jansen, *Editors.*, pp 157-189.
5. GIROUX M.J., SHAW J., BARRY G., COBB B.G., GREENE T, OKITA T., HANNAH L.C. (1996). A single gene mutation that increases maize seed weight. Proceeding of the National Academy of Science, 93 : 5824-5829.
6. GOLDMAN I.L., ROCHEFORD T.R., DUDLEY J.W. (1993). Quantitative trait loci influencing protein and starch concentration in the Illinois long term selection maize strains. Theoretical and Applied Genetics, 87 : 217-224.
7. KEELING P.L., BANISADR R., BARONE L., WASSERMAN B.P., SINGLETARY G.W. (1994). Effect of temperature on enzymes in the pathway of starch biosynthesis in developing wheat and maize grain. Australian Journal of Plant Physiology, 21 : 807-827.
8. LANDER E. , BOTSTEIN D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics, 121 : 185-199.
9. PELLESCHI S., ROCHER J.P., PRIOUL J.L. (1997). Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. Plant, Cell and Environment, 20 : 493-503.
10. PRIOUL J.L. (1996). Corn. *In* Photoassimilate distribution in plants and crops. E. Zamski and A.A. Schaffer , *Editors*, Marcel Dekker, New-York (Publisher), pp 549-594.

11. PRIOUL J.L., QUARRIE S., CAUSSE M., DE VIENNE D. (1997). Dissecting complex physiological functions through the use of molecular quantitative genetics. Journal of Experimental Botany, 48 : 1151-1163.
12. SÈNE M. (1996). Étude de la réglation *in vivo* de la synthèse de l'amidon dans les grains de maïs par des approches de génétique moléculaire quantitative. Thèse de l'Université de Paris-Sud (n° 4678), Orsay (France), pp 128.
13. SÈNE M., THÉVENOT C., PRIOUL J.L. (1997). Simultaneous spectrophotometric determination of amylose and amylopectin in starch from maize kernel by multi-wavelength analysis. Journal of Cereal Science, 26 : 211-221.
14. TINKER N.A., MATHER D.E. (1995). MQTL : softare for simplified composite interval mapping of QTL in multiple environments. JQTL 1: 2(electronic journal, access at: http:/probe;nalusda.gov:8000/otherdocs/jqtl/).
15. TOUZET P., WINKLER R.G., HELENTJARIS T. (1995). Combined genetic and physiological analysis of a locus contributing to quantitative variation. Theoretical and Applied Genetics, 91 : 200-205.

D11 : Biotechnologies et conservation des ressources génétiques à l'IPGRI (Institut international des ressources phytogénétiques)

ENGELMANN F.
IPGRI (Institut International des Ressources Phytogénétiques), Via delle Sette Chiese 142, 00145 Rome, Italie.

INTRODUCTION

L'IPGRI (Institut international des ressources phytogénétiques), successeur de l'IBPGR (Bureau international pour les ressources phytogénétiques), est une organisation internationale autonome qui opère sous l'égide du Groupe Consultatif pour la Recherche Agricole Internationale (GCRAI). Le mandat de l'IPGRI est d'avancer la conservation et l'utilisation des ressources génétiques pour le bénéfice des générations présentes et futures. L'IPGRI travaille en partenariat avec d'autres organisations, conduit des programmes de recherche et de formation et fournit des avis et informations scientifiques et techniques. L'IPGRI a quatre objectifs principaux : renforcer les programmes nationaux, contribuer à la collaboration internationale, améliorer les stratégies et techniques de conservation, et offrir un service international d'information (IPGRI, 1993).

La structure de l'IPGRI comprend un siège à Rome, cinq Groupes Régionaux, deux Groupes Thématiques ainsi que l'INIBAP (Réseau international pour l'amélioration du bananier et plantain). Les Groupes Régionaux ont la responsabilité des activités de l'Institut en Afrique Sub-saharienne ; Asie occidentale et Afrique du nord ; Asie, Pacifique et Océanie; Amériques ; Europe. Les Groupes Régionaux développent des stratégies régionales, appuient les programmes nationaux et régionaux et entreprennent des activités d'intérêt régional. Les deux Groupes Thématiques conduisent et coordonnent les activités de recherche, d'information et de formation au niveau inter-régional et global dans leurs domaines respectifs d'expertise, et fournissent un appui scientifique et technique aux Groupes Régionaux. Les deux Groupes Thématiques sont intitulés « Science et Technologie des Ressources Génétiques » (GRST), et « Documentation, Information et Formation » (DIT). L'INIBAP a son siège à Montpellier, France, et des bureaux régionaux en Afrique, Asie, Amérique et Caraïbes. Le Centre de Transit de l'INIBAP, basé à l'Université Catholique de Louvain, Belgique, maintient une collection *in vitro* de plus de 1000 accessions de bananiers et plantains et en assure également l'assainissement et la diffusion au niveau mondial (INIBAP, 1996).

L'objectif de cet article est de présenter et d'illustrer les principales activités des deux Groupes Thématiques de l'Institut ayant trait à la recherche sur les biotechnologies et à leur utilisation.

SCIENCE ET TECHNOLOGIE DES RESSOURCES GÉNÉTIQUES

Le rôle du Groupe GRST est d'apporter à l'Institut et à ses partenaires un appui scientifique et technique pour la conservation et l'utilisation des espèces cultivées et

fourragères et de leurs apparentées sauvages, ainsi que des espèces forestières utiles et d'intérêt en agroforesterie. Le Groupe développe ses activités au travers des 6 projets complémentaires suivants :

- localisation et évaluation de la diversité génétique ;
- stratégies et technologies de la conservation *ex situ* ;
- conservation *in situ* des espèces cultivées et espèces sauvages apparentées ;
- stratégies globales pour les ressources génétiques forestières ;
- liens entre conservation et utilisation ;
- aspects humains et politiques de la conservation et de l'utilisation des ressources génétiques.

Pour la réalisation de ses programmes de recherche sur la mesure et la localisation de la diversité génétique, la conservation *in situ*, la conservation *ex situ* et la gestion des banques de gènes, la phytopathologie et l'utilisation des ressources génétiques, le Groupe GRST est conduit à utiliser, développer et/ou adapter différents outils biotechnologiques, incluant les techniques de culture *in vitro* et de cryoconservation, de marquage biochimique et moléculaire et les techniques de détection, indexation et caractérisation des agents pathogènes. Une attention particulière est donnée à la mise au point de techniques simples, robustes et peu coûteuses, pour faciliter leur application dans les laboratoires disposant de moyens et d'infrastructures limités.

Les techniques de culture *in vitro* trouvent des applications importantes pour la collecte, la multiplication et la conservation de nombreuses espèces, principalement d'origine tropicale ou subtropicale, qui produisent des semences récalcitrantes ou intermédiaires qui ne peuvent être conservées à long terme (Chin et Pritchard, 1988 : Ellis *et al.*, 1990) et pour les espèces à multiplication végétative qui soit ne produisent pas de graines, ou pour lesquelles la conservation sous forme de semences ne présente qu'un intérêt limité. La culture de méristèmes, en association ou non avec la thermothérapie, permet la production de plantes exemptes de virus. L'échange de matériel *in vitro* réduit significativement le coût du transport et simplifie les procédures de quarantaine (Engelmann, 1997). Au cours des quinze dernières années, l'IBPGR et l'IPGRI ont mis en place des programmes de recherche pour le développement de techniques de collecte, conservation (croissance ralentie et cryoconservation) et multiplication *in vitro* de nombreuses espèces récalcitrantes et à multiplication végétative, principalement d'origine tropicale (tableau 1), dont certaines sont maintenant opérationnelles pour une utilisation en routine dans les banques de gènes, comme c'est le cas pour la pomme de terre (IPGRI, 1996a).

Dans le domaine de la phytopathologie, les recherches visent la mise au point de tests à large spectre de détection de virus, de tests non destructifs d'évaluation de l'état phytosanitaire des semences ainsi que de techniques de thérapie (IPGRI, 1997). En collaboration avec la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture), l'IPGRI publie des Directives techniques pour l'échange en sécurité de matériel végétal qui font le point sur les maladies et agents pathogènes de différentes espèces cultivées, ainsi que sur leurs symptômes, hôtes, mode de transmission, techniques de détection et traitements. Des Directives techniques sont disponibles pour 16 espèces ou groupes d'espèces différentes, incluant notamment le bananier et plantain, la patate douce, l'igname, le manioc et le cocotier. La dernière publication de cette série porte sur l'Eucalyptus (Ciesla *et al.*, 1996).

Tableau 1 : Liste des espèces pour lesquelles l'IBPGR/IPGRI a participé à la mise au point de techniques de collecte, conservation (croissance ralentie et cryoconservation) et propagation *in vitro*.

Espèce	collecte	croissance ralentie	cryo-conservation	propagation
Cacaoyer	√		√	√
Agrumes	√	√	√	√
Cocotier	√	√	√	
Bananier/plantain	√	√	√	√
Patate douce		√	√	
Allium		√	√	√
Aroidacées		√	√	
Canne à sucre			√	
Vigne	√	√	√	
Igname			√	
Palmier à huile			√	
Manioc	√	√	√	
Caféier	√		√	
Pomme de terre		√	√	
Fruitiers tempérés	√		√	
Jacquier			√	
Fruitiers tropicaux	√		√	
Hévéa			√	
Thé			√	
Litchi			√	
Amandier		√	√	√
Ananas			√	
Taro			√	
Arbres tropicaux	√	√	√	√

Les programmes concernant l'étude de l'étendue et de la distribution de la diversité génétique chez les plantes cultivées expérimentent différentes techniques moléculaires, notamment microsatellites, AFLP et RAPD pour estimer la diversité génétique dans diverses situations spécifiques de portée générale (IPGRI, 1996a). Ces projets incluent l'utilisation de techniques moléculaires chez le cocotier et l'étude des liens entre les approches génétique et ethnobotanique pour la description de la diversité chez les plantes cultivées, en utilisant le taro comme espèce modèle. Un travail important a également été réalisé récemment pour évaluer les performances, l'applicabilité et le coût des différentes techniques moléculaires pour l'étude des ressources génétiques (Ayad *et al.*, 1997). Un ulletin technique intitulé "Outils moléculaires pour la conservation des ressources phytogénétiques : un guide des technologies" a été publié récemment (Karp *et al.*, 1997). Il a pour but d'aider les utilisateurs dans le choix et l'application des différentes techniques disponibles.

DOCUMENTATION, INFORMATION ET FORMATION

Le Groupe DIT est responsable d'une gamme importante d'activités variées qui ont trait à l'information et à la documentation. Elles incluent la documentation des ressources génétiques, les services de bibliothèque et d'information, les publications, la formation, l'information et la sensibilisation du public ainsi que l'évaluation de l'impact des activités de l'Institut.

Dans le domaine de la documentation des ressources génétiques, les marqueurs biochimiques et moléculaires sont maintenant intégrés dans les listes de descripteurs pour les plantes cultivées produits par l'IPGRI. Les trois dernières listes de descripteurs, pour la tomate, le caféier et la bananier (IPGRI, 1996 b et c ; IPGRI-INIBAP/CIRAD, 1996) ont été publiées à la fois en anglais, espagnol et français afin d'étendre leur diffusion.

De nombreuses publications de l'IPGRI ont trait à différents aspects de l'utilisation des biotechnologies en relation avec la conservation des ressources génétiques. Si la plupart des publications de l'IPGRI sont rédigées en anglais, un important effort est réalisé pour en traduire un nombre croissant en espagnol et en français, afin d'améliorer leur diffusion auprès des chercheurs hispanophones et francophones. L'IPGRI produit notamment, en collaboration avec CABI, Grande Bretagne, les Résumés sur les ressources génétiques végétales (Plant Genetic Resources Abstracts) qui incluent une section sur les biotechnologies. Le Bulletin des ressources phytogénétiques, réalisé en collaboration avec la FAO, publie des articles de recherche et de synthèse en anglais, espagnol et français, sur de nombreux domaines des ressources phytogénétiques. Des informations plus détaillées sur les publications de l'IPGRI sont accessibles par Internet (http://www.cgiar.org/ipgri).

La formation tient une place importante dans les activités de l'IPGRI. Jusqu'à ce jour, près de 2000 personnes (techniciens, chercheurs, curateurs de banque de gènes, etc.) ont reçu une formation organisée par l'Institut, sous la forme de périodes de formation individuelle (courte à longue durée) ou de participation à des cours généraux ou spécialisés. Le personnel de l'IPGRI est également souvent impliqué dans des activités de formation délivrées par d'autres organismes.

L'IPGRI collabore avec différentes universités dans les pays en voie de développement pour la mise en place de programmes universitaires (niveau Maîtrise) ciblés sur les ressources génétiques, produit et distribue du matériel de formation. L'IPGRI a ainsi initié récemment la production de modules de formation (IPGRI, 1995, 1996), dont le dernier est intitulé "Mesure de la variation génétique par l'utilisation des marqueurs moléculaires" (Ford-Lloyd et Painting, 1996). Ces modules sont accessibles par Internet (http://www.cgiar.org/ipgri/training/10-1/) et également disponibles sous forme de disquettes.

CONCLUSION

L'IPGRI déploie une large gamme d'activités de recherche, documentation, information et formation dans lesquelles de nombreux outils biotechnologiques, tels que la culture *in vitro*, la cryoconservation, le marquage biochimique et moléculaire pour la caractérisation et l'évaluation de la diversité génétique, les techniques de détection, d'indexation et de caractérisation des agents pathogènes jouent un rôle important. Le développement de nouvelles techniques ou l'adaptation de techniques existantes visant à améliorer la conservation des ressources phytogénétiques, menés en collaboration avec ses nombreux partenaires du Sud et du Nord est un des objectifs prioritaires de l'IPGRI.

Bibliographie

1. AYAD W.G., HODGKIN T., JARADAT A., RAO V.R. (eds.). 1997. Molecular Genetic Techniques for Plant Genetic Resources: Report of an IPGRI Workshop, 9-11 October, 1995, Rome, Italy. International Plant Genetic Resources Institute, Rome. Sous presse.
2. CIESLA W.M., DIEKMANN M., PUTTER C.J.A. (eds.).1996. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No. 17. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
3. CHIN H.F., PRITCHARD H.W. 1988. Recalcitrant Seeds, a Status Report. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italie.
4. ELLIS R.E., HONG T., ROBERTS E.H. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. coffee. J. Exp. Bot. 41 : 1167-74.
5. ENGELMANN F. 1997. *In vitro* conservation methods. Sous presse *in* Biotechnology and Plant Genetic Resources : Conservation and Use, B.V. Ford-Lloyd, J.H. Newburry and J.A. Callow, Eds., CABI, Wallingford, GB.
6. FORD-LLOYD B.V., PAINTING K.A. 1996. Measuring Genetic Diversity using Molecular Markers. Version 1.2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
7. KARP A., KRESOVICH S., BHAT K.V., AYAD W.G., HODGKIN T. 1997. Molecular Tools in Plant Genetic Resources Conservation : a Guide to Technologies. IPGRI Technical Bulletin No. 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
8. INIBAP. 1996. Annual Report. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France.
9. IPGRI. 1993. Diversity for Development. The Strategy of the International Plant Genetic Resources Institute. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
10. IPGRI. 1996a. Annual Report 1995. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
11. IPGRI. 1996b. Descripteurs de la tomate (*Lycopersicon* spp.). Institut international des ressources phytogénétiques, Rome, Italie.
12. IPGRI. 1996c. Descripteurs du caféier (*Coffea* spp. et *Psilanthus* spp.) Institut international des ressources phytogénétiques, Rome, Italie.
13. IPGRI. 1997. Annual Report 1996. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
14. IPGRI-INIBAP/CIRAD. 1996. Descripteurs pour le bananier (*Musa* spp.) Institut international des ressources phytogénétiques, Rome, Italie ; Réseau international pour l'amélioration de la banane et la banane plantain, Montpellier, France , Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Montpellier, France.

SECTION D

Textes et résumés des Affiches

de D12 à D37

D12 : Marqueurs isoenzymatiques et structures génotypiques de populations spontanées d'espèces du genre *Medicago*

ABDELKEFI A., BIBORCHI A., BOUSSAID M.[1], MARRAKCHI M.

Laboratoire de génétique et Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences de Tunis. [1] Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie de Tunis.

L'électrophorèse d'enzymes représente un bon outil pour établir des marqueurs génétiques utiles dans l'évaluation des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. L'analyse du déterminisme génétique de 7 systèmes enzymatiques (LAP, PGI, PGM, 6-PGD, GOT, ICD, MDH) a permis de mettre en évidence 6 loci polymorphes chez *Medicago ciliaris* et *Medicago intertexta*, espèces annuelles et diploïdes. L'étude des structures génotypiques montre, d'une part une forte homozygotie de *Medicago ciliaris* témoin de son régime préférentiellement autogame et d'autre part une hétérozygotie chez *M. intertexta* révélatrice d'une aptitude à l'allopollinisation. L'échange génique entre ces deux taxons est détecté par l'analyse électrophorétique de deux populations naturelles sympatriques. *Medicago intertexta* et *Medicago ciliaris* constitueraient, dans la section des intertextae, deux compartiments spécifiques définis en fonction de leur régime de reproduction respectif. Chez les espèces pérennes et tétraploïdes, la technique d'électrophorèse pose de sérieux problèmes de lecture et d'identification génotypique à partir des phénotypes isoenzymatiques révélés. Les électrophorèses sur gel d'amidon, réalisées à partir d'un large échantillon d'individus diploïdes et tétraploïdes appartenant à différentes espèces du complexe des *Medicago* pérennes, révèlent pour les systèmes isoenzymatiques variables des bandes électrophorétiques de même niveau de migration pour les deux niveaux de ploïdie, mais avec des différences d'intensité des bandes typiques des formes tétraploïdes. Il est donc probable qu'un système isoenzymatique donné aurait le même type de contrôle génétique chez les deux niveaux de ploïdie avec des différences dues au dosage allèlique chez les formes tétraploïdes. Pour chaque locus déterminé chez les diploïdes, les différents profils théoriques possibles chez les tétraploïdes sont établis en fonction du dosage allélique. Les différents génotypes ainsi ciblés sont soumis à des autofécondations et leur descendance est analysée. L'ensemble des résultats analysés confirme l'hypothèse du contrôle génétique retenu chez les diploïdes et met en évidence l'effet du dosage allèlique sur l'intensité des bandes électrophorétiques chez les tétraploïdes.

D13 : Évaluation des péroxydases comme marqueurs de la tolérance à la salinité chez les céréales. Relation avec le calcium

AOUAD A.[1], BAAZIZ M.[1], MERGOUM M.[2]

[1] Laboratoire de Biochimie et Amélioration des Plantes. Faculté des Sciences-Semlalia, B.P. S15. Marrakech, Maroc

[2] Centre Régional de Recherches Agronomiques, INRA, B.P. 589, Settat, Maroc

Les céréales jouent des rôles importants dans l'alimentation humaine. De ce fait, la céréaliculture occupe une place importante dans l'agriculture mondiale. Cependant, plusieurs facteurs environnementaux, tels que la sécheresse et la salinité, entravent la production des céréales, surtout dans les régions arides et semi-arides. L'amélioration et la sélection de variétés tolérantes aux stress environnementaux, constitue une solution idéale pour résoudre ce

problème, surtout lorsque cette sélection est assistée par des marqueurs biochimiques ou moléculaires. Les péroxydases, oxydoréductases très répandues chez les plantes, sont souvent utilisées comme marqueurs de la tolérance à de nombreux stress biotiques et abiotiques. L'évaluation de ces enzymes comme marqueurs de la tolérance à la salinité chez les céréales a permis de caractériser les variétés d'orges et de triticale, qui se sont montrées plus tolérantes à la salinité, par une augmentation de l'activité de leur péroxydases ionique des racines. Le calcium, élément qui joue un rôle important dans la nutrition des plantes, est souvent impliqué dans la résistance des plantes à la salinité. L'effet de cet élément sur la croissance de 10 variétés de céréales, cultivées en milieu hydroponique, et sur leur activité péroxydasique est déterminée. Les résultats obtenus montrent que des faibles concentrations en calcium stimulent légèrement la croissance des feuilles en présence et en absence du stress salin. Celle-ci est inhibée lorsque la concentration du calcium atteint 10 mM pour les feuilles et les racines. L'effet du calcium sur les péeroxydases se manifeste par une augmentation des activités des péroxydases solubles des racines, en présence et en absence du stress salin. Quant aux péroxydases ioniques, liées aux parois cellulaires, elles sont activées chez les variétés tolérantes et inhibées chez les autres variétés. La relation entre le calcium et les péroxydases et leurs rôles dans la tolérance à la salinité chez les céréales sont discutées.

D14 : Variabilité génétique des caractères de la ramification des plantules d'arganier

BANI-AAMEUR F., ZAHIDI A.

Laboratoire de Recherche sur la Variabilité Génétique, Université Ibnou Zohr, Faculté des Sciences. B.P. 28/s, 80000 Agadir, Maroc.

Cinq types morphologiques de port des arganiers (*Argania spinosa* (L.) Skeels) adultes sauvages chevauchent entre le port très épineux très ramifié et le type inerme peu ramifié. Sa domestication en tant qu'arbre fruitier oléicole, passe par la production de plants accessibles aux techniques culturales telles que la taille et la récolte. Ces techniques seraient plus aisées avec des plants raisonnablement ramifiés et peu épineux. La variabilité génétique de neuf caractères de la ramification de la tige a été observée chez des plantules âgées d'un an élevées en pépinière. Les effets de la provenance, de la famille et du génotype des plantules ont été étudiés chez dix familles originaires de chacune des trois localités du sud ouest du Maroc : Ait Mellouil, Argana et Ait Baha. Quel que soit le caractère de la ramification, l'effet provenance n'était pas significatif. Par contre, l'effet famille était significatif pour les longueurs de la tige et des rameaux secondaires, et, pour le nombre de rameaux tertiaires. Les moyennes des hauteurs des tiges variaient entre 69,3 et 6,5 cm. Toutes les tiges n'étaient pas ramifiées. Quand ils étaient présents, le nombre de rameaux secondaires variait entre 20 et 2 ; et leurs longueurs étaient comprises entre 44,3 et 2,3 cm. Quand les rameaux tertiaires se montraient, leur nombre était compris entre 9 et 0,14. Les différences entre les plantules d'une même famille étaient hautement significatives pour l'ensemble des caractères, exception faite du nombre de rameaux tertiaires. Ainsi la sélection pour ce caractère serait plus efficace au niveau familial. Les héritabilités au sens stricte de la longueur de la tige et du rameau secondaire étaient les plus élevées (0,38). L'héritabilité du nombre de rameaux tertiaires était de 0,22. La plus faible héritabilité (0,06) était observée pour le nombre de rameaux secondaires. Ces héritabilités illustrent l'ampleur des intervalles de progrès potentiel exploitable par un programme d'amélioration génétique orienté vers la domestication de l'arganier.

D15 : Identification de cultivars du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par l'amplification aléatoire d'ADN (RAPD).

BEN ABDALLAH A.[1,2,3], STITI K.[2], LEPOIVRE Ph.[3], DU JARDIN P.[2]

[1] Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, Rue Hédi Karray 2049 Ariana (Centre de Recherches Phoenicicoles, 2260 Degache) - **TUNISIE.** [2] Unité de Biologie végétale - Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques Passage des Déportés, 2 B-5030 Gembloux - **BELGIQUE.** [3] Unité de Phytopathologie -Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Passage de Déportés. 2 B-5030 Gembloux - **BELGIQUE.**

L'analyse de l'ADN génomique des feuilles du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) chez quatre cultivars femelles (Deglet nour, Allig, Kentichi, Menakher), un génotype mâle (T23) et leurs descendants hybrides a été réalisée par la technique RAPD (*random amplified polymorphic DNA*). Des amorces donnant des résultats reproductibles et révélant un polymorphisme au sein de cet ensemble des génotypes ont été sélectionnées. 53 bandes polymorphes (soit 12,5 % du total des bandes) résultent de l'utilisation de 11 amorces sélectionnées parmi 122 testées. Ces marqueurs RAPD ont permis aussi bien de caractériser et de distinguer les différents cultivars que de différencier les géniteurs de leurs descendants. La reproductibilité des résultats et le polymorphisme suffisamment élevé font de ces marqueurs un outil potentiel pour l'identification variétale chez le palmier dattier. La méthodologie suivie dans cette étude pourrait servir pour l'évaluation du potentiel phoenicicole, qui souffre d'un manque de critères discriminants, ainsi que pour l'assistance à des programmes d'amélioration variétale.

Mots clefs :
Phoenix dactylifera L., RAPD, identification variétale, polymorphisme, marqueur moléculaire.

D16 : Aptitude à l'embryogenèse somatique chez le pois : analyse diallèle et contrôle génétique

BENCHEIKH M.
Institut d'Agronomie, B.P. 151 02000 Chlef, Algérie.

À partir d'apex de plantules de 5 jours, des structures embryonnaires de pois ont été obtenues sur un milieu inducteur d'embryogenèse somatique proposé par Kisely *et al.* (1987). Plusieurs lignées (30) ont été testées. Elles ont montré des différences significatives tant pour le pourcentage de cals embryogenèses que pour le nombre de structures embryonnaires par cal embryogène.

L'analyse quantitative par l'utilisation des croisements diallèles, menée avec 6 lignées ayant des potentiels différents de régénération et leurs combinaisons hybrides respectives, a révélé des effets additifs importants. Cependant, malgré l'importance des effets additifs, l'analyse génétique semble montrer deux systèmes génétiques : l'un avec dominance favorable et l'autre avec dominance défavorable. L'étude de la ségrégation d'une génération F2, issue d'un

croisement entre deux lignées très différentes, semble confirmer l'hypothèse d'un déterminisme génétique relativement simple avec peu de locus en jeu.

La recherche de marqueurs moléculaires de l'ADN nucléaire, par la technique RFLP, a permis de mettre en évidence 3 marqueurs liés faiblement à des QTL de l'embryogenèse somatique. Cependant le passage par une régression multiple progressive permet d'expliquer, avec 6 marqueurs dont 2 liés, 44 % de la variance de l'embryogenèse somatique.

D17 : Composition variétale des palmeraies marocaines révélée par méthode isoenzymatique

BENDIAB K.[2], BAAZIZ M.[1]

[1] Laboratoire de Biochimie et Amélioration des Plantes, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences-Semlalia, B.P. S 15, Marrakech, Maroc.

[2] Laboratoire de Biochimie, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences et Techniques de Gueliz. B.P. 618, Marrakech, Maroc.

En se basant sur l'électrophorèse des enzymes, 28 cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*), connus par leurs caractères morphologiques, sont identifiés en utilisant des systèmes enzymatiques plus actifs chez cette espèces : estérases (EST), endopeptidase (ENP) et Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT). Ainsi, 8, 6 et 7 phénotypes électrophorétiques respectifs ont été révélés en utilisant des extraits de feuilles. Les combinaisons des phénotypes ont permis d'obtenir une clé d'identification des cultivars de palmier dattier basée sur les phénotypes électrophorétiques. La composition variétale de 11 palmeraies marocaines différentes par leur répartition géographique, est réalisée. A l'exception des palmeraies de M'Hamid et Rissani, plus de 50 % des palmiers restent non identifiés en se basant sur la clé établie. Ces données sont confirmées par la prédominance des palmiers provenant de graines et appelés 'Khalts'. Les cultivars les plus fréquents dans les 11 palmeraies sont 'Jihel' et 'Bou-Feggouss', connus par leur bonne qualité fruitière. L'analyse factorielle des correspondances utilisant les fréquences des phénotypes isoenzymatiques, a montré que la palmeraie de Marrakech, située dans la partie nord du Haut Atlas, est liée aux palmeraies de Skoura, Ait Atman, Ksar Jdid et Ksar Sifa. Les populations de palmiers dattiers de Zagora, M'hamid et Rissani, formant un seul groupe, sont caractérisées, respectivement, par les cultivars 'Bou-Sthammi Noire', 'Bou-Skri' (et Iklane) et 'Bou-Feggouss'. L'assortiment variétal obtenu sur la base des isoenzymes est comparé à celui déterminé à l'aide des critères morphologiques de la datte.

D18 : Le germoplasme de blé dur en Algérie : son "érosion" et les perspectives de sa réhabilitation

BENLARIBI M.

I.S.N. Université de Constantine, Algérie.

La multitude de variétés locales de blé dur constitue jusqu'aux années soixante (1960) un potentiel original de grande valeur.

Ce potentiel en ressources phylogénétiques atteignant actuellement un degré d'"érosion" très poussé avant même d'avoir été valorisé se compose de variétés traditionnelles sélectionnées

dans des populations locales peu productives certes, mais demeurent le mieux adaptées aux conditions bioclimatiques et agronomiques d'une part, et aux habitudes sociales, particulièrement l'association céréales - élevage, d'autre part.

Il perd chaque jour du terrain malgré ses qualités devant l'introduction précipitée de cultivars dits à "haut rendement" qui sont sélectionnés dans d'autres conditions géo-écologiques et ne possédant aucune capacité de réponse à l'itinéraire technique suivi et encore moins aux conditions de sécheresse en Algérie.

D'ailleurs, la majorité de ces variétés d'introduction a disparu avant même d'être généralisées à travers le pays laissant un grand vide en matière de génotypes de blé dur.

Malgré cette évidence pratique, tous les programmes d'amélioration engagés depuis près de vingt ans, sans grand résultat d'ailleurs, partent d'un matériel végétal d'introduction, éludant le germoplasme local.

Devant cette situation une stratégie de réhabilitation des ressources de blé dur comme d'autres espèces végétales est envisagée par les services concernés.

D19 : Embryogenèse somatique chez *Phoenix dactylifera* L. : effet du cultivar sur la composition phénolique et le brunissement des cals

EL BELLAJ M., EL IDRISSI-TOURANE A., EL HADRAMI I.

Laboratoire de Physiologie Végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences-Semlalia. B.P. S15. 40 001 Marrakech, Maroc

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une monocotylédone pérenne adaptée aux conditions écologiques rudes des zones sahariennes et subsahariennes. Sa prolifération dans ces régions permet la création des oasis dont l'importance socio-économique est considérable pour une population humaine non négligeable. Actuellement, l'existence de cette espèce est menacée par plusieurs facteurs particulièrement la sécheresse et la maladie vasculaire connue sous le nom de bayoud. À elle seule, cette maladie est responsable de la destruction des 2/3 des palmeraies marocaines, sévit actuellement en Algérie et risque de s'étendre à d'autres pays. La reconstitution et le repeuplement des palmeraies par des cultivars de bonne qualité dattière, résistants aux maladies et aux stress, demande un grand nombre de plants. À présent, les biotechnologies appliquées à la multiplication du Palmier dattier reposent essentiellement sur la seule technique d'organogenèse qui s'est avérée insuffisante pour répondre à une demande de plus en plus importante. La nécessité de développer la recherche sur l'embryogenèse somatique s'impose donc pour, entre autres, alimenter régulièrement les phoeniciculteurs en vitroplants. Cependant, la récalcitrance de certains cultivars du dattier vis-à-vis de cette technique, qui se manifeste essentiellement par un brunissement des tissus au cours de la phase d'induction de la callogenèse, nécessite la compréhension des mécanismes biochimiques impliqués dans ces phénomènes.

Dans ce travail, un suivi de l'évolution de la composition phénolique, composante essentielle du phénomène de brunissement tissulaire, des cals de plusieurs cultivars de dattier a été réalisé. Les résultats révèlent que les cultivars BSTN et BFG présentant des indices de brunissement élevés (0,42 et 0,34 respectivement), possèdent une plus grande capacité à dégrader les composés phénoliques comparés aux cultivars JHL et IKL dont le degré de brunissement ne dépasse pas 0,20 et 0,22 respectivement. Il existe donc une relation positive entre l'aptitude des tissus à brunir et le potentiel de dégradation des phénols chez les cultivars étudiés. Les analyses

de la composante phénolique effectuées sur d'autres cultivars pendant la même phase de callogenèse ont permis de distinguer deux grands groupes se caractérisant par un indice de brunissement supérieur ou inférieur à 0,3. Dans le premier cas, les cals bruns contiennent plus de phénols totaux et de flavanes ainsi qu'un indice de polymérisation des flavanes plus élevé par rapport aux cals non bruns de ces mêmes cultivars. C'est le cas ici de HAFS, BSL, BSTN, KRN et BFG. Dans le deuxième cas, les cals qui ne brunissent pas ou peu se présentent plus riches en phénols totaux et en flavanes ; il s'agit particulièrement des cultivars MJHL et JHL. Par ailleurs, il a été relevé que le rapport flavanes/phénols totaux et ici nettement inférieur à celui du premier groupe de cultivars. L'approfondissement de ces données est d'une importance certaine pour la maîtrise de l'embryogenèse somatique et l'adaptation des milieux de culture aux différents cultivars étudiés chez le dattier. Le degré d'implication des composés phénoliques dans la récalcitrance des cultivars vis-à-vis de l'embryogenèse somatique sera discuté.

D20 : Étude comparative d'hybrides interspécifiques issus de croisements entre quatre espèces d'Aegilops et des blés cultivés (*Triticum aestivum, T. durum*)

EL KHLIFI O.K.[1], BENLHABIB O.[2], MALKI M.[1]

[1] Faculté des Sciences Casablanca Ain Chock, Casablanca, Maroc.

[2] I.A.V. Hassan II, Rabat, Maroc.

Des croisements interspécifiques entre le blé tendre (*Triticum aestivum*) ou dur (*T. durum*), et différentes espèces d'Aegilops (*Ae. ovata*, *Ae. triaristata*, *Ae. squarrosa* et *Ae. ventricosa*), ont été entrepris. Seules les accessions résistantes à la mouche de Hesse ou Cécidomyie (*Mayetiola destructor say*) ont été employées afin de transférer cette résistance au blé. Le sauvetage des embryons hybrides immatures a été utilisé.

Une étude comparative de l'aptitude au croisement des quatre espèces d'*Aegilops* avec les blés cultivés, rend compte que le taux de nouaison n'est pas le meilleur critère pour juger la réussite d'un croisement. La viabilité et la fertilité des F_1 et de leurs descendants sont plus discriminants. Les taux élevés de plantes hybrides ont été obtenues chez *Ae. ovata* croisé au blé tendre, soit 12 %. Cependant, toutes les plantes sont létales, et ne conduisent à aucune descendance. Les taux de plantes hybrides ont été au contraire de 0,5 % seulement, chez *Ae. squarrosa*, mais ont conduit à la formation de plantes viables et fertiles en F_1, F_2 et BC_1. Les causes de ces différences sont discutées.

La fertilité des hybrides a été très variable, aussi bien en autofécondation qu'en rétrocroisement. Cette variabilité a été observée entre les familles, mais aussi à l'intérieur des familles, surtout celle issue du croisement entre *Ae. triaristata* et le blé dur. La fertilité du pollen des hybrides F_1 de ce croisement, a varié de 0 à 89 %.

Les descendants BC_1 ont présenté des taux de germination souvent faibles et des taux de mortalité importants. Les descendants F_2 ont présenté moins de problèmes de variabilité.

L'aptitude au croisement interspécifique du blé dur a été généralement plus faible que celle du blé tendre. Mais en croisement réciproque, le blé tendre s'est montré souvent, plus récalcitrant. Il n'a formé des plantes hybrides qu'avec *Ae. ovata*.

Trente-sept hybrides interspécifiques ont été installés au champ pour leur caractérisation morphologique. Le comptage du nombre de chromosomes et une analyse méiotique ont été également réalisés.

La plupart des critères d'évaluation utilisés dans l'analyse morphologique et de résistance aux maladies, ont souvent permis de caractériser les différents hybrides. La résistance à la rouille noire et au mildiou, le port de la plante et la forme de l'épi, sont des caractères transmis à la majorité des hybrides, du parent sauvage.

Le nombre de chromosomes a été souvent celui attendu chez les hybrides interspécifiques, soit 28 quand l'espèce sauvage tétraploïde est croisée au blé dur, et 35 quand celle-ci est croisée au blé tendre. Un doublement spontané des chromosomes a été noté chez les hybrides viables issus d'*Ae. squarrosa*.

L'analyse des cellules mères de pollen a montré de faibles taux d'appariements chromosomiques, particulièrement, chez les hybrides issus d'*Ae. ventricosa* croisé au blé dur. Certains de ces derniers sont présentés jusqu'à 25,55 univalents. Mais pour ceux issus d'*Ae. Squarrosa*, les appartements ont été relativement importants, soit jusqu'à 19,6 bivalents.

D21 : Relation virulence et polymorphisme de l'ADN chez *Aschochyta rabiei* parasite du pois chiche (*Cicer arietinum*)

HAMZA S.

Laboratoire de Génétique, Institut National Agronomique de Tunis, 43 av. Charles Nicolle. 1082 Tunis. Tunisie.

La variabilité génétique de cent cinquante cultures monosporale d'*Ascochyta rabiei* isolées à partir de cinq localités différentes de la région de Béja ont été analysées par la méthode RFLP en utilisant les simples séquences répétées (SRS). L'ADN génomique a été digéré par les enzymes de restriction HinfI et RsaI et séparé par électrophorèse sur gel d'agarose. L'hybridation avec les SRS du type (GATA), $(CA)_5$ a permis de regrouper les 150 isolats en 17 génotypes et classés selon leurs relations phylogénétiques. L'analyse RAPD utilisant 8 amorces decamères a permis la différenciation des 17 génotypes indiquant le pouvoir descriminatif de cette méthode. La virulence des 17 génotypes a été réalisée sur une série différentielle composée de 8 variétés. Cette analyse a permis de distinguer 8 pathotypes avec une prépondérance du pathotype 1 et 2 virulent qui regroupent plus de la moitié des génotypes. La classification phylogénétique obtenue par analyse RFLP n'est pas corrélée à la classification des groupes de virulence. Cette faible association entre les profils RFLP et la virulence montre que le polymorphisme de l'ADN et indépendant de la virulence et s'explique par le mode de reproduction sexuée du champignon dont la forme a été observée dans les débris foliaires de pois chiche.

D22 : Variabilité morphologique chez des descendances maternelles d'*Atriplex halimus*

HANÈNE H.
Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire 2020 Sidi thabet, Tunisie.

La valorisation des sols marginaux nécessite l'introduction de plantes fourragères tolérantes aux conditions extrêmes du milieu, parmi lesquelles les Atriplex prennent une place de choix. En Tunisie, *Atriplex halimus* occupent les régions semi-arides et arides. Le maintien et la multiplication de cette espèce autochtone nécessite une meilleure connaissance de sa biodiversité naturelle. Les semences récoltées plante par plante pour l'ensemble des localités repérées nous permettent d'évaluer la variabilité intra-plante (descendances maternelles) et la variabilité entre plantes de différentes origines, cette étude a été menée *in vitro* et *in vivo*, en culture hydroponique.

En culture *in vitro*, les plantules issues de graines sont cultivées sur le milieu de culture Murashige et Skoog à différentes concentrations. Cette expérience met en évidence l'influence de la composition minérale du milieu de culture sur la croissance des jeunes plants. Pour le deuxième essai, nous avons utilisé des semences de deux origines différentes du point de vue étage bioclimatique. Les caractères mesurés concernent la croissance végétative et les teneurs en azote protéique des feuilles. Le traitement des données par analyse de variance multivariée a montré des différences entre plantules issues des graines prélevées d'un même pied mère c'est-à-dire des descendances maternelles ou demi-frères. Nous avons remarqué également, que l'écart entre plantes d'une même origine est d'autant plus grand que ceux-ci proviennent d'une parcelle accessible aux vents, ce qui peut être expliqué par la reproduction allogame de ces plantes.

D23 : La collection des espèces végétales à la faculté des sciences agronomique, un exemple original de la conservation *in situ* de la diversité biologique

HOUNKPEVI A.

INTRODUCTION

Le Bénin est un petit pays aux ressources naturelles limitées de 112.622 km^2 avec une population estimée à 5.000.000 habitants. La densité de population varie de 450 hab/km^2 au Sud à 10 hab/km^2 au Nord du pays.

On assiste dans le Sud du pays à une forte pression sur les ressources naturelles engendrant ainsi la fragmentation des écosystèmes végétaux. Cette fragmentation n'est pas sans conséquence sur la structure des peuplements et des populations végétales.

En effet, certaines espèces vivrières ou médicinales et des écosystèmes forestiers sont actuellement menacés d'extinction. Par exemple, certains fruitiers du périmètre urbain de Cotonou et les mangroves de la zone lagunaire de Cotonou-Ouest.

Certaines espèces sont devenues rares ou ne se retrouvent que sous forme de pieds isolés protégés et entretenus par les paysans lors de défrichements. C'est le cas du néré (arbre à moutarde), le kapokier, le karité (oléagineux).

Certaines plantes à espèce, et condiments ne se retrouvent plus à l'état spontané dans les formations végétales. Par exemple : le gingembre, le poivre, le piment, le gombo etc.

C'est donc dans le but de sauvegarder les espèces de grande culture et de promouvoir les espèces utiles en voie de disparition qu'a été initié à la FSA depuis 1994, le programme de collection des espèces végétales.

OBJECTIFS

L'objectif global de ce programme est la conservation *in situ* des espèces de grande culture et des espèces dites « mineures » d'importance socio-économique non négligeable à des fins pédagogique et de recherche.

De façon spécifique, il s'agira :

- d'œuvrer pour la conservation *in situ* des espèces cultivées et/ou rares et de leurs ressources génétiques ;
- de caractériser et évaluer les espèces ciblées ;
- d'exploiter la collection vivante dans des programmes de formation et de recherche pluridisciplinaire ;
- de maîtriser la culture ou la sylviculture de ces espèces ;
- de transférer le paquet technologique des acquis en milieu réel (Paysans et Productions Privés) en collaboration avec les structures nationales de recherche et de développement (I.N.R.A.B., C.A.R.D.E.R., etc.).

LES ACQUIS

Le tableau ci-après présente les différentes espèces installées de 1994 à 1997 par DO CAO*.

Espèces	Nombre	Observations
Ornementales	74	DA CAO : coopérant français chargé de cours de Phytotechnie Spéciale à la FSA (1992-1997)
Fruitières	19	
Espèces	10	
Manguiers	7	
Cocotiers	5	
Bananiers	19	
Agrumes	21	
Cannes à sucre	3	
Citronnelles	2	
Ananas	3	
Bambous	3	
Gingembre	3	Par HOUNKPEVI

À partir de cette collection, la pépinière a déjà commencé à produire des plants greffés (manguiers et citrons) et des jeunes plants pour les programmes de reboisement.

PERSPECTIVES

La collection actuelle n'est qu'une première phase. Elle sera complétée progressivement à partir :

- **de nouvelles prospections à l'intérieur du Bénin**

- des introductions de l'extérieur (Togo, Niger, Burkina Faso, Nigeria...) et à partir des banques de gènes des Organismes Internationaux dotés de structures de conservation à moyen et long termes.

Cette nouvelle série de collections prendra en compte, les formes sauvages disponibles, les espèces dites « mineures » et d'importance socio-économique non négligeable (Fonio, aracée etc.) et les espèces d'intérêts pharmacologique.

Enfin, la collection sera exploitée dans des programmes de recherche pluridisciplinaire avec un accent particulier sur les manipulations en biotechnologie végétale avec production de vitro-plants indemnes du complexe virus-bactérie (exemple : manioc, bananier, niébé, gingembre etc.).

D24 : Variabilité génotypique et analyse biochimique des capacités embryogènes et organogènes des anthères et des embryons immatures chez le Blé

J'AITI F.[1], BENLHABIB O.[2], BAAZIZ M.[3], EL HADRAMI I.[1*]

Laboratoire de Physiologie Végétale[1] et Laboratoire de Biochimie[3], Département de Biologie, Faculté des Sciences-Semlalia, BP. S15, 40 001 Marrakech-Maroc. Laboratoire de Cytogénétique et de Culture de Tissus, IAV Hassan II, Rabat-Maroc[2] (* pour toute correspondance)

Dans les coutumes alimentaires marocaines, le pain constitue une denrée indispensable préparée essentiellement à base de blé et d'orge. Le blé (*Triticum durum* ou *T. aestivum*), dont la production est fluctuante, occupe la deuxième place après l'orge. L'utilisation de variétés adaptées aux stress biotiques et abiotiques (pluviométrie, température extrême, maladies, ravageurs...) est donc d'une importance certaine pour la céréaliculture. Plusieurs programmes de sélection et d'amélioration sont actuellement en cours. Ils reposent essentiellement sur les méthodes classiques et visent l'intégration des outils biotechnologiques. En effet, la maîtrise des techniques de production *in vitro* de plantes chlorophylliennes haploïdes (cultures anthères) ou diploïdes (cultures d'embryons immatures) offre différentes possibilités aux sélectionneurs. Pour cela, un travail a été réalisé dans le cadre de notre programme de recherche qui a pour objectif l'adaptation de ces deux techniques aux variétés marocaines. Aussi, avons nous relevé que la réponse des anthères et des embryons immatures à la culture *in vitro* est fortement liée aux génotypes. De plus, les variétés les plus androgènes ne sont pas forcément les plus réactives en culture d'embryons zygotiques. Tel est le cas de la variété Saada (blé tendre) qui produit des plantes haploïdes chlorophylliennes et qui se montre totalement récalcitrante pour la régénération de plantes diploïdes. Le génotype Anouar (blé dur) a également donné 100 % de cals embryogènes et organogènes en culture d'embryons zygotiques et ne présente qu'une réponse modérée vis-à-vis de la culture anthères. Ceci laisse supposer l'existence d'une différence dans le déterminisme génétique de l'embryogenèse somatique et gamétique. La réactivité ou la récalcitrance d'un génotype est donc sous contrôle génétique. Néanmoins, l'impact des conditions de culture et de différents traitements du matériel végétal contribuent pour une large part à cette même réactivité et/ou récalcitrance des variétés. En effet, en culture d'embryons immatures, la récalcitrance de plusieurs variétés, concernant la régénération de plantes, a été levée par l'utilisation de plusieurs substances, entre autres, un inhibiteur de l'action de l'éthylène (AgNO3). Ainsi, l'incorporation de nitrate d'argent dans le milieu d'induction a favorisé, dans nos conditions expérimentales, la formation de cals morphogènes chez les variétés Cocorit, Marzak et Saada qui ne produisaient aucune plante sur le milieu

témoin (J'aiti et al., 1997). De même, le passage direct d'un milieu d'induction (2 mg/l de 2,4-D) à un milieu de régénération sans hormones a amélioré significativement le nombre de plantes vertes produites chez les deux espèces de blé. En culture anthères, certaines variétés telles que Isly et Cocorit ne présentaient aucune capacité embryogène sur les milieux habituellement utilisés. Cependant, l'utilisation de ces mêmes milieux conditionnés par les ovaires a permis la production de cals et d'embryons haploïdes à partir des anthères de ces génotypes (J'aiti et al., 1996). Parallèlement à ces modifications de conditions de culture et à cette variabilité génotypique relevée, une étude biochimique a été réalisée pour déterminer le degré d'implication de certains paramètres biochimiques telles que les protéines totales, les péroxydases et les estérases dans la réactivité ou la récalcitrance des anthères et des embryons zygotiques. Ainsi, il a été noté que la compétence des embryons à produire des cals morphogènes paraît liée à leur capacité de biosynthèse protéique et d'activation des systèmes enzymatiques, péroxydasiques et estérasiques (J'aiti et al., 1996). De même, il a été remarqué que les anthères les plus réactives se caractérisent par des activités peroxydasiques et estérasiques élevées. L'importance et l'interaction de ces paramètres génotypiques et biochimiques dans la réactivité des embryons immatures et des anthères sera discutée.

Mots clés

blé, embryogenèse somatique, organogenèse, marqueurs biochimiques, anthères, embryons immatures.

Remerciements

Ce travail est réalisé dans le cadre du Fonds Francophone de la Recherche « Jeune Équipe de Recherche associée à l'AUPELF-UREF, JER 3008 » et dans le cadre d'une collaboration en Biotechnologie entre l'IAV Hassan II et l'ICARDA. Il bénéficie également d'une bourse de recherche de la FIS (FIS, D/1937-2).

Bibliographie

1. J'AITI F., BENLHABIB O., EL HADRAMI I. (1997). Actes Inst. Agro.Vet., 17 : 34-42.
2. J'AITI F., BENLHABIB O., BAAZIZ M., EL HADRAMI I., NACHIT M. (1996). Actes de la 3e Réunion du Réseau SEWANA, Recherche Intégrée sur le blé (sous presse).
3. J'AITI F., BENLHABIB O., BAAZIZ M., EL HADRAMI I. (1996). Actes des Journées Scientifiques sur l'amélioration du blé, Oujda 25-27 Avril 1996 (sous presse).

D25 : Polymorphisme hétérochromatique intervariétal chez le blé dur, et chez le blé tendre cultivés en Algérie

KHALFALLAH N., HAMOUDA D.

Laboratoire d'Amélioration des plantes, Institut des Sciences de la Nature, Université de Constantine, Alger

L'application de la technique du C-banding chez trois variétés de blé dur algérien, a révélé un polymorphisme hétérochromatique entre ces trois variétés, notamment chez les chromosomes 1B, 2B, 3B et 4B. La variété Oued Zenati sélectionnée dans une population locale de la station de Guelma (plaines intérieures) est plus riche en hétérochromatine.

Les résultats de l'application de cette technique au blé tendre, sont discutés par rapport à la variété témoin Chinese Spring.

D26 : Étude de la diversité allélique des oméga-gliadines de la zone D, en relation avec les tests de technologie appréciant la valeur d'utilisation du blé tendre (*Triticum aestivum.* L).

KHELIFI D.[1], BRANLARD G.[2]

[1] Institut des Sciences de la Nature, Université de Constantine, 25000 Constantine. 25000 Constantine. Algérie.

[2] I.N.R.A., Domaine de Crouelle, 63039 Clermont-Ferrand, France.

La diversité des oméga-gliadines de la zone D a été analysée pour 169 blés tendres provenant de 17 pays. Douze bandes de mobilité différente ont été répertoriées. La localisation chromosomique de chacune des bandes a été réalisée grâce à l'analyse des lignées nullitétrasomiques et substituées. Le calcul des corrélations interbandes révèle plusieurs groupes de bandes constitués de deux ou rois bandes. Cinq, sept et trois allèles ont été identifiés pour les chromosomes 1As, 1Bs et 1Ds respectivement.

La relation entre la diversité allélique des oméga-gliadines et la qualité technologique a été étudiée. Les résultats de l'influence de ces protéines sur la qualité montrent nettement que certaines protéines ont un effet significatif dans l'expression des caractéristiques rhéologiques de la pâte.

Ces protéines s'avèrent de bons marqueurs de la qualité, d'autant plus qu'elles peuvent être délectées à un stade précoce de la sélection.

D27 : Collecte et évaluation des ressources locales de blé dur pour la tolérance à la sécheresse : prospections en zones Bour et Oasis marocaines

LAMINI H.[1,2], EL MEKKAOUI M.[1], BAHRI H.[1], EL JAAFARI S.[2]

(1) Département d'Agronomie et Amélioration des Plantes, École Nationale d'Agriculure. Meknès. MAROC (2) Laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismaïl, Meknès, MAROC

L'extension du front de la sécheresse dans les zones particulièrement exposées aux aléas climatiques, les rapides transformations socio-économiques au Maroc, ont provoqué la disparition d'un nombre relativement important de cultivars de blés traditionnels. Ces cultivars peuvent constituer une source de variabilité importante utilisable dans l'amélioration génétique du blé. La mobilisation de ces ressources génétiques pourrait 1) relever le plafond d'amélioration génétique, 2) abaisser la vulnérabilité aux stress biotiques et abiotiques et 3) introduire des voies de développement et d'adaptation écologique nouvelles. Une meilleure connaissance des mécanismes de tolérance de ces blés et l'identification de paramètres morpho-physiologiques correspondant est nécessaire pour une utilisation efficace de ces

ressources génétiques pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse chez le blé. Une série de prospections a été réalisée dans des zones Bour et dans des Oasis du Maroc : Settat, El Jadida, Taza, Sidi Kacem et Tafilalet. Parmi les cultivars collectés, 24 génotypes ont fait l'objet d'une description agro-morphologique (forme et la longueur de l'épi et du grain, la hauteur de la paille la fertilité des épillets et le poids de mille grains) et d'une caractérisation physiologique pour leur tolérance au déficit hydrique. Deux variétés améliorées ont été utilisées comme référence : Sarif (à adaptation large) et Isly (à adaptation spécifique). Les paramètres physiologiques mesurés concernent le statut hydrique de la plante (teneur relative en eau, potentiel hydrique), son activité photosynthétique (fluorescence chlorophyllienne, échanges gazeux) et son rendement en biomasse. Une large variabilité a été trouvée pour ces paramètres au sein du matériel collecté. Un indice de sensibilité vis à vis de la sécheresse a été calculé sur base de rendement en biomasse en conditions de déficit hydrique rapportée au témoin en conditions favorables d'alimentation en eau. Cet indice a permis de classer les différents cultivars en fonction de leur niveau de tolérance, les autres paramètres physiologiques ont été utilisés dans une approche analytique visant à comprendre les mécanismes de tolérance développés par ces cultivars et l'identification de critères d'évaluation. Douze cultivars se sont révélés plus tolérants que les 2 variétés témoin Sarif et Isly. Les possibilités d'utilisation de ces ressources locales pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse chez le blé sont discutées.

D28 : Étude de la structure du complexe d'espèces des sétaires et de la diversité du millet (*S. italica*) et de son ancêtre sauvage (*S. viridis*) par des marqueurs AFLP

LE THIERRY D'ENNEQUIN M., PANAUD O., SILJAK-YAKOVLEV S., SARR A.
Laboratoire d'Évolution et Systématique, URA CNRS 2154, Université Paris XI, Bât. 362, 91405 ORSAY Cedex FRANCE.

Le millet, *Setaria italica*, est une céréale d'importance majeure en Chine qui a été domestiquée à partir de son ancêtre sauvage *Setaria viridis*. Ces deux espèces qui forment le pool primaire du complexe des sétaires ont en commun l'annualité, la diploïdie (2n=18) et l'autogamie. L'étude de la domestication et de la structure des complexes d'espèces permet d'apporter des connaissances indispensables à l'utilisation des ressources génétiques. La détermination du nombre chromosomique et l'évaluation de la quantité d'ADN de 15 espèces du complexe des sétaires ont permis de mettre en évidence la présence de trois niveaux de ploïdie ainsi que d'importantes variations interspécifiques de la taille du génome. De plus le millet, dont le contenu en ADN a été évalué à 1 pg, se révèle être le plus petit génome avec le riz parmi les céréales.

D'après des données archéologiques, la domestication du millet remonte à 5000 ans avant notre ère. De nombreux auteurs s'accordent à dire qu'il y a eu deux domestications distinctes, une en Chine et une autre plus récente (2000 ans avant notre ère) en Europe. Cependant d'autres hypothèses comme celle d'une domestication unique en Chine suivie d'une diffusion vers l'Europe ou plus récemment celle de l'existence d'un troisième centre de domestication dans une région située entre l'Afghanistan et le Liban ont été développées. L'ensemble de ces travaux est basé sur des études de diversité par des marqueurs morphologiques ou isozymiques. Les objectifs de notre étude ont été d'une part d'évaluer la diversité du pool primaire du complexe des sétaires par des marqueurs moléculaires de type AFLP et d'autre part d'identifier les centres de domestication possible du millet. Ces données confrontées aux données acquises avec les autres types de marqueurs permettent de valider certaines hypothèses et témoignent de l'efficacité des marqueurs AFLP pour l'évaluation de la diversité génétique.

D29 : Étude de la variabilité génétique pour l'aptitude a l'androgenèse dans une collection française de blé dur (*Triticum durum* desf.)

MIHAMOU A.Z., PICARD E., BELABED A., WERTHEIMER D.[1]

Faculté des Sciences, Département de Biologie, Laboratoire d'amélioration et de production végétales. 60000 Oujda Maroc **Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bat 360 F 91405 Orsay France

Le but de ce travail est d'étudier la variabilité génétique pour l'aptitude à l'androgenèse *in vitro* et surtout pour la production de plante chlorophylliennes de blé dur.

Chez cette espèce le taux de régénérations de plantes chlorophylliennes par culture d'anthères est très faible. Par contre les taux de régénérations de plantes albinos et de racines restent assez élevés. La collection étudiée comprend 101 génotypes -fournie par le GAE (Société Française, Essonne) dont un seul génotype fourni par l'ICARDA. Cette étude nous a permis de régénérer une cinquantaine de plantes chlorophylliennes chez 18 génotypes dont 4 lignées fixées (MONDUR, EURODUR, MEGADUR, PRIMADUR). Ces résultats comptent parmi les meilleurs obtenus chez cette espèce, par cette méthode.

Les paramètres qui ont été utilisés pour étudier cette variabilité sont les pourcentages d'épis embryogènes, d'embryons, de régénérations chlorophylliennes, de régénérations albinos et de régénérations racinaires. Pour chaque paramètre, les meilleurs génotypes ne sont toujours pas les mêmes. La corrélation entre ces différents paramètres. L'effet génotypique reste significatif pour tous les paramètres étudiés sauf pour le pourcentage de régénérations chlorophylliennes. Ceci s'explique par la faiblesse de ce pourcentage. Le meilleur pourcentage de régénérations vertes est de l'ordre de 1,2 %.

Mots clés : Androgenèse *in vitro*, blé dur, variabilité génétique.

D30 : La réponse *in vitro* de 11 génotypes de blé d'hiver au traitement avec NaCl

MORARU I., RĂDUCANU F., ZGLIMBEA ROMULUS G.

Institut de Recherche pour Céréales et Plantes Techniques, Fundulea, Roumanie.

L'excès de salinité du terrain a beaucoup d'implications à l'intérieur du monde vivant, imposant d'effectuer des études pour l'amélioration du niveau de tolérance des plantes cultivées à la salinité. Des résultats récents concernant la possibilité de tester et de sélectionner *in vitro* pour ce type de résistance ont été rapportés chez le sorgho (WASKOM et col., 1990), la betterave (FREYTAG et col., 1990), le lin (MC HUGHEN, 1987), le blé (DE LEON, 1995). Le but de notre expérimentation a été la recherche des possibilités de tests *in vitro*, comme première étape, conduisant à un procédé de sélection au niveau des cals pour une meilleure résistance à la salinité chez des génotypes de blé. Ont été analysés 11 génotypes de blé d'hiver (du Laboratoire d'amélioration du blé, IRCPT, Fundulea). Les cultures *in vitro* ont été initiées à partir d'embryons immatures (1-1,5 mm longueur) placés sur le milieu MURASHIGE et SKOOG (1962) supplémenté avec 2 mg/l 2,4D, 0,5 mg/l KN, pH = 5,8 et incubées à 27°C et à

l'obscurité. L'agent de sélection (NaCl) a été introduit dans le milieu de culture à deux concentrations : 4 g/l et 6 g/l respectivement. L'analyse de variance concernant la réponse *in vitro* des 11 génotypes de blé d'hiver au traitement avec NaCl montre que pour le poids des cals ont été trouvés des valeurs du facteur F significatives seulement pour les génotypes et les traitements, et non pour l'interaction génotype x traitement. La plus forte réaction aux traitements appliqués a été observé chez le génotype Rapid, avec une réduction en pourcentage significative du poids des cals (56,27 %- V_1 et 66,33 %- V_2 respectivement). Il a été suivi par Fundulea 29 (50,35 % et 57,74 % respectivement). Pour les génotypes Fundulea 4 et Alex, on a observé que les traitements n'ont pas influencé négativement l'évolution des cals (les réductions du poids des cals ne sont pas statistiquement différentes). On a constaté qu'entre le poids initial et le poids final des cals (après les traitements avec NaCl) il n'existait aucune corrélation significative statistiquement ($r = 0,207$; $r = 0,464$ respectivement). Cela suggère que le poids initial des cals étudiés n'a pas d'influence sur leur réponse au traitement au NaCl. Le comportement des génotypes *in vitro* est en rapport avec leurs caractéristiques génétiques. Cette affirmation est corroborée par le fait que chez le témoin non traité il existe une corrélation positive significative entre poids initial et final ($r = 0,683$). L'expérimentation a été complétée aussi avec les résultats obtenus au niveau des plantules à la concentration de 6 g/l NaCl. Ont été effectuées l'analyse de variance concernant la réaction des génotypes à cette concentration et l'étude des corrélations entre les résultats obtenus *in vitro* (poids du cal) et *in vivo* (longueur de la plantule).

D31 : Utilisation de lignées isogéniques en sélection du blé assistée par des marqueurs moléculaires : techniques et approches

NAJIMI B., EL JAAFARI S.
Laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismaïl, Meknès, MAROC.

Des lignées isogéniques du blé sont développées à l'INRA de Meknès et caractérisées pour leur résistance à quatre principales maladies. Ces lignées sont issues de croisements entre les principales variétés cultivées au Maroc (Nasma, Marchouch, Kanz et Achtar) et des sources de résistance aux maladies citées, suivis d'une série de croisements retours au parent récurrent que constitue la variété cultivée. La proportion minimale du génome en commun étant de 97 %. Ces lignées sont actuellement au cours d'évaluation, au Laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes de la Faculté des Sciences de Meknès, pour des mécanismes de tolérance à la sécheresse (ajustement osmotique, photosynthèse, régulations stomatiques...) présentent des différences concernant des caractères morphophysiologiques potentiellement impliqués dans la tolérance à la sécheresse. Dans le cadre d'une bourse d'excellence de l'AUPELF-UREF, nous visons développer des marqueurs moléculaires pour assister la sélection de variétés à résistance multiple aux maladies et tolérantes vis-à-vis de la sécheresse. Cet aspect moléculaire du programme sera réalisé dans un premier temps à la Station d'Amélioration des Plantes de Gembloux selon trois voies :

- La technique la plus efficace pour analyser des lignées isogéniques est l'AFLP : c'est une technique récente mais efficace consistant à la digestion de l'ADN par deux enzymes suivie de ligation d'adaptateurs et d'amplification d'ADN. Cela permet de générer 50 à 100 fragments d'ADN localisés sur des endroits différents.
- Les microsatellites qui commencent à être disponibles chez le blé.

- Les marqueurs RFLP dont une série a été isolée et cartographiée à la Station d'Amélioration des Plantes de Gembloux.

Nous rechercherons ensuite, les corrélations entre le polymorphisme des marqueurs moléculaires sur les lignées et parents utilisés et leurs réponses morphophysiologiques au stress étudié.

Remerciements

- Dr. M. Jlibene de l'INRA-Meknès pour avoir mis à notre disposition les lignées isogéniques.
- Dr. J.-M. Jacquemin de la Station d'Amélioration des Plantes de Gembloux, pour avoir diriger l'élaboration de l'approche moléculaire.

D32 : Le rôle de l'organisation génétique du syndrome de domestication au sein du pool primaire du mil (*Pennisetum sp.*)

PONCET V., ROBERT T., LAMY F., SARR A.

Laboratoire d'Évolution et Systématique, URA CNRS 2154, Université Paris XI, Bât. 362, 91405 ORSAY Cedex FRANCE.

Le mil cultivé (*Pennisetum glaucum* sp. *glaucum*) et la forme sauvage dont il serait issu (*Pennisetum glaucum* sp. *monodii*) sont encore parfois trouvés en situation de sympatrie. L'absence de barrières reproductives strictes et un mode de reproduction préférentiellement allogame facilitent les flux de gènes entre les deux populations qui conservent pourtant leurs caractéristiques phénotypiques. Différents mécanismes biologiques ont été proposés pour expliquer cette situation. Le rôle de l'organisation sur les chromosomes des gènes déterminant les différences morphologiques entre la forme sauvage et la forme cultivée (caractères constituant le « syndrome de domestication ») est ici considéré. Un regard particulier est porté sur la structure de l'épillet, élément clé du syndrome de domestication. La construction d'une carte génétique comportant des marqueurs de type RFLP et AFLP (marqueurs dérivés de la PCR) a permis d'affecter aux groupes de liaisons 6 et 7 des QTL (quantitative trait locus) impliqués dans l'expression des différences cultivé/sauvage de l'épillet. D'autre part, il apparaît que les différences au niveau de l'architecture générale, du développement et de la floraison sont déterminées par une portion du génome relativement restreinte. Cela pourrait traduire le fait que des facteurs génétiques (effets pléiotropiques) ont été la cible de la sélection lors du processus de domestication. L'étude comparée de différents génomes de céréales (maïs, sorgho, riz, millet) pour ces régions permettra de tester leur homologie et de comparer en particulier leur organisation pour des espèces ayant des modes de reproduction différents (allogames et autogames).

Cette organisation génétique resserrée du syndrome permet d'envisager des stratégies d'introgression massive dans le pool cultivé de la variabilité adaptative des sauvages grâce à un maintien efficace du type cultivé au cours des rétrocroisements et une introgression des allèles sauvages sur une large partie du génome.

D33 : Polymorphisme des accessions de sorgho (*Sorghum bicolor*)

RAIES A.[1], ELFENDRI-JARRAYA N.[1,2], TRIGUI N.[3], CHIBANI F.[4], CHALBI N.[2], KALLEL H.[1]

(1) Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences de Tunis, 2092 El-Manar II Tunis, Tunisie. (2) Laboratoire de Génétique et de Biométrie, Faculté des Sciences de Tunis, Tunis (3) Laboratoire de Génétique, Faculté des Sciences de Sfax, B.P. W, 3080, Sfax, Tunisie. (4) Unité de Biotechnologie Végétale et de Ressource Génétique, INRST, B.P. 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie.

Dans le présent travail, nous avons essayé de mettre en évidence la variabilité morphologique des accessions de Sorgho (*Sorghum bicolor L.*) en Tunisie. Cette variabilité a pu être analysée dès les premiers stades du développement de la plante au moyen d'un test précoce. L'étude des caractères séparés a été effectué par l'analyse de la variance puis complétée par une comparaison des moyennes prises deux à deux ainsi que par le calcul de la plus petite différence significative (PPDS) entre les moyennes pour chaque caractère. L'étendue des différences significatives est ainsi représentée. Pour mieux estimer la ressemblance ou la dissemblance entre les accessions étudiées, nous avons adopté la méthode de calcul des indices de proximité basée sur les différents groupes obtenus par la méthode de DUNCAN. La représentation schématique des indices de proximité est traduite sous forme de dendrogramme. Au stade deux semaines, la diversité génétique entre les accessions est encore peu marquée. Celle-ci devient plus nette au stade un mois. En effet les accessions se regroupent d'une façon plus homogène selon leur utilisation ou en fonction de leur répartition géographique. Cette étude nous a montré que généralement, c'est le sorgho fourrage et plus particulièrement celui du Cap-Bon qui représente les moyennes les plus fortes. Alors que les moyennes les plus faibles sont rencontrées chez les accessions de sorgho grain.

Malgré les avantages que présente cette céréale pour l'alimentation animale et humaine ainsi que pour l'industrie, sa culture reste assez limitée dans notre pays. Cette évaluation préliminaire est certainement d'un grand apport pour la valorisation agricole de nos ressources génétiques du Sorgho.

D34 : Caractérisation moléculaire de cals embryogènes de deux cultivars de Palmier dattier, Deglet Nour et Takerboucht en vue de leur exploitation en création variétale

SAKA H.

Laboratoire de Physiologie végétale -CRP Mahdi Boualem -BP 37 -INRA, Algérie

La voie de l'embryogenèse somatique est utilisée afin d'obtenir du cal de deux cultivars de palmier dattier , Deglet Nour et Takerboucht et ce à partir de différents tissus de rejet. Notre objectif étant d'obtenir des protoplastes de palmier dattier à partir de cal embryogène, il était primordial dans un premier temps d'identifier des marqueurs permettant une discrimination des deux cultivars au stade cal embryogène . Une caractérisation moléculaire est réalisée par PCR/RAPD en utilisant 60 amorces décamères arbitraires. Cette technique a permis de sélectionner 12 amorces révélant un polymorphisme. Ces marqueurs RAPD, fragments polymorphes générés, de type présence ou absence permettront de distinguer les hétérofusions des autofusions lors de fusions somatiques des deux cultivars.

D35 :Déterminisme génétique de la régénération chez le tournesol

SARRAFI A.

I.N.P-E.N.S.A.T, Laboratoire de biotechnologie et amélioration des plantes. Unité associée à l'I.N.R.A. 145, Avenue de Muret 31076 Toulouse Cedex FRANCE. Tel et fax : +(0)5.62.13.65.64

La régénération des plantes par culture *in vitro* est généralement obtenue de façon spécifique, mettant en évidence une forte composante génétique. C'est le cas chez le tournesol où la production des plantes ou des embryons par l'organogenèse ou embryogenèse somatique est à ce jour limitée à un nombre restreint de génotypes. Par ailleurs, chez cette espèce, l'obtention des embryons somatiques et la connaissance du déterminisme génétique de la régénération a un intérêt considérable pour la réalisation des expérimentations en vue du déterminisme des mécanismes cellulaires et moléculaires de la régénération ou de la transformation par génie génétique. Nous avons donc commencé, depuis 1994, à mener des études sur les facteurs génétiques impliquées dans le processus en utilisant un matériel génétique varié, disponible à l'ENSAT ou crée pour les travaux de l'amélioration de cette espèce à l'INRA. Les expérimentations et les résultats les plus importants obtenus sont les suivants : l'étude des lignées alloplasmiques (deux lignées ayant le même noyau et des cytoplasmes différents) nous a permis de comparer quelques paramètres organogénétiques comme, par exemple, le taux de bourgeons formés par explant mis en culture à partir des cotylédons chez des génotypes différents, sur leur propre cytoplasme et celui d'espèces différentes. Nous avons pu ainsi déterminer l'effet favorable des facteurs génétiques et l'interaction nucléo-cytoplasmique de ce matériel en organogenèse. Nous remarquons un effet favorable ou défavorable de certains cytoplasmes concernant le nombre de bourgeons formés par explant. Soixante-dix lignées F7 provenant du croisement entre deux génotypes de tournesol ainsi que leurs parents on été étudiées pour leur aptitude à la régénération *in vitro* par organogenèse à partir de cotylédons. Les parents ont également été évalués pour leur aptitude à l'embryogenèse somatique à partir des couches épidermiques et par la culture des protoplastes d'hypocotyles. La régénération *in vitro* a permis de déterminer l'influence du facteur génétique sur organogenèse. Les résultats montrent que le génotype RHA-266 a généralement une aptitude plus importante aux paramètres de l'organogenèse que celle de la lignée PAC-2. La lignée F7 'LR-19' est la plus performante pour le pourcentage de cotylédons organogènes et le nombre de bourgeons par explant, elle possède des valeurs supérieures à celles du meilleur parent (RHA-266). Ce qui peut s'expliquer par l'accumulation d'allèles favorables à la régénération provenant des deux parents. L'embryogenèse somatique, à partir des couches épidermiques, semble être importante chez le génotype PAC-2. Pour ce qui concerne la culture de protoplastes, le génotype RHA-266 est plus performant que le génotype PAC-2. L'étude des paramètres de organogenèse de 18 hybrides F1 et de leurs 9 parents (6 mâles et 3 femelles) dans un plan factoriel démontre une variabilité très importante chez le matériel étudié. Les valeurs significatives de l'aptitude générale à la combinaison obtenues pour la plupart des parents mettent en évidence l'existence d'un contrôle génétique additif pour les paramètres de organogenèse chez le matériel étudié. L'aptitude spécifique à la combinaison pour les paramètres de organogenèse chez les hybrides F1 montre également des cas positifs et significatifs en raison de l'effet dominant des gènes contrôlant ces paramètres. Dans une autre expérimentation, par l'étude de 10 lignées de tournesol et de leurs 25 hybrides F1, nous avons montré l'importance de la variabilité génétique et des aptitudes générales et spécifiques à la combinaison des lignées et des F1 pour les paramètres de organogenèse étudiés. Les résultats de ces deux dernières expérimentations basées sur la variabilité génétique et l'aptitude générale à la combinaison montrent que quelques lignées sélectionnées peuvent transférer cette aptitude à leur descendance et améliorer ainsi la performance des lignées productives mais récalcitrantes à l'organogenèse.

D36 : Première mise en évidence du déterminisme sexuel chez le palmier dattier

SILJAK-YAKOVLEV S.[1], BENMALEK S.[2], CERBAH M.[1], COBA DE LA PENA T.[3], BOUNAGA N.[2], BROWN S.[3], SARR A.[1]

[1] Laboratoire d'Évolution et Systématique, URA CNRS 2154, Université Paris XI, Bât. 362. 91405 ORSAY Cedex, France

[2] Centre de Recherche Scientifique et Technologique sur les Régions Arides, Laboratoire de Botanique. BP 119, 16000 ALGER-Gare, Algérie

[3] Institut des Sciences Végétales, Cytométrie, CNRS UP 40, 91198 Gif-sur-Yvette, France

Le Palmier dattier joue un rôle écologique et économique majeur dans les agrosystèmes des zones arides. En raison de la dioécie et de la durée de la maturation sexuelle, l'amélioration génétique de cette espèce n'a pas suivi les formidables progrès enregistrés chez d'autres espèces. En particulier, les ressources génétiques disponibles sont peu ou pas exploitées, les variétés étant essentiellement des clones femelles identifiés pour leur potentiel de production et diffusées sur une grande échelle. Cette uniformité génétique engendre une grande vulnérabilité vis-à-vis des stress biotiques et abiotiques. Ainsi depuis quelques années une épidémie de fusariose (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*) dévaste les principales palmeraies du Maghreb. La sélection de variétés résistantes s'appuyant sur l'exploitation de la diversité génétique issue de croisements contrôlés s'impose, mais les contraintes biologiques rendent pour l'instant cette démarche rédhibitoire (5 à 10 ans pour distinguer les sexes des descendances et effectuer la sélection).

Le Palmier dattier fait partie des espèces dioïques chez lesquelles le déterminisme du sexe était encore mal connu. Vu l'initiation reproductive tardive (5 à 10 ans pour la première floraison) la détermination précoce du sexe peut avoir des retombées importantes dans la relance des schémas d'amélioration génétique.

Dans le cadre de nos recherches sur l'évolution des génomes, nous nous sommes donc intéressés au déterminisme sexuel chez le Palmier dattier, par une approche cytogénétique (fluorochrome banding des séquences riches en bases GC).

La méthodologie mise au point permet l'identification précoce du sexe (stade germination), ce qui ouvre de larges perspectives pour l'exploitation de la diversité génétique au travers de croisements contrôlés. En effet, les sélectionneurs pourront dès le stade jeune (et non plus après 10 ans) identifier des individus femelles ayant introgressé des gènes d'intérêt agronomique, comme des gènes de tolérance à des stress biotiques et abiotiques. En particulier, cette approche pourrait être appliquée à la création de variétés résistantes au bayoud, maladie dont la vaste diffusion est probablement associée à l'uniformité génétique des palmeraies.

D37 : Tests aux champs et identification isoenzymatique des plantations d'hybrides d'Eucalyptus (*E. urophylla*, *E. alba*) dans la forêt d'État de Pasirmayang, Jambi

UMBOH M.I.J., DURIADI D., NURJANAH N., YANI S., HUSEN A.
SouthEast Asian Regional Centre for Tropical Biology, JL Raya Tajur Km 6, Bogor, Indonésie : télécopie : +62 251 32 68 51

L'utilisation du bois d'Eucalyptus comme matière première pour l'industrie de la pâte à papier est en nette progression. Cependant, bien qu'originaires des régions de l'Est indonésien (les îles Sumba, Timor and Flores) et du Nord australien, certaines espèces d'Eucalyptus ne s'adaptent pas au climat de ces régions où se concentrent les industries de la pâte à papier indonésiennes. Ainsi, des essais de plantations d'hybrides d'Eucalyptus ont été effectués dans des zones forestières de l'est d'Indonésie (PT Barito Pacific Timber), notamment à Pasirmayang, Jambi. Ce travail a pour principaux objectifs l'étude de la croissance et l'identification des hybrides (*E. urophylla* et *E. alba*) et de leurs parents dans des plantations, ainsi que la recherche des meilleures combinaisons espèces/variétés d'Eucalyptus pour leur haut potentiel de production dans des plantations à Sumatra et à d'autres endroits industrialisés. Les explants utilisés proviennent de germinations âgées de 2 mois, obtenues à partir de pollinisation contrôlée de *E. urophylla* (X) et de *E. alba* (C), et de leurs parents respectifs. Des essais sur 972 plants issus de 4 hybrides (*E. urophylla* et *E. alba*) et de leur plante mère ont été effectués dans 3 blocs. Les plants ont été plantés à une distance de 3 x 6 m. Parés 12 semaines de plantation, on constate une influence significative du facteur génotype/clone sur la croissance élevée de 3 clones hybrides et de leur plante mère. L'identification de ces clones peut être complétée par une étude morphologique effectuée sur des feuilles et des tiges des arbres âgés d'un an. De plus, l'identification de génotypes à travers l'analyse des estérases et des péroxydases a montré une variation parmi les clones hybrides et parentaux, notamment le clone hybride Ua_5 présentant des caractères génétiques spécifiques et le clone Ea_1 montrant des caractères génétiques du clone hybride Ua_1.

SECTION E

Autres aspects récents des recherches en biotechnologies

Communications orales E1 à E6

E1 : Amélioration de la teneur en acides aminés essentiels par manipulation génétique de leur biosynthèse

FRANKARD V., VAUTERIN M., JACOBS M.
Laboratoire de Génétique des Plantes, Vrije Universiteit Brussel, Paardenstraat 65, B-1640 Sint-Genesius Rode, Belgique. ☎ 32.2.359 0302, fax 32.2.359 0399, 💻 vfrankar@vub.ac.be.

INTRODUCTION

En considérant la valeur nutritive des plantes, les acides aminés essentiels lysine et thréonine sont sous-représentés chez les céréales (contenu total en lysine de 1,5 à 4,5 %, alors que l'OMS recommande 5,5 % ; contenu total en thréonine de 2,7 à 3,9 %, alors que l'OMS recommande 4,0 %), alors que la méthionine et la cystéine sont déficientes chez les légumineuses (contenu total en méthionine et cystéine de 1 à 2 %, alors que l'OMS recommande 3,5 %). Les rations alimentaires destinées aux animaux monogastriques sont donc complémentées pour combler ces déficiences. Une des voies de l'amélioration de la valeur nutritive des plantes cultivées consiste à manipuler génétiquement la biosynthèse de ces acides aminés en vue d'augmenter leurs teneurs respectives.

RÉGULATION BIOCHIMIQUE DE LA BIOSYNTHÈSE DE LYSINE ET DE THRÉONINE

Chez les plantes supérieures, la biosynthèse de l'aspartate, duquel sont dérivés la lysine, la thréonine, l'isoleucine et la méthionine, est régulée par plusieurs boucles de rétro-inhibition (Bryan, 1990). L'activité de l'aspartate kinase (AK), première enzyme de cette voie et nécessaire à la synthèse de tous ces acides aminés, est rétro-inhibée par la lysine et la thréonine. La présence de plusieurs isozymes sensibles à des effecteurs différents a pu être mise en évidence. En outre la lysine rétro-inhibe sévèrement (Ki entre 5 et 20 µM) l'activité de la dihydrodipicolinate synthase (DHDPS), première enzyme propre à sa branche biosynthèse.

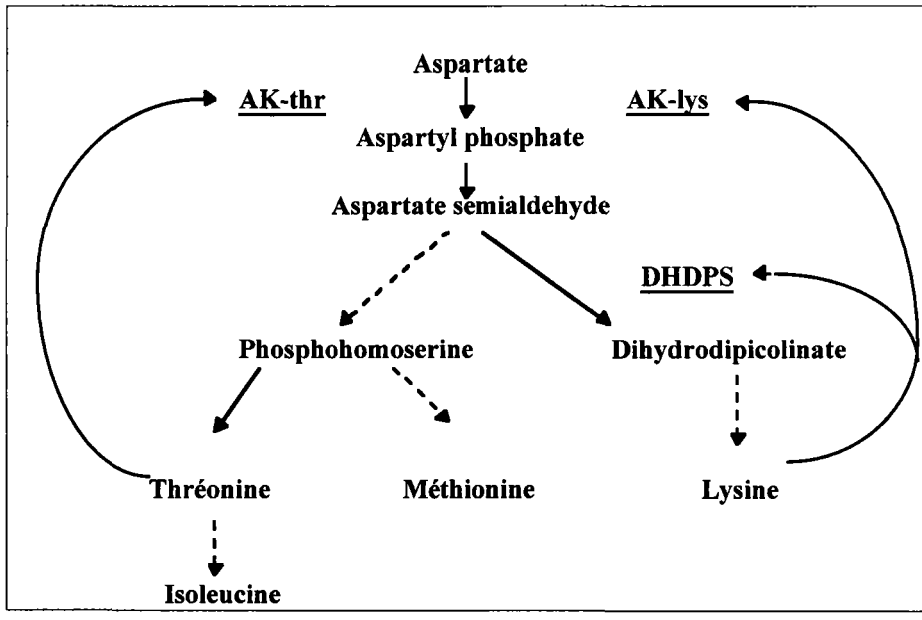
MUTANTS SURPRODUCTEURS D'ACIDES AMINÉS LIBRES

Chez différentes espèces, un certain nombre de mutants accumulant de la lysine ou de la thréonine dans la fraction libre des acides aminés ont pu être isolés après une sélection basée sur la présence d'analogues d'acides aminés ou de combinaisons toxiques d'acides aminés dans le milieu de culture. Alors que l'accumulation de thréonine libre est détectée dans tous les tissus analysés, et en particulier dans les graines, l'augmentation du contenu en lysine libre ne se présente que dans les feuilles et les cals. De plus, un phénotype aberrant caractérisé par une réduction extrême de la surface foliaire, une absence d'élongation et une stérilité complète, est corrélé à la présence d'importantes quantités de lysine libre (25 % et au-delà) (Frankard *et al.* 1992). Chez le tabac, un catabolisme rapide semble être à l'origine de l'absence de lysine libre dans les graines. L'accumulation de ces deux acides aminés au niveau

foliaire est en outre dépendante du stade de développement de la plante, avec un maximum lors de l'élongation de la tige.

La caractérisation biochimique de ces mutants a mis en évidence une dérégulation au niveau de deux enzymes-clés normalement rétro-inhibées par ces acides aminés : la DHDPS chez le mutant surproducteur de lysine, et l'AK lysine-sensible chez le mutant surproducteur de thréonine. Le clonage et la caractérisation des gènes codant pour ces enzymes ont permis de mieux comprendre la biosynthèse de ces acides aminés et sa régulation.

Figure 1. Diagramme simplifié de la famille biosynthétique de l'aspartate. Les enzymes et produits principaux sont présentés.



CLONAGE ET CARACTÉRISATION DU GÈNE CODANT POUR DHDPS

Chez le mutant surproducteur de lysine (RAEC-1 chez *Nicotiana sylvestris*), le gène codant pour la DHDPS complètement désensibilisée au rétrocontrôle strict normalement exercé par lysine, a pu être isolé par hybridation hétérologue. La mutation a pu être identifiée : il s'agit d'une substitution de deux nucléotides changeant une asparagine en isoleucine dans une région très conservée de la protéine (Ghislain *et al.* 1995). Des construits chimères impliquant ce gène sous le contrôle d'un promoteur fort d'une part, et d'un promoteur spécifique aux graines d'autre part, ont été transférées via *Agrobacterium* respectivement dans le tabac et le colza. Les tabacs transgéniques exprimant le gène *dhdps-r1* de façon constitutive reproduisent le phénotype aberrant décrit chez le mutant surproducteur, et associé à une forte surproduction de lysine. Le colza transgénique ne présente aucune différence avec le type sauvage, en particulier au niveau de la production de graines. L'analyse du contenu en acides aminés chez ces graines permettra d'évaluer l'impact de l'accumulation de lysine libre sur le contenu total. Un certain nombre de plantes parmi lesquelles *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana* sp., *Hordeum vulgare* et le soja, ont pu être transformées par le gène *dap*A de *E. coli*, naturellement beaucoup moins sensible au

rétrocontrôle exercé par la lysine. Une certaine variation dans l'accumulation de lysine, en particulier dans les graines, a pu être montrée, essentiellement liée au catabolisme plus ou moins actif de cet acide aminé.

D'autre part, le promoteur de *dhdps* chez *Arabidopsis thaliana* a été isolé (Vauterin et al, 1994) et fusionné avec le gène rapporteur GUS, et transféré dans le tabac et dans *A. thaliana*. La détection colorimétrique de cette activité enzymatique chez ces plantes transgéniques a permis d'identifier les tissus exprimant ce gène, en particulier:

- les tissus conducteurs, impliquant un transport de la lysine dans la plante ;
- les méristèmes apicaux (foliaires et racinaires), suggérant la nécessité de produire de la lysine pour la synthèse protéique au sein de tissus à développement rapide ;
- certains tissus floraux, tels que les grains de pollen, les graines immatures, et l'embryon (mais pas l'albumen) des graines matures.

Outre cette régulation liée au développement de la plante, une régulation environnementale liée au régime de lumière a pu être mise en évidence. Ceci peut être corrélé au fait que la voie de biosynthèse dérivée de l'aspartate est presque dans sa totalité localisée dans le chloroplaste. Ainsi, des plantules de *Nicotiana* germées à l'obscurité présentent une coloration GUS plus intense dans les cotylédons et nouvelle dans l'hypocotyle, par rapport à celles germées à la lumière. D'autre part, une illumination de 6 heures après une germination à l'obscurité suffit pour rétablir la coloration du contrôle. L'absence de photosynthèse à l'obscurité entraîne une diminution de sucrose et donc d'oxaloacétate disponible pour la biosynthèse d'aspartate dans les tissus photosynthétiques. L'expression du gène dans le phloème suggère un transport de la lysine qui y serait biosynthétisée, pour tenter de maintenir la synthèse protéique dans ces tissus.

L'expression fonctionnelle du gène *dhdps* sauvage d'*A. thaliana* dans une souche d'*E. coli* déficiente pour cette activité enzymatique a permis de réaliser des expériences de mutagenèse *in vitro*. Un certain nombre de mutations ponctuelles a pu être identifié, rendant la protéine insensible au rétrocontrôle par la lysine, mais réparti sur l'ensemble de la séquence codant pour la protéine mature. En effet, même si une proportion relative des mutations se trouve dans une partie très conservée de la protéine, des substitutions significatives se localisent aussi bien en amont qu'en aval de cette région.

CLONAGE ET CARACTÉRISATION DES GÈNES CODANT POUR AK

En ce qui concerne la deuxième enzyme clé, AK, plusieurs formes ont pu être identifiées sur base de l'effecteur rétro-inhibant leur activité enzymatique. Le gène codant pour une forme sensible au rétrocontrôle par la thréonine (*ak-hsdh*) a pu être isolé par hybridation hétérologue chez *A. thaliana* : la séquence correspondante d'acides aminés révèle la présence d'une seconde région correspondant à l'activité enzymatique homoserine deshydrogénase (HSDH), soit la troisième réaction du tronc commun. Il s'agit donc d'une protéine bifonctionnelle AK-HSDH présentant une activité AK côté NH_2 et une activité HSDH côté COOH (Ghislain *et al.* 1994). Cependant, la majeure partie de l'activité AK est sensible au rétrocontrôle par la lysine. Afin d'isoler le gène codant pour cette protéine, une approche RCP a été développée. Des amorces dégénérées correspondant à des régions conservées entre AK bactériennes sensibles à la lysine, ont été synthétisées. De la sorte, deux gènes (*ak-lys1* et *ak-lys2*)codant pour des AK monofonctionnelles ont pu être identifiés et caractérisés pour la première fois chez une plante supérieure, en l'occurence

A. thaliana (Frankard *et al.* 1997, et Tang et al, 1997). Ces deux gènes présentent environ 70 % d'identité au niveau des acides aminés déduits. Comme pour le gène *ak-hsdh*, un grand nombre de petits introns interrompent les deux séquences codantes : leur position est conservée entre celles-ci, mais pas leur taille ni leur séquence. La présence d'un transit peptide du côté NH_2 des deux protéines AK-Lys implique un ciblage chloroplastique pour toutes deux. La présence de deux protéines ayant la même fonction ne peut donc pas se justifier par leur localisation subcellulaire différente.

Afin de distinguer les rôles de ces deux AK-Lys, leurs promoteurs ont été fusionnés au gène rapporteur GUS. Le tabac et *A. thaliana* ont été transformés par ces deux construits, et l'essai colorimétrique a été pratiqué sur différents tissus des deux plantes. De façon générale, une certaine complémentarité dans l'expression des deux gènes a pu être déterminée, bien que l'expression de ceux-ci chez les deux plantes ne soit pas identique. Chez *A. thaliana, ak-lys2* est fortement exprimée dans l'ensemble de la plante (une à deux heures en présence du substrat, X-Gluc), depuis les feuilles cotylédonaires jusqu'aux organes floraux et aux racines. Dans l'ensemble l'expression reste malgré tout plus forte dans les tissus jeunes et dans les méristèmes, ce qui a déjà été rapporté pour l'expression de *dhdps*. Au niveau des organes floraux, l'expression reste limitée au niveau de l'enveloppe des anthères ainsi que du tapetum, et de la base du fruit. Cependant, les grains de pollen, les graines immatures et matures ne sont pas colorées, et la tige comme les racines, est colorée selon un gradient augmentant de la base à la pointe. L'expression de *ak-lys1* est beaucoup plus faible, et se retrouve essentiellement dans la tige selon un gradient inverse que *ak-lys2*, ainsi que dans les méristèmes racinaires et foliaires. Les grains de pollen sont colorés, de même que les graines immatures et matures. Chez *N. tabacum*, l'expression des deux gènes se retrouve principalement selon le même schéma dans les organes floraux, alors que le reste des tissus ne se colore pas. Au niveau de la fleur, *ak-lys1* s'exprime également fortement dans le stigmate et le tissu vasculaire central de l'ovaire, et plus faiblement dans la partie extrême de la corolle et dans le carpelle. En conclusion, le gène *ak-lys2* s'exprime globalement plus dans tous les tissus végétatifs, alors que *ak-lys1* semble plus impliqué dans la floraison proprement dite.

L'isolement et la caractérisation d'un certain nombre de mutants d'*A. thaliana* présentant une des isozymes d'AK moins sensible au rétrocontrôle exercé soit par la thréonine (mutant RL4, isozyme AK-HSDH), soit par la lysine (mutants RLT4 et RLT 40, une des AK-Lys), a permis d'établir l'accumulation généralisée (plus ou moins importante) de thréonine chez ceux-ci (Heremans and Jacobs, 1994 and 1995). La surproduction de thréonine se retrouve aussi dans les graines, sans conséquences apparentes pour la germination. L'identification de ces mutations au niveau nucléotidique est actuellement en cours, avec une priorité donnée à la séquence d'*ak-lys2*. Une fois cette mutation incorporée au cDNA correspondant, ce gène muté pourra être utilisé dans des construits chimères, en vue de moduler son expression, et donc l'accumulation de thréonine à des tissus spécifiques. Ces plantes transgéniques pourront être croisées avec celles exprimant le gène *dhdps* muté, ou alternativement retransformées avec ce gène via *Agrobacterium*. Ainsi une certaine flexibilité dans le niveau d'accumulation, le tissus cible et l'acide aminé choisi peuvent être envisagés. L'expression simultanée d'une protéine riche en lysine (et/ou thréonine) sera également envisagée, en vue de stabiliser et de rendre plus digestible l'acide aminé produit dans le tissu cible.

Une seconde application consiste en l'utilisation de ces gènes mutés en tant que marqueurs de sélection. En effet, en choisissant un promoteur à expression précoce, la

protéine mutée produite, DHDPS ou AK-Lys, permet de résister à la présence respectivement d'un analogue de la lysine (L-amino-ethyl-cystéine, ou AEC), ou de concentrations toxiques de lysine plus thréonine dans le milieu de culture. Une fois la sélection effectuée, le gène ne doit plus s'exprimer, et n'aura pas d'autres conséquences sur le développement de la plante transgénique. Il s'agit d'autre part de gènes plus adéquats que les gènes de résistance aux antibiotiques, dans la mesure où cette voie de biosynthèse n'existe pas chez l'homme et les animaux monogastriques, et qu'ils ne pourraient donc pas interférer en cas de transfert horizontal.

En conclusion, la disponibilité des gènes codant pour les enzymes DHDPS, AK-HSDH et AK-Lys insensibles au rétrocontrôle, permet la manipulation génétique de ces voies de biosynthèse en vue d'augmenter la teneur en acides aminés essentiels libres chez les plantes cultivées.

Remerciements

VF est titulaire d'une bourse post-doctorale du FWO-Vlaanderen (Fonds voor Wetenschappelijke Onderzoek).

Bibliographie

1. BRYAN J.K. (1990) Advances in the biochemistry of amino acids. In *The Biochemistry of Plants: Intermediary Nitrogen Metabolism*, Volume 16 (Miflin, B.J., and Lea P.J., eds.). New York : Academic Press, pp.161-195.
2. FRANKARD V., GHISLAIN M., JACOBS M. (1992). Two feedback insensitive enzymes of the aspartate pathway in *Nicotiana sylvestris*. Plant Physiol 99, 1285-93.
3. FRANKARD V., VAUTERIN M., JACOBS M. (1997) Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for a monofunctional aspartate kinase. Plant Molec Biology, 34: 233-242.
4. GHISLAIN M., FRANKARD V., VANDENBOSCHE D., MATTHEWS B.F., JACOBS M. (1994) Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana*. Plant Molec Biol 24, 835-851.
5. GHISLAIN M., FRANKARD V., JACOBS M. (1995) A dinucleotide mutation in dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* leads to lysine overproduction. Plant J 8(5): 101-111.
6. HEREMANS B., JACOBS M. (1994) Selection of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh mutants resistant to aspartate-derived amino acids and analogues. Plant Sci 101, 151-162.
7. HEREMANS B., JACOBS M. (1995) Threonine accumulation in a mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. with an altered aspartate kinase. J Plant Physiol 146, 249-257.
8. TANG G., ZHU-SHIMONI J., AMIR R., BEN-TZVI ZCHORI I., GALILI G. (1997) Cloning and expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a monofunctional aspartate kinase homologous to the lysine-sensitive enzyme of *Escherichia coli*. Plant Molec Biol. 34: 287-294.
9. VAUTERIN M., JACOBS M. (1994) Isolation of a poplar and an *Arabidopsis thaliana* dihydrodipicolinate synthase cDNA clone. Plant Molec Biol 25:545-550.

E2 : Étude d'éléments de voies des MAP kinases impliquées dans l'embryogenèse précoce du colza

HAMAL A., LEPRINCE A.-S., JOUANNIC S., KREIS M., HENRY Y.
Laboratoire de Biologie du Développement des Plantes, IBP, ERS 569, UPS, 91405 Orsay

La mise en évidence et l'étude moléculaire de gènes contrôlant la morphogenèse constituent l'un des points centraux de la Biologie du Développement des Plantes. Chez les végétaux, des événements de morphogenèse se produisent tout au long de la vie de la plante, durant *le développement embryonnaire* avec la mise en place des premiers méristèmes, durant *le développement de la plante* pendant lequel les méristèmes vont fonctionner et lors du *développement du gamétophyte*.

Il est désormais clairement établi que la plupart des cellules végétales conservent une remarquable totipotence. Ainsi, que ce soit *in situ* en dehors de la reproduction sexuée, ou en culture *in vitro,* des cellules du sporophyte ou des cellules gamétophytiques peuvent être à l'origine d'une embryogenèse. Le développement embryonnaire à partir de microspores cultivées *in vitro* est dénommé *androgenèse*.

Chez les Eucaryotes, un grand nombre de gènes contrôlant le développement codent pour des facteurs de transcription ou des molécules jouant un rôle dans des cascades de signalisation. Les protéines kinases sont des éléments essentiels des diverses voies de communication impliquées notamment dans le développement. Les données actuelles indiquent que les éléments des cascades de signalisation ont été conservés en bloc durant l'évolution, en tant que « modules de signalisation ». De tels modules, constitués par les Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) permettent aux organismes de répondre à différents stimuli (hormone, stress...), en établissant un lien entre des récepteurs membranaires et des facteurs nucléaires de régulation de la transcription ou des effecteurs cytoplasmiques.

MATÉRIEL VÉGÉTAL

Le colza (*Brassica napus*) est un excellent modèle pour l'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant les événements associés au déclenchement et aux premières étapes de l'embryogenèse. En effet, chez cette espèce l'enclenchement du développement embryonnaire à partir de microspores est contrôlé par la simple action d'un stress thermique. Ainsi, alors que le passage à 17°C conduit à la production de pollen mûr trinucléé, un traitement des microspores à 32°C durant 10 à 48 heures stoppe le développement gamétophytique et permet la réactivation des mitoses, avec la poursuite de cycles mitotiques dans les noyaux des microspores en phase G2 du cycle cellulaire et la réentrée dans le cycle cellulaire des noyaux végétatifs en phase G1 des grains de pollen. Ces mitoses sont suivies de différenciations cellulaires, d'une organogenèse et conduisent à la formation d'embryons. L'utilisation du colza est également justifiée à la fois par le rendement de la culture susceptible de produire dans de bonnes conditions de 20 à 30 embryons pour 100 microspores cultivées, et par la proximité des génomes d'*Arabidopsis* et de colza.

PROBLÉMATIQUE

Chez la Levure, les Mammifères, la Drosophile, *C. elegans*, le Xénope, différentes voies des MAP kinases ont été identifiées. Les éléments des voies des MAP kinases ont été très bien conservés durant l'évolution des Eucaryotes, en tant que modules de signalisation. Ces modules assurent la transduction de signaux, au travers d'une cascade de phosphorylations. Chaque MAP kinase est activée par phosphorylation par une kinase à double spécificité appelée MAP kinase kinase (MAP2K), qui est elle-même activée par une MAP3K, qui interagit soit avec une protéine G monomérique soit avec une MAP4K, elle-même activée par une protéine G hétérotrimérique ou monomérique. Ces cascades de phosphorylation se produisent en réponse à des stimulis variés résultant de la fécondation, de divers stress et d'autres signaux impliqués dans de nombreux processus jouant un rôle dans le développement (réponse aux agents mitogènes : facteurs de croissance, cytokinines). Les modules de signalisation ainsi activés participent à la survie cellulaire, la croissance et la différenciation.

Les données disponibles actuellement dans le règne végétal, montrent que des cascades de MAP kinases sont impliquées dans la réponse à l'éthylène, à l'auxine, à l'acide abscissique. De tels modules pourraient également participer à la réponse aux stress, à l'activation du cycle cellulaire et probablement à la différenciation et à l'embryogenèse. Il est donc envisageable, chez les végétaux, d'aborder l'étude du module des MAP kinases d'une part lors de la réponse au stress, d'autre part durant les premières divisions de la microspore, et enfin durant l'embryogenèse précoce. Notre expérimentation vise à tester l'hypothèse selon laquelle une ou des voies des MAP kinases sont impliquées dans ces mécanismes.

STRATÉGIE

Afin d'identifier des voies de signalisation faisant intervenir des voies des MAP kinases, nous nous sommes attachés, dans une première étape, à en rechercher les éléments clés. Chez les Eucaryotes, les éléments des cascade des MAP kinases sont codés par des membres de familles multigéniques. L'approche utilisée a consisté à identifier et caractériser chez *Arabidopsis* et le colza des ADNc ou des gènes codant pour des éléments de voies des MAP kinases, afin d'étudier les modulations de leur expression au cours du développement végétatif et floral de la plante, ainsi que durant les différentes étapes de l'embryogenèse. Nous avons utilisé deux stratégies complémentaires pour identifier ces ADNc :

- la première repose sur l'utilisation des ADNc étiquetés ou EST (Expressed Sequence Tags) disponibles chez *Arabidopsis* ou le riz notamment ;

- la seconde est basée sur l'utilisation comme sondes d'amplifiats PCR obtenus à l'aide d'oligonucléotides dégénérés reconnaissant des motifs hautement conservés des sous-domaines VI et VIII de ce type de protéines sérine/thréonine kinases d'autres eucaryotes.

Nous disposons au laboratoire, de plusieurs banques d'ADNc susceptibles de présenter un intéret pour notre thématique. Il s'agit de deux banques d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana*, l'une de jeunes plantes et l'autre de pollen, et une banque d'ADNc de colza, réalisée à partir d'embryons androgénétiques aux stades globulaire et cordiforme.

RÉSULTATS

Le travail de criblage et d'analyse des EST nous a permis de caractériser un grand nombre d'ADNc différents, codant de potentielles MAP2K, MAP3K et MAP4K.

Les amplifiats PCR nous ont permis d'obtenir un ADNc complet de colza, bn*MAP3Kε*, de 4500 paires de bases, codant pour un homologue potentiel du gène *CDC7* de *S. pombe,* impliqué dans la cytokinèse, ainsi que trois ADNc *MAP3Kα,* un *d'Arabidopsis* et deux (orthologues) de colza. Une première donnée d'hybridation *in situ* indique que le gène MAP3Kε est exprimé au stade cœur durant l'embryogenèse zygotique d'*Arabidopsis.*

La seconde stratégie de clonage a tiré bénéfice des très nombreuses EST disponibles, qui nous ont permis d'isoler une quinzaine d'ADNc :

- l'ADNc at*MAP2K* d'*Arabidopsis* est la première MAP kinase kinase identifiée chez cette espèce (Jouannic *et al.* 1996) et la seconde décrite chez les végétaux ;

- un deuxième groupe d'ADNc, nommés MAP3Kβ, γ, δ, et ε code pour des homologues de MAP kinase kinase kinases des sous-familles MEKK, Raf et CDC7, suggérant ainsi l'existence de différentes voies des MAP kinases chez les plantes. Il s'agit de 3 ADNc at*MAP3Kβ* d'*Arabidopsis* et d'1 de colza, 1 ADNc at*MAP3Kγ* d'*Arabidopsis* et de 4 ADNc at*MAP3KΔ* d'*Arabidopsis* très proches de CTR1.

- un troisième groupe d'ADNc, nommés MAP4Kα, code pour de potentielles MAP kinase kinase kinase kinases, les premières identifiées chez des végétaux. Ces ADNc *MAP4Kα* présentent des homologies avec la kinase humaine SOK1, membre de la sous-famille des MAP4K, activée par un stress oxydatif.

Il est important de noter que parmi ces ADNc, plusieurs ont été isolés à partir de la banque d'ADNc d'embryons de colza, indiquant ainsi que les gènes correspondant sont exprimés au cours de l'embryogenèse précoce (stades globulaire et cœur). Par contre, les ADNc atMAP2Kα et at MAP3Kγ n'ont pu être isolés à partir de cette banque. Les données des hybridations entre ADNc et ADN génomique de colza et d'*Arabidopsis,* indiquent que la plupart des ADNc identifiés correspondent à de petites sous-familles multigéniques (*MAP4Kα, MAP3KΔ*, etc..). Certains gènes seraient présents seulement en une ou deux copies dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (*atMAP2Ka, atMAP3Kε).*

L'isolement de nombreux ADNc va permettre une étude phylogénétique regroupant les MAP2K, MAP3K et MAP4K végétales avec l'ensemble de celles précédemment caractérisées. Nous pensons en particulier que ces données devraient permettre une étude fine de la proximité entre MAP3K et MAP4K. Par ailleurs, le fait que nous disposions des séquences de différents ADNc issus de la même sous-famille multigénique MAP3Kd chez des espèces aussi diverses qu'*Arabidopsis*, le ricin, le maïs et le riz, va nous permettre une description de l'histoire de cette sous-famille.

Les différentes EST d' *A. thaliana* déjà caractérisées ont fait l'objet d'une cartographie physique par une approche PCR sur une banque de YAC, dans un travail en collaboration avec le Laboratoire de Phytopathologie Moléculaire de l'IBP. Les analyses des séquences, des phylogénies et de la cartographie nous apportent de nombreux renseignements relatifs à l'histoire de ces gènes et à leur dynamique dans le génome d'*Arabidopsis.*

TRAVAUX ACTUELS

À la suite de ces premiers résultats, les expérimentations actuelles et celles à venir vont nous amener à développer plusieurs types d'analyses :

- la caractérisation des gènes par criblage de banques génomiques. Nous disposons par exemple d'un fragment contenant l'intégralité du gène *atMAP3Kε*, dont le séquençage est en cours.
- l'étude de l'expression des gènes est réalisée par les approches classiques de type Northern-blot et RT-PCR. Une première étude porte sur l'analyse de l'expression selon les organes (végétatifs et floraux) en fonction du développement de la plante, ainsi qu'à divers stades du développement embryonnaire. Les premiers résultats indiquent que des gènes étudiés sont exprimés durant l'embryogenèse ou dans les cellules en division. Une seconde étude, basée sur des suspensions cellulaires d'*A. thaliana* synchronisées, porte sur l'analyse de l'expression au cours du cycle cellulaire. Enfin, une troisième étude concerne l'expression de ces gènes à la suite de différents stress appliqués soit sur des plantes entières d'*Arabidopsis* aux stades rosette et floral, soit sur des microspores.
- l'étude de certains promoteurs, fusionnés avec le gène rapporteur *GUS*, sera réalisée.

PERSPECTIVES

À l'heure actuelle, nous disposons au laboratoire de nombreux ADNc codant des éléments potentiels de la voie des MAP kinases, dont certains paraissent être impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Les travaux ultérieurs vont tirer bénéfice de nombreuses collaborations, internes à l'IBP avec les équipes de C. Bergounioux (cycle cellulaire) et B. Lejeune (phylogénie), internes à l'Université Paris-Sud dans le cadre de l'IFR Signalisation avec le Laboratoire de M. Jacquet (mutants de levure), avec l'équipe suisse de V. Simanis (mutants de levure). Par ailleurs, le soutien CEE dans le cadre du programme SIME (BIOTEC-RTD) a permis d'initier des collaborations avec les laboratoires de K. Palme (interactions protéines G-MAP4K ou MAP3K), d'E. Heberle-Bors (interactions MAP2K - MAPK), de M.C. Risueno (cytologie, immunolocalisation et hybridation *in situ)*, et probablement de M. van Lockeren-Campagne (interactions kinases - phosphatases).

Nous cherchons à élucider la fonction des protéines correspondant aux ADNc identifiés et caractérisés. L'étude fonctionnelle des gènes retenus sera abordée selon deux approches : des tests de complémentation de mutants de levure qui nous apporteront des indications sur la fonction biochimique et la nature des partenaires potentiels des protéines, et des analyses de plantes transgéniques portant des constructions antisens. Nous avons donc la double ambition de confirmer la fonction biochimique de ces kinases et d'identifier la fonction biologique des cascades de MAP kinases.

Bibliographie

1. KREIS M., DECROOCQ-FERRANT V., TREGEAR J., JOUANNIC S. 1995. Protein kinase genes expression during late flower bud development of higher plants. *J of Exper Bot* 46: 18.
2. TREGEAR J., JOUANNIC S., SCHWEBEL-DUGUÉ N., KREIS M , 1996. An unusual protein kinase displaying characteristics of both the serine/threonine and tyrosine families is encoded by the *Arabidopsis thalina* gene *ATN1*. *Plant Science* 117: 107-119.
3. TREGEAR J., DECROOCQ-FERRANT V., JOUANNIC S., KREIS M. 1996. Protein kinase genes expressed during reproductive plant development. In : "Embryogenesis, The generation of a plant", eds TL Wang and AC Cuming, bIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, 77-88.
4. JOUANNIC S., HAMAL A., KREIS M., HENRY Y. 1996. Molecular cloning of an *Arabidopsis thaliana* MAP kinase kinase-related cDNA (accession n° Y07694). *Plant Physiol* (PGR96-098) 112: 1397.
5. JOUANNIC S., HAMAL A., KREIS M., HENRY Y. 1996. Studies of MAP4K, MAP3K and MAP2K genes during microspore embryogenesis of *Brassica napus*, Plant Embryogenesis Workshop, September 12-14, 1996, University of Hamburg, Germany.
6. JOUANNIC S., HAMAL A., TREGEAR J., KREIS M., HENRY Y. 1996. MAP kinase signaling pathways during *Brassica napus* microspore embryogenesis. Plant Tissue Culture Symposium, Séminaire Franco-Chinois sur les Biotechnologies, 7-9 Octobre 1996, Montpellier.
7. JOUANNIC S., HAMAL A., LEPRINCE A.-S., KREIS M., HENRY Y. 1997. New plant MAP kinase signaling pathways elements. Développement et évolution, Coll. Sté Franç Biol du Dév., 29-31 Mai 1997, Dourdan, France.
8. TREGEAR J., HAMAL S., JOUANNIC S., LECHARNY A., HENRY Y., KREIS M. Characterization of MAP3Kα, a novel MEK kinase gene from *Arabidopsis thaliana* and identification of three distinct plant MEK kinase subgroups. (en préparation).
9. JOUANNIC S., HAMAL A., LEPRINCE A.-S., TREGEAR J., KREIS M., HENRY Y. New plant MAP kinase signaling pathways elements. (en préparation).

E3 : Introgression du retard à la morphogenèse des glandes à gossypol de la graine de *Gossypium sturtianum* Willis chez la principale espèce de cotonnier cultivé (G. *hirsutum* L.).

MERGEAI G.[1], BAUDOIN J.-P.[1], DU JARDIN P.[2], VROH BI I.[1,2].

[1] Unité de Phytotechnie des Régions intertropicales, [2] Unité de Biologie végétale, Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, B-5030 Gembloux, tél. : +32-81-622144, fax : +32-81-614544, courrier électronique : mergeai.g@fsagx.ac.be

INTRODUCTION

Chez toutes les espèces de cotonnier, les glandes à gossypol ou glandes à pigments sont des petites cavités où s'accumulent des déchets du métabolisme de la plante. On y trouve essentiellement du gossypol et différents autres terpénoïdes. Ces glandes sont toxiques pour les insectes et constituent un moyen de défense naturel du cotonnier contre ses ravageurs (Altman *et al.*, 1990). Le contenu de ces glandes est également très toxique pour tous les animaux monogastriques, y compris pour l'homme. La présence de gossypol dans la graine limite l'exploitation du haut potentiel alimentaire du cotonnier. Les amandes des graines de cotonnier contiennent en moyenne 20 % d'huile comestible et plus de 40 % de protéines dont la qualité nutritive est équivalente à celle des protéines du soja. L'huile et les tourteaux, produits par pression des amandes, contiennent des quantités importantes de gossypol dont l'élimination exige la mise en œuvre de procédés industriels qui altèrent la qualité des protéines et augmentent les coûts de production.

Dans la nature, seuls certains cotonniers diploïdes sauvages australiens présentent des glandes à gossypol partout sauf dans leurs graines (Fryxell, 1965; Brubacker *et al.*, 1996). Chez ces cotonniers, l'apparition des glandes à gossypol se produit après la germination. L'introgression de ce retard à la morphogenèse des glandes à gossypol de la graine chez le cotonnier cultivé permettrait de le transformer en une véritable plante vivrière tout en préservant un de ses moyens de défense naturels contre les insectes. Cette introgression constitue l'objectif majeur de nos recherches.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Deux hybrides trispécifiques incluant *Gossypium sturtianum* Willis (2n = 2x = 26, génome C_1) et *G. hirsutum* L. (2n = 4x = 52, génome $(AD)_1$) ont été créés en utilisant respectivement *G. thurberi* Torado (2n = 2x = 26, génome D_1) et *G. raimondii* Ulbrich (2n = 2x = 26, génome D_5) comme espèces pont (Mergeai *et al.*, 1995). Ces deux hybrides trispécifiques sont identifiés par les initiales TSH (*G.thurberi* x *G.sturtianum* x *G. hirsutum*) et HRS (*G.hirsutum* x *G.raimondii* x *G. sturtianum*). Environ deux cents rétrocroisements ont été réalisés pour chaque hybride trispécifique au moyen de deux variétés de *G. hirsutum* originaires du Congo-Kinshasa (C2, NC8). Les 100 premiers croisements ont été effectués sans application de régulateurs de croissance et les 100 croisements suivants ont été réalisés en utilisant le mélange

d'hormones proposé par Altman (1988) : 100 mg/l d'acide Naphtoxyacétique + 50 mg/l d'acide gibberellique. La majorité des embryons hybrides ont été cultivés sur le milieu de Stewart et Hsu (1977) de manière à garantir leur bonne germination et un bon démarrage des plantules. La densité de glandes à gossypol sur les graines produites par rétrocroisement a été évaluée en utilisant une échelle variant de 0 pour les graines totalement dépourvues de glande à 10 pour les graines dont la densité de glandes était semblable à celle de l'espèce cultivée. L'évaluation de la densité en glandes à gossypol a été réalisée après élimination des téguments et trempage de l'amande pendant une heure dans de l'eau stérile. Les analyses méiotiques des matériels produits ont été réalisées sur des boutons floraux fixés pendant 72 heures dans la solution de Carnoy (éthanol 95 % :chloroforme : acide acétique glacial, 6:3:1 v:v:v). Au moins 26 cellules mère du pollen ont été analysées pour chaque génotype.

Parallèlement aux travaux d'hybridation interspécifique, une technique de sélection du cotonnier assistée par marqueurs moléculaires de l'ADN nucléaire (RAPD) a été développée afin de faciliter la restauration de l'équilibre génétique des matériels introgressés. Ces travaux ont porté sur l'amélioration de la technique CTAB d'extraction de l'ADN du cotonnier (Vroh Bi *et al.*, 1996), sur l'optimisation des réactions RAPD (Vroh bi *et al.*, 1997) et sur l'identification de marqueurs spécifiques des parents de chaque hybride trispécifique (Mergeai *et al.* 1998).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les deux hybrides trispécifiques sont totalement autostériles et les premières tentatives de rétrocroisements n'ont pratiquement donné aucun résultat. Sans application de régulateurs de croissance, aucune graine n'a pu être produite par l'hybride TSH et il a fallu réaliser environ 100 croisements pour obtenir une graine à partir de l'hybride HRS. Grâce à l'application de régulateurs de croissance, le taux de réussite moyen est passé de 0 à 15 graines pour 100 croisements pour l'hybride TSH et de 1 à 20 graines pour 100 croisements pour l'hybride HRS.

L'application de régulateurs de croissance a permis de produire 41 graines BC_1 (17 à partir de HRS et 24 à partir de TSH). Parmi ces 41 graines, 6 étaient totalement démunies de glandes tandis que la distribution de fréquences des densités de glandes observées chez le reste des graines présentait un aspect de cloche asymétrique : les classes de densité de glandes intermédiaires étant les plus représentées.

Sur les six graines totalement démunies de glandes que nous avons produites, une seule a donné une plante adulte dont la densité de glandes était totalement normale. Pour obtenir cette dernière, il a été nécessaire de cultiver la graine *in vitro* pendant 2 semaines et de greffer la plantule obtenue sur un porte-greffe de l'espèce *G. hirsutum*. Toutes les autres graines sans glandes produites par rétrocroisement des hybrides trispécifiques n'ont pas germé ou ont dégénéré après quelques jours de culture *in vitro*. La seule plante que nous avons obtenue à partir d'une graine totalement démunie de glandes (TSH x NC8/5) fleurit abondamment mais est tout à fait autostérile.

L'analyse de la méiose des hybrides trispécifiques et de leur descendance confirme le bien-fondé de la stratégie d'introgression suivie. Les deux hybrides trispécifiques sont euploïdes 2n = 4x = 52) et les nombres d'associations bi- et multivalentes chez TSH (15.34 ± 0.49 II + 0.93 ± 0.17 III + 0.69 ± 0.14 IV + 0.26 ± 0.1 VI) et chez HRS (17.03 ± 0.49 II + 0.82 ± 0.19 III + 0.15 ± 0.07 IV + 0,07 ± 0.05 VI) sont nettement plus hauts que ce qui avait été observé par Shujing et Biling (1993) chez l'hybride trispécifique *G.aroreum* L.x *G.bickii* Prokh x *G.hirsutum* (4,54 II + 0,57 III + 0,41 IV). Dans ce

dernier hybride, *G. bickii* (2n = 2x = 26, génome G_1) constituait l'espèce donneuse du caractère recherché et *G. aboreum* (2n = 2x = 26, génome A_2), espèce diploïde asiatique, était utilisée comme pont.

Le génotype introgressé est également euploïde (2n = 4x = 52). L'expression du caractère recherché chez ce cotonnier tétraploïde peut être due aux chromosomes de *G. sturtianum* encore présents chez celui-ci ou à des recombinaisons entre les chromosomes du génome C porteurs des facteurs de répression et ceux des sous-génomes A_h et D_h du cotonnier cultivé.

Les hauts taux d'appariement (20.61 ± 0.57 II + 0.69 ± 0.17 III + 0.77 ± 0.15 IV) et de formation de chiasmas (50.38 ± 0.63) observés chez le génotype TSHxNC8/5 permettent d'espérer le passage du caractère recherché aux générations suivantes et un retour assez rapide vers une forme de cotonnier génétiquement équilibrée dont les graines seront dépourvues de glandes à gossypol alors que sa partie aérienne conservera cet important moyen de défense naturel contre les insectes.

Afin de faciliter la restauration de l'équilibre génétique des matériels introgressés, nous avons développé, parallèlement aux travaux d'hybridation interspécifiques, une technique de sélection du cotonnier assistée par marqueurs moléculaires de l'ADN nucléaire. Cette technique se base sur l'amélioration de la méthode classique d'extraction de l'ADN au CTAB de Murray et Thompson (1980). La principale modification apportée à la méthode standard concerne l'ajout de charbon de bois activé pendant l'incubation des extraits de tissus végétaux. Cette modification originale a permis une amélioration significative de l'amplification PCR de l'ADN extrait chez le cotonnier et chez d'autres plantes récalcitrantes comme le caféier, le bananier, l'hévéa et le manioc (Vroh bi *et al.*, 1996).

À partir d'ADN extrait des différentes espèces de cotonnier intervenant dans la création des hybrides TSH et HRS nous avons optimisé les paramètres intervenant dans les réactions RAPD (Vroh bi *et al.*, 1997). Tous les facteurs testés ont influencé le résultat final mais la concentration d'ADN, du chlorure de magnésium, des désoxynucléotides triphosphates et la température de dénaturation se sont avérés être les paramètres les plus importants. Les différents facteurs envisagés ont été optimisés par réajustements successifs en partant des conditions RAPD standards et en considérant les recommandations des fournisseurs des différents constituants de la réaction.

Au total, 375 bandes RAPD ont été générées par 30 amorces décamères (Mergeai *et al.*, 1998). Parmi ces bandes, seulement 36 (9,6 %) se retrouvent chez tous les parents des hybrides trispécifiques. Les 339 (90,4 %) autres fragments sont polymorphes. Le tableau 1 résume les résultats obtenus concernant l'identification de marqueurs RAPD spécifiques des espèces diploïdes sauvages constitutives des hybrides TSH et HRS et leur transmission dans ces hybrides.

Tableau 1 : Transmission des marqueurs RAPD spécifiques des cotonniers diploïdes chez les hybrides trispécifiques

Génotypes testés	Nombre de marqueurs RAPD spécifiques chez le génotype parental	Nombre de marqueurs RAPD spécifiques chez TSH	Nombre de marqueurs RAPD spécifiques chez HRS
G. sturtianum	49	18*	22*
G. raimondii	12	0	4
G. thurberi	13	4	0

* *Les deux hybrides trispécifiques partagent 18 bandes caractéristiques de G sturtianum*

L'absence systématique de certains marqueurs spécifiques des espèces sauvages chez les hybrides trispécifiques peut s'expliquer par la présence d'un seul complément de chacune des 13 paires de chromosomes des espèces diploïdes sauvages et par l'existence d'interférences entre certains fragments d'ADN au moment de l'amplification (Heun et Helentjaris, 1993). Pour limiter ce risque de « compétition » entre fragments lors de l'amplification, nous n'avons pris en considération que des bandes bien nettes qui étaient à la fois présentes chez l'espèce parentale et chez les hybrides trispécifiques. Au total, 22 marqueurs de ce type ont été identifiés chez *G. sturtianum* contre 4 marqueurs pour *G. raimondii* et *G. thurberi*. Étant donné la grande proximité phylétique qui existe entre les espèces sauvages diploïdes du génome D (*G. thurberi* et *G. raimondii*) et le sous-génome D_h de *G. hirsutum*, il n'est pas surprenant d'observer pour elles un plus faible nombre de marqueurs RAPD spécifiques que pour *G. sturtianum* qui appartient à un génome nettement plus distant.

Ces marqueurs RAPD spécifiques ont été utilisés pour évaluer l'introgression de segments d'ADN des espèces diploïdes sauvages chez les plantes obtenues en rétrocroisant les hybrides trispécifiques par des variétés de *G. hirsutum*. Tous les marqueurs RAPD spécifiques de *G. sturtianum* ont été retrouvés parmi les BC_1 obtenus à partir de TSH et HRS et le nombre de marqueurs spécifiques observés par plante variait de 7 à 20 (avec une moyenne de 13). Ces marqueurs spécifiques de *G. sturtianum* seront utilisés pour sélectionner, à chaque génération de rétrocroisement, les plantes introgressées génétiquement les plus proches du parent récurrent, c'est-à-dire celles qui présenteront le moins de marqueurs spécifiques de l'espèce sauvage donneuse du caractère, de manière à accélérer le retour vers une forme bien équilibrée.

Remerciements

Ce travail a été financé par la convention 2.4565.95 du « Fonds de la recherche fondamentale collective » de Belgique.

Bibliographie

1. ALTMAN D.W. (1988). Exogenous hormone applications at pollination for in vitro and *in vivo* production of cotton interspecific hybrids. *Plant Cell Rep.* 7,257-261.
2. ALTMAN D.W., STIPANOVIC R.D, BELL A.A. (1990). Terpenoids in foliar pigment glands of A, D, and AD genome cottons: Introgression potential for pest resistance. *J. Hered.* **81**, 447-454.
3. BRUBAKER C.L., BENSON C.G., MILLER C., LEACH D.N. (1996). Occurrence of terpenoid aldehydes and lysigenous cavities in the glandless seeds of Australian *Gossypium* species. Austr. J. Bot. **44**, 601-612.
4. FRYXELL, P.A. (1965). A revision of the Australian species of *Gossypium* with observation on the occurrence of *Thespesia* in Australia. *Austr. J. Bot.* **13**, 71-102.
5. HEUN M., HELENTJARIS T. (1993) Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. Theor Appl Genet **85** : 961-968.
6. MERGEAI G., VROH BI I., DU JARDIN P., BAUDOIN J.-P. (199). Introgression of glanded-plant and glandless-seed trait from *G. sturtianum* Willis into tetraploid cotton plants. Proc. Beltwide cotton improvement conference. Ed. National cotton council. San Antonio, USA, 6-7 January 1995, 513-514.

7. MERGEAI G., VROH BI I., BAUDOIN J.-P., DU JARDIN P.. (1998). Use of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to assist wide hybridization in cotton. *In* : Cotton Biotechnology. YPS Bajaj (Ed). Springer verlag, 121-139.
8. MURRAY M., THOMSON W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. **8** : 4321-4325.
9. SHUIJIN Z., BILING L. (1993). Studies of the «glandless seeds-glanded plant» trait from *Gossypium bickii* into cultivated upland cotton (*G. hirsutum*). *Coton Fibres Trop.* **48**, 195-199.
10. STEWART JMcD, HSU C.L. (1977). In-ovulo embryo culture and seedling development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* **137**: 113-117.
11. VROH BI I., HARVENGT L., CHANDELIER A., MERGEAI G., DU JARDIN P. (1996). Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding* **115**, 205 - 206.
12. VROH BI I., DU JARDIN P., MERGEAI G., BAUDOIN J.-P. (1997). Optimisation et application de la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) dans un programme de sélection récurrente chez le cotonnier (*Gossypium* spp.). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **1**, 142-150.

E4 : Hybridation interspécifique chez le blé : progrès récents et perspectives d'avenir

COMEAU A.[1], ST-PIERRE C.A.[2], MAËS O.[2,3], COLLIN J.[2]

[1] Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sainte-Foy G1V 2J3

[2] Université Laval, Département de Phytologie, Sainte-Foy, Québec G1K 7P4

[3] présentement à : IRBV, Université de Montréal, Montréal H1X 2B2

Lors d'un séminaire présenté à Québec en 1980, madame Yvonne Cauderon se demandait quelles espèces pouvaient être croisées au blé, et par quels moyens? Aujourd'hui, il faut plutôt se demander quelles sont les dernières barrières qui subsistent en hybridation interspécifique du blé. Avant de présenter quelques exemples de résultats de croisements interspécifiques, nous voulons d'abord redéfinir les fondements scientifiques des tentatives de transfert de gènes étrangers, et signaler certains liens avec les techniques d'haploïdie. Nous indiquerons comment ces recherches contraignent et orientent l'avenir de l'hybridation interspécifique du blé et d'autres céréales.

PROGRÈS RÉCENTS

La pollinisation

Lors de la double fécondation des angiospermes, le tube pollinique pénètre la synergide, en libère les réserves de calcium au moment même où les noyaux spermatiques s'orientent vers la paroi de l'œuf (Chaubal et Reger 1995). Un grain de pollen étranger semble germer et réagir à peu près comme celui du blé, sans doute attiré par un signal provenant des synergides. Un grain de pollen d'une espèce très distante est souvent incapable de germer sur le pistil de blé. Toutefois, le pollen d'espèces aussi distantes que *Brassica campestris* et *Narcissus poeticus* peuvent germer et développer un tube pollinique vers le micropyle du blé (Ahmad et Comeau, non publié) ; cette barrière semble donc beaucoup plus faible que prévu. Quant aux espèces moins distantes, le pollen de presque n'importe quelle espèce de graminée peut sans doute féconder un ovule de blé. Les noyaux spermatiques sont alors attirés par l'œuf et par les noyaux polaires et ainsi le processus de fécondation donne naissance au zygote et à l'endosperme. Un pollen de *Carex* peut féconder l'œuf de blé, même si le pollen de blé franchit ces étapes plus rapidement que le pollen étranger (Mol & Zenkteler 1982).

La pollinisation pose par contre un certain problème au rétrocroisement, mais ceci est sans doute relié à la fréquence d'œufs très déséquilibrés au niveau chromosomique, incapables de maintenir un développement normal en pré-fécondation. Les gènes d'aptitude au rétrocroisement jouent probablement à ce niveau, de même que les gènes qui augmentent la fréquence de gamètes non réduits.

Sauvetage d'embryons et de proembryons : hypothèses nouvelles

C'est seulement après la fécondation qu'interviennent plusieurs mécanismes destinés à empêcher le transfert de gènes entre espèces distantes. Les noyaux étrangers se

fusionnent de manière anormale dans le cas de blé x *Carex*, et les premières divisions sont mortelles. Par contre, dans les croisements blé x maïs, blé x mil à chandelle, blé x chiendent, les mécanismes de mortalité sont moins rapides et moins absolus, de sorte que le sauvetage des embryons, parfois combiné à l'usage *in vivo* d'hormones en post-fécondation, suffit pour récupérer des plantules viables. Dans notre laboratoire, nous avons travaillé à améliorer l'étape du sauvetage des embryons. Nous avons déployé de grands efforts pour dépasser l'approche empirique en accord avec un petit groupe de chercheurs qui estiment que les milieux de culture *in vitro* devraient refléter les vraies conditions *in vivo* (Murray 1988, Monnier 1995, Carman *et al.* 1996). Ainsi, Maës (1990) a défini assez exactement les conditions biochimiques qui prévalent dans l'ovule au cours des 12 à 15 premiers jours après la fécondation. Ses travaux démontrent des fluctuations majeures du niveau d'un grand nombre de composantes minérales et organiques au cours de la première division cellulaire après la fécondation. On parle ici de teneurs de 4 à 20 fois supérieures à la normale pour plusieurs substances.

Chaubal et Reger (1995) ont prouvé que les cations sont distribués de manière très inégale dans le sac embryonnaire avant la fécondation, et ils ont décrit comment l'entrée du tube pollinique dans une synergide libère les noyaux spermatiques, lesquels seront ensuite attirés vers l'œuf. Cet événement tue la synergide et il est suivi d'une redistribution des cations. On pourrait soupçonner que le calcium joue chez les plantes un rôle semblable à celui qu'il joue dans les fécondations animales, en prenant part à une onde de dépolarisation qui empêcherait une pollinisation surnuméraire. Cette hypothèse reste à démontrer, mais une telle onde se produirait probablement en quelques minutes tout au plus. De son côté, Maës (1990) a observé en post-fécondation une fluctuation lente et complexe touchant plusieurs composantes chimiques. Le pic de cette fluctuation aurait une durée d'environ 24 heures, centrée sur la première division cellulaire. Il y aurait, durant cette période, une augmentation des cations, anions, acides aminés, sucres et peut-être aussi des polyamines.

Si on cherche les avantages possibles de cette vague chimique, il y a bien sûr la possibilité qu'il y ait rapport avec les besoins nutritionnels et l'état très hétérotrophe du zygote et du proembryon. Il s'agirait donc d'une entrée rapide de matériel nécessaire aux synthèses cellulaires. Le proembryon ne s'embarrasserait pas de synthétiser des précurseurs, des sucres simples, des acides aminées, etc. nécessaire à la construction de macromolécules ; il les recevrait massivement avant la première division. Chez certains proembryons animaux, la synthèse des ARN est d'ailleurs inactive pendant une ou deux divisions cellulaires et le proembryon dépend des ARN d'origine maternelle pour diriger sa synthèse protéique. La présence d'un tel stratagème serait à vérifier chez les plantes. Toutefois l'hypothèse nutritionnelle semble insuffisante. Rappelons que cette vague étudiée par Maës ne touche pas spécifiquement l'œuf, mais l'ovule dans son ensemble, et affecte probablement plusieurs compartiments de la cellule.

À la lecture de nombreuses publications sur la structure et le fonctionnement du chromosome et de la chromatine, on peut concevoir que les fortes concentrations d'ions et de substances organiques auraient un effet sur un grand nombre de molécules qui interagissent avec l'ADN. Plusieurs protéines modifient la structure et le fonctionnement de la chromatine ; on parle ici d'histones, de « trans-acting factors », de protéines HMG (High-Mobility Group), topoïsomérases et une kyrielle d'autres. Ceci nous intéresse en particulier dans le cadre de la transcription et de la réplication. Plusieurs de ces protéines possèdent des régions d'homologie avec les histones et autres protéines structurantes qui enroulent l'ADN ou attachent l'ADN au cytosquelette

nucléaire et qui sont responsables de la stabilité structurale de la chromatine. Or on sait que la force du lien entre histones et ADN varie en fonction de la concentration en cations monovalents et divalents et en fonction de certaines autres molécules. Wolffe (1995) se pose la question du rôle possible de ces protéines, incluant les histones, qui pourraient même réguler massivement tout un génome et spécialement peut-être dans le cadre des premières étapes de la différenciation. Dans les proembryons de certains animaux marins, on a d'ailleurs noté des histones modifiées, spécifiques aux toutes premières divisions.

On peut donc poser plusieurs questions légitimes, qui permettraient peut-être de formuler des hypothèses de recherche valables.

Le rôle des cations, des acides aminés, polyamines, sucres et autres molécules pourrait-il être largement des rôles de messagers ou de régulateurs, capables de modifier l'interaction ADN-protéines de manière à rendre actifs ou silencieux plusieurs batteries de gènes spécialisés dans les diverses étapes du début de la morphogenèse ? Diverses molécules agiraient-elles sur divers groupes de gènes, ou à des moments différents, au fur et à mesure que la vague chimique croît et se résorbe?

L'osmolarité globale joue-t-elle un rôle, ou les effets observés sont-ils spécifiques à des ions ou molécules précises ?

Par exemple, selon Maës (1990) l'ovule peut atteindre brièvement des teneurs en sodium de 35 mM, alors que 50 mM suffisent à extraire complètement du noyau la topoïsomérases II, protéine qui représente un constituant important du chromosome. Si on se rappelle que Coumans (1998) a déjà détecté des effets morphogénétiques induits par le sodium, soit une formation d'embryoïdes à partir de scutellums de blé dur, on peut donc se demander si le sodium pourrait être un cation qui joue un rôle réellement important en début de morphogenèse. De plus, dans le même laps de temps, le potassium atteint jusqu'à 160 mM, et on peut facilement imaginer qu'à une telle dose il pourrait affecter indirectement, de plusieurs manières, la structure et le fonctionnement de l'ADN. Plusieurs autres ions et molécules organiques atteignent simultanément des doses très fortes. Puisque nous jouons ici dans le domaine des questions et hypothèses nouvelles, ajoutons cette corollaire : le tout premier rôle de ce choc chimique multiple serait-il de conformer la chromatine dans un état qui remet à zéro le programme de développement de la cellule, donc de la dédifférencier totalement et de la rendre compétente pour une différenciation normale subséquente?

Les résultats de Maës (1990), et les hypothèses formulées à partir de la littérature récente peuvent donc inspirer des recherches académiques, mais aussi des améliorations pratiques aux protocoles de travail, tant en hybridation interspécifique qu'en culture d'anthères ou de microspores. Par exemple, nous avons cultivé *in vitro* les proembryons de blé sur le milieu U2.5 riche en acides aminées, inspiré de l'environnement *in vivo* (Comeau et al. 1992). Mais à la lumière de ces mêmes résultats, on constate *a posteriori* que les approches empiriques ont quelquefois produit des milieux *in vitro* qui imitent un peu mieux les conditions naturelles. Par exemple, les milieux à 2 compartiments, originalement préconisés par Michel Monnier, reproduisent la fin de cycle de l'onde observée par Maës. De plus, l'usage de suppléments en acides aminés, comme la glutamine et l'hydrolysat de caséine, représente une autre action orientée accidentellement vers l'imitation de la nature. Une imitation encore mieux réussie des conditions de la morphogenèse *in vivo* pourrait-elle nous permettre de diminuer encore davantage les barrières à l'hybridation interspécifique ?

On a également essayé de modifier la concentration des ions, des sucres, des acides aminés dans le but d'augmenter le succès de la culture d'anthères chez l'orge. L'affiche

de Laroche et al. (1997) présente quelques-uns des résultats récents qui nous incitent à continuer dans notre tentative d'imitation des conditions naturelles. En nous basant sur les mêmes principes, nous essayons aussi de mettre au point un milieu de culture permettant la croissance du proembryon non disséqué, dans un ovaire fécondé simplement stérilisé à l'hypochlorite de calcium, ce qui pourrait être utile pour les croisements blé x maïs.

Le transfert de gènes

Il est désormais assez facile de croiser les espèces entre elles ; nous avons d'ailleurs croisé le blé à 24 espèces de graminées. Nous ne discuterons pas ici des cas où le génome étranger est éliminé, et où l'objectif pratique se limiterait à la production de haploïdes. Pour le transfert de gènes, si on s'éloigne des génomes A, B et D, le succès est encore aujourd'hui difficile à obtenir, et surtout difficile à prouver. Parmi les obstacles, il faut souligner que plusieurs séries de gènes amènent des incompatibilités et des dysfonctionnements biochimiques ou génétiques chez les hybrides, souvent létales dans le cas des allèles Kr et des gènes de nécrose hybride (Ne_1 et Ne_2), et débilitantes dans le cas des gènes de chlorose et autres (Bizimungu 1994). Certains gènes qui modifient l'aptitude au rétrocroisement revêtent une importance pratique considérable, car il se dépense dix fois plus de temps pour cette étape que pour l'obtention des F_1 (Comeau *et al. 1993*). Les aspects les plus coûteux du travail demeurent donc : 1) l'art de provoquer les transferts de gènes entre génomes différents, et 2) l'identification rapide des perles rares qui incorporent les gènes étrangers dans un chromosome de blé à comportement mendélien. Divers auteurs ont proposé une série de méthodes comme l'irradiation, la régénération à partir de cals, l'usage de gènes inducteurs de cassures et recombinaisons incluant le célèbre gène ph1b, dans le but d'accélérer les transferts. L'efficacité de toutes ces méthodes n'a pas été suffisamment évaluée, et leur efficacité relative pour introduire des gènes étrangers, en fonction des diverses sources de gènes possibles, reste appuyée sur une base scientifique incomplète.

Après observation de la méïose des hybrides interspécifiques à l'espèce cultivée, on a depuis longtemps classé plusieurs espèces distantes comme moins désirables au point de vue pratique. La faiblesse de cette conclusion est mise en lumière par les travaux suivants. On a croisé le riz à des espèce très distantes, jugées non utilisables par les cytogénéticiens à cause de l'absence d'appariement méiotique. Un croisement de riz *Oryza sativa* (génome AA) x *Oryza officinalis* (génome CC) donne donc des plants totalement stériles et dont la méïose ne contient que des univalents. Conclusion classique : voilà un parent sauvage à éviter. Malgré le pessimisme de cette règle de base, l'étude approfondie avec les marqueurs RFLP révèle de multiples micro-introgressions, présentes sur 11 des 12 chromosomes du génome A (Jena et al. 1992). Parmi ces micro-introgressions se trouve un gène nouveau et très utile, la résistance à un insecte suceur appelé « fulgoride brun » (brown planthopper), *Nilapravata lugens*. On parle ici de micro-introgressions parce que la plupart de ces introgressions sont identifiées par un seul et unique marqueur RFLP. Ceci contredit donc de plein fouet tout le courant de pensée depuis les débuts de la science cytogénétique. Jena et al. cherchent à expliquer le phénomène en invoquant l'existence d'un mécanisme non conventionnel responsable introgressions ; mais une telle hypothèse est peut-être superflue car Mujeeb-Kazi a noté des cas semblables chez le blé (Mujeeb-Kazi & Hettel 1995).

En fait, les micro-introgressions ne sont détectables que depuis l'avènement des RFLP, et la recherche de ce phénomène n'est pas encore entrée dans les habitudes des

chercheurs. Les cas possibles de micro-introgression ne sont pas rares dans nos propres populations de blé interspécifiques. Plusieurs lignées de blés interspécifiques ont été étudiés par la méthode GISH (genomic in situ hybridization), et dans la majorité des cas, la résistance n'est pas associée à un fragment de chromosome assez gros pour être détectable par le GISH. Il resterait donc à appliquer le test des RFLP, si les croisements avaient été planifiés en fonction de cette méthode ; nous pouvons difficilement le faire avec notre matériel actuel, ayant utilisé plusieurs parents blé dans chaque croisement. Un hybride [(blé #1 x élyme)/blé #2//blé #3] est plus difficile à étudier par RFLP.

PERSPECTIVES D'AVENIR

La méthodologie de croisement et de rétrocroisement sera donc à redéfinir en fonction des progrès possibles dans l'étude des micro-introgressions chez plusieurs espèces. Il est peut-être logique d'adopter une approche bien différente si de telles micro-introgressions peuvent être obtenues, et ce même si la fréquence est très faible. Tant qu'on cherche les grosses translocations, on obtient avec les introgressions une foule de gènes délétères ou indésirables. Avec les micro-introgressions, les changements sont très subtils sauf pour le caractère recherché, et au niveau cytogénétique classique la détection est impossible. Par contre, on peut arriver très vite à un produit commercialisable, et ce détail est très important.

L'optimisation des méthodes de criblage

Si on planifiait le travail en fonction d'une possibilité de micro-introgressions, la clé du succès serait d'obtenir de grosses populations et de sélectionner avec un système très efficace pour la résistance à un stress ou à une maladie. Le fait que la micro-introgression se produise une fois sur un million n'est pas un obstacle si le système de criblage séquentiel permet d'identifier la plante individuelle dans la grande population. Un système de cycles de sélection successifs serait en effet idéal pour cet objectif. Si on conserve à chaque cycle les meilleurs individus représentant 1 % de la population, en 3 ou 4 générations on pourrait identifier l'individu recherché. Nous avons développé un excellent crible pour la résistance au virus de la jaunisse nanisante de l'orge (VJNO, ou BYDV), virus qui attaque plusieurs céréales ou graminées (Comeau *et al.* 1993, 1994 ; Makkouk *et al.* 1994). Les lignées interspécifiques créées dans notre projet ont atteint le niveau d'avancement où elles attirent l'attention des phytogénéticiens. Par exemple un hybride trispécifique à 2n=28 semble avoir une tolérance ou une résistance quasi complète au VJNO, avec en surplus une résistance à plusieurs autres maladies, ce qui nécessite évidemment une confirmation en 1997. Nous essayons maintenant de mettre au point un crible aussi efficace pour étudier la résistance à la sécheresse *stricto sensu*, ou capacité de rendement agronomique en état de déficit hydrique (Nodichao, 1997), dans le but de mieux rentabiliser les croisements interspécifiques impliquant des parents résistants à la sécheresse.

Méthodes moléculaires et cytogénétique

Les RFLP, RAPD, et la panoplie de plus en plus large de nouvelles méthodes performantes capables de remplacer ces premiers outils moléculaires (marqueurs dérivés par PCR : SCAR, microsatellites, EST, etc.) deviennent désormais les instruments disponibles pour étudier la fréquence des micro-introgressions. La cytogénétique conventionnelle est impuissante dans l'étude de ce phénomène, mais elle rend toujours de grands services pour la caractérisation des translocations classiques. Les techniques de cytométrie de flux seraient intéressantes mais sont

réservées aux laboratoires les plus riches. Le GISH pourrait remplacer avantageusement le Giemsa si le protocole était simplifié ; c'est une technique impressionnante mais onéreuse. Nous essayons présentement de micro-disséquer un petit télomère de chromosome de chiendent, porteur de résistance au virus (Comeau *et al.* 1994), pour en développer des sondes utilisables pour le criblage de populations de blé interspécifique.

La biodiversité valorisée par l'hybridation interspécifique

Celui qui possède l'art des croisements interspécifiques sait apprécier la biodiversité à sa juste valeur. Parmi les espèces apparentées au blé, on trouve une abondance de gènes de résistance aux virus, à la fusariose, à la sécheresse et aux maladies foliaires et racinaires. Ces gènes pourraient résoudre des problèmes d'échecs culturaux dans les pays du Sud et diminuer la pollution dans les pays plus fortunés, en réduisant les besoins de pesticides et d'engrais conventionnels. Au Québec, plusieurs espèces apparentées au blé sont des mauvaises herbes parfaitement vivaces et adaptées à notre environnement ; les gènes pour créer le blé rustique et même le blé vivace existent dans la nature. On accorde présentement trop peu d'intérêt à l'introgression des gènes étrangers parce qu'on a adopté une perspective à court terme de cette recherche (St-Pierre *et al.* 1997). L'attention insuffisante accordée aux croisements interspécifiques compte parmi les raisons qui font que la biodiversité devient un passe-temps de philosophes de salon, une sorte de ballon politique avec lequel les politiciens jouent un peu au besoin pour polir leur image, seulement pour ensuite mettre le ballon de côté. Les semenciers, souvent traditionnalistes, n'ont généralement pas encore compris qu'il s'agit d'un enjeu socio-économique très important. C'est ainsi que si on met sur un plateau de la balance les argents qui vont vers les croisements interspécifiques, et sur l'autre les argents qui vont vers la génétique moléculaire et la transformation génétique chez les graminées, on a un rapport de quelque 10 à 15 millions de dollars sur au-delà d'un milliard. Or si on s'attachait à mieux étudier le rapport coût-bénéfice, on constaterait que la biodiversité a énormément à offrir, autant pour les obtenteurs privés et publics que pour l'ensemble des pays producteurs céréaliers, qu'ils soient riches ou pauvres, et que l'exploitation de la biodiversité devient plus facile avec les méthodes moléculaires. Les gènes des espèces sauvages ont fait leurs preuves dans les régions soumises aux stress pendant des millions d'années ; il n'y a qu'à apprendre à mieux exploiter ce trésor négligé.

Bibliographie

1. BIZIMUNGU B. 1994. Hybridation interspécifique pour l'introgression de la tolérance au virus de la jaunisse nanisante de l'orge et à la moisissure nivéale tachetée, du triticale au blé. Ph. D. 107 pp.
2. CARMAN J., BISHOP D., HESS J. 1996. Carbohydrates, minerals and free amino acids in *Triticum aestivum* L. kernels during early embryony. *J. Plant Physiol.* 149:714-720.
3. CAUDERON Y. 1980. Hybridation interspécifique chez le blé: réalisations et potentiel. Conférence présentée à Ste-Foy, Québec.
4. CHAUBAL R., REGER B.J. 1995. Calcium uptake, release, and programmed death in synergid cells of pearl millet. *Plant Physiol.* 108:29.

5. COMEAU A., ST-PIERRE C.A., COLLIN J. 1993. Interspecific hybrids of wheat as sources of barley yellow dwarf virus resistance. *in*: A. Damania, ed. Biodiversity and Wheat Improvement. J. Wiley & Sons, N.Y. pp. 83-94.
6. COMEAU A., MAKKOUK K.M., AHMAD F., ST-PIERRE C.A. 1994. Bread wheat x *Agrotricum* crosses as a source of immunity and resistance to the PAV strain of barley yellow dwarf luteovirus. Agronomie. 2: 153-160.
7. COMEAU A., NADEAU P., PLOURDE A., SIMARD R., MAES O., et al. 1992. Media for the *in ovulo* culture of proembryos of wheat and wheat-derived interspecific hybrids or haploids. *Plant Science* 81:117-125.
8. JENA K., KHUSH G., KOCHERT G. 1992. RFLP analysis of rice (*Oryza sativa* L.) introgression lines. Theor. Appl. Genet. 84: 608-616.
9. LAROCHE L., ST-PIERRE C.A., COLLIN J., COMEAU A. 1997. Stimulation de l'androgenèse *in vitro* par un prétraitement des anthères au début de la phase d'induction. in : Biotechnologies, amélioration des plantes et sécurité alimentaire. Orsay. (Affiche).
10. MAÉS O. 1990. Études biochimiques et physiologiques sur les conditions del'embryogenèse chez *Triticum aestivum*.. pp. 127 Université Laval, Québec, Canada
11. MAKKOUK K.M., COMEAU A., GHULAM W. 1994. Resistance to barley yellow dwarf luteovirus in *Aegilops* species. Can. J. Plant Sci. 74: (3): 631-634.
12. MOL R., ZENKTELER M.. 1982. Cytoembryological studies on some wild species as pollinators of wheat and barley. Z. Pflanzenzüchtg. 89: 31-38.
13. MONNIER M. 1995. Culture of zygotic embryos. In *In vitro embryogenesis in plants*, ed. T. A. Thorpe. pp. 117-153 Kluwer Acad. Publ.
14. MUJEEB-KAZI A., HETTEL G.P. 1995. Utilizing wild grass biodiversity in wheat improvement : 15 years of wide cross research at CIMMYT. Research Report No. 2. CIMMYT. Mexico.
15. MURRAY D. 1988. *Nutrition of the angiosperm embryo* NY: J Wiley Sons. 246 pp.
16. NODICHAO L. 1997. Biodiversité racinaire et résistance à la sécheresse. Mémoire, M. S. Univ. Laval. 168 pp.
17. ST-PIERRE C., COMEAU A., GAUTHIER B. 1997. L'aspect public de la privatisation des semences. Biodiversité mondiale. 7: 9-16.
18. ST-PIERRE C., COMEAU A., GAUTHIER B. 1997. Privatization of crop seeds : the public aspect (adapted from French). Global biodiversity. 7: 9-16.
19. WOLFFE A. 1995. Chromatin structure and function. Acad. Press. N. Y. 299 pp.

E5 : Divers systèmes de régénération nécessaires à l'application des biotechnologies pour l'amélioration de la Patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)

SIHACHAKR D.[1], NZOGHÉ D.[2], UMBOH I.[3], CAVALCANTE J.-M.[1], MUSSIO I.[1], SERVAES A.[1], LAVERGNE D.[1], DUCREUX G.[1]

[1] Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât. 360, Université Paris Sud, 91405 Orsay Cedex - France, Télécopie : 33 (0)1 69 85 54 90, e.mail : dara.sihachakr@mve.u-psud.fr.

[2] Laboratoire de Culture *in vitro*, CIAM - BP 2183 Libreville - Gabon.

[3] Seameo - Biotrop, JL Raya Tajur, Km 6, PO Box 116 - Bogor - Indonésie.

INTRODUCTION

La Patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Convolvulacées) est une plante économiquement importante dans les zones tropicales et même dans certaines zones tempérées d'Europe du sud et des États-Unis d'Amérique (Sihachakr et Ducreux 1993). Elle produit des racines tubéreuses très riches en calories et vitamines, ainsi qu'en protéines dont la teneur varie entre 2 et 10 % de matière sèche selon les cultivars (Yang et al. 1975 ; Hattori et al. 1985). Ses tubercules sont utilisés dans l'industrie féculière ou destinés aux distilleries, mais sa culture reste surtout dans un cadre familial pour la production d'un complément alimentaire riche en calories. Son feuillage est également utilisé comme fourrage.

La Patate douce est originaire d'Amérique du sud (Colombie, Équateur et Nord Pérou) où il existe encore une grande diversité d'*Ipomoea batatas*. Elle a été introduite en Europe par Christophe Colomb au 15^{e} siècle. La Patate douce ou *Ipomoea batatas* (L.) Lam. est une dicotylédone gamopétale, de l'ordre des Polémoniales et de la famille des Convolvulacées. Les études cytologiques et d'hybridation interspécifique ainsi que l'analyse génomique (Jones et Deonier 1965) ont permis de classer la Patate douce et les espèces sauvages apparentées en 3 groupes (Nishiyama et al. 1975). Les espèces du 1er groupe, apparemment autopolyploïdes comprennent : *Ipomoea batatas* (2n = 6x = 90 chromosomes) et 3 autres espèces, *I. trifida* (2n = 2x = 30, 4x = 60 et 6x = 90, *I. littoralis* (2n = 4x = 60) et *I. leucantha* (2n = 2x = 30). Quatre espèces diploïdes (2n = 2x = 30) forment le 2^{e} groupe : *I. triloba*, *I. lacunosa*, *I. trichocarpa* et *I. ramoni*. Le 3^{e} groupe comprend 2 espèces tétraploïdes, *I. gracillis* et *I. tiliacea*, dont la composition génomique reste indéterminée. Les espèces sont sexuellement incompatibles entre les groupes.

Le complexe *I. trifida*, constitué notamment d'*Ipomoea trifida* et aussi d'autres espèces sauvages du 1er groupe, a fait l'objet d'études particulières pour l'identification de ressources génétiques susceptibles d'être utilisées dans un programme de sélection de Patate douce (Kobayashi 1984). *I. trifida* serait l'ancêtre direct de la Patate douce cultivée. C'est aussi la seule espèce sauvage qui peut donner une descendance fertile lors des croisements avec la Patate douce (Orjeda et al. 1991). Certaines de ses

accessions portent de nombreux caractères intéressants, en particuler la résistance aux nématodes et la capacité élevée d'accumulation des réserves (Sakamoto 1976).

Des progrès ont été réalisés par les méthodes de sélection classiques pour l'introduction des caractères de résistance aux maladies, aux nématodes et aux insectes, ainsi que pour l'amélioration de la qualité du tubercule notamment à la suite d'hybridation avec *I. trifida* (Iwanaga et al. 1991). Cependant, le processus de sélection est un travail laborieux et de longue haleine. Il nécessite des techniques améliorées de croisements et aussi la manipulation d'un très grand nombre d'individus, étant donné la structure hexaploïde (2n = 6x = 90) de la Patate douce. De plus, l'incompatibilité sexuelle et la faible fertilité de certains génotypes et des hybrides dues à la différence de niveau de ploïdie des parents (Freyre et al. 1991; Orjeda et al. 1991) rendent encore plus difficiles l'exploitation des méthodes de sélection classiques (Sihachakr et Ducreux 1993).

Afin de mener les programmes de sélection de la Patate douce avec efficacité, il est nécessaire d'y inclure des techniques nouvelles, comprenant notamment l'utilisation de la variation somaclonale, la fusion de protoplastes et la transformation génétique, pour élargir la variabilité génétique et transférer des gènes d'intérêt. Ces nouvelles méthodes peuvent être utilisées en conjonction avec les méthodes de sélection classiques. Cependant, l'accès à ces nouvelles techniques nécessite la maîtrise des protocoles reproductibles et performants de régénération à partir de culture de tissus de Patate douce. Cette plante est considérée comme une espèce récalcitrante en ce qui concerne la régénération. Dans ce travail nous allons examiner chez cette plante, divers systèmes de régénération à travers la culture d'explants et de protoplastes, ainsi que l'embryogenèse somatique.

LES DIVERS SYSTÈMES DE RÉGÉNÉRATION *IN VITRO* CHEZ LA PATATE DOUCE

La culture d'explants

Parmi les divers systèmes de régénération *in vitro*, l'embryogenèse somatique est sans doute la voie la plus recherchée, car elle offre la possibilité de multiplication à un taux élevé et inégalable. Néanmoins, chez la Patate douce, la réponse embryogène dépend fortement du génotype, et peut être absente chez certains cultivars (Cavalcante Alves et al. 1994 ; Desamero et al. 1994 ; Pido et al. 1995). Par conséquent, la régénération par l'organogenèse à partir de culture d'explants paraît la seule méthode disponible pour ces génotypes. Ainsi des fragments de tiges repiqués sur du milieu MS additionné de 1 mg/l d'acide 3-indole acétique (AIA) peuvent donner naissance à des bourgeons (Sihachakr 1982 b). Des études comparatives plus détaillées de milieux de culture ont permis de montrer que les meilleures réponses concernant la précocité (2 semaines de culture) et la fréquence de régénération (22 %) à partir de culture de fragments d'entre-nœuds de patate douce, ont été obtenues avec la combinaison de 0,01 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et de 0,01 mg/l de kinétine. De plus, la réponse organogène dépend de la position et de la taille des fragments mis en culture (Bouhassan 1984).

Des fragments de racines néoformées sur des cultures de tiges ou de feuilles de patate douce peuvent être induites à régénérer des bourgeons sur le milieu MS contenant 0,2 mg/l d'acide α-naphthalèneacétique (ANA), utilisé seul ou combiné avec 0,1 mg/l de benzyladénine (BA) (Pido et al. 1995).

Les réponses concernant la régénération varient, généralement, selon les différents génotypes étudiés (Hwang et al. 1983 ; Carswell et Locy 1984 ; Alkalifa et Chambliss 1985 ; Templeton-Somers et Collins 1985, 1986).

La comparaison de la capacité organogène des différents organes mis en culture a montré que les explants de tiges sont les plus aptes à régénérer par rapport aux explants foliaires (Sihachakr 1982 b ; Bouhassan 1984). Par ailleurs les meilleures réponses organogènes sont obtenues à partir des explants prélevés sur des plantes *in vitro*.

Il est intéressant de noter que le repiquage des fragments de cals non-organogènes ou amorphes sur un milieu favorable à l'organogenèse a entraîné souvent leur nécrose. Néanmoins, certains d'entre eux sont capables de reprendre la croissance et de produire parfois des racines, mais ce traitement n'a jamais abouti à la formation de bourgeons.

L'embryogenèse somatique

• *Les réponses embryogènes*

Les premiers travaux sur l'induction de l'embryogenèse somatique chez la Patate douce ont abouti à l'obtention des structures embryoïdes à partir de cals issus de culture d'anthères (Tsai et Tseng 1979). Par la suite, des investigations ont été entreprises par plusieurs chercheurs, utilisant principalement le cultivar White Star. Des cals embryogènes d'un aspect compact et d'une couleur jaunâtre ont été induits à partir de culture de fragments d'organes sur du milieu MS additionné de 1 mg/l de 2,4-D (Liu et Cantliffe 1984 a, b). La comparaison de capacité embryogène de différents organes a montré que les jeunes feuilles sont les plus aptes à l'embryogenèse somatique par rapport aux fragments de tiges et de racines, et aux apex. Le transfert des cals embryogènes sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance a conduit au développement des structures embryonnaires, à savoir des embryons aux stades globulaires et cœurs, dont certains évoluent en plantes feuillées. Transplantées en conditions de serre, les plantes ainsi obtenues sont capables de fleurir et de former des tubercules.

Les travaux ultérieurs ont montré que les bourgeons axillaires prélevés sur des plantes *in vitro* semblent constituer le matériel végétal le plus approprié à l'induction de l'embryogenèse somatique chez la Patate douce, car ils donnent les meilleures réponses embryogènes (Chée et Cantliffe 1988 a, b, 1989 a ; Shultheis et al. 1990 ; Desamero et al. 1994 ; Cavalcante-Alves et al. 1994).

Des études comparatives de milieux, réalisées notamment sur le cultivar White Star, ont montré que l'induction de l'embryogenèse somatique chez la Patate douce est optimale avec l'utilisation de 10 µM de 2,4-D, et que la combinaison de 10 µM de 2,4-D et de 1 µM de BAP assure le maintien et la multiplication des cals embryogènes induits en milieu solide, et seulement 5 µM de 2,4-D en milieu liquide (Chée et Cantliffe 1988 a). On a également constaté que l'acide picolinique (2–3 mg/l) combiné avec de la kinétine (0,25–1 mg/l) est capable d'induire une embryogenèse somatique directe à partir de culture de méristème apical du cultivar Regal, mais il reste sans effet sur le cultivar Jewel (Desamero et al. 1994). La germination des embryons semblent être conditionnée par leur état de maturation. En effet, si le transfert des cals embryogènes sur un milieu sans régulateur de croissance conduit à la différenciation des embryons à différents stades, très peu d'entre eux arrivent à maturation et encore moins à la conversion en plantes. Beaucoup de structures embryonnaires présentent des anomalies de développement (absence de pôles ou méristèmes apical et racinaire,

arrêt de développement aux stades globulaires et torpilles...). Seuls les embryons qui ont atteint les stades torpilles avancés ou cotylédonnaires sont capables de germer et de se développer en plantes (Chée et Cantliffe 1988 b).

Tableau 1 : Réponse embryogène de 10 cultivars de Patate douce.

Génotype	D11	Qu	Yul	Zho	90	132	209	530	865	953
A)Réponse Embryogène (%)	0,0	1,3	1,5	15,0	10,0	5,0	8,0	3,6	17,0	7,0
B)Réversion De cals (%)	-	1,0	1,0	3,0	12,0	2,5	7,0	1,5	10,5	0,5

A) Pourcentage de cals embryogènes obtenus après 6-8 semaines d'incubation de bourgeons axillaires dans du milieu MS contenant 10 µM de 2,4-D , effectif : 120-160 bourgeons axillaires/génotype . l'effet " génotype " est très hautement significatif pour P = 0,001 ; B) Pourcentage de réversion de cals embryogènes en cals friables et non-embryogènes après repiquage sur du milieu MS contenant 10 µM de 2,4-D ; effectif : 200 cals/génotypes . l'effet " génotype " est très hautement significatif pour P = 0,001.

L'évaluation du potentiel embryogène à partir de culture de bourgeons axillaires chez 10 cultivars de Patate douce a montré l'existence d'un effet " génotype " très hautement significatif (Tab. 1A) (Cavalcante et al. 1994 ; Sihachakr et al. 1995). Parmi les génotypes testés, les cultivars 90, Zho et 865 ont donné les meilleures réponses embryogènes avec respectivement 10, 15 et 17 % de cals embryogènes (Tableau 1A). Il est intéressant de noter que le cultivar Duclos XI n'a donné aucune réponse embryogène quelle que soit la concentration en 2,4-D utilisée (2,5 à 15 µM), alors que ce même génotype a produit quelques régénérations de bourgeons à partir de culture de protoplastes (Sihachakr et Ducreux 1987 b, 1993 ; Sihachakr et al. 1997).

Les cals embryogènes sont multipliés par repiquages successifs sur du milieu MS contenant 10 µM de 2,4-D et 1 µM de BAP et maintenus à l'obscurité. Cependant, après plusieurs repiquages, certains secteurs du cal deviennent friables et non embryogènes. Ils ont tendance à envahir complètement la culture car leur croissance est 5 à 8 fois plus rapide que celle des cals embryogènes. De plus, la réversion des cals embryogènes vers un état friable non embryogène est irréversible, et s'accompagne d'une perte définitive de la capacité à régénérer des bourgeons (Cavalcante et al. 1994 ; Sihachakr et al. 1997). La comparaison des fréquences de réversion a montré un effet " génotype " très hautement significatif (Tab ; 1B). En effet, les cultivars Quangshu, Yulciboi et 953 sont parmi les génotypes qui ont le taux de réversion le plus faible (0,5 à 1 %), alors que le cultivar 90 présente le taux le plus élevé (12 %) (Tableau 1B).

• *La différenciation des embryons somatiques et la régénération de plantes*

Il est intéressant de noter que l'induction et la différenciation d'embryons somatiques chez la Patate douce, ainsi que leur maturation nécessite la présence d'un niveau élevé d'auxine, du 2,4-D en particulier. En effet, la différenciation d'embryons somatiques de Patate douce est obtenue en transférant les cals embryogènes dans le même milieu (MS + 10 µM de 2,4-D + 1 µM de BAP) que celui utilisé pour leur multiplication. La culture est alors maintenue à l'obscurité pendant une semaine après le repiquage, puis exposée à la lumière. Dans ces conditions, plus de 90 % des cals embryogènes traités développent des embryons globulaires après 4 semaines de culture. Cependant, seulement 5 % des embryons globulaires différenciés pour tous génotypes confondus de Patate douce sont capables d'évoluer vers le stade cotylédonnaire et de se développer en plantules à la suite de leur transfert dans un milieu dépourvu de

régulateurs de croissance. La majorité des embryons restent stationnaires tout en gardant la capacité de redonner des cals embryogènes lorsqu'ils sont transférés sur les milieux d'induction ou de multiplication. Le repiquage des embryons globulaires sur un milieu contenant 1 µM de 2,4-D et 1 µM de kinétine pendant 3 semaines, suivi d'un transfert dans un milieu MS dépourvu de régulateurs de croissance améliore sensiblement leur développement en embryons au stade cotylédonnaire, plus aptes à germer, mais avec une fréquence variant de 24 à 90 % selon le génotype.

Les embryons somatiques de Patate douce au stade cotylédonnaire verdissent à la lumière. Ils sont plus aptes à se développer en plantes à raison de 3-5 plantes par cal. On remarque, cependant, que les vieilles cultures (plus de 6 mois), maintenues à l'obscurité dans un milieu initialement riche en 2,4-D, parviennent, parfois, à différencier des embryons qui peuvent atteindre le stade cotylédonnaire.

Il est important de noter que les cals embryogènes ainsi obtenus chez plusieurs génotypes de Patate douce et leur capacité de conversion en plantes sont constamment maintenus depuis plus de 5 ans de culture.

• *Caractérisation biochimique*

Afin d'évaluer les potentialités embryogènes de différents types de structures obtenues, des cals embryogènes et non embryogènes de patate douce ont été caractérisés par l'analyse des isoenzymes et du comportement d'une kinase, la nucléoside diphosphate kinase, impliquée dans le phénomène de différenciation cellulaire.

• *L'analyse des isoenzymes*

Les isoenzymes sont facilement détectables et la variation de leurs activités est souvent associée à des différences génétiques et des modifications morphogénétiques, alors que l'évaluation du potentiel embryogène par observations morphologiques est toujours subjective. Dans cette étude, 4 systèmes d'isoenzymes ont été analysés pour caractériser les différents événements morphogénétiques survenus au cours de l'embryogenèse somatique chez la Patate douce. Ce sont les estérases (Est, E.C.3.1.1.2), les péroxydases (Prx, E.C.1.11.1.7), les phosphatases acides (Acp, E.C.3.1.3.2) et les glutamates axaloacétates transaminases (Got, E.C.2.6.1.1).

Les feuilles, les cals embryogènes et non embryogènes et les embryons somatiques au stade globulaire issus de 3 génotypes (cv 90, 953 et Quangshu) ont été utilisés. Chacun des 4 systèmes d'isoenzymes analysés ont permis de distinguer les 3 génotypes étudiés. De plus, ils montrent des variations dans leurs activités entre les différents types d'organisation, et en particulier entre les cals embryogènes et non embryogènes (Calvacante et al. 1994).

Le profil des bandes des estérases est complexe. Il comprend un très grand nombre de bandes, sans doute lié à l'état hexaploïde de la patate douce. La feuille est caractérisée essentiellement par des bandes situées dans la zone de migration lente. Les cals friables non embryogènes, à croissance rapide se distinguent des cals embryogènes par l'absence d'activité des estérases, sauf au niveau de la migration rapide pour le cultivar 953. Peu de différences existent entre les cals embryogènes et les embryons globulaires, sauf pour le cultivar Quangshu, qui montre de nombreuses bandes dans la zone de migration rapide des estérases (Cavalcante et al. 1994).

Pour les péroxydases, les cals friables non embryogènes se distinguent des cals embryogènes essentiellement par la présence d'activités au niveau de la zone de migration lente. Il y a peu de différences entre les cals embryogènes et les embryons

globulaires. Ils sont essentiellement caractérisés par des bandes de migration rapide (Cavalcante et al. 1994).

Pour les glutamates oxaloacétates transaminases (Got), la feuille est caractérisée par des bandes situées dans la zone de migration rapide. Les cals friables non embryogènes des génotypes 90 et 953 ont respectivement des activités faibles et intenses dans la zone de migration lente.

En ce qui concerne les phosphatases acides, les cals non embryogènes sont caractérisés par l'absence d'activités notamment chez les cultivars 90 et Quangshu, ou par une très faible activité pour le génotype 953. Peu de différence a été observée pour les cals embryogènes et les embryons globulaires. Les feuilles ont des activités intenses dans la zone de migration lente (Cavalcante et al. 1994).

Dans cette étude, les cals embryogènes et non embryogènes montrent de grandes différences dans les activités des isoenzymes. En revanche, peu de changements ou aucune modification spécifique n'ont été observés entre les cals embryogènes et les embryons globulaires. Cela semble indiquer que les isoenzymes étudiées sont probablement impliquées dans l'organisation de cals plutôt que dans le processus de différenciation des embryons somatiques.

Il est également intéressant de noter que les activités des isoenzymes sont plus faibles ou absentes chez les cals friables non embryogènes, comparées à celles des cals embryogènes. Cette situation est non seulement due à la différence de quantité de protéines, qui est de 20 à 30 % plus faible dans les cals friables non embryogènes, mais elle peut être aussi liée à une activité faible ou nulle des isoenzymes dans les cals non embryogènes. Des résultats similaires ont été constatés chez les cals embryogènes et non embryogènes de maïs (6).

• *Les marqueurs protéiques*

Les nucléosides diphosphates kinases (NDPK, E.C.2.7.4.6) sont des enzymes ubiquistes responsables de la synthèse des nucléosides triphosphates à partir des nucléosides diphosphates. Elles sont impliquées dans le contrôle du flux métabolique des groupes phosphates et dans la conversion de leur niveau de fonction. Les NDPK ont un rôle très important pour le maintien du niveau de GTP nécessaire aux synthèses protéiques. La protéine native est un hexamère (100 kDa) constituée de sous-unités identiques (17-20 kDa), chaque sous-unité possède un site actif et peut être phosphohorylée. L'étroite analogie existant entre la NDPK d'épinard, le produit du gène humain Nm23 (impliqué dans les tumeurs malignes) et celui de la drosophile Awd (décisif pour le développement) nous a conduit à émettre l'hypothèse de la contribution de la NDPK au niveau des processus de prolifération et de différenciation des cals de patate douce.

La NDPK est analysée d'une part en tant qu'élément de la chaîne de signalisation des processus précoces de différenciation cellulaire, et d'autre part comme enzyme clé de la gestion énergétique cellulaire au cours des processus de divisions intenses des cellules.

Au cours de la phase exponentielle de croissance des cellules en prolifération, l'activité NDPK est fortement augmentée, comparée à celle exprimée par les cellules en phase stationnaire. Cette augmentation du niveau de l'activité NDPK au cours de la croissance peut traduire l'intensité des divisions cellulaires et par voie de conséquence l'intensité des échanges nucléotidiques et énergétiques qui y sont associés. De plus, l'activité NDPK mesurée sur les extraits protéiques des cultures embryogènes est 4 fois plus forte que sur les cultures non embryogènes. Les résultats des immunotransferts permettent de montrer la distribution générale du polypeptide 15-17

kDa, caractéristique de la NDPK décrite chez les systèmes animaux. L'existence d'une forme plus lourde (28-31 kDa) est spécifiquement observée sur les extraits de cultures embryogènes. Des résultats complémentaires nous permettent de relier ce polypeptide (28-31 kDa) aux organites impliqués dans la gestion du pouvoir énergétique tel que les mitochondries et les chloroplastes. La surexpression de l'activité enzymatique de la NDPK dans les cals embryogènes et la présence d'une bande correspondant à un polypeptide de poids moléculaire élevé, permettent de supposer une participation active de la NDPK au cours des processus de la différenciation cellulaire et de la considérer comme un marqueur potentiel lors de la mise en place des événements de l'embryogenèse somatique.

L'induction de la production et du développement des embryons est sous la dépendance des stimulis hormonaux. La transduction de ces signaux lors des processus du développement chez la patate douce est encore mal connue. Les mécanismes par lesquels les cellules végétales reçoivent les signaux physiologiques et assurent leur traduction jusqu'aux cellules cibles doivent être élucidés via le fonctionnement corrélé des NDPK et des protéines G.

La culture des protoplastes

L'isolement et la culture des protoplastes ainsi que la régénération de plantes constituent des étapes essentielles pour réaliser le transfert de gènes par transformation génétique ou par fusion somatique. De plus, il est bien établi que les cellules végétales cultivées subissent des changements génétiques, appelés variations somaclonales (Larkin et Scrowcroft 1981). L'hétérogénéité cellulaire d'une population de protoplastes est particulièrement appropriée pour l'isolement et l'identification de somaclones comportant des caractères agronomiques intéressants, tels que l'accroissement du rendement et de la qualité des tubercules, et des tolérances.

Chez la patate douce, des protoplastes peuvent être isolés à partir de fragments de tiges, de pétioles ou de cals, alors que le mésophylle se montre très récalcitrant à la digestion enzymatique. Le matériel frais est en incubation, pour la nuit à 27°C et à l'obscurité, dans une solution enzymatique constituée de 0,5 M de mannitol, de sels minéraux (Frearson et al ; 1973), de Cellulase RS et de Pectolyase Y23 utilisées à 0,5 % (m/v) (Sihachakr et al ; 1997). Dans ce cas, le rendement en protoplastes est estimé à 0,2 – 1,3 X 10^6 protoplastes/g de masse fraîche. Les protoplastes sont généralement cultivés en milieu liquide. Ils évoluent, le plus souvent, vers la formation de cals qui ne manifestent aucune organogenèse (Bidney et Shepard 1980 ; Otani et al. 1987 ; Kokubu et Sato 1988), ou qui produisent seulement des racines (Sihachakr et Ducreux 1987 a). Cependant, des néoformations sporadiques de bourgeons à partir de culture de protoplastes de patate douce ont été signalées pour le cultivar Chugoku N°25 (Murata et al 1986).

Des résultats intéressants concernant la régénération de bourgeons à partir de culture de protoplastes ont été obtenus chez la patate douce, grâce à des efforts qui ont porté sur la recherche de combinaisons de régulateurs de croissance, de séquences de milieux de culture et en particulier sur le choix du matériel végétal utilisé comme source de protoplastes (Sihachakr et Ducreux 1987 b). En effet, la comparaison entre le matériel végétal prélevé en serre et *in vitro* montre la nette supériorité de ce dernier concernant la viabilité et le taux de division de protoplastes qui en sont issus, ainsi que la capacité ultérieure à régénérer des bourgeons. Ces performances sont sans doute dues à l'état physiologiquement juvénile et homogène du matériel végétal qui caractérise les plantes *in vitro*. De plus, la grande dilution de la culture, combinée avec le passage sur des milieux successifs riches en cytokinine, de la zéatine en particulier,

stimule la croissance des cals et favorise la régénération de bourgeons (Sihachakr et Ducreux 1987 b). Ainsi, des plantes ont été régénérées à partir de cals de protoplastes, mais la régénération est limitée à deux cultivars de patate douce, cv. Duclos 11 et Ira. Par ailleurs, l'utilisation de matériel végétal hautement organogène, tels que les cals embryogènes de patate douce, comme source de protoplastes a abouti à l'obtention de cals friables non embryogènes et incapables de régénérer (Sihachakr et al. 1997).

Le contrôle de régénération chez d'autres génotypes de patate douce nécessite donc le développement d'un protocole alternatif. Il est intéressant de rappeler que les racines tubéreuses de Patate douce portent de nombreux bourgeons adventifs qui peuvent se développer en plantes feuillées (Sihachakr 1982 a). Nous avons alors mis à profit cette propriété rhizogène pour tenter d'obtenir des régénérations de bourgeons sur les cals de protoplastes à travers la rhizogenèse. Des cals de protoplastes ont été d'abord repiqués sur du milieu MS contenant 2 mg/l de zéatine pendant un mois, avant d'être transférés sur du milieu contenant 0,01 mg/l de 2,4-D et 0,01 mg/l de kinétine. Environ 2-5 % des cals ainsi traités produisent des racines 20-30 jours après le transfert. La rhizogenèse peut être améliorée, la fréquence pouvant atteindre 10 % dans du milieu contenant 0,2 mg/l d'ANA, avec en moyenne une à 5 racines par cal. Les racines néoformées sont ensuite coupées en fragments de 10 mm de long puis repiqués dans du milieu contenant 0,5 mg/l de zéatine. Un à deux mois plus tard, des bourgeons apparaissent soit directement sur les racines cultivées, ou soit à travers un cal formé au niveau des sections avec une fréquence variant de 3 à 6 % (Sihachakr et al. 1997). Finalement, à travers ce protocole, la régénération de plantes a été obtenue chez les cultivars Ira, Quangshu et *I. trifida*. Des travaux sont en cours pour appliquer ce protocole de régénération à d'autres génotypes de patate douce et des espèces sauvages apparentées.

Les plantes régénérées présentent une grande variabilité affectant la morphologie générale de la plante, celle des feuilles, la ramification ainsi que le système racinaire. L'analyse du contenu en ADN de 15 protoclones d'apparence morphologique normale, par cytométrie en flux, a montré des valeurs similaires ou très proches de celles du clone témoin (Sihachakr et Ducreux 1993).

Dix protoclones choisis ont été transplantés en conditions de champ au Gabon pour une évaluation préliminaire. Deux types de matériel ont été testés : des boutures issues directement de culture *in vitro*, et celles issues de pépinière. Malgré une apparence de morphologie similaire, les protoclones montrent une certaine variabilité dans la croissance et la formation des tubercules. Certaines boutures de protoclones issues de culture *in vitro* n'ont pas tubérisé, alors que d'autres (clones R8, R22, R35, R39, R52 et R56), notamment celles issues de pépinière, ont donné un rendement en tubercules deux fois supérieur à celui du clone témoin D11 (Sihachakr et al. 1997). Des essais au champ sont en cours à Bogor (Indonésie) pour confirmer le comportement des protoclones.

Tableau 2 : Évaluation préliminaire de 10 protoclones de patate douce (R8 – R56) et du témoin (D11) réalisée en conditions de champ au Gabon à partir de boutures issues de plantes *in vitro* et de pépinière ; rendement en tubercules : g/plante.

Génotype	R8	R22	R35	R39	R40	R41	R42	R43	R52	R56	D11
Boutures *in vitro*	406	197	162	121	122	12	10	0	225	67	2
Boutures de pépinière	809	729	738	733	589	236	71	174	860	772	332

CONCLUSION

Dans cette étude, divers systèmes de régénération chez la patate douce ont été présentés. Bien que la micropropagation soit bien maîtrisée, la régénération chez cette plante montre encore des difficultés affectant notamment la culture de cals secondaires ou de protoplastes. La voie de l'embryogenèse somatique paraît alors la plus prometteuse et reproductible pour la régénération chez cette plante. Elle permet d'assurer un taux élevé et inégalable de multiplication d'individus sains, homogènes et juvéniles. Cependant, bien que les cals embryogènes constituent sans doute un matériel compétent et hautement organogène, le potentiel embryogène n'a pu être conservé à travers la culture de protoplastes. En effet, les protoplastes isolés à partir de cals embryogènes évoluent en culture vers la formation d'un cal friable non embryogène et incapable de régénérer des bourgeons. En conséquence, un protocole alternatif a été développé aboutissant à la néoformation de bourgeons. Ce protocole s'inspire des propriétés organogènes des racines de patate douce. Il consiste à initier d'abord la production de racines sur les cals de protoplastes, puis à induire la régénération de bourgeons à partir des racines néoformées.

Les plantes régénérées à partir de culture de protoplastes montrent une très grande variabilité affectant notamment la croissance et la tubérisation. Certains protoclones présentent un rendement en tubercules deux à trois fois supérieur à celui du témoin. Ces résultats montrent bien que la culture de tissus, et en particulier à travers le passage par cal de protoplastes, peut induire la variabilité génétique. Des somaclones stables et intéressants peuvent être rapidement régénérés. Cette technique constitue, donc, un moyen efficace d'élargir la variabilité génétique chez des plantes, telles que la patate douce, présentant des difficultés dans la reproduction sexuée.

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de la Communauté Européenne et de l'AUPELF.

Bibliographie

1. ALKALIFA M.A., CHAMBLISS O.L. (1985) Feasibility of tissue culture propagation of sweet potatoes for foundation and stock-evaluation of different propagation procedures HortScience, 20(4): 665 (Conference abstract).
2. BIDNEY D.L., SHEPARD J.F. (1980) Colony development from sweet potato petiole protoplasts and mesophyll cells. Plant Sci. Lett., 18: 335-342.
3. BOUHASSAN A. (1984) Analyse du polymorphisme des néoformations obtenues *in vitro* à partir de divers tissus de Patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Convolvulacées). Thèse 3e Cycle, Univ. Paris Sud, Orsay, 167 pp.
4. CARSWELL G.K., LOCY R.D. (1984) Root and shoot initiation by leaf, stem, and storage roots explants of sweet potato. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 3. 229-336
5. CAVALCANTE ALVES J.M., SIHACHAKR D., ALLOT M., TIZROUTINE S., MUSSIO I., SERVAES A., DUCREUX G. (1994) Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Plant Cell Reports, 13: 437-441.
6. CHÉE R.P., CANTLIFFE D.J. (1988 a) Somatic embryony patterns and plant regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 24:955-958.
7. CHÉE R.P., CANTLIFFE D.J. (1988 b) Selective enhancement of *Ipomoea batatas* Poir embryogenic and non-embryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 15: 149-159.
8. CHÉE R.P., CANTLIFFE D.J. (1989 a) Composition of embryogenic suspension cultures of *Ipomoea batatas* Poir. and production of individualized embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 17: 39-52.

9. CHÉE R.P., CANTLIFFE D.J. (1989 b) Inhibition of somatic embryogenesis in response to 2,3,5-triiodobenzoic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Ipomoea batatas* (L) Lam cultured *in vitro*. J. Plant Physiol., 135: 398-403.
10. DESAMERO N.V., RHODES B.B., DECOTEAU D.R., BRIDGES W.C. (1994) Picolinic acid-induced direct somatic embryogenesis in sweet potato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 37: 103-111.
11. FREARSON E.M., POWER J.B., COCKING E.C. (1973) The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. Dev. Biol., 33: 130-137.
12. FREYRE R., IWANAGA M., ORJEDA G. (1991) Use of *Ipomoea trifida* (HBK.) G. Don. plasm germ for sweet potato improvement. 2. Fertility of synthetic hexaploids and triploids with 2n gametes of *I. trifida*, and their interspecific crossability with sweet potato. Genome, 34: 209-214.
13. HATTORI T., NAKAGAWA T., MAESHIMA M., NAKAMURA K., ASAHI T. (1985) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for sporamin, the major soluble protein of sweet potato tuberous roots. Plant Molecular Biology, 5: 313-320.
14. HWANG L.S., SKIRVIN R.M., CASYAO J., BOUKAMP J. (1983) Adventitious shoot formation from sections of sweet potato grown *in vitro*. Scientia Horticulturae, 20: 119-129.
15. IWANAGA M., FREYRE R., ORJEDA G. (1991) Use of *Ipomoea trifida* (HBK.) G. Don. germ plasm for sweet potato improvement. 1. Development of synthetic hexaploids of *I. trifida* by ploidy-level manipulations. Genome, 34: 201-208.
16. JONES A., DEONIER M.T. (1965) Interspecific crosses among *Ipomoea lacunosa, I. ramoni, I. trichocarpa* and *I. triloba*. Bot. Gaz. 126: 226-232.
17. KOBAYASHI M. (1984) The *Ipomoea trifida* complex closely related to sweet potato. Proc 6th Symp. Int. Soc. Trop. Root Crops, CIP, 1983, Lima, Peru, pp 561-568.
18. KOBUKU T., SATO M. (1988) Isolation and culture of petiole protoplasts of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. and its related species. Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ., 24: 83-89.
19. LARKING P., SCROWCROFT W. (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet., 60: 197-214.
20. LIU J.R., CANTLIFE D.J. (1984 a) Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) leaf, shoot tip, stem and root explants culture. Plant Cell Reports, 3: 112-115.
21. LIU J.R., CANTLIFFE D.J. (1984 b) Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.). HortScience, 19(3): 113 (abstract 501).
22. MURATA T., HOSHINO K., MIYAZI Y. (1986) Plant regeneration from protoplasts of sweet potato. Japan Breed., 36: 236-237.
23. NISHIYAMA I., MIYAZI T., SAKAMOTO S. (1975) Evolutionary autoploidy in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its progenitors. Euphytica, 24: 197-208.
24. ORJEDA G., FREYRE R., IWANAGA M. (1991) Use of *Ipomoea trifida* germ plasm for sweet potato improvement. 3. Development of 4x interspecific hybrids between *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (2n = 6x = 90) and *I. trifida* (H.B.K.) G. Don. (2n = 2x = 30) as storage-root initiators for wild species. Theor. Appl. Genet., 83: 159-163.
25. OTANI M., SHIMADA T., NIIZEKI H. (1987) Mesophyll protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Plant Science, 53: 157-160.
26. PIDO N., KOWYAMA Y., SHIMONISH K., KARUBE M. (1995) Plant regeneration from adventitious root segments derived from leaf discs of sweet potato cultivar Jewel. Plant Tissue Culture and Biotechnolgy, 2: 81-84.
27. SAKAMOTO S. (1976) Breeding of a new sweet potato variety, Minamiyutaka, by the use of wild relatives. Jpn Agric. Res. Q., 10: 183-186.
28. SHULTHEIS J.R., CANTLIFFE D.J., CHEE R.P. (1990) Optimizing sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) root and plantlet formation by selection of proper embryo development stage and size, and gel type for fLiudized sowing. Plant Cell Reports, 9. 356-359.
29. SIHACHAKR D. (1982 a) Utilisation de boutures de feuilles isolées de Patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) pour l'analyse de la tubérisation. Thèse Doc Etat, Université Paris Sud, Centre d'Orsay, 68 pp.
30. SIHACHAKR D. (1982 b) Premiers résultats concernant la multiplication végétative *in vitro* de la Patate douce (*Ipomoea batatas* Lam., Convolvulacées). Agronomie Tropicale 37:142-151.
31. SIHACHAKR D., DUCREUX G. (1987 a) Isolement et culture de protoplastes de deux variétés de Patate douce (*Ipomoea batatas* Lam.). Can. J. Bot ., 65:192-197.

32. SIHACHAKR D., DUCREUX G. (1987 b) Plant regeneration from protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). Plant Cell Reports, 6: 326-328.
33. SIHACHAKR D., DUCREUX G. (1993) Regeneration of plants from protoplasts of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 23, Plant protoplast and genetic engineering IV, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 43-59.
34. SIHACHAKR D., CAVALCANTE-ALVES J.M., TIZROUTINE S., ALLOT M., MUSSIO I., SERVAES A., NOZHGÉ D., DUCREUX G. (1995) Embryogenèse somatique chez la Patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.): caractérisation et régénération des plantes. In: Dubois J, Demarly Y - AUPELF-UREF (eds) Quel avenir pour l'amélioration des plantes, John Libbey EUROTEXT, pp. 251-261.
35. SIHACHAKR D., HAÏCOUR R., CAVALCANTE ALVES J.M., UMBOH I., NZOGHÉ D., SERVAES A., DUCREUX G. (1997) Plant regeneration in sweet potato (*Ipomoea batatas* L., Convovulaceae). Euphytica 96 : 143-152.
36. TEMPLETON-SOMERS K.M., COLLINS W.W. (1985) Genetic variation in sweet potato tissue cultures. HortScience, 20(4): 664 (abstract).
37. TEMPLETON-SOMERS K.M., COLLINS W.W. (1986) Heritability of regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Theor. Appl. Genet., 71: 835-841.
38. TSAI H.S., TSENG M.T. (1979) Embryoid formation and plantlet regeneration from anther callus of sweet potato. Bot. Bull. Acad. Sinica, 20: 117-122.
39. YANG T.H., TSAI Y.C., HSEU C.T., KO H.S., CHEN S.W., BLACKWELL R.Q. (1975) Protein content and its amino acid distribution of locally produced rice and sweet potato in Taiwan. J. Chinese Agric. Chem. Soc., 13:132-138.

E6 : Un modèle d'étude pour la régulation de l'accumulation d'un groupe ubiquitaire de protéines allergènes dans les plantes alimentaires

CARPIN S., HAMDI S., VALENTA R., SCHOENTGEN F., CHÉNIEUX J.-C., RIDEAU M.

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Biochimie Végétale, EA 2106, Faculté de Pharmacie , 31 avenue Monge, 37200 Tours. Tel : 02 47 36 72 10, E-mail : Chenieux@balzac.univ-tours.fr.

INTRODUCTION

La Pervenche de Madagascar, *Catharanthus roseus* (L) G. Don, Apocynacée tropicale accumule plusieurs alcaloïdes indoliques d'intérêt pharmacologique (ajmalicine, vinblastine, vincristine). Elle est également cultivée en Europe comme plante ornementale.

Au cours d'études sur la régulation des biosynthèses alcaloïdiques dans des cultures *in vitro* de cette espèce, nous avons observé, après électrophorèse bidimensionnelle, l'accumulation d'une protéine de 17 kDa (pHi : 6,5) stimulée par la présence de cytokinines dans le milieu de culture, et au contraire inhibée par l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), une auxine de synthèse (Carpin et *al.*, 1997). Nous avons souhaité identifier cette protéine cytokinine-dépendante et caractériser le gène correspondant.

RÉSULTATS

Dans une première étape, la partie N-terminale de cette protéine a été microséquencée sur 30 acides aminés qui sont donnés dans la figure 1 suivante :

NH2 - GVISYDMEIKSSLSAAKLFKAFVLDVGTLI

Figure 1.

À partir de cette séquence, nous avons sélectionné 2 amorces (soulignées dans la figure 1) qui ont été utilisées en combinaison avec un primer poly T pour rechercher le clone ADNc correspondant, par la technique de RT-PCR. Nous avons ainsi obtenu et séquencé un clone ADNc partiel codant la protéine T1. L'utilisation d'amorces internes nous a permis d'obtenir grâce à la technique de RACE-PCR la séquence complète en acides nucléiques, codant la protéine T1. Cette séquence est donnée en figure 2.

```
ccaaaacatcttctcaccactaaatatatatcctctcttttgcctccttaaattactttA
ataatttcttttcttcattttgcataaaaaaaaaaaaaaaATGGGTGTTATTTCTTATGAT
                                        M  G  V  I  S  Y  D

ATGGAGATCAAATCCTCACTCTCAGCAGCTAAGTTATTCAAGGCTTTTGTCCTCGATGTT
M  E  I  K  S  S  L  S  A  A  K  L  F  K  A  F  V  L  D  V

GGTACCCTCATCAACAAAGCATTGCCTAATGTCATTAAGAGTGTTGAGATCCTCCAAGGA
G  T  L  I  N  K  A  L  P  N  V  I  K  S  V  E  I  L  Q  G

GATGGAGGTGCTGGTACTATCAAGTTGGTCCATTTCGGTGAAGGTGGGCCAGTACCGAGT
D  G  G  A  G  T  I  K  L  V  H  F  G  E  G  G  P  V  P  S

GTGAAGCACCATGTGGAGGAGTTGGACAAGGATAACATGAGCTACAAATACAGTATTGTG
V  K  H  H  V  E  E  L  D  K  D  N  M  S  Y  K  Y  S  I  V

GACGGAGAAGCTTTGATGCCCGGCCTCCAGTCAATCTCTTACGTTATCAAAATCGAACCA
D  G  E  A  L  M  P  G  L  Q  S  I  S  Y  V  I  K  I  E  P

TCCGGCCACGGTTCCGTCTGCAAGCACAACACTACATTCCATTTCAAGGCTGGTTCCAAT
S  G  H  G  S  V  C  K  H  N  T  T  F  H  F  K  A  G  S  N

ATTAACGAAGATGAAATTAAGGCTGGTAAAGAAAGGGCTGCCGAAATGATCAAAGCCGTT
I  N  E  D  E  I  K  A  G  K  E  R  A  A  E  M  I  K  A  V

GAAGCTTACGTTCAAGCCAATCCAGATTATTAATAACAAAATCTGATTTCTCTATTTCAA
E  A  Y  V  Q  A  N  P  D  Y  *  *

ATAAATATATTGTATTTCTGTTTTCAAGTGTGAGTTTTTTCCTTCTAGAATAAATGCTAC
TGTGTTCTTCAGCAGTGGTGAGATTGATCAGTGATCATCTAAACAGGTTCTGAAGAAAAT
TTTAATGGAATTAACGTTACTTACAAAAAAAAAA
```

Figure 2. Séquence en acides nucléiques et en acides aminés du clone ADNc codant la protéine T1 (code d'accès dans la banque EMBL : Y10612).

Ce clone a été utilisé comme sonde radiomarquée dans des tests de Northern blot afin d'étudier l'expression des ARN messagers, codant la protéine T1, extraits de cals de Pervenche soumis à différentes conditions hormonales. Nous avons ainsi vérifié que l'accumulation des transcrits codant la protéine T1 est, comme cette dernière, stimulée par les cytokinines et inhibée par le 2,4-D.

```
C. roseus      -GVISYDMEI KSSLSAAKLF KAFVLDVGTL INKALPNVIK SVEILQGDGG AGTIKLVHFG
Bet vl         MGVFNYESET TSVIPAARLF KAFILDGDNL FPKVAPQAIS SVENIEGNGG PGTIKKISFP
Mald1          MGVYTFENEF TSEIPPSRLF KAFVLDADNL IPKIAPQAIK QAEILEGNGG PGTIKKITFG
Apig1          MGVQTHVLEL TSSVSAEKIF QGFVIDVDTV LPKAAPGAYK SVEI-KGDGG PGTLKIITLP
Aopr1          MSSGSWSHEV AVNVAAGRMF KAAMLDWHNL GPKIVPDFIA GGSVVSGDGS VGTIREIKIN

C.roseus       EGGPVPSVKH HVEELDKDNM SYKYSIVDGE ALMPGLQSIS YVIKIEPSGH -GSVCKHNTT
Bet vla        EGFPFKYVKD RVDEVDHTNF KYNYSVIEGG PIGDTLEKIS NEIKIVATPD GGSILKISNK
Mald1          EGSQYGYVKH RIDSIDEASY SYSYTLIEGD ALTDTIEKIS YETKLVACGS GSTIKSISHY
Apig1          DGGPITTMTL RIDGVNKEAL TFDYSVIDGD ILLGFIESIE NHVVLVPTAD GGSICKTTAI
Aopr 1         NPAIPFSYVK ERLDFVDHDK FEVKQTLVEG GGLGKMFECATTHFKFEPSSN GGCNVKVTAS

C.roseus       FHFKAGSNIN EDEIKAGKER AAEMIKAVEA YVQANPD-Y
Bet vl         YHTKGDHEVK AEQVKASKEM GETLLRAVES YLLAHSDAY
Mald1          -HTKGNIEIK EEHVKVGKEK AHGLFKLIES YLKDHPDAY
Apig1          FHTKGDAVVP EENIKYANEQ NTALFKALEA YLIAN
Aopr 1         YKILPGVADE SAKAKEGITN HM---KATEA YLLANPTAY
```

Figure 3. Comparaison avec les séquences en acides aminés des protéines allergènes de Bouleau (Bet v 1), de Pommier (Mal d 1), de Céleri (Api g 1) et de l'Asperge (Aopr 1).

La comparaison de la séquence en acides aminés de la protéine avec celles de la banque de données EMBL a montré une très forte homologie entre notre protéine et plusieurs autres actuellement regroupées sous le terme de « protéines de pathogenèse intracellulaires » (IPR : Intracellular pathogenesis-related proteins) : figure 3 ci-dessus.

Parmi celles-ci figurent l'allergène principal des grains de pollen du Bouleau (Bet v1, Breiteneder et *al.*, 1989), mais aussi des protéines caractérisées dans de nombreuses espèces alimentaires (Pomme de Terre, Haricot, Pois, Soja, Céleri, Persil, Pommier, Asperge ....), ou non (Tabac, Ginseng). Le caractère allergène a été clairement démontré pour certaines de ces protéines (AoPR 1 de l'Asperge, Mal d 1 de la Pomme, Api g 1 du Céleri dont les codes d'accès sont respectivement les suivants : X62103, Z48969, Z48967 ...), mais n'a pas été systématiquement recherché.

En ce qui concerne la protéine T1, nous avons souhaité rechercher un éventuel caractère allergène de celle-ci. Pour cela, nous avons réalisé des western blot qui ont été hybridés avec du sérum de patients allergiques à l'allergène Bet v 1, et avec des anticorps monoclonaux dirigés contre Bet v 1. Les résultats obtenus nous ont ainsi permis de démontrer que cette protéine de Pervenche était immunologiquement différente de Bet v 1 (données non montrées).

CONCLUSIONS

La protéine T1 caractérisée appartient donc à un groupe de protéines ubiquitaires, appelées IPR, et dont on connaît mal actuellement le rôle biologique. Selon certains travaux (Breiteneder et *al.*, 1995 ; Ebner et *al.*, 1995), la consommation des plantes alimentaires pré-citées pourraient représenter un danger pour les patients allergiques au pollen de Bouleau.

Ces cultures *in vitro* de Pervenche de Madagascar constituent un bon modèle pour étudier les facteurs environnementaux (hormones ou autres...) capables de réguler l'accumulation de telles protéines chez les végétaux. Ces études pourraient permettre de mieux comprendre le rôle de ces protéines au sein des végétaux et pourraient permettre de contrôler leur biosynthèse dans les espèces végétales alimentaires.

Bibliographie

1. CARPIN S., GARNIER F., ANDREU F., CHÉNIEUX J.C., RIDEAU M., HAMDI S. 1997, Plant Physiol. Biochem. 35 (8) : 603-608.
2. BREITENEDER H., PETTENBURGER K., BITO A., VALENTA R., KRAFT D., RUMPOLD H., SCHEINER O., BREITENBACH M. 1989, EMBO 8 : 1935-1938.
3. BREITENEDER H., HOFFMANN-SOMMERGRUBER K., O'RIORDAIN G., SUSANI M., AHORN H., EBNER C., KRAFT D., SCHEINER O. 1995, Eur. J. Biochem. 233 : 484-489.
4. EBNER C., HIRSCHWEHR R., BAUER L., BREITENEDER H., VALENTA R., EBNER H., HRAFT D., SCHEINER O. 1995, J. Allergy Clin. Immunol. 95 : 962-969.

SECTION E

Textes et résumés des Affiches

de E7 à E45

E7 : Relation entre l'activité spécifique des enzymes et la digestion de la paroi pour l'obtention de protoplastes de *Prunus cerasus* L. « Montmorency »

MEHRI-KAMOUN R.[1], LEPOIVRE Ph.[2], BOXUS Ph.[3]

[1] Laboratoire de Phytopathologie. FSAGx. 5030 Gembloux. Belgique.
Actuellement à l'École Supérieure d'horticulture de Chott-Meriem.4042 Sousse. Tunisie.

[2] Laboratoire de Phytopathologie. FSAGx. 5030 Gembloux. Belgique.

[3] Station des cultures fruitières et maraîchères. CRAGx. 5030 Gembloux. Belgique.

INTRODUCTION

L'obtention de protoplastes nécessite l'élimination des parois pectocellulosiques tout en préservant l'intégrité de la cellule. Cet objectif ne sera atteint qu'en ajustant les types d'enzymes à utiliser. La complexité de la structure de la paroi végétale et la multiplicité des liaisons covalentes, qu'il faut rompre pour libérer le protoplaste, rendent souvent difficile l'optimisation des combinaisons d'enzymes aptes à la dégrader. En général, ces enzymes sont produites par des micro-organismes (*Trichoderma viride, Aspergillus niger...*) et agissent sur les différents composés de la paroi végétale (Noat *et al.*, 1991). Outre leurs activités principales (cellulases, pectinases), ces préparations commerciales possèdent également des activités secondaires (a-amylase, endo ß-glucanase et protéase) permettant la lyse complète de la paroi cellulaire.

La plupart des préparations commerciales d'enzymes contiennent des impuretés parfois toxiques (Chupeau & Bourgin, 1980), notamment d'autres enzymes (ribonucléases, protéases, lipases), des phénols et les sels résiduels aux milieux de culture de l'organisme producteur.

La pureté des enzymes représente un facteur important, à prendre en compte dans l'isolement des protoplastes pour éviter d'altérer la cellule particulièrement le plasmalemme (Pilet, 1972 ; Patnaik *et al.*, 1982 ; Bengochea & Dodds, 1980) afin de maintenir la viabilité des protoplastes, leur capacité à synthétiser une paroi et à entrer en division, une fois mis sur milieu de culture approprié (Imbrie-Milligan & Hodges, 1986 ; Dugas *et al.*, 1989 ; Shea *et al.*, 1989). Cette observation explique la nécessité parfois de purifier et/ou de déssaler les préparations enzymatiques commerciales pour augmenter le rendement et la viabilité des protoplastes. Ainsi une purification par un passage sur colonne de chromatographe, Gonzales-Rio & Revilla (1991), a amélioré le taux de viabilité des protoplastes d'*Actinidia* de 20-40 %.

Les enzymes pectolytiques se divisent en 2 groupes : les enzymes déestérifiantes et les enzymes dépolymérisantes. Le premier groupe hydrolyse les liaisons ester méthyliques, il s'agit de la pectine-méthyl estérase (PME) qui libère du méthanol et forme des pectates. Le deuxième groupe agit par hydrolyse (acide ou enzymatique) des liaisons α [1, 4] ou par des réactions de ß-élimination propres aux polyuronides méthylés. Cette déestérification et dépolymérisation sont des réactions qui dépendent du pH et de la température (Thibault, 1980).

Dans ce présent travail, et dans le but d'isoler des protoplastes à partir de mésophylle foliaire et de cals (de racines et de feuilles) de *Prunus cerasus* L. « Montmorency », nous avons déterminé les solutions optimales d'enzymes en fonction des tissus sources et caractérisé ces solutions en terme d'activité spécifique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Isolement des protoplastes

Différentes combinaisons d'enzymes (cellulases et pectinases) ont été testées pour l'obtention de protoplastes à partir de mésophylle foliaire de vitroplants agés de 2 semaines et de cals issus de feuilles et de racines de *Prunus cerasus* L. "Montmorency". Toutes les enzymes sont dissoutes dans la solution enzymatique CPW 13% mannitol additionnée de 5 mM MES (pH= 5,6).

Mesure de l'activité spécifique des cellulases et des pectinases utilisées pour l'isolement des protoplastes

Une étude de l'activité des préparations enzymatiques utilisées (cellulases et pectinases) pour l'obtention de protoplastes de mésophylle foliaire ou de cals a été effectuée. L'activité cellulasique des cellulases Onozuka R-10 et RS (Yakult Pharmaceutical, Japon) ont été mesurées en utilisant comme substrat du papier filtre (FPase) ou de la carboxyméthylcellulose tandis que les activités spécifiques polygalacturonase (PG), pectate lyase (PL) et pectine méthylestérase (PME) ont été mesurées pour la Macérozyme R-10 (Yakult Pharmaceutical, Japon) et Pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical).

Les dosages des protéines existant dans les préparations enzymatiques commerciales ont été réalisés suivant la méthode de Bradford (1976) afin de déterminer les quantités d'enzymes à mettre en jeu pour la détermination des activités spécifiques.

• *Les cellulases*

L'activité du complexe cellulasique total est mesurée par l'activité (FPase) sur papier filtre et par l'activité carboxyméthylcellulase (CMCase) en utilisant comme substrat le carboxyméthylcellulose (Hœchst). L'échantillon contenant 500 µl de la solution cellulase R-10 ou RS à 1 % est déposé soit sur 40 mg papier filtre (Whatman chromatography paper, N° 3001-653) pour la FPase, soit sur 40 mg de carboxyméthylcellulose (pour la CMCase). On ajoute ensuite 1 ml de tampon citrate 0,05 N (pH= 4,85). Ce mélange est incubé à 48°C pendant 1 h. La réaction est stoppée par incubation à 100°C pendant 20 min. L'activité FPase et CMCase est évaluée en dosant les sucres réducteurs libérés à partir des substrats. Une unité d'activité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme libérant 1 mg d'équivalent de glucose par mg d'enzyme et par heure.

• *Les pectinases*

- Analyse de l'activité pectate lyase (PL) contenue dans la Macérozyme R-10 et la Pectolyase Y-23

La technique de dosage de l'activité pectate lyase est basée sur le principe suivant : la pectine est dégradée sous l'action des pectate lyases par ß-élimination. Cette réaction libère des composés contenant une double liaison entre C_4 et C_5 ; cette double liaison et le groupe carboxyle en C_5 entraînent une absorption maximale à 235 nm.

Le mélange réactionnel est constitué de 750 µl de la solution du substrat et le même volume de la solution des enzymes. La solution du substrat est préparée à partir de 0,5 % de polypectate de sodium (Sigma P 1879) dissous dans un tampon Tris-HCl 0,1 M à pH= 8,5. La solution des enzymes est obtenue en ajoutant un volume des échantillons (variant de 50 à 200 µl selon la teneur en protéines totales) à 37,5 µl de $CaCl_2.2H_2O$ (5.10^{-4} mM) ; le tout est ensuite porté à un volume de 750 µl à l'aide du tampon Tris-HCl 0,1 M (22,4 g/l, pH= 8,5).

Ce mélange réactionnel est ensuite incubé pendant 1 h dans un bain thermostatisé à 30°C. On arrête la réaction en plongeant les échantillons dans un bain à 100°C pendant 20 min. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée dans des cuvettes en quartz à 235 nm. Le témoin est constitué de l'échantillon ayant subi une dénaturation (100 °C pendant 10 min). L'activité est exprimée en unité/µg de protéines. Une unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à l'augmentation d'absorbance de 0,01 U/min.

- Analyse de l'activité polygalacturonase (PG) contenue dans la Macérozyme R-10 et la Pectolyase Y-23

Les polygalacturonases catalysent l'hydrolyse des liaisons glucosidiques α-1,4 glycosidiques internes dans les polymères pectiques générant des oligomères d'acide galacturonique.

Le mélange réactionnel est constitué d'un mélange de 1 ml de la solution des enzymes à analyser et de 1 ml de la solution substrat. La solution servant de substrat à l'enzyme est préparée à partir de pectine NaPP (Sigma) dilué à 0,5 % dans de l'acétate de sodium (0,1 M ;

pH=5). Ces échantillons ont été incubés dans un bain-marie à 30°C et pendant 1 h. On ajoute à l'ensemble de ces échantillons 1 ml du réactif alcalin de sulfate de cuivre puis on dénature les protéines à 100°C pendant 20 min. Une fois les tubes refroidis, on ajoute alors 1 ml de réactif de molybdate d'arsenic. On agite le mélange et on centrifuge à 8000 tours/min pendant 10 min pour éliminer les éléments insolubles. On attend au moins 10 min afin que la réaction soit terminée. L'absorbance est alors mesurée au spectrophotomètre à 515 nm.

Le témoin est constitué d'un échantillon identique pour lequel l'enzyme a été préalablement dénaturée à 100°C pendant 10 min avant d'ajouter la solution substrat. Une unité (U) d'activité polygalacturonase est définie comme la libération de 1 µg d'acide galacturonique par min et par ml.

- Analyse de l'activité pectine méthylestérase (PME) contenue dans la Macérozyme R-10 et la Pectolyase Y-23

La pectine méthylestérase (PME) enlève spécifiquement les groupement méthoxyls qui sont substitués sur le C_6 de certains galacturonosyls. La mesure de son activité repose sur la variation du pH engendrée lors de la libération des groupements carboxyles, qui provoquent une acidification du milieu révélée par un indicateur et quantifiée par spectrophotométrie. Le substrat utilisé est la pectine estérifiée à 73 % (Fluka 76282) diluée à 1 % dans une solution NaCl à 0,15 % (pH= 7). L'indicateur de pH est le rouge de méthyle ajouté au substrat à la concentration de 5 %. On ajuste le pH de la solution à 7.

Le mélange réactionnel contient 750 µl de substrat et 750 µl de solution enzymatique (macérozyme ou pectolyase) et est incubé à 35°C dans un bain-marie pendant au moins 2 h. La lecture de l'absorbance se fait au spectrophotomètre à 520 nm. Une unité d'activité PME correspond à 10x le nombre de µl de NaOH 0,01M ajouté à pH=7 et à 35°C.

RÉSULTATS

Isolement de protoplastes

Dans le but d'isoler des protoplastes de mésophylle foliaire ou de cals (de feuilles ou de racines), nous avons optimalisé la solution enzymatique nécessaire à chaque source de tissus et caractérisé la solution optimale par l'analyse des activités spécifiques des enzymes qu'elle contient.

À partir de feuilles, seule la solution contenant 1 % de Cellulase Onozuka R-10 et 0,1 % de Pectolyase Y-23 (comme pectinase) a permis d'isoler 6 x 10^6 protoplastes/g de feuilles présentant une viabilité de l'ordre de 59 %.

L'augmentation ou la diminution de la concentration en Cellulase R-10 ou en Pectolyase Y-23 n'a pas amélioré le rendement en protoplastes ni leur viabilité. Par contre, le remplacement de la cellulase Onozuka R-10 par la cellulase Onozuka RS a permis de doubler le rendement de protoplastes à partir de mésophylle foliaire de la « Montmorency » (de 6 à 14 x 10^6 protoplastes) et d'augmenter leur viabilité de 59 à 79 %.

L'isolement de protoplastes à partir de cals de feuilles et de cals de racines a nécessité l'utilisation 2 % de Cellulase R-10 et 0,03 % Macérozyme R-10 (comme pectinase). Les rendements respectifs obtenus sont 3,5 et 8 x 10^6 protoplastes/g de poids frais avec un taux de viabilité respectif de 86 et 91 %.

Détermination des activités spécifiques des cellulases et pectinases commerciales utilisées pour l'isolement des protoplastes

Une fois la solution enzymatique optimum définie avec différentes préparations commerciales de cellulases et pectinases, nous avons entrepris l'analyse des activités enzymatiques FPase et CMCase et des activités enzymatiques PME (pectineméthylestérase), PL (pectatelyase) et PG (polygalacturonase) qui sont présentes. Les tableaux 1 A & B regroupent les résultats relatifs à ces expériences.

- Activités Spécifiques PME, PL et PG contenues dans les pectinases : Macérozyme R-10 et Pectolyase Y-23

Le dosage de l'activité de la PME réalisé par la méthode spectrophotométrique (Cabra, 1994) a permis de détecter une faible activité PME dans la pectolyase Y-23 (inférieure à 1) et 10 fois plus forte dans la macérozyme R-10. L'activité pectate-lyase (PL) est très faible dans la pectolyase Y-23 (0,32±0,06), et inexistante dans la macérozyme R-10. Par contre, l'activité spécifique polygalacturonase (PG) observée, est approximativement 2 fois plus élevée dans la pectolyase Y-23 que dans la macérozyme R-10. Elle est de 10,60±1,13 pour la pectolyase Y-23 et de 5,32±0,84 pour la macérozyme R-10 (tableau 1-A).

- Activités Spécifiques FPase et CMCase contenues dans les cellulases Onozuka R-10 et RS

L'activité cellulasique a été définie par la capacité de dégrader le papier filtre (FPase) et le carboxyméthylcellulose (CMCase) (tableau 1-B). Il n'y a pas de différences significatives dans l'activité FPase entre la Cellulase Onozuka R-10 dérivant de *Trichoderma viride* et la Cellulase Onozuka RS dérivant du mutant de *Trichoderma viride*; par contre, l'activité CMCase de la Cellulase RS est près de 2 fois plus élevée que celle de la Cellulase R-10. Le fait que l'activité de dégradation du papier filtre (FPase) de la cellulase R-10 est la même que celle de la cellulase RS, laisse supposer que la première contient d'autres enzymes exprimant une activité FPase et n'existant pas dans la Cellulase RS.

Tableau 1-A : Activités spécifiques polygalacturonase (PG), pectate-lyase (PL) et pectineméthylestérase (PME) contenues dans le Macérozyme R-10 et la Pectolyase Y-23.

Quantité d'enzymes	PG	PL	PME
Pectolyase Y-23	10,60 ± 1,13	0,32±0,06	0,93±0,01
Macérozyme R10	5,32 ± 0,84	0	9,70±0,58

La mesure de l'activité PL est effectuée par mesure de la densité optique à 235 nm Une unité d'activité correspond à la variation de 0,18 d'absorbance par min à pH= 8,5 et à 30°C.
L'activité PME est quantifiée par mesure de la densité optique à 520 nm. Une unité d'activité PME correspond à 10x le nombre de µl de NaOH 0,01 M par h, à pH=7 et à 35°.
L'activité PG est définie comme la libération de 1µg d'acide galacturonique par min et par ml.
L'activité enzymatique est exprimée en unités/mg protéine.
Les valeurs entre parenthèses représentent l'erreur standard (3 répétitions).

Tableau 1-B : Activités spécifiques FPase et CMCase contenues dans les cellulases Onozuka R-10 et RS.

Enzymes	FPase (mg équivalent de glucose / mg protéine	CMCase (mg équivalent de glucose / mg protéine
Cellulase RS	2,37 ± 0,3	0,98 ± 0,2
Cellulase R-10	2,34 ± 0,82	0,53 ± 0,09

Fpase : Activité de décomposition du papier filtre. CMCase : Activité de décomposition de la carboxyméthylcellulose.
Une unité d'activité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme libérant 1 mg d'équivalent de glucose par h à partir d'un substrat (papier filtre ou carboxyméthylcellulose).
Les valeurs entre parenthèses représentent l'erreur standard (3 répétitions).

DISCUSSION

Il ressort de nos résultats que la digestion des tissus foliaires de la « Montmorency » nécessite l'utilisation en combinaison de la Cellulase RS et la Pectolyase Y-23 alors que les protoplastes

de cals (de feuilles ou de racines) peuvent être isolés avec la Cellulase R-10 et la Macérozyme R-10. D'autre part, l'utilisation de la Cellulase Onozuka RS et de la Pectolyase Y-23 (comme pectinase) a augmenté significativement le nombre et la viabilité des protoplastes de mésophylle foliaire par rapport à l'utilisation de la Cellulase Onozuka R-10 et de la Macérozyme R-10. Ces résultats sont corrélés avec l'activité spécifique de ces enzymes.

L'analyse de ces activités a permis d'établir une comparaison entre les différentes cellulases et pectinases employées en fonction des tissus sources de protoplastes. La caractérisation de la solution optimale a été effectuée en terme d'activités spécifiques PL, PG et PME des 2 pectinases (Macérozyme R-10 et Pectolyase Y-23) et d'activités FPase et CMCase des 2 cellulases (R-10 et RS) contenues dans les solutions. Ces enzymes clivent les parois végétales en libérant des oligomères par ß-élimination (PL), par hydrolyse (PG) sur des pectines faiblement méthylées ou sur des pectines estérifiées par clivage de la liaison ester du groupement méthoxyl (PME). Les préparations de cellulases contiennent divers composés agissant en synergie pour transformer la cellulose en sucres solubles et ce, par hydrolyse des liaisons ß, 1-4 glycosidiques.

Des différences significatives sont enregistrées entre les 2 pectinases étudiées concernant les activités PME, PG et PL et entre les 2 cellulases concernant l'activité CMCase. La différence la plus marquée entre les 2 pectinases concerne l'activité PG, et entre les 2 cellulases l'activité CMCase. L'utilisation de la Cellulase RS (forte activité CMCase) et de la Pectolyase Y-23 (forte activité PG), a augmenté la macération et la digestion des cellules, permettant l'obtention d'un grand nombre de protoplastes viables de mésophylle foliaire avec très peu de débris cellulaires et de cellules intactes alors qu'à partir de cals, le maximum de protoplastes viables a été obtenu avec la Cellulase R-10 (faible activité CMCase) et Macérozyme R-10 (faible activité PG). Ce qui souligne que la différence de sensibilité des parois de mésophylle foliaire ou de cals (de feuilles ou de racines) à l'action d'une enzyme peut rendre compte de la composition de la paroi comme l'ont évoqué Ochatt & Power (1990).

L'activité des enzymes a été rapportée par plusieurs auteurs comme étant un des facteurs déterminant de l'obtention des protoplastes mais jusqu'à présent, aucune recherche ne s'est intéressée à la relation entre le nombre et la viabilité de protoplastes obtenus d'une part, et l'activité spécifique des enzymes de digestion de la paroi d'autre part. Les auteurs se limitent à citer l'origine (micro-organismes de purification) (Beldman *et al.*, 1985; Grèzes *et al.*, 1994; Mills & Hammerschlag, 1994) ou les valeurs théoriques indiquées par les fournisseurs (Johnson *et al.*, 1982). Le composé de macération de la Macérozyme R-10 isolée de *Rhizopus sp.* (Yakult Pharmaceutical, Japan) est une endopolygalacturonase alors que la Pectolyase Y-23, qui est une enzyme hautement purifiée d'*Aspergillus japonicus* et contient 2 types de pectinases : une endopolygalacturonase et une endopectine lyase qui sont capables de l'hydrolyse des liaisons.

Nous avons caractérisé la solution optimale d'enzymes en terme d'activité spécifique bien que ces seules activités ne permettent pas d'expliquer entièrement, leur action sur la macération et la digestion des parois pectocellulosiques des tissus. Les activités secondaires (a-amylase, protéases...) et les impuretés que contiennent les enzymes commerciales (phénols, sels résiduels) peuvent également influencer l'obtention des protoplastes. D'où la nécessité de parfois purifier ou de dessaler ces préparations en vue d'augmenter le rendement et surtout la viabilité des protoplastes isolés comme le suggèrent Gonzales-Rio & Revilla (1991) sur l'*Actinidia*.

La différence de sensibilité des parois de mésophylle foliaire ou de cals de feuilles ou de racines peut rendre compte de la composition de la paroi. Cette étude préliminaire mérite d'être approfondie et élargie à d'autres enzymes existant dans les préparations commerciales intervenant dans la digestion de la paroi et d'établir les rôles de ces enzymes sur la dégradation de la paroi cellulaire des tissus sources de protoplastes.

Bibliographie

1. BENGOCHEA T., DODDS J.H. [1986]. Isolation, culture and regeneration of plants. In Plant protoplasts : A biotechnological tool for plant improvement. (Eds) brammar W.J & edidin M Chapman & hall. London -New york: 1-43.
2. BRADFORD M.M. [1976]. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 . 248-254.
3. CABRA G. [1994]. Sélection et caractérisation d'un variant somaclonal de pomme de terre résistant à *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica (Van Hall). Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. 121p.
4. CHUPEAU Y., BOURGIN J.P. [1980]. Les protoplastes des cellules végétales. In : Multiplication végétative des plantes supérieures. (Eds) CHAUSSAT R. & BIGOT R. Gauthiers- Villars. Paris
5. DUGAS C.M., LI Q, KHAN I.A., NOTHNAGEL E.A. [1989]. Lateral diffusion in plasma membrane of maize protoplasts with implications for cell culture. *Planta*.. 179: 387-396.
6. GONZALES-RIO T., REVILLA M.A. [1991]. Evaluation of parameters affecting yield viability and cell division of *Actinidiaceae* protoplasts. 8th International protoplast symposium. *Physiologia Plantarum*. 82 (1) A 85.
7. GREZES J., THOMAS D., THOMASSET B. [1994]. Factors influencing protoplast isolation from *Coffea arabica* cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36: 91-97.
8. IMBRIE-MILLIGAN C. HODGES T.K. [1986]. Microcallus formation from Maize protoplasts prepared from embryogenic callus. *Planta* 168: 395-401.
9. JOHNSON L.B., STUTEVILLE D.L., HIGGINS R.K., DOUGLAS H.L. [1982]. Pectolyase Y-23 for isolating mesophyll protoplasts from several Medicago species. *Plant Science Letters*. 26 133-137.
10. KAMOUN R. [1996]. Culture de protoplastes et contaminants procaryotiques de Prunus cerasus L. « Montmorency ». Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. 150p.
11. MILLS D., HAMMERSCHLAG F.A. [1994]. Isolation of cells and protoplasts from leaves of *in vitro* propagated peach (*Prunus persica*) plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36: 99-105.
12. NOAT G., NARI J., MOUSTACAS A-M., BOREL M. [1991]. Propriétés des parois cellulaires végétales et interaction matrice-enzymes. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 138, Actualités botaniques (3/4): 263-277.
13. OCHATTS J., POWER J.B. [1990]. Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In: Comprehensive Biotechnology. (Ed) Moo-Young M., Warren G.S., Fowler M.W. Pergamon Press. New York : 100-127.
14. PATNAIK G., WILSON D., COCKING E.C. [1982]. Importance of enzyme purification for increasing plating efficiency and plant regeneration from single protoplasts of *Petunia purodii*. *Z Pflanzenphysiol*. 102: 199-205.
15. PILET P.E. [1972]. Transaminase activities of root protoplasts. *Experientia* 28: 638- 639.
16. SHEA E.M., GIBEAUT D.M., CARPITA N.C. [1989]. Structural analysis of the cell walls regenerated by carrot protoplasts. *Planta* 179: 293-308.
17. THIBAULT J.F. [1980]. Les substances pectiques, In : Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés. (Eds) MONTIES B. Gauthier-Villars. 233-251.

E8 : Utilisation de l'électrofusion de protoplastes pour l'amélioration de la Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.)

ELLOUZ O.[1], LAKHOUA L.[1], JADARI R.[2], MUSSIO I.[3], SERVAES A.[3], AMBROISE A.[3], DUCREUX G.[3], SIHACHAKR D.[3]

[1] Laboratoire de Culture *in vitro*, École Nationale d'Ingénieurs de Sfax (ENIS), BP " W ", 3038 Sfax, Tunisie ;

[2] Laboratoire de Culture *in vitro*, Dept d'Horticulture, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (IAVH), Rabat Institut, BP 6202, Rabat, Maroc ;

[3] Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât. 360, Université Paris Sud, 91405 Orsay Cedex, France : télécopie : +33 (0)1 69 85 54 90, e.mail : dara.sihachakr@mve.u-psud.fr

INTRODUCTION

Les variétés de pomme de terre cultivée sont toutes tétraploïdes (2n = 4x = 48 chromosomes) (Rossignol et al. 1996). L'état tétraploïde améliore la vigueur, le rendement et la qualité des tubercules ; mais la sélection au niveau tétraploïde est longue et laborieuse. La sélection au niveau diploïde est possible grâce à l'obtention des génotypes diploïdes à partir des variétés tétraploïdes par parthénogenèse (Hougas et Peloquin 1957). De plus, elle permet aussi, par croisements sexués, l'accès à l'importante source de variabilité génétique et de résistance constituée par des espèces sauvages ou primitives apparentées à la pomme de terre et diploïdes pour la plupart. Toutefois, ces diploïdes améliorés ne peuvent constituer, en aucun cas, des variétés, et il est nécessaire de revenir au niveau tétraploïde. Ainsi, dans les programmes d'amélioration de la Pomme de terre, l'hybridation somatique, notamment intraspécifique, peut se situer en aval de la sélection pour combiner ensemble des génotypes dihaploïdes sélectionnés (2n = 2x = 24) afin de les remonter au niveau tétraploïde (2n = 4x = 48) tout en maintenant l'état hétérozygote indispensable à une bonne vigueur, et indépendamment de la reproduction sexuée. Les hybrides ainsi obtenus peuvent constituer de nouvelles variétés immédiatement utilisables, s'ils répondent aux critères agronomiques et commerciaux exigés (Debnath et Wenzel 1987 ; Chaput et al. 1990 ; Millam et al. 1995 ; Pehu 1996).

Dans ce travail, nous avons combiné ensemble trois génotypes dihaploïdes (Aminca, Cardinal et Nicola) de pomme de terre par électrofusion de protoplastes, afin d'étudier le comportement des hybrides somatiques obtenus et d'isoler les meilleures combinaisons génomiques de pomme de terre.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Trois clones dihaploïdes de Pomme de terre (2n = 2x= 24), gracieusement fournis par l'INRA de Landerneau – France, sont utilisés pour réaliser des fusions intraspécifiques : Nicola H1, Aminca H6 et Cardinal H14. Les génotypes dihaploïdes sélectionnés présentent certaines caractéristiques intéressantes, telles qu'une très grande productivité en Tunisie pour la variété Nicola, une maturation très précoce et une dormance de courte durée du tubercule pour Aminca, et une bonne qualité de tubercules à peau rouge pour Cardinal. De plus, Aminca et Cardinal sont résistantes au pathotype A du nématode doré et à certains virus.

La micropropagation des clones est réalisée par microbouturage sur le milieu de MS (Murashige et Skoog 1962) additionné de vitamines (Morel et Wetmore 1951), de 20 g/l de saccharose et solidifié par l'ajout de 8 g/l d'agar. Les cultures sont exposées à une photopériode de 12 h/j de lumière d'une intensité de 62 $\mu M/m^2/s$ et à une température 20° C.

Isolement et culture des protoplastes, et régénération de plantes

Le protocole d'isolement de protoplastes et de régénération de plantes a été précédemment décrit (Chaput et al. 1990). Brièvement, des mésophylles prélevés sur des plantes *in vitro* âgées de 3-4 semaines ont été scarifiés et mis en incubation dans une solution enzymatique composée de sels minéraux (Frearson et al. 1973), de 0,5 % (m/v) de Cellulase RS, de 0,05 % (m/v) de Pectolyase Y23 et de 0,5 M de mannitol, le pH étant ajusté à 5,5. Après une période de digestion de 16 h à 27°C et à l'obscurité, les protoplastes ont été purifiés et rincés respectivement dans une solution de saccharose à 21 % (m/v), et une solution de rinçage contenant 0,5 M de mannitol et 0,5 mM de $CaCl_2$.

Les protoplastes fusionnés sont cultivés dans le milieu liquide V-KM (Binding et al. 1978) additionné de 250 mg/l de polyéthylène glycol (PEG), de 0,2 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxylacétique (2,4-D), de 0,5 mg/l de zéatine et de 1 mg/l d'acide α-naphthalèneacétique (ANA). La pression osmotique est assurée par l'ajout de 0,18 M de glucose et de 0,18 M de mannitol.

Les cals suffisamment développés ont été repiqués dans le milieu de régénération MS (Murashige et Skoog 1962) contenant notamment 2 mg/l de zéatine et 0,1 mg/l d'acide indole-3-acétique (AIA).

Protocole d'électrofusion

L'appareillage d'électrofusion et le protocole de fusion ont été précédemment décrits (Sihachakr et al. 1988). Brièvement, la chambre de fusion, constituée d'électrodes parallèles, est placée au fond d'une boîte de pétri (15 x 50 mm) contenant environ 600-700 µl d'un mélange, à parties égales, de protoplastes des deux parents. La densité des suspensions de protoplastes est ajustée à 4×10^5 protoplastes/ml. L'application d'un courant sinusoïdal de haute fréquence (1 MHz) pendant 15 s provoque l'alignement des protoplastes, assurant ainsi le contact membranaire nécessaire à la fusion cellulaire. La fusion est réalisée à la suite de l'application de 1-2 impulsions d'un champ électrique d'une amplitude de 1,2 KV/cm, pendant 40 µs chacune.

Analyse morphologique en serre

Les plantes sélectionnées, qui sont des hybrides putatifs, et les clones parentaux sont transférées en serre pour une étude morphologique des parties aérienne et souterraine.

Analyse des isoenzymes

Les extraits bruts ont été préparés à partir de plantes obtenues *in vitro* âgées de six à huit semaines. Les systèmes de phosphoglucomutase (Pgm), d'isocitrate déshydrogénase (Idh) et de malate déshydrogénase(Mdh) sont analysés par électrophorèse sur gel d'amidon à 13 % selon le protocole décrit par Chaput et al. (1990). Les systèmes des péroxydases (Prx) et des estérase (Est) sont révélés sur gel de polyacrylamide selon le protocole de Cavalcante et al. (1994).

Étude cytologique

Les comptages chromosomiques ont été réalisés sur l'apex racinaire prélevé sur des plantes, après une semaine de repiquage sur le milieu MS additionné de 0,02 mg/l d'ANA afin de favoriser l'apparition de racines adventives. La coloration a été faite au carmin acétique (Sihachakr et al. 1988).

Étude de la microtubérisation

Pour cette étude, le protocole de microtubérisation mis au point par Lakhoua et Ellouz (1990) a été utilisé. Brièvement, des boutures nodales munies de la feuille axillaire ont été repiquées sur du milieu MS, contenant une quantité double des macroéléments, 80 g/l de saccharose, 5 mg/l de benzylaminopurine (BAP) et solidifié par 8 g/l d'agar. Les cultures sont exposées à la lumière pendant 2 semaines avant d'être transférées à l'obscurité à 20° C. Nous avons suivi le phénomène de tubérisation *in vitro* et estimé le taux de tubérisation [(nombre de boutures tubérisées/nombre de boutures ayant démarrées) x 100] pendant 55 jours.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Afin d'optimiser le taux de fusion, deux paramètres ont été testés sur des protoplastes isolés : la concentration en ions Ca^{2+} et l'amplitude du courant continu. Le taux de fusion est optimal pour une concentration de 0,5 mM d'ions calcium sous une amplitude de 1250V/cm ; tandis qu'à 1 mM ou en absence de Ca^{2+}, le taux de fusion se trouve à un niveau très faible pour tous voltages confondus. Ces observations sont en accord avec des travaux antérieurs concernant l'amélioration du taux de fusion, notamment binaire, par la présence d'ions Ca^{2+} (Tempelaar et al. 1987 ; Sihachakr et al. 1994). Par ailleurs, on a constaté que le taux de fusion reste à un niveau très bas pour un faible voltage (1000 V/cm) quelle que soit la concentration en ions calcium utilisée. Pour des voltages élevés, supérieurs à 1250 V/cm, on assiste à l'éclatement des protoplastes et aussi à la formation de fusions multiples.

Dans le milieu VKM (Binding et al. 1978), la plupart des protoplastes issus du traitement électrique synthétisent une paroi cellulaire en 48 h. Après 10 j de culture, 75 % des protoplastes traités survivent, mais seulement 6,5 % d'entre eux ont subi des divisions soutenues aboutissant à la formation de microcals visibles à l'œil nu après 2 semaines de culture. Un début de brunissement des microcals apparaît deux semaines plus tard, nécessitant l'apport du milieu frais pour renouveler les constituants nutritifs favorables au développement cellulaire (Sihachakr et al. 1994). Les cultures sont alors diluées 10 fois dans le milieu VKM dont les régulateurs de croissance ont été remplacés par 0,2 mg/l de 2,4-D et 2 mg/l de BAP. Cependant, un séjour trop prolongé (au-delà de 6-8 semaines) dans ce milieu de dilution conduit à l'arrêt de croissance des cals dont certains brunissent et meurent quelques semaines plus tard. Le maintien d'une croissance rapide et soutenue de cals nécessite leur transfert, à l'aide d'une pipette de 5 ml, sur du milieu MS (Murashige et Skoog 1962) solide contenant des vitamines (Morel et Wetmore 1951), 20 g/l de saccharose, 7 g/l d'agar et une combinaison de 0,5 mg/l de zéatine et de 0,5 mg/l d'ANA. Après 2 à 3 semaines sur le milieu de croissance, les cals suffisamment développés sont transférés sur le milieu de régénération contenant notamment 2 mg/l de zéatine et 0,1 mg/l d'AIA. Les premières régénérations apparaissent au bout de 4-5 semaines de culture. En moyenne, le taux de régénération est estimé à 6-7 % après 6 à 8 semaines de culture. Les jeunes pousses développées d'environ 2 cm sont séparées de leur cal et transférées sur le milieu de multiplication pour des analyses ultérieures.

La sélection préliminaire des structures hybrides est basée sur la vigueur et le comportement des plantes *in vitro*. Ainsi, parmi les 75 plantes régénérées à partir du couple de fusion (Am, Car), nous avons sélectionné 3 plantes hybrides putatives, et 2 autres parmi les 54 régénérées du couple de fusion (Car, Ni). Les 5 plantes sélectionnées sont toutes tétraploïdes. Transplantées en serre, elles sont très vigoureuses et dépassent en hauteur les clones parentaux. Elles présentent une morphologie intermédiaire et sont capables de tubériser. Les tubercules issus de plantes sélectionnées ont une peau rose intermédiaire entre la peau rouge des tubercules de la variété Cardinal et jaune des variétés Aminca et Nicola. La nature hybride des plantes sélectionnées a été confirmée par l'analyse des isoenzymes dont le profil présente les bandes complémentaires des clones parentaux et aussi une bande supplémentaire spécifique de l'état hybride notamment pour les systèmes Mdh et Idh.

La stabilité et la morphologie normale des plantes hybrides somatiques obtenues dans cette étude sont sans doute liées à leur état tétraploïde stable. Ceci est probablement dû à l'utilisation de tissus différenciés tels que le mésophylle comme source de protoplastes (Guri et Sink 1988 ; Sihachakr et al. 1988, 1994 ; Jadari et al. 1992 ; Serraf et al. 1994). Les résultats obtenus dans ce travail sont en accord avec d'autres auteurs concernant la régénération des hybrides somatiques tétraploïdes à partir de fusions somatiques intraspécifiques (Debnath et Wenzel 1987 ; Chaput et al. 1990) et interspécifiques chez la pomme de terre (Fish et al. 1988 ; Serraf et al. 1991 ; Jadari et al. 1992). Par contre, d'autres travaux ont abouti à l'obtention de structures hybrides somatiques hexaploïdes et mixoploïdes (Waara et al. 1991) ou même octoploïdes de pomme de terre (Puite et al. 1986).

L'évaluation préliminaire de la capacité à tubériser *in vitro* a montré que les clones hybrides forment les tubercules très tôt. Après 55 j de culture, tous les clones hybrides ont tubérisé à 100 %, alors que seulement la moitié des clones parentaux a initié à peine la tubérisation. Les

différentes caractéristiques des tubercules obtenus *in vitro* sont résumées dans le tableau 1. La masse moyenne des microtubercules hybrides et leur calibre sont nettement supérieurs à ceux des clones parentaux. De plus, ils ont une peau de couleur rose, confirmant ainsi la nature hybride des clones sélectionnés.

Tableau 1. Caractéristiques des microtubercules formés par des hybrides somatiques et des clones parentaux (Ellouz 1995)

Génotype	Masse moyenne (mg/tubercule)	Long. moy. (mm)	Larg. Moy. (mm)	Couleur
Cardinal (2x)	19,2±5,1	2,9±0,4	2,4±0,3	Rouge
Nicola (2x)	8,1±4,9	2,5±0,7	1,6±0,3	Jaune
Nicola (4x)	7,7±2,7	2,5±0,5	1,8±0,3	Jaune
Car-Ni 1	114,3±16,5	6,5±0,4	5,3±0,3	Rose
Car-Ni 2	87,3±10,7	5,9±0,4	4,6±0,3	Rose
Aminca (2x)	22,2±3,2	3,2±0,3	2,8±0,3	Jaune
Am-Car 2'	56,6±6,3	5,4±0,5	4,0±0,2	Rose
Am-Car 31	80,0±14,8	5,8±0,6	4,8±0,3	Rose
Am-Car 33	76,9	5,9	4,3	Rose

Les hybrides somatiques intraspécifiques de pomme de terre obtenus dans cette étude présentent une vigueur importante qui se traduit au niveau de la morphologie générale des plantes, de la croissance en hauteur et de la taille des feuilles, ainsi qu'au niveau de la tubérisation *in vitro*. Cette vigueur est certainement due à l'état tétraploïde hétérozygote obtenu à la suite de fusion entre deux protoplastes différents. Des résultats similaires concernant la vigueur des hybrides somatiques intraspécifiques de pomme de terre ont été obtenus par d'autres chercheurs (Austin et al. 1985 ; Debnath et Wenzel 1987 ; Chaput et al. 1990 ; Rasmussen et al. 1996).

CONCLUSION

L'efficacité de la méthode de fusion et de régénération de protoplastes utilisée pour l'obtention des structures hybrides somatiques, associée à la maîtrise de la technique de multiplication notamment à travers les microtubercules, ouvre sans doute de nouvelles perspectives pour l'intégration de ces techniques nouvelles dans les programmes de sélection de la pomme de terre en complément des méthodes conventionnelles. Dans ce cas, il est possible d'étendre le processus de production et de diffusion rapide à d'autres génotypes intéressants, dont le choix se fera en fonction de la complémentarité de leurs caractères, des contraintes environnementales et aussi des exigences des consommateurs.

Remerciements

Nous remercions le Comité Mixte de Coopération Universitaire (CMCU) (Coopération Franco-Tunisienne) et le Fonds International de Coopération Universitaire (FICU) (AUPELF.UREF) pour leur soutien financier.

Bibliographie

1. AUSTIN S., BAER M.A., HELGESON J.P. (1985) Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. Plant Sci 39:75-82.
2. BINDING H., NEHLS R., SCHIEDER O., SOPORY S.K., WENZEL G. (1978) Regeneration of mesophyll protoplasts isolated from dihaploid clones of *Solanum tuberosum*. Physiol Plant 43 :52-54.
3. CAVALCANTE ALVES J.M., SIHACHAKR D., ALLOT M , TIZROUTINE S., MUSSIO I., SERVAES A , DUCREUX G. (1994) Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomeoa batatas* L. Lam.) Plant Cell Rep 13. 437-441
4. CHAPUT M.H., SIHACHAKR D., DUCREUX G., MARIE D., BARGHI N. (1990) Somatic hybrid plants produced by electrofusion between dihaploid potatoes : BF15 (H1), Aminca (H6) and Cardinal (H3). Plant Cell Rep 9 :411-414.
5. DEBNATH S.C., WENZEL G. (1987) Selection of somatic fusion products in potato by hybrid vigour. Potato Res 30 :371-380.
6. ELLOUZ O. (1995) Amélioration de la pomme de terre par hybridation somatique Thèse spécialité Ecole Nationale des Ingénieurs Sfax, Tunisie.
7. FISH N., KARP A., JONES M.J.K. (1988) Production of somatic hybrids by electrofusion in Solanum Theor Appl Genet 76 : 260-266.
8. FREARSON E.M., POWER J.B., COCKING E.C. (1973) the isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. Dev Biol 33 :130-137.
9. GURI A., SINK K.C. (1988) Interspecific somatic hybrid plants between eggplant (*Solanum melongena*) and *Solanum torvum*. Theor Appl Genet 76 · 490-496.
10. HOUGAS R.W., PELOQUIN S.J. (1957) A haploid plant of potato variety Katadin. Nature 180 1209-1210.
11. JADARI R., SIHACHAKR D., ROSSIGNOL L., DUCREUX G. (1992) Transfer of resistance to *Verticillium dalhiae* Kleb. from *Solanum torvum* SW into potato (*Solanum tuberosum* L) by protoplast electrofusion. Euphytica 64 :39-47.
12. LAKHOUA L., ELLOUZ O. (1990) Induction de la microtubérisation chez *Solanum tuberosum* L var Spunta. In : 'Cinquantenaire de la culture *in vitro* chez les végétaux'. Les colloques de l' INRA (N°51) (DORE C., ed). pp: 279-281.
13. MILLAM S., PAYNE L.A., MACKAY G.R. (1995) The integration of protoplast-derived material into a potato breeding program. A review of progress and problems. Euphytica 85 : 451-455.
14. MOREL G. WETMORE R.H. (1951) Fern callus tissue culture. Am. J. Bot , 38.141-143.
15. MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15 : 473-497.
16. PEHU E. (1996) The current status of knowledge on the cellular biology of potato. Potato Res 39 . 429-435.
17. PUITE K.J.S., ROEST S., PIJNACKER LP. (1986) Somatic hybrid potato plants after electrofusion of dihaploid *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. Plant Cell Rep 5 : 262-265.
18. RASMUSSEN J.O., NEPPER J.P., RASMUSSEN O.S (1996) Analysis of somatic hybrids between 2 sterile dihaploid *Solanum tuberosum* L. breeding lines ; restoration of fertility and complementation of Globodera pallida Pa2 and Pa3 resistance. Theor Appl Genet 92 : 403-410
19. ROSSIGNOL L., ROUSSELLE-BOURGEOISE F. (1996) Botanique, morphologie et taxinomie. In . P Rousselle, Y Robert, PC Crosnier (eds) La pomme de terre, INRA Editions, Paris, pp49-69
20. SERRAF I., SIHACHAKR D., BROWN S., BARGHI N., DUCREUX G., ROSSIGNOL L. (1991) Interspecific somatic hybridization in potato by electrofusion. Plant Sci 76 . 115-126.
21. SERRAF I., TIZROUTINE S., CHAPUT M.H., ALLOT M , MUSSIO I., SIHACHAKR D , ROSSIGNOL L., DUCREUX G. (1994) Production and characterization of intergeneric somatic hybrids through protoplast electrofusion between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *Lycopersicon pennellii*. Plant Cell Tissue Org Cult 37: 137-144.
22 SIHACHAKR D., DAUNAY M.C., SERRAF I., CHAPUT M.H., MUSSIO I., HAICOUR R., ROSSIGNOL L., DUCREUX G. (1994) Somatic hybridization of eggplant (*Solanum melongena* L) with its close and wild relatives. In : Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, Vol 27, Somatic hybridization in crop improvement I. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp255-278
23. SIHACHAKR D., HAÏCOUR R., SERRAF I., BARRIENTOS E , HERBRETEAU C , DUCREUX G., ROSSIGNOL L., SOUVANNAVONG V. (1988) Electrofusion for the production of somatic hybrid plants of *Solanum melongena* L. and *Solanum khasianum* CV Clark. Plant Sci 57 :215-223.
24. TEMPELAAR M.J., DUYST A., DE VLAS S.Y., KROL G., SYMMONDS C., JONES M J K. (1987) Modulation and direction of the electrofusion response in plant protoplasts. Plant Sci. 48 : 99-105.
25. WAARA S., WALLIN A., ERIKSSON T. (1991) Production and analysis of intraspecific somatic hybrids of potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Sci 75 : 107-115.

E9 : Production de fruits et d'embryons diploïdes par traitement a l'acide gibbérellique des inflorescences non pollinisées du palmier dattier (*phoenix dactylofera* l.).

BEN ABDALLAH A.[1], LEPOIVRE P.[2], DU JARDIN P.[3]

[1] : Laboratoire de culture de tissus et d'amélioration du palmier dattier, Centre de Recherches Phoenicicoles, INRAT, 2260 Degache, Tunisie.

[2] :Unité de Phytopathologie et [3] : Unité de Biologie végétale, Faculté universitaire des Sciences agronomiques, Gembloux, Belgique.

INTRODUCTION

L'acide gibbérellique (AG) est une hormone dont les effets sur la croissance et le développement des plantes sont très nombreux. Au moment de la floraison, l'application d'AG améliore la nouaison et la fructification de nombreuses espèces fruitières comme le poirier, le pommier ou les *Citrus* (Gianfagna, 1995).

Chez le palmier dattier, on sait que le traitement à l'acide gibbérellique des inflorescences femelles lors de l'éclatement des spathes permet d'améliorer le taux de nouaison, le taux de fructification et augmente le poids des fruits (Abbas et Seif, 1993).

Ce travail tente de préciser l'action de l'acide gibbérellique sur la fructification du palmier dattier en appliquant les traitements d'AG3 en conditions contrôlées de pollinisation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Quatre cultivars femelles ont fait l'objet de nos travaux menés au cours de 2 années successives : Deglet nour, Allig et Menakher (3 cultivars à dattes demi molles) et Kentichi (cultivar à datte sèche). Pour chaque cultivar, nous avons utilisé un plant sur lequel huit inflorescences ont été sélectionnées (permettant six traitements différents à l'acide gibbérellique et les 2 témoins). Différentes solutions aqueuses d'acide gibbérellique (AG3-Sigma lot 126F-O116) ont été appliquées par pulvérisation au niveau d'une inflorescence sur chaque plant des 4 cultivars. Au niveau de chaque plant, deux inflorescences ont été retenues comme témoins. La première de ces inflorescences (témoin T1) est restée non pollinisée et non traitée à l'acide gibbérellique tandis que la seconde (témoin T2) a été pollinisée normalement avec le pollen récolté du génotype T23 (identifié comme étant un bon pollinisateur de ces cultivars femelles).

Avant l'éclatement des spathes, les inflorescences ont été ensachées avec du papier kraft. Une première pulvérisation d'acide gibbérellique a été réalisée lors de leur éclatement, suivie d'une pulvérisation avec la même concentration, sept jours plus tard. L'ensachage a été maintenu pendant un mois jusqu'à la nouaison afin d'éviter toute pollinisation non contrôlée. Le témoin T1 a été maintenu ensaché jusqu'à la nouaison.

À l'enlèvement des sacs, un mois après le dernier traitement, le nombre de fruits noués et de cupules de fleurs chutées ont été dénombrés par épillets et le pourcentage de nouaison (rapport entre les fruits noués et le nombre total des fleurs) est alors calculé. À la maturité des fruits, les noyaux ont été récoltés, mis à germer et le niveaux de ploïdie des plantules a été déterminé par cytométrie de flux.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les traitements à l'AG des inflorescences non pollinisées des quatre cultivars femelles étudiés (Deglet nour, Allig, Kentichi et Menakher) a permis d'obtenir une nouaison et la formation de

fruits (contenant des noyaux d'aspect normaux) avec des taux variables selon les cultivars mais avoisinant les taux de nouaison observés chez les témoins pollinisés normalement (30 à 45 %) alors que les inflorescences non pollinisées et non traitées avec AG n'ont donné que peu de fruits noués (0,9 à 9%) et aucun embryon (tableau 1).

Tableau 1 : % de fruits noués sur les inflorescences traitées avec AG3.

Cultivars	Concentration en AG3 (mg/ml)								T1	T2
	1	3	5	10	30	60	100	200		
Deglet Nour			35,4	31,1	20,6	29	20,8	31,3	0.9	45.4
Allig			26,8	28,9	32,8	28,9	33,0	26,0	4,0	35,6
Menakher	14,6	39,3	24,5	20,7	13	17,6			1,0	34.0
Kentichi	64,4	36,2	41,2	41,6	38,6	41,0			9,4	38

Les différents paramètres ont été mesurés en utilisant 20 fruits par traitement. Des différences significatives (test de Newman et Keuls au seuil de 5 %) ont été observées au niveau du poids frais des fruits (tableau 2).

Tableau 2 : Effet des traitements des inflorescences à l'(AG3 sur le poids frais.

Cultivars	Concentration en AG3 (mg/ml)								T2
	1	3	5	10	30	60	100	200	
Deglet Nour			17,1	16,6	15,0	13,4	16,1	12.8	12.4
Allig			12,0	11,5	10,8	10,4	12,2	11.3	10.3
Menakher	22,5	19,4	17,8	18,4	17,5	18,6			19,3
Kentichi	8,5	7,8	8,1	7,5	8,0	8,2			7,4

Par rapport aux fruits obtenus par pollinisation, le traitement à l'AG3 a entraîné une augmentation du poids moyen des fruits mais l'AG3 n'a eu aucun effet significatif sur le poids moyen des noyaux ainsi que sur la dimension des fruits (longueur et diamètre). Les dattes récoltées après traitement à l'AG3 contiennent moins de sucre totaux (25 à 30 % au lieu des 50 % chez T2), mais leur contenu en glucose et fructose reste inchangé (résultats non publiés).

Les noyaux obtenus à partir des fruits récoltés des inflorescences traitées à l'AG montrent, toutes concentrations d'AG3 confondues, un % de germination identique à celui des noyaux obtenus par fécondation normale. Cinquante plantules issues de ces noyaux présentent toutes un niveau de ploïdie identique aux plantes recoltée sur T2 et obtenues par hybridation classique (tableau 3).

Tableau 3 : % de germination et niveau de ploïdie des cultivars.

Cultivars	% de germination	
	Traitement à l'AG3	T2
Deglet Nour	96/120 (2n)	18/20 (2n)
Kentichi	72/120 (2n)	16/20 (2n)

Les plantes obtenues par traitement à l'AG3 des inflorescences non pollinisées pourraient provenir (1) d'une pseudogamie et d'une parthénogenèse induite *in situ*, résultant en la formation des haploïdes doublés ou plus probablement (2) une apomixie gamétophytique qui donne des diploïdes sans qu'il y ait méiose. Les haploïdes doublés permettraient d'accélérer les programme d'amélioration du palmier dattier. Par contre, l'apomixie permettrait d'obtenir des plantes conformes aux plantes mères, par simple traitement à l'acide gibbérellique et germination directe, sans passage par la culture *in vitro*.

Nos plantes obtenues à partir d'embryons non fécondés sont en cours d'analyse (origine et statut génétique par rapport aux parents) par observation sur le terrain et l'utilisation de marqueurs moléculaires de type RAPD et AFLP.

Bibliographie

1. GIANFAGNA T. 1995. In : Davies P.J. (éd.) Plant hormones. New York Kluwer Academic Publishers, pp 751-773.
2. ABBAS M.A., SEIF A.S. 1993. In : Al-Hosieny M.P. (éd.) Abstract of the third symposium on date palm Al-Ahsa Press, pp 100.

E10 : Caractérisation de la capacité androgénétique de quelques variétés de blé dur d'origine tunisienne

SLIM AMARA H[1]., DAALOUL A.[1], BENZAGHOU S.[2], LEPOIVRE P.[2]

[1] Laboratoire de Génétique et Amélioration des Plantes, Département des Sciences de la Production Végétale, Institut National Agronomique Tunis, Tunisie.

[2] Unité de Phytopathologie, Faculté Universitaire des Sciences agronomiques, Gembloux. Belgique.

INTRODUCTION

La maîtrise des techniques conduisant à l'obtention et à l'utilisation de plantes haploïdes chez les espèces de grande culture est un objectif prioritaire pour les programmes d'amélioration. Parmi les techniques d'obtention d'haploïdes, les cultures d'anthères constituent l'approche la plus aisée sur le plan pratique et consiste à dévier le développement normal du gamétophyte mâle vers la voie sporophytique. Il existe cependant des espèces cultivées, comme le blé dur, qui demeurent récalcitrantes à l'androgenèse ou pour lesquelles les faibles taux de réussite rendent cette approche inutilisable en pratique (induction médiocre de cals ou embryons haploïdes, régénération difficile des plantes à partir des structures multicellulaires induites, obtention de plantes albinos, ...).

Notre travail a consisté à caractériser le comportement androgénétique de quelques variétés de blé dur, sur le plan de leur capacité à régénérer des plantes et sur le plan du développement cytologique des microspores.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel végétal est constitué de 6 variétés de blé dur dont trois variétés tunisiennes traditionnelles [(Azizi AP9, Jenah Khotifa AP4 et Khiar) travaillées à la fois à Tunis et à Gembloux] et deux variétés améliorées [Cham 1 et Om rabia 5 (travaillées uniquement à Tunis)].

Les plantes donneuses ont été cultivées au champ (Tunis) ou en serre (Gembloux). Les épis, prélevés lorsque les microspores se trouvaient au stade uninucléé moyen à tardif, ont ensuite été soumis à un prétraitement au froid [5°C pendant 7 jours (Gembloux) ou 4°C pendant 2 jours (Tunis)] avant d'être désinfectés à l'hypochlorite. Les anthères ont ensuite été mises en culture à raison de 60 (Tunis) à 100 (Gembloux) par boîte de Petri.

Dans un premier temps, nous avons comparé le milieu d'induction I2 proposé par l'ICARDA et caractérisé par 5 mg/l de $AgNO_3$ et 2 mg/l de 2,4 D (Lashermes *et al.*, 1991) (= milieu 1) avec le même milieu de base contenant 0,5 mg/l de kinétine et 100 mg/l de PAA (acide phényl acétique) (= milieu 2). Les embryoïdes induits à partir des microspsores ont été successivement transférés sur le milieu de régénération RW et MP (Lashermes *et al.*, 1991).

Une analyse cytologique du développement des microspores durant la phase d'induction *in vitro* a été menée par des observations réalisées tous les 7 jours.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

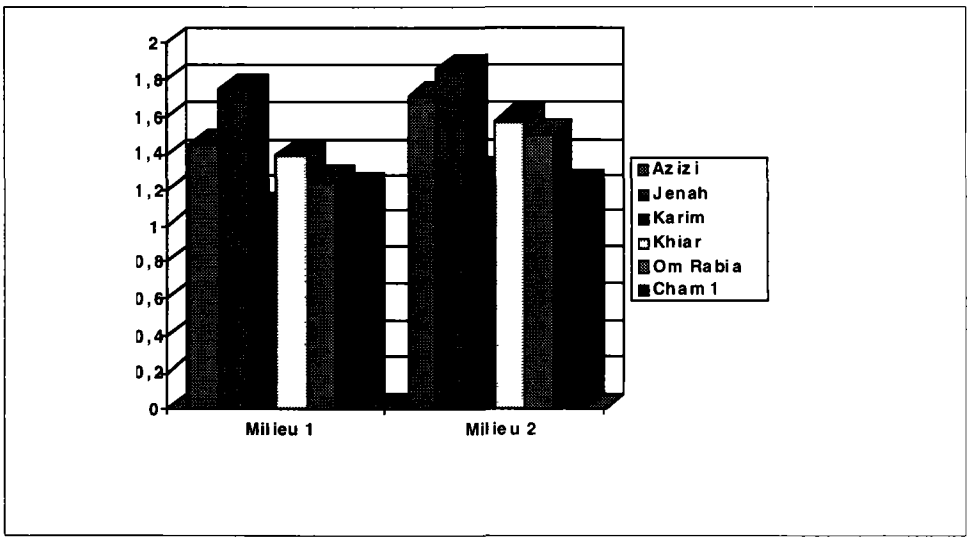
Réactivité des différentes variétés et effet du milieu d'induction

L'analyse des paramètres androgénétiques (% d'anthères embryogènes ou callogènes et proportion de plantes régénérées à partir de ces structures) a montré un effet du génotype hautement significatif. Pour l'ensemble des 2 milieux, ce sont les variétés Jenah Khotifa AP4, Azizi AP9 et Khiar qui se sont montrées les plus réactives (avec une proportion maximale

d'anthères réactives de 2 % chez la variété Jenah Khotifa) que les plantes donneuses aient été cultivées en serre (Gembloux) ou au champ (Tunis) (Figure 1).

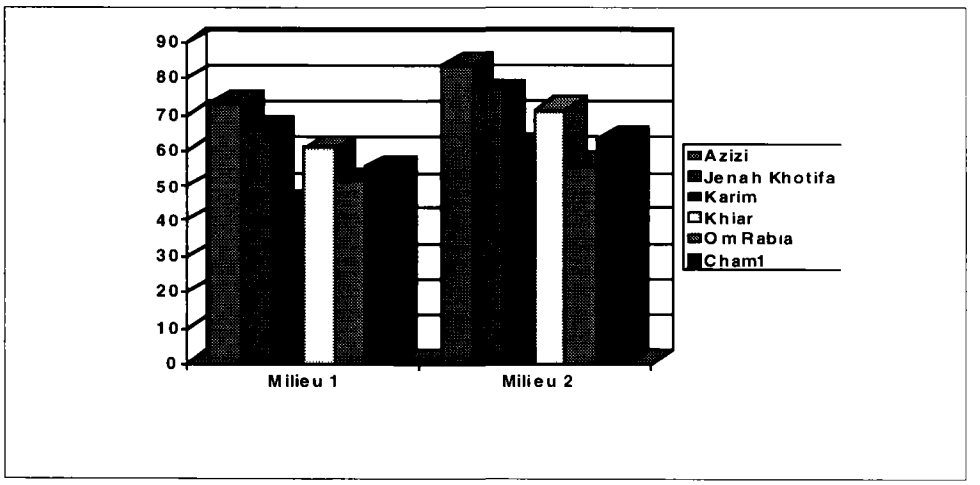
Alors que le pourcentage d'anthères réactives sur ce milieu d'induction reste faible, la proportion des structures multicellulaires ainsi induites qui ont abouti ultérieurement à la régénération de plantules a atteint près de 60 à 70 % avec une proportion élevée de plantes vertes (jusqu'à près de 85 % pour la variété Azizi) à Tunis alors que seules des plantes albinos se retrouvaient parmi les régénérats à Gembloux.

Figure 1. % d'anthères réactives sur les milieux d'induction 1 (résultats obtenus avec les plantes donneuses cultivées aux champs en Tunisie.



L'apport de PAA et de kinétine a montré un effet favorable pour le % d'anthères réactives sur le milieu 1 d'induction mais a également eu un effet positif sur la régénération ultérieure de plantes vertes (Figure 2) notamment en diminuant le taux d'albinisme. Les concentrations de PAA comprises entre 100 et 150 mg/l et de kinétine entre 0,5 et 1 mg/l se sont avérées les plus performantes pour les variétés Azizi et Cham1.

Figure 2. Effets des milieux d'induction sur la proportion de plantes vertes régénérées (résultats obtenus avec les plantes donneuses cultivées aux champs en Tunisie).



L'analyse cytologique du développement des microspores

L'analyse du développement des microspores a montré que les étapes de l'androgenèse chez le blé dur étaient qualitativement identiques à celles observées chez le triticale (Schumann, 1990) tout en présentant une évolution plus lente. Dans nos conditions de culture, les premières divisions de microspores ont commencé à être observées à partir du 15ème jour de mise en incubation. La première division observée dans le milieu d'induction était généralement de type symétrique, une division asymétrique étant parfois observée avec une fréquence moindre.

En cas de division équationnelle, la microspores uninucléée donnait deux noyaux fils identiques possédant chacun une grande taille et une chromatine diffuse. Ce type de division se poursuivait pour donner des structures possédant six, huit, dix, douze noyaux voir même plus. Dans le cas de division asymétrique, le noyau de la microspore se divisait en formant un noyau de type végétatif et un noyau de type génératif. Le noyau génératif restait latent (une division a parfois été observée) alors que le noyau végétatif continuait à se diviser pour donner une structure multicellulaire. Ces divisions se sont traduites par la formation de microstructures possédant un caractère callogène (cellules larges, disposées de manière lâche et possédant de grandes vacuoles) ou plus fréquemment un caractère embryoïde (cellules à cytoplasme dense et peu vacuolisées).

Bibliographie

1. LASHERMES P., ENGIN G. ORTIZ-FERRARA G. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L) adapted to dry areas of West Asia and North Africa. J. Genet Breed 45, 33-38, 1991
2. SCHUMANN G. *In vitro* production of haploids in Triticale. In . Bajaj Y. P. S. (Ed). Biotechnology in Agriculture and forestery. Vol 13 : Wheat. Springer Verlag. Berlin, pp· 382-402, 1990

E11 : Les capacités de régénération par voie végétative de l'*Albizzia julibrissin*. Influence de la nutrition carbonée sur les phénomènes de callogenèse et d'organogenèse

ALONSO LOPEZ A., EL MAATAOUI M., ESPAGANAC H.

Laboratoire de Biologie Végétale Expérimentale. Faculté des Sciences. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. 33, rue Louis Pasteur - 84000 AVIGNON.

Albizzia julibrissin, légumineuse arborescente déjà amplement utilisée en horticulture, manifeste de bonnes capacités de régénération en culture *in vitro*. Indépendemment de l'intérêt que cela peut présenter dans le domaine de l'application, cette espèce a pu être utilisée pour étudier certains aspects de l'influence de la nutrition carbonée sur deux phénomènes de morphogenèse : production de cals d'une part et mise en place de bourgeons et de pousses feuillées d'autre part.

Dans une première partie, l'auteur montre, en cultivant des portions de l'appareil végétatif de jeunes plants issus de semis, que les fragments de nature foliaires sont peu réactifs. Les fragments d'épicotyle ou d'hypocotyle par contre, produisent des cals volumineux sur lesquels se forment de petits nombres de bourgeons. Les explants racinaires, quant à eux, fournissent

des cals importants portant un grand nombre de bourgeons néoformés. Une embryogenèse somatique a aussi été induite à partir de cals âgés et à partir d'embryons zygotiques immatures excisés au stade cotylédonaire. Ces phénomènes peuvent être obtenus en absence de toute phytohormone à condition que le milieu soit complémenté par un sucre à la concentration de 30 $g.l^{-1}$. Dans une deuxième partie, en se limitant à la culture de fragments de racines, il est montré que la réponse morphogène peut être modulée en modifiant la nature de l'hydrate de carbone ajouté au milieu. Certains sucres (tels que le saccharose, fructose, glucose) déclenchent une callogenèse excessivement importante, au point qu'elle gêne et même anéantit le développement des bourgeons se formant sur les cals. En présence de xylose ou de lactose par contre la callogenèse est très discrète, ce qui permet le développement en plante entière de tous les bourgeons organisés sur les cals. Si maintenant on utilise un sucre tel que le maltose, on obtient une réponse intermédiaire. L'auteur démontre enfin qu'en associant dans le milieu de culture un sucre fortement callogène (fructose) à un autre (xylose) très faiblement callogène, on optimise et on obtient une bonne maîtrise de la production de pousses feuillées. Chacune de ces deux parties a été complétée par une étude histocytologique en microscopie photonique, qui a montré que des variations dans la mise en place de réserves amylacées, témoignant de systèmes métaboliques vraisemblablement différents, pouvaient jouer un rôle important dans ces phénomènes. En présence de sucres tels que saccharose, fructose, glucose, il semble que les cellules des cals mis en place soient capables de produire de l'amidon, mais incapables de l'utiliser. Dans une troisième partie enfin, en utilisant des techniques de CIHP, des identifications et des dosages de divers glucides ont été réalisées d'une part dans les explants mis en culture d'autre part dans les milieux sur lesquels ils étaient cultivés. On a pu ainsi montrer que quel que soit le sucre ajouté au milieu de culture, il est prélevé par le fragment de racine : toutefois ce prélèvement ne s'opère pas toujours de la même manière. Le nombre de sucres que l'on peut identifier et doser dans un fragment de racine, indépendamment de celui ou de ceux qui ont été incorporés au milieu, est plus important si la culture a été réalisée sur un mélange de sucres. Ceci témoigne sans aucun doute d'une diversification des métabolismes se déroulant dans les fragments cultivés dans de telles conditions.

L'ensemble des résultats et observations est discuté en fonction de travaux antérieurs réalisés par d'autres chercheurs utilisant d'autres espèces essentiellement ligneuses.

Mots-clés : *Albizzia julibrissin* ; morphogenèse *in vitro* ; nutrition carbonée ; cyto-histologie, régénération, chromatographie ionique.

E12 : Exploitation de la transgenèse végétale chez *Arabidopsis thaliana*, une plante modèle, afin d'isoler des gènes d'intérêt pour améliorer les plantes cultivées.

AUBANELLE L., CATTEROU M., DUBOIS F., CARON D., SANGWAN R.S., SANDWAN B.S.
Laboratoire Androgenèse et Biotechnologie, UPJV, Ilot des Poulies,
33 rue Saint-Leu 80039 AMIENS France

L'amélioration des plantes agronomiquement intéressantes est soumise à la compréhension du développement végétal. La recherche de nouvelles corrélations entre gènes impliqués dans le développement et leur fonction devrait contribuer à une meilleure connaissance de la morphogenèse végétale. La stratégie consiste à isoler des mutants affectés dans leur croissance (1)

La transformation génétique utilisée en tant qu'outil d'étude fondamentale chez *Arabidopsis thaliana* a permis d'établir une collection de mutants liés à l'insertion du T-DNA *d'Agrobacterium tumefaciens* (2). Trois d'entre eux présentent un phénotype altéré :

deux sont principalement affectés dans leur processus d'élongation, le troisième se distingue par une perte de la dominance apicale (3).

La caractérisation de ces mutants s'oriente selon deux axes principaux :

- une approche physiologique permet de cerner la fonction du gène sur les différentes étapes contrôlant le développement que sont la division, la différenciation et l'élongation cellulaires.
- une approche moléculaire est envisagée afin de localiser le gène sur la carte génétique en vue d'un éventuel séquençage.

Les perspectives de ce travail dans le transfert de ces connaissance vers des espèces végétales cultivées.

Bibliographie

1. DUBOIS F., BUI DAND HA D., SANGWAN R.S. and DURAND J. 1996. The *Petunia* Tral gene controls celle elongation, plant developemnt and mediates responses to cytokinins. Plant Journal **1** · 47-59.
2. SANGWAN R.S., BOURGEOIS Y., SANGWAN-NORREEL B.S. 1991. Genetic transformation of Arabidopsis thaliana zygotic embryos and identification of critical parameters influencing transformation efficiency. Mol. Gen. Genet., 230 : 475-485.
3. PAWLICKI N., VILCOT B., BOURGEOIS Y., AUBANELLE L., CATTEROU M., SANGWAN R.S , SANGWAN-NORREEL B.S. 1996. Morphological, anatomical and molecular studies of some T-DNA mutants in *Arabidopsis thaliana*. VIIth Inter. Conf. on Arabidopsis Research, 23-27 June 1996, Norwich, U.K.

E13 : Modifications des niveaux endogènes de cytokinines et régénération de bourgeons chez *Eucalyptus globulus* par l'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* souche 82.139

AZMI A.[1], DEWITTE W.[2], LANDRÉ P.[1], JOUANIN L.[3], VAN ONCKELEN H.[2], CHRIQUI D.[1]

[1] UPMC, Lab. CEMV, Bât. N2, case courrier 150, 4, place Jussieu, F-75252 Paris cedex 05. [2] University of Antwerp, UIA, Department of Biology, B-2610 Antwerp, Belgique. [3] INRA, Laboratoire de Biologie Cellulaire, route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles Cedex

L'importance des eucalyptus en foresterie justifie que des approches biotechnologiques visant la production en masse et la transformation génétique soient développées. Le genre *Eucalyptus* regroupe cependant des espèces d'intérêt majeur mais considérées comme récalcitrantes à l'ensemble de ces approches[(1)]. Une stratégie alternative utilisant la souche 82.139 d'*Agrobacterium tumefaciens*[(2)] s'est avérée efficace pour régénérer des bourgeons sur des tumeurs induites par inoculation de *vitro*plants clonés et sur de jeunes germinations[(3)]. Les bourgeons ainsi régénérés, tous diploïdes, ont ensuite été enracinés et acclimatés. Comparées à des tumeurs non caulogènes induites par la souche à nopaline C58, les tumeurs caulogènes induites par la souche 82.139 sont caractérisées par des teneurs élevées en zéatine et en riboside de zéatine endogènes[(3)]. Une analyse histologique a permis d'identifier les cellules compétentes pour la régénération et les cellules cibles de la transformation par la souche 82.139 ont été visualisées au moyen d'une construction comportant le gène *gus* sur le fragment *XbaI* de son T-DNA. En parallèle, l'immunolocalisation *in situ* des cytokinines bases[(4)] a été réalisée montrant une correspondance entre les sites transformés et les sites d'accumulation des cytokinines tandis que les bourgeons régénérés sont non transformés et toujours situés assez

loin des sites transformés. L'utilisation de la souche 82.139, grâce à la surcharge hormonale qu'elle produit, permet donc de résoudre, comme chez d'autres espèces déjà traitées par cette méthode telles que le peuplier[2] et le chou[5], les problèmes de la récalcitrance chez l'eucalyptus. Ces résultats devraient également aider à l'amélioration des protocoles de transformation génétique chez cette espèce.

Bibliographie

1. AZMI A., NOIN M., LANDRÉP., PROUTEAU M , BOUDET A.M., CHRIQUI D.. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls · ontogenesis and ploidy level of the regenerants. Plant Cell Tissue and Organ Culture, (1997) in press.
2. BRASILEIRO A.C.M., LEPLÉ J.C., MUZZIN J., OUNNOUGHI D., MICHEL M.F., JOUANIN L. An alternative approach for gene transfer in trees using wild-type *Agrobacterium* strains Plant Mol Biol., 17 (1991) 441-452.
3. AZMI A., DEWITTE W., DREVET C., VAN ONCKELEN H., LANDRÉ P., BOUDET A.M., JOUANIN L , CHRIQUI D. Bud regeneration from *Eucalyptus globulus* clones and seedlings through hormonal imbalances induced by *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139. Plant Sci (1997) sous presse
4. DEWITTE W., CHIAPPETTA A., AZMI A., STRNAD M., CHRIQUI D., VAN ONCKELEN H. Functional aspects of *in situ* localization of bound cytokinins in vegetative and reproductive shoot meristems of *Nicotiana tabacum* cv "Petit Havana" SR1 (Plant Journal, soumis).
5. BERTHOMIEU P., BÉCLIN C., CHARLOT F., DORÉ C., JOUANIN L. Routine transformation of rapid cycling cabbage (*Brassica oleracea*) - Molecular evidence for regeneration of chimeras. Plant Sci , 96 (1994) 223-235.

E14 : Analyse des potentialités androgénétiques du pollen de palmier dattier

BEN ABDALLAH A.[1], LEPOIVRE Ph.[2]

[1] Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, Rue Hédi Karray 2049 Ariana (Centre de Recherches Phoenicicoles, 2260 Degache) - TUNISIE.

[2] Unité de Phytopathologie - Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques. Passage de Déportés. 2 B-5030 Gembloux - BELGIQUE.

Dans les pays phoenicicoles, un besoin de plus en plus pressant de variétés améliorées et/ou résistantes à des maladies existent chez le palmier dattier. À ce jour, l'amélioration du palmier dattier, espèce allogame et dioïque, par les techniques de la génétique classique n'a pas réussi à créer et à fournir aux agriculteurs des variétés commerciales intéressantes, étant donné la lenteur de croissance de cette plante et le temps qui s'écoule entre chaque génération. Une sélection plus rapide basée sur l'emploi des haplométhodes permettraient d'obtenir des génotypes homozygote chez lesquels des caractères récessifs éventuels pourraient être recherchés. L'obtention des plantes haploïdes chez le palmier dattier n'a été que très peu étudiée. Dans l'objectif d'analyser les potentialités androgénétiques des génotypes mâles cultivés dans le sud tunisien, différents paramètres intervenant dans la culture *in vitro* des anthères ont été étudiés (génotype, stade des microspores mises en culture, conditions de culture *in vitro*). Ce travail a d'abord porté sur 15 génotypes mâles de palmier dattier. Seuls 4 génotypes ont montré une réponse favorable lors de l'induction en androgènes (T106, T167,

P6, T23) parmi lesquels T106 et T23 ont été retenus pour les travaux ultérieurs. Le stade optimum de développement des microspores pour la mise en culture des anthères a été le stade uninucléé moyen. La recherche d'une éventuelle relation entre les différents stades cytologiques de la microspore et la morphologie de l'inflorescence n'a pas permis de dégager des résultats probants. Deux facteurs ont été étudié : (1) l'effet d'une gamme de concentrations de 2,4D (avec ou sans charbon actif) dans un milieu de callogenèse à base des éléments minéraux de Murashige et Skoog ainsi que (2) la nature et la concentration du sucre (maltose ou saccharose). Le pourcentage de cals formés et le pourcentage de microspores en division ont été comptabilisés parés 6,10,15,20,25 et 35 jours de culture des anthères. Les meilleurs résultats ont permis d'obtenir 70 % de microspores en division et 18 % anthères donnant naissance à des cals embryogènes. Ces résultats ont été obtenus sur un milieu contenant du maltose (40 g/l), du 2,4D (10 mg/l) et du charbon actif (1 g/l) et ont été confirmés pendant deux campagnes. La régéneration des cals embryogènes obtenus a été étudiée sur des milieux à base des éléments du milieu Murashige et Skoog mis au point pour l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier et contenant peu ou pas de régulateurs de croissance. Les résultats n'ont permis, jusqu'à présent, aucune régénération. Les cals embryogènes obtenus se maintiennent longtemps en vie mais un blocage semble avoir lieu pour la régénération.

E15 : Un exemple de production de molécules à haute valeur ajoutée par des cultures *in vitro* d'organes végétaux : synthèse d'hyoscyamine et de scopolamine chez *Datura innoxia* Mill

BOITEL-CONTI M., LABERCHE J.-C., DUCROCQ C., DARIA P., SANGWAN-NORREEL B.
Laboratoire d'Androgenèse et Biotechnologie, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu, F.80039 Amiens Cedex, France

Le poster présente les travaux concernant l'amélioration des connaissances fondamentales relatives aux voies de biosynthèse de métabolites secondaires chez *Datura innoxia* Mill pour la synthèse d'alcaloïdes tropaniques en vue d'augmenter la production de ces molécules d'intérêt thérapeutiques, à très haute valeur ajoutée. Les connaissances fondamentales acquises sont exploitées pour l'élaboration d'un procédé de production en bioréacteur par des cultures *in vitro* de racines transgéniques hyperproductrices.

E16 : Callogenèse et régénération chez le Pois chiche (*Cicer arietinum*)

BOUABDALLAH L.
Institut des Sciences de la Nature, Université d'Oran (Es-Sénia), Oran, Algérie

Le Pois chiche est une légumineuse cultivée en Algérie pour sa richesse en protéines destinées à la consommation humaine. La culture de tissu *in vitro* de cette plante offre de nombreuses perspectives (amélioration de la qualité, augmentation de la production et résistance aux maladies, à la sécheresse et à la salinité,...)

La callogenèse a été initiée à partir des différents organes végétatifs (racines, tiges, folioles) et embryons mis en culture sur le milieu Murashige et Skoog additionné de deux hormones

(auxine et cytokinine) à différentes concentrations, à une photopériode de 16 heures et une température de 26°C.

Les résultats obtenus varient selon l'organe et la composition hormonale. La culture d'embryons en présence d'une faible auxine (acide indole-3 acétique ou AIA) et d'une kinétine (à faible concentration) a donné des taux élevés de cals fiables et blanchâtres. Cette callogenèse, a été suivie d'une régénération assez importante de plantules d'apparence normale dont le nombre varie de 2 à 3 par cal.

Parmi les autres explants, seules les tiges donnent des cals, sur le même milieu sans régénération directe.

Le remplacement de l'AIA par une forte auxine (2,4 D à faible concentration) a permis d'obtenir à partir des tiges, racines et embryons une callogenèse abondante.

Ces résultats préliminaires ouvrent la voie à la recherche de variants résistants à l'Anthracnose et à la Fusariose, principales maladies du Pois chiche pour lesquelles les moyens de lutte utilisés jusqu'à présent restent inefficaces.

E17 : Effet du génotype et du milieu de culture dans la culture d'embryons immatures de blé dur (*Triticum durum* Desf.) et de blé tendre (*Triticum aestivum L.*)

BOUIAMRINE E., MZOURI K., AMSSA M.

Université Moulay Ismail, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Laboratoire des Biotechnologies Végétales, B.P. 4010 B'ni M'hamed, Meknès, Maroc.

Dans un programme de sélection au niveau cellulaire, le choix des génotypes qui pourront être ultérieurement améliorés dépendra principalement de leur aptitude à la culture *in vitro*. Celle-ci réside dans leur capacité de produire des cals et de régénérer par la suite des plantes. Dans ce présent travail, 14 variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) et 16 variétés du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) ont été évaluées pour leur aptitude à la culture *in vitro*. Pour chacune d'elles, quatre paramètres ont été pris en considération : le taux de callogenèse, de cals embryogènes, de régénération et le nombre moyen de plantules par cals régénérant. Le milieu de base utilisé est celui de Murashige et Skoog (1962) additionné de 2 mg/l de 2,4-D. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence un effet génotype très marqué dans la production de cals embryogènes, le pourcentage de régénération et le nombre moyen de plantules par cals régénérants. Dans l'objectif d'améliorer la régénération de certains génotypes. 4 variétés des deux espèces (2 présentent une mauvaise aptitude à la culture *in vitro* et deux autres prises comme témoins) ont été choisis. Nous avons ainsi testé l'effet de la concentration en BAP (10^{-7} à 10^{-4} M) combiné au 2,4-D (2mg/l) en présence ou en absence de l'ANA (5.10^{-6} M). Une interaction génotype-milieu de culture a été observée. L'ajout de la BAP (10^{-6} M) en présence de l'ANA a amélioré significativement le pourcentage de régénération des 4 variétés du blé tendre. Par contre chez le blé dur, cette amélioration n'a concerné que les variétés à faible taux de régénération. Cependant, l'augmentation De la concentration en BAP ($> 10^{-6}$ M) a tendance à inhiber la callogenèse et à provoquer la nécrose des cals. Cette nécrose est plus forte chez le blé dur que chez le blé tendre. L'albinisme apparaît uniquement chez le blé dur, mais à des faibles fréquences (0 à 6 %) selon les variétés.

E18 : Intérêt du traçage isotopique pour l'étude, chez l'homme du devenir métabolique des productions végétales : l'exemple du blé dur enrichi en ^{13}C et des pâtes alimentaires

CHARGVARDIEFF P.[1], PEAN M.[1], LE BRAS S.[1], GAULTIER S.[1], ANTOINE J.-M.[1], MASSICOTTE D.[2], PERONNET F.[3]

[1] Groupe Danone, 7 rue de Téhéran, 75381 Paris Cedex 08, France. [2] Département d'Éducation Physique. Université de Montréal, CP6218 Centre Ville, Montréal P.Q. Canada H3C3J7. [3] Laboratoire de Bioénergétique fondamentale et appliquée, Université Joseph Fournier, BP 53X, 38041 Grenoble, France.

Les végétaux constituent une grande part de l'alimentation humaine. Les études portant sur leurs propriétés nutritionnelles répondent à des préoccupations touchant la diététique et la santé publique. Les études cliniques chez l'homme, utilisant le traçage isotopique avec des isotopes stables tel le carbone 13, se sont particulièrement développées depuis une quinzaine d'années. Elles font appel à des techniques sans risques (isotope non-radioactif), atraumatiques (tests respiratoires par exemple) et puissantes (spectrométrie de masse, GCMS, RMN) et ont porté sur le devenir de molécules simples (glucose, acide aminé, par exemple). Les études concernant les aliments, produits de composition complexe, nécessitent de disposer de produits marqués de façon homogène pour pouvoir servir de traceurs ; de tels produits marqués aux isotopes stables n'étaient pas disponibles jusqu'à présent.

Pouvoir connaître l'intérêt alimentaire des produits issus de différents systèmes de culture : cueillette, traditionnel, intensif, hors-sol..., dans différentes zones de production : pays tempérés, tropicaux ..., pour différents types de végétaux : amylacés, oléoprotéagineux... est un enjeu majeur pour l'avenir de l'agriculture, et en particulier pour l'amélioration des plantes.

Nous présentons ici un procédé biotechnologique d'enrichissement isotopique applicable aux végétaux supérieurs, qui entreront dans notre alimentation après des étapes de transformation technologique plus ou moins poussées. Les résultats présentés concernent la production de blé dur (*Triticum durum*), marqué au ^{13}C destiné à des études sur les pâtes alimentaires.

Le principe consiste à faire assimiler au végétal, pendant tout son cycle cultural, des substrats marqués : les formes isotopiques sont apportées, pour le carbone, sous forme de carbone inorganique ($^{13}CO2$) assimilé par le processus photosynthétique. Pour cela, il est nécessaire de maîtriser la gestion des systèmes de cultures en milieu artificiel (contrôle et régulation des paramètres climatiques, confinement des atmosphères) ainsi que l'analyse isotopique (spectrométrie de masse).

Dans ces conditions, la fourniture permanente pendant tout le cycle cultural de la plante, de l'espèce isotopique mentionnée permet d'obtenir un marquage homogène de la biomasse, à un niveau d'enrichissement fixé par l'expérimentateur (dans notre cas aux alentour de 10 % ^{13}C). Nous présenterons, sur la culture de la variété Ardente, les résultats obtenus sur la productivité et l'enrichissement isotopique.

La semoule obtenue a été mélangée à de la semoule non marquée pour fabriquer des pâtes alimentaires ayant un enrichissement d'environ 1,16 %, largement suffisant pour suivre le devenir métabolique de l'amidon marqué au ^{13}C. Les pâtes ont été utilisées dans une étude sur l'équilibre énergétique et pondéral, et l'utilisation des substrats énergétiques endogènes et exogènes chez l'homme au repos, à la suite d'un exercice préalable de puissance et de durée variables. Les résultats obtenus, en terme de quantité de glucides endogènes et exogènes oxydés, ainsi que de lipides oxydés illustreront la faisabilité et l'intérêt du marquage biologique de molécules complexes comme l'amidon, dans les études nutritionnelles chez l'homme.

E19 : Haplodiploïdisation chez le blé dur (*Triticum turgidum* var *durum*)

CHLYAH H., SAIDI N., CHERKAOUI S., LAMSAOURI O., CHLYAH O., MDARHRI-ALAOUI M., AMAIL O., CHLYAH A.

Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Département de Biologie, B.P. 1014 Rabat, Maroc

Plusieurs voies d'haplodiploïdisation ont été testées dans le but d'obtenir des plantes vertes haploïdes doublées (HD). La méthode d'androgenèse (culture d'anthères ou microspores) a été parfaitement mise au point, en milieu gélosé, entre 1991 et 1993, avec des pourcentages de régénération élevés mais avec des taux d'albinisme proche de 100 %. L'utilisation par la suite de milieux liquides et de nombreux nouveaux génotypes n'a pas permis de résoudre le problème d'albinisme.

Dans le but de bénéficier de la capacité génétique supérieure - cytoplasmique ou nucléaire - du blé tendre pour l'androgenèse avec régénérations vertes, des croisements blé tendre x blé dur ont été effectués suivis d'un ou plusieurs rétrocroisements avec le blé dur. À partir des plantes R1, seules celles issues d'un croisement originel avec un parent blé tendre portant la translocation 1BL/1RS ont pu former des plantules vertes par androgenèse.

Une troisième voie - celle des hybridations intergénériques - a été testée pour un grand nombre de génotypes de blé dur et de maïs (ou orge). Cette voie permet la formation de plantes vertes HD pour presque tous les génotypes de blé dur testés. Cette méthode - comportant le sauvetage par culture d'embryons haploïdes - est comparée à la culture simple d'ovules non fécondés ; cette dernière technique a également donné des résultats positifs.

E20 : Effet à long terme du saccharose exogène sur l'interaction C/N chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) cultivée *in vitro*

SIMA B.D., LE V.Q., DESJARDINS Y.

Dans le but d'évaluer l'impact du saccharose sur l'interaction C/N dans des conditions *in vitro*, des plants de pomme de terre sont cultivés sous une intensité lumineuse de 80 $\mu E\ m^{-2}s^{-1}$, dans 3 différents milieux de Murashige et Skoog (MS) : MS de base sans saccharose, MS avec 2 % de saccharose, MS avec 2 % de saccharose et sans source d'azote. Des mesures d'activité PEPCase et pyruvate kinase effectuées à 13, 26 et 39 jours de croissance montrent que les plants cultivés sur MS de base avec 2 % de saccharose présentent les activité enzymatiques et les teneurs en protéines totales les plus élevées tandis que les plus importantes teneurs en amidon et en saccharose sont observées chez les plants cultivés sans source d'azote. Ceci est une indication de la compétition en chaînes carbonés entre les métabolisme carboné et azoté. L'accumulation de sucres chez les plants cultivés sans source d'azote s'explique par une vitesse d'assimilation d'azote plus faible et une demande réduite d'α-cetoglutarate provenant du cycle de Krebs.

La comparaison des bandes de 97,4 kD de PEPCase dans des analyses d'immunodétection (western blots) entre les 3 conditions de culture liée à l'activité PEPCase indique clairement que le saccharose exogène participe à la régulation de la PEPCase au niveau de la synthèse de la protéine.

E21 : Obtention de plantes chlorophylliennes haploïdes de Blé dur et de Blé tendre par culture de microspores isolées

DE BUYSER J., PICARD E.
Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale. Université de Paris Sud XI -Bât 360 - 91405 Orsay - France

Au cours de cette décennie, la technique de culture de microspores isolées a progressé et s'est largement développée chez plusieurs espèces (Colza, Tabac, Riz, Orge...). Quelques articles ont fait part de résultats positifs chez le Blé tendre (*T. aestivum*). L'utilisation de cette technique a donc été envisagée pour le Blé tendre mais également pour le Blé dur (*T.durum*) en vue d'études fondamentales et appliquées. Obtenues par broyage des épillets, filtration et centrifugation, les microspores isolées sont cultivées en boite de Pétri (35 mm.) contenant le milieu liquide de CHU modifié avec 0,26M de glucose ou de maltose et 4 à 5 ovaires d'épis plus âgés.

Chez le Blé tendre, les résultats obtenus concernant la formation des embryons montrent :

- qu'en l'absence d'ovaires, aucun embryon n'est formé quel que soit le génotype utilisé.
- que le maltose est toujours plus favorable (facteur 10) que le glucose.
- que l'absence de pré-traitement donne des taux d'embryons plus élevés qu'un traitement au froid (4°C 1 à 3 semaines) ou qu'un traitement de pré-culture avec mannitol (0,3M pendant 4 à5 jours).
- que l'isolement des microspores après 4 à 5 jours de culture des anthères en milieu liquide fait baisser le rendement.
- que l'agitation des microspores (40 t/m.)pendant la phase de culture retarde le développement des embryons et baisse leur fréquence.
- que cependant la culture anthères en milieu liquide reste toujours supérieure à la cultures de microspores isolées.

Pour les génotypes 107 et HJA, il est possible d'obtenir respectivement 120 et 80 embryons par épi en culture de microspores isolées et régulièrement plus de 500 embryons par épi en culture anthères. L'utilisation des mêmes protocoles pour le Blé dur a permis d'obtenir plus de 50 embryons par épi en culture de microspores (pré-traitement des épis à 4 °C, 2 à 3 semaines et milieu avec maltose). La régénération est obtenue parés transfert des embryons. Chez le Blé tendre, il n'y a pas de différence entre embryons issus de microspores isolées et de culture anthères. Les deux milieux testés (MS0 et R-190-2) donnent des résultats similaires. Pour le génotype 107 le taux de régénération des embryons est de 80 % (15 à 20 % de plantes vertes et 60 à 65 % de plantes albina). La régénération est également possible après changement du milieu dans les boites de cultures des microspores lorsque les embryons sont bien développés. En ce qui concerne le Blé dur, 7 plantes chlorophylliennes ont été régénérées soit après culture de microspore isolées soit après culture anthères. Ces résultats nous permettent d'envisager l'utilisation de ces espèces pour des expériences de transformation et l'étude des protéines des voies de signalisation.

E22 : Initiation de suspensions cellulaires embryogènes à partir d'explants de bourgeons méristématiques en prolifération chez les bananiers

DHED'A D.[1], HAICOUR R.[2]

[1] Université de Kisangani, Faculté des Sciences, c/o Ridja D. Buma, Sotexki, B.P. 14897 Kinshasa I, ZAIRE. [2] Université Paris Sud, MVE, Bât 360, 91405 Orsay cedex, France

Des suspensions cellulaires embryogènes ont été établies chez deux cultivars (Métavia, ABB et Ihtisim, AAB) en utilisant les explants de bourgeons méristématiques en prolifération (scalps) en milieu liquide enrichi en 2,4-D et zéatine. La Grande Naine (AAA) n'a pas pu produire des suspensions embyrogènes par cette méthode.

L'étude de l'induction de cals sur les scalps a montré qu'il est relativement aisé d'obtenir un cal globulaire jaune non embryogène sur un milieu contenant 5 à 36,2 uM 2,4-D. Dans quelques cas (4,8-14,8 %), on a pu observer la formation de cals blancs chez la Grande Naine après 8 à 16 semaines sans subculture.

Chez Matavia, dans 18,1 % de cas, des cals globulaires jaunes se sont transformé en cals blancs embryogènes capables de produire des suspensions embryogènes.

L'ensemble des résultats obtenus peut permettre de conclure qu'il est possible d'établir des suspensions embryogènes chez un grand nombre de cultivars présentant une prolifération plus ou moins semblable à celle de Matavia. On peut en outre insister sur le rôle joué essentiellement par le 2,4-D dans l'induction de cellules embryogènes et celle de différents types de cals obtenus.

La connaissance des facteurs et conditions particulières dans lesquelles s'effectuent ces processus et ceux de la transformation du cal jaune en cal blanc embryogène observée chez Matavia pourrait permettre l'initiation des suspensions cellulaires embryogènes à partir de différents explants somatiques dont les feuilles du bananier.

E23 : Étude comparative d'hybrides interspécifiques issus de croisements entre quatre espèces d'Aegilops et de blés cultivés (*Triticum aestivum, Triticum durum*)

EL KHILIFI O.K.[1], BENLHABIB O.[2], MALKI M.[1]

[1] Faculté des Sciences Casablanca Ain Chock, Casablanca, Maroc. [2] I.A.V. Hassan II, Rabat, Maroc.

Des croisements interspécifiques entre le blé tendre (*Triticum aestivum*) ou dur (*T. durum*), et différentes espèces d'Aegilops (*Ae. ovata*, *Ae. triaristata*, *Ae. squarrosa* et *Ae. ventricosa*), ont été entrepris. Seules les accessions résistantes à la mouche de Hesse ou Cécidomyie (*Mayetiola destructor say*) ont été employées afin de transférer cette résistance au blé. Le sauvetage des embryons hybrides immatures a été utilisé.

Une étude comparative de l'aptitude au croisement des quatre espèces d'*Aegilops* avec les blés cultivés, rend compte que le taux de nouaison n'est pas le meilleur critère pour juger la réussite d'un croisement. La viabilité et la fertilité des F_1 et de leurs descendants sont plus discriminants. Les taux élevés de plantes hybrides ont été obtenues chez *Ae. ovata* croisé au blé

tendre, soit 12 %. Cependant, toutes les plantes sont létales, et ne conduisent à aucune descendance. Les taux de plantes hybrides ont été au contraire de 0,5 % seulement, chez *Ae squarrosa*, mais ont conduit à la formation de plantes viables et fertiles en F_1, F_2 et BC_1. Les causes de ces différences sont discutées.

La fertilité des hybrides a été très variable, aussi bien en autofécondation qu'en rétrocroisement. Cette variabilité a été observée entre les familles, mais aussi à l'intérieur des familles, surtout celle issue du croisement entre *Ae. triaristata* et le blé dur. La fertilité du pollen des hybrides F_1 de ce croisement, a varié de 0 à 89 %.

Les descendants BC_1 ont présenté des taux de germination souvent faibles et des taux de mortalité importants. Les descendants F_2 ont présenté moins de problèmes de variabilité.

L'aptitude au croisement interspécifique du blé dur a été généralement plus faible que celle du blé tendre. Mais en croisement réciproque, le blé tendre s'est montré souvent, plus récalcitrant. Il n'a formé des plantes hybrides qu'avec *Ae. ovata*.

Trente-sept hybrides interspécifiques ont été installés au champ pour leur caractérisation morphologique. Le comptage du nombre de chromosomes et une analyse méiotique ont été également réalisés.

La plupart des critères d'évaluations utilisés dans l'analyse morphologique et de résistance aux maladies, ont souvent permis de caractériser les différents hybrides. La résistance à la rouille noire et au mildiou, le port de la plante et la forme de l'épi, sont des caractères transmis à la majorité des hybrides, du parent sauvage.

Le nombre de chromosomes a été souvent celui attendu chez les hybrides interspécifiques, soit 28 quand l'espèce sauvage tétraploïde est croisée au blé dur, et 35 quand celle-ci est croisée au blé tendre. Un doublement spontané des chromosomes a été noté chez les hybrides viables issus d'*Ae. squarrosa*.

L'analyse des cellules mères de pollen a montré de faibles taux d'appariements chromosomiques, particulièrement, chez les hybrides issus d'*Ae. ventricosa* croisé au blé dur. Certains de ces derniers sont présentés jusqu'à 25,55 univalents. Mais pour ceux issus d'*Ae. Squarrosa*, les appartements ont été relativement importants, soit jusqu'à 19,6 bivalents.

E24 : Stratégie de sélection par haplodiploïdisation. Cas d'une plante autogame, le piment

HARZALLAH H.

École Nationale de Médecine Vétérinaire 2020 Sidi thabet, Tunisie.

L'amélioration génétique des caractères agronomiques, polygéniques, ne peut se faire classiquement qu'à long terme au bout de plusieurs cycles de sélection. Cependant, l'introduction de l'haplodiploïdisation dans la sélection sur descendance, soit une sélection selon les aptitudes à la combinaison, permettra de détecter et de produire directement de bonnes combinaisons hybrides, ce qui n'est pas possible par autofécondation. Chez le piment, nous avons appliqué un schéma de sélection utilisant le prédicteur de la valeur en lignées puis l'haplodiploïdisation. Des croisements diallèles ont été réalisés entre des variétés locales commercialisées et deux variétés mexicaines spontanées à petits fruits mais intéressantes pour la tolérance aux sels et à certaines maladies virales.

Une étude quantitative fondée sur les méthodes d'approches génétiques, tirées des tableaux diallèles, nous a permis d'étudier les effets des gènes et à partir du tableau diallèle constitué par les quantités [2 F_2-F_1], on a pu quantifier les effets d'épistasie. Cette étude de l'expression des gènes apportés par les parents en croisements, permet d'orienter la sélection et de faire un tri parmi les croisements à haplodiploïdiser. La culture d'anthères *in vitro* a été ainsi menée à

partir des croisements diallèles sélectionnés. Des différences génotypiques significatives ont été constatées pour l'aptitude à produire des anthères embryogènes et des embryons.

Cet effet génotypique a été décomposé en aptitudes générales et spécifiques à la combinaison.

Les plantes haploïdes doublées issues de certains croisements ont été testées pendant plusieurs années du point de vue leurs performances agronomiques et biochimiques (taux de β carotènes et de capsaïcine). Des expériences ont été également menées pour la tolérance au stress salin et nous avons repéré une lignée HD plus tolérante que le parent spontané.

Ces résultats permettent de montrer l'importance du choix des parents à introduire en sélection, les différences génétiques existantes chez les variétés entraînent des transgressions intéressantes chez certaines lignées haploïdes doublées.

E25 : Régénération des plantes à partir des couches cellulaires minces de riz

HOANG K.O.[1], LE T.B.[1], TRAN THANH VAN K.[2]

[1] Institut de Biotechnologie, CNRST, Hanoï, Vietnam.

[2] Institut de Biotechnologie des Plantes, Université de Paris-Sud, 91405 ORSAY Cedex, France.

Le riz (*Oryza sativa*) constitue un élément important dans l'alimentation chez la moitié de la population mondiale. Les estimations de production sont de 460 millions de tonnes en 1997, 560 millions en l'an 2000 et 766 millions en 2020.

La croissance inévitable de la population mondiale requiert des programmes d'amélioration adaptés aux caractéristiques climatiques, pédologiques et culturelles des différentes parties du globe. Les techniques de biotechnologies relatives au transfert des gènes d'intérêt connaissent des limitations liées en partie à celles de méthodes de régénération des plantes. Si la régénération à partir de protoplastes donne des résultats satisfaisants quant à l'obtention de plantes *in vitro*, les risques de variations somaclonales peuvent rendre difficile l'étude de l'expression des gènes transférés.

Dans nos expériences de transformation (par biolistique ou via Agrobactérie) à l'Institut de Biotechnologie à Hanoï, nous avons cherché à obtenir des embryons de riz à partir des cals issus d'anthères, d'embryons zygotiques immatures et matures. Par ces méthodes, surtout quand les embryons matures sont utilisés, les embryons somatiques sont différenciés sur un cal volumineux et après un délai relativement long.

Il est primordial, en particulier si l'objectif visé est la transformation, de mettre au point des méthodes permettant d'obtenir l'embryogenèse directe ou tout du moins sans une longue phase callogène intermédiaire et la régénération des plantes dans un délai le plus court possible. Ainsi, la méthode des couches cellulaires minces a permis d'obtenir chez le riz, des embryons soit directement, soit à partir des nodules embryogènes différenciés à partir des couches minces (0,3 - 0,5 mm) pratiquées transversalement sur des jeunes plantes, cultivées sur les milieux de Murashige et Skoog contenant de l'agar (0,8 %), du saccharose (3 %), du 2,4-D (10mM), NAA (5mM) et de la BAP (10mM).

Cette méthode de régénération ouvre la voie à l'obtention rapide des plantes transgéniques de riz minimisant les variations somaclonales.

E26 : Stimulation de l'androgenèse *in vitro* par un prétraitement des anthères au début de la phase d'induction

LAROCHE L., ST-PIERRE C.A.[1], COLLIN J. [1], COMEAU A. [2]
[1] Département de Phytologie, Université Laval, Ste-Foy (Québec, Canada) G1K 7P4. [2] Centre de recherche Agriculture et Agro-alimentaire Canada, Ste-Foy (Québec, Canada) G1V 2J3

La culture d'anthères est une technique d'haplodiploïdisation permettant de simplifier et de raccourcir les délais nécessaires à la production de nouveaux cultivars d'orge. Cependant, un faible taux d'embryogenèse et de régénération de plantes vertes limitent encore l'utilisation de cette technique dans le secteur privé de l'amélioration des céréales. L'embryogenèse peut être stimulée par la culture *in vitro* d'anthères d'orge sur un milieu FHG semi-liquide très visqueux pendant les premiers jours de la phase d'induction. Une partie du contenu en eau du milieu FHG semi-liquide s'évapore lorsque le milieu est entreposé dans des boîtes de pétri pendant une longue période avant son utilisation. La mise en culture d'anthères sur ces milieux plus visqueux et l'ajout, quatre jours plus tard, de milieu FHG liquide pour diminuer la viscosité du milieu, stimule l'embryogenèse. Des travaux de recherche visant à reproduire de façon contrôlée les résultats de ces essais ont été réalisés. Différents groupes d'ingrédients (l'ensemble de tous les ingrédients, le maltose ou les sels) ont été concentrés deux ou trois fois, ou complètement enlevés de la composition du milieu d'induction FHG semi-liquide pendant une période de quatre ou de six jours au début de la phase d'induction. Après la période de prétraitement, un certain volume de milieu FHG semi-liquide complémentaire a été rajouté pour ramener la composition du milieu de prétraitement à celle du milieu d'induction FHG semi-liquide de base. Ces travaux de recherche ont permis de démontrer qu'en culture d'anthères d'orge, les microspores sont sensibles à la composition du milieu nutritif pendant les premiers jours de la phase d'induction. La réponse androgénique peut être stimulée par un prétraitement de quatre ou de six jours des anthères avec le milieu d'induction FHG semi-liquide dont la concentration des ingrédients de base, a l'exception du ficoll 400, est deux fois plus élevée. Le prétraitement permet de multiplier par un facteur de 10 le nombre de plantes vertes régénérées, par rapport à la méthode sans prétraitement, pour un génotype présentant déjà une bonne réponse androgènique. Chez un génotype présentant une réponse androgènique plus faible, le prétraitement permet de stimuler le nombre de plantes vertes régénérées par une facteur moins élevé. Le prétraitement permet également de diminuer la variabilité de la réponse androgènique à l'intérieur d'un même génotype d'orge

E27 : Influence du chlorure de sodium sur le développement *Retama retam* Forssk (Webb.)

IGHILHARIZ Z.
Institut des Sciences de la Nature, Université d'Oran (Es-Senia), Oran 31000, Algérie

Retama retam Forssk (Webb.) est une légumineuse qui croît dans les zones arides et semi-arides algériennes. Cette plante a la particularité par son système racinaire très développé de fixer les sables dunaires. Cette espèce fait partie de l'association *Helianthemum stipulatum-Retama retam*. En Algérie, le genre Retama compte trois espèces ; les sols sur lesquels pousse ce genre sont proches de la Méditerranée ou près du Sahara. Ces différentes stations sont riches en sels de nature variée.

Peu de travaux ont été réalisés sur ce végétal. Notre travail porte sur l'étude de la germination et des premiers stades de la croissance de cette plante. L'étude de l'influence du NaCl sur la germination, la croissance, les caractéristiques hydriques et ioniques ainsi que sur les modifications biochimiques a été entreprise dans le cadre de ce travail.

Les graines de *Retama retam* nécessitent pour germer un prétraitement à l'acide sulfurique concentré. La température optimale de germination se situe à 25C°.

La présence de NaCl inhibe la germination. Néanmoins les graines peuvent germer en présence de NaCl (5 % de germination à 200 mM).

La croissance des plantes en présence ou non de NaCl est appréciée par la hauteur de la tige, la longueur de la racine principale ainsi que la masse fraîche et sèche de ceux-ci. Le sel lorsqu'il est présent à fortes concentrations (100 à 150 mM), réduit la croissance en hauteur des tiges et diminue la production de la matière végétale fraîche ou sèche. La longueur des racines n'est pas modifiée, leur masse fraîche et sèche diminue sous l'effet du sel.

Retama retam se comporte comme une glycophyte tolérante au sel car elle présente à 150 mM de NaCl une croissance pondérale de 80 % comparée au témoin.

Sous l'action du chlorure de sodium, les plantes accumulent du Na^+Cl^- beaucoup plus dans les tiges que les racines. Leur métabolisme et modifié, il y a accumulation de saccharose, de glucose et de proline. Ces différents éléments sont à l'origine de l'ajustement osmotique du *retam* en milieu salin. En effet, les potentiels hydriques et osmotiques baissent sous l'action du sel. La teneur en eau augmente.

L'étude du métabolisme lipidique montre des modifications sous l'effet du sel. Il y a diminution du pourcentage du C.18-3 et celui du C.16-0. La phosphatidylcholine (PC) augmente sous l'action du sel ; le DGDG ou digalactosyldiacylglycérol diminue.

Les différents résultats obtenus nous permettent de conclure que *Retama retam* se comporte comme une glycophyte tolérante d'osmorégulation qui lui permet de "s'adapter" aux conditions salines. Il faut remarquer que si morphologiquement la plante n'est apparemment pas sensible à une faible dose de NaCl, de l'ordre de 50 mM, elle présente déjà des modifications physiologiques en particulier dans le statut de l'eau.

Par ses caractères d'adaptation à la sécheresse et sa tolérance au NaCl, cette plante peut être considérée comme une espèce à développer en zones arides et semi-arides pour freiner la désertification.

E28 : Régulation du métabolisme énergétique et de la signalisation au cours de l'embryogenèse somatique de la patate douce *Ipomea batatas* (l.)] : rôle de la NDPK

LAVERGNE D.[1], NATO A.[1], CAVALCANTE ALVES J.-M.[1], SIHACHAKR D.[1], VERON M.[2], TRAINCART F. [2], DUCREUX G.[1]

[1] Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, Université Paris XI, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE.
[2] CNRS, URA 1129, Unité de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur, 75724 PARIS, FRANCE

Les nucléosides diphosphate kinases (NDPK, EC.2.7.4.6.) jouent un rôle clé dans le contrôle du flux métabolique des groupes phosphate entre nucléosides di et triphosphate et dans le maintien de leurs niveaux de fonction (Pestel, 1992). La protéine native est un hexamère (100 kDa) constituée de sous-unités identiques (17-20 kDa) chaque sous-unité possède un site actif et peut être phosphorylé (Dumas et al., 1992). L'étroite analogie existant entre la NDPK d'épinard, le produit du gène humain Nm23 et celui de la drosophile Awd (Rosengard et al., 1989), nous a conduit à émettre l'hypothèse de la contribution de la NDPK au niveau du déclenchement et de la mise en œuvre du développement des plantes.

MODÈLE EXPÉRIMENTAL

Au cours de ce travail des cellules de Patate douce [(*Ipomea batatas* (L.)] en phase de prolifération active (cals non embryogènes) et des cellules en phase de différenciation (cals embryogènes) sont comparativement étudiées.

MÉTHODES D'INVESTIGATION

Les activités enzymatiques de la NDPK ont été mesurées par spectrophotométrie et l'analyse des polypeptides spécifiques à la NDPK a été effectuée par la technique de Western Blot. Des anticorps poly et monoclonaux dirigés contre la NDPK de *Dictyostélium discoïdeum* et contre la NDPK d'érythrocytes humains ont été utilisés dans les expérimentations immunologiques.

RÉSULTATS

1) Au cours de la phase exponentielle de croissance de cellules en prolifération l'activité NDPK est fortement augmentée comparée à celle exprimée par les cellules en phase stationnaire. Cette augmentation du niveau de l'activité NDPK au cours de la courbe de croissance peut traduire l'intensité des divisions cellulaires et par voie de conséquence l'intensité des échanges nucléotidiques et énergétiques qui y sont associés.

2) De plus, l'activité NDPK mesurée sur les extraits protéiques des cultures embryogènes est quatre fois plus forte que sur les cultures non embryogènes. Les résultats des immunotransferts permettent de montrer le distribution générale du polypeptide 13-17 kDa, caractéristique de la NDPK décrite chez les systèmes animaux.

L'existence d'une forme plus lourde 28-31 kDa est spécifiquement observée sur les extraits de cultures embryogènes. Sa présence est aussi démontrée dans les extraits solubles des organes végétatifs (tissus différenciés tels que les feuilles, tiges, racines, bourgeons axillaires) de plantes cultivées *in vitro*. Des résultats complémentaires obtenus au laboratoire suggérant que le polypeptide 28-31 kDa pourrait être associé aux organites impliqués dans la gestion du pouvoir énergétique tels que les mitochondries et les chloroplastes. Des isoformes localisées au cytoplasme et aux mitochondries ont déjà été décrites chez les cellules de *Dictyostelium* (Troll et al., 1993). La surexpression de l'activité enzymatique de la NDPK dans les cals embryogènes et la présence d'une bande correspondant à un polypeptide de poids moléculaire élevé, permettent de supposer une participation active de la NDPK au processus de la différenciation cellulaire et de la considérer comme un marqueur potentiel de l'embryogenèse somatique (Cavalcante, 1996). Elle pourrait être impliquée à la fois au niveau du déclenchement de la prolifération cellulaire et du contrôle du métabolisme, par la gestion du pouvoir énergétique et par la maîtrise de voies de signalisation faisant appel aux protéines G.

PERSPECTIVES

Des investigations pour démontrer le rôle de la NDPK dans le déclenchement et la régulation des étapes moléculaires et biochimiques de l'embryogenèse somatique de la Patate douce sont envisagées. Dans ce but la protéine NDPK sera purifiée à homogénéité pour être séquencée. Elle servira à la préparation d'anticorps monoclonaux, sondes spécifiques indispensables pour approfondir la surexpression des NDPK lors des processus d'embryogenèse somatique.

Bibliographie

1. CAVALCANTE ALVES J.M. (1996) - Thèse Doctorat Université de Paris Sud, UFR Scientifique d'Orsay, France.
2. DUMAS C., LASCU I., MORERA S., GLASER P., FOURME R., WALLET V., LACOMBE M.L., VERON M., JANIN J. (1992) - The EMBO Journal, 11, 3203-3208.
3. PESTEL M. (1992) - Thèse Doctorat, Université de Rouen, Haute-Normandie, France.
4. ROSENGARD A.M., KRUTZSCH H.C., SHEARN A., BIGGS J.R., BAKER E., MARGULIS I.M.K., KING C.R., LIOTTA L.A., STEEG P.S. (1989) - Nature, 342, 177-180.
5. TROLL H., WINCKLER T., LASCU I., MÜLLER N., SAURIN W., VERON M., MUTZEL R. (1993) - J. Biol. Chem., 268, 25469-25475.

E29 : Multiplication végétative *in vitro* du sapin de Numidie *Abies numidica*

LEBTAHI F., BOUGHEDOURA N.
Institut National de la Recherche Forestière, INRF B.P. 37 Chargea, Alger, Algérie

Dans la perspective de conserver les ressources génétiques et de procéder à l'amélioration de diverses espèces forestières rares et menacées de dépérissement et de disparition, notre laboratoire a jugé utile et important de lancer un programme de recherche en matière de multiplication végétative *in vitro*.

Le Sapin de Numidie (*Amies numidica*) est une espèce endémique des monts Babors. Elle couvre actuellement une superficie de 300 hectares seulement.

Cette espèce forestière qui figure dans la liste des plantes rares et vulnérables a été peu étudiée et peu utilisée dans les projets de reforestation et ce malgré son importance sylvicole et esthétique. En effet, elle peut contribuer d'une façon notable à l'équilibre écologique par des reboisements dans des zones à hautes montagnes, à la colonisation des terrains à sols calcaires les plus pauvres et à la protection et à l'embellissement de l'environnement.

Actuellement, l'extension et la sauvegarde de cette essence, devient l'une de préoccupations majeures du secteur forestier. À cet effet, nos travaux sont menés dans ce but pour mettre des méthodes de multiplication rapides d'arbres sélectionnés comme élites et destinés à la création de parcs à clones.

Les travaux que nous menons au laboratoire concernent essentiellement la micropropagation du Sapin selon deux voies :

- la voie de l'organogenèse qui permet d'obtenir des bourgeons par stimulation directe de l'explant ;
- la voie de l'embryogenèse somatique.

L'ensemble de nos expérimentations portent sur des séries de tests à la recherche des milieux de culture favorables à la multiplication cellulaire et au bourgeonnement et de balances hormonales favorisant davantage cette prolifération cellulaire et ce bourgeonnement.

La mise au point de cette technique nécessite l'expérimentation de plusieurs types d'explants issus de sujets juvéniles et âgés.

E30 : Amplification du palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.) par les voies de l'organogenèse, de l'embryogenèse somatique et de la réversion florale

MASMOUDI R., MEZIOU B., KRICHEN W., FEKI L., OTHMANI A., DRIRA N.
Laboratoire de Physiologie Végétale Faculté des Sciences de Sfax - 3038 Sfax - TUNISIE

La phœniciculture, élément principal de l'écosystème oasien, occupe une place stratégique dans l'économie des régions arides et chaudes du globe. Les recherches que nous avons menées sur le palmier dattier, depuis plusieurs années, en vue de sa multiplication clonale rapide, nous ont permis de définir de nombreuses modalités de propagation de cette espèce. Nous avons exploré les possibilités que peuvent offrir les tissus et organes de la phase adulte : bourgeons végétatifs

axillaires de rejets et feuilles qui en dérivent, fragments de folioles et jeunes palmes de rejets, ébauches florales et explants inflorescentiels de pieds femelles adultes. Les conditions de culture artificielle nous ont permis de révéler et de faire exprimer de nombreuses modalités de développement toutes étroitement liées tant aux conditions de l'environnement physico-chimique, qu'à la nature et au stade de développement des explants expérimentés.

Les principaux types de morphogenèse obtenus *in vitro* sont les suivants :

- Évolution des bourgeons végétatifs axillaires en plantules structurées par initiation de racines adventives à leur base.
- Néoformation directe de bourgeons sur les jeunes palmes sans aucune manifestation apparente de cals.
- Prolifération de cals organogènes conduisant à des plantes entières et viables.
- Réversion vers l'état végétatif des ébauches florales des pieds femelles engagées normalement dans la voie reproductrice.
- Réversion affectant les potentialités organogénétiques des tissus inflorescentiels.
- Apparition de structure simulant l'évolution du zygote et conduisant à la formation d'embryons puis de plantules.
- Déviation des apex floraux vers la voie inflorescentielle.

Ainsi, la culture *in vitro* des organes de la phase adulte du palmier dattier permet, d'une part, d'accéder à une meilleure compréhension des diverses modalités de développement chez cette espèce, d'autre part, d'obtenir des plantes selon de nombreuses voies de néoformation dont certaines présentent la garantie de conformité de la descendance. Celle-ci a pu être vérifiée à l'aide notamment des premières productions fruitières des plantes transférées en plein champ dont la vigueur semble avoir contribué à la précocité de l'entrée en floraison.

E31 : Culture *in vitro* et qualité de l'arôme de la ciboulette (*Allium schœnoprasum l.*)

MELLOUKI F.[1,2], VANNEREAU A.[1], COSSON L.[1]

[1] Laboratoire de Botanique et Phytochimie, Faculté de Pharmacie, Rue J.B. Clément. F- 92296 CHATENAY-MALABRY

[2] Département de Biologie, Faculté des Sciences et Techniques, MOHAMMEDIA, Maroc

L'utilisation des techniques de culture *in vitro* dans l'étude de métabolites à intérêt agro-alimentaire ou pharmaceutique est actuellement largement exploitée. De telles techniques présentent un certain nombre d'avantages :

- Les cellules cultivées *in vitro* se multiplient sur un milieu défini, dans des conditions de culture strictes, indépendamment des conditions saisonnières ou climatiques. Ceci permet une meilleure reproductibilité des résultats.
- Quand les cellules sont cultivées *in vitro*, sous forme de cals ou de suspensions, les corrélations qui existent dans la plante entière sont abolies. La caractérisation à l'échelle cellulaire de voies métaboliques comme celle de la production de substances aromatiques est rendue plus objective.

Nous avons choisi d'étudier la production de l'arôme de ciboulette par des cultures *in vitro,* en comparaison avec celle de feuilles fraîches. Nous disposions pour ce fait d'une souche non-organogène entretenue en milieu liquide. Les espèces du genre *Allium* émettent une forte odeur caractéristique des composés soufrés, obtenue après action d'une enzyme, l'alliinase (C-S lyase) vacuolaire sur des substrats cytosoliques, les S-Alk(en)yl-L-Cysteine Sulfoxides (ACSO). L'émission de l'arôme nécessite donc une lyse cellulaire. La qualité de l'arôme est ainsi directement liée à :

- l'activité de l'alliinase ;
- la proportion relative des différents précurseurs ACSO.

L'ALLIINASE : C-S LYASE (EC 4.4.1.4.)

L'enzyme a été extraite et purifiée à partir de la souche cultivée *in vitro* et à partir des feuilles. Il s'agit d'une glycoprotéine. L'homogénéité de l'enzyme a été obtenue par cinq étapes successives de purification. Son degré de pureté a été analysé à chaque étape par électrophorèse SDS-PAGE. Ses caractéristiques physicochimiques et cinétiques ont été déterminées : masse moléculaire, nombre de sous-unités et point isoélectrique, Km, température et pH d'action optima. Ces caractéristiques semblent être identiques, quelle que soit l'origine de l'enzyme, ce qui conforte l'intérêt de la culture *in vitro*.

LES PRÉCURSEURS (ACSO)

L'étude des précurseurs de l'arôme a été effectuée par C.L.H.P. après dérivatisation. Le S-méthyle-L-cystéine sulfoxide (MCSO), le S-propyle-L-cystéine sulfoxide (PCSO) et le *trans*-1-S-propényle-L-cystéine sulfoxide (PeCSO) ont été identifiés. Les proportions relatives de ces trois précurseurs sont très similaires entre les feuilles et les cultures. Le profil des précurseurs a été étudié après ajout dans le milieu de culture de divers composés exogènes. Les résultats obtenus montrent que les proportions des précurseurs les uns par rapport aux autres changent significativement. Il en résulte donc qu'il est possible de modifier « à volonté » la qualité de l'arôme émis par des cellules de ciboulette cultivées *in vitro*.

E32 : Déterminisme génétique de quelques molécules caractéristiques du pattern phénolique et leur relation avec la couleur des téguments chez la féverole (*Vicia faba L*) : Leguminosae.

MERGHEM R.[1], DUC G.[2], JAY M.[3]

[1] Université de Constantine, Institut des Sciences de la Nature, 25000 Constantine. Algérie. [2] INRA Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, BP 1540, F-21034 Dijon Cédex France. [3] Université Claude Bernard Lyon 1, Biologie micromoléculaire et Phytochimie, 43, Bd du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne France.

La haute teneur protidique des légumineuses justifie en partie le caractère vital que revêtent ces plantes en alimentation animale et humaine. Leurs protéines fournissent les acides aminés indispensables à la vie avec des teneurs en lysine avoisinant 18 g/kg de matière sèche, constituant ainsi un bon complément pour les céréales qui en sont déficientes. Cependant, lorsque des sources de protéines, comme le pois (*Pisum sativum)* et la féverole (*Vicia faba*), sont utilisées dans l'alimentation des monogastriques, les performances des animaux restent le plus souvent en deçà de celles obtenues avec les rations traditionnelles à base de larges proportions de soja (Eggum 1980 ; Huisman 1989). Des expérimentations *in vivo* effectuées avec *Vicia faba* (Marquard, 1989 et Jansman, 1991) ont démontré que la disponibilité en protéines et dans une moindre mesure en énergie est réduite par le présence de tannins condensés localisés dans les téguments des graines. Deux gènes récessifs, éliminant les tannins condensés des téguments et déterminant la couleur blanche des fleurs ont été mis en évidence chez *Vicia faba* par Picard 1976. Aprés cette découverte plusieurs programmes de sélection en

Europe ont inclus le caractère Zéro tannin et des cultivars sont actuellement enregistrés. Le gène Zéro-tannin entraîne une grande sensibilité aux micro-organismes pathogènes du sol (Villalobos and Jellis 1990), ce phénomène pourrait être surmonté par le croisement génétique entre génotypes dépourvus de tannins et des génotypes ayant un pouvoir tannant (Bond et Duc 1993). En effet, les tannins condensés jouent un rôle de défense pour le végétal lui-même, en particulier vis-à-vis des attaques des micro-organismes et prédateurs (Salunke et al., 1990). Pour pallier ce problème, la sélection devra s'orienter vers la recherche de nouveaux génotypes dont la teneur en tannins condensés autoriserait une bonne tenue au champ et serait sans effet néfaste pour l'alimentation. Des génotypes à fleur ponctuée jaune et à faible teneur en tannins condensés ont été reporté par Cabrera et Martin (1986), Bond *et al.* (1991) et des génotypes à téguments rouges par Cabrera et Martin (1989). Une collection de génotypes de féverole (*Vicia faba*) est analysée pour son contenu en tannins condensés et son pouvoir tannant ; l'héritabilité du pattern phénolique est également évaluée à travers l'analyse des descendants F_3 issus d'un croisement diallèle entre un génotype à fleur ponctuée noir et tégument beige très tannant, un génotype à fleur ponctuée noir et tégument vert à pouvoir tannant intermédiaire et enfin un génotype à fleur ponctuée noir et tégument noir très peu tannant. Les résultats montrent l'existence, dans le cas de la féverole, de génotypes à fleur ponctuée noir présentant des teneurs intermédiaires en tannins condensés. L'analyse de la descendance F_3 issue du croisement diallèle confirme bien le lien entre couleur des téguments, activité tannique et pouvoir tannant.

Mots clés : *Vicia faba* - légumineuses à graines - croisements - analyse génétique - valeur nutritionnelle - couleur des téguments - tannins condensés.

E33 : Essai de reproduction asexuée (marcottage) des feuilles de *Bryophyllum pinnatum* (Lam) Oken Crassulaceae

NANCY L.
Laboratoire de Pharmacognosie, 27, Bd Jean Moulin, 13885 Marseille cedex 5

Dans le but de justifier l'usage populaire de *Bryophyllum pinnatum* (Lam) Oken Crassulaceae et d'envisager sa culture, une enquête a été effectuée dans les provinces du Cameroun de juillet 1994 à octobre 1995. Dans les 10 provinces enquêtées, cette plante herbacée est doublement utilisée, à la fois comme végétal comestible (feuille = légume) et comme médicament (dans le traitement des otites, de la toux et des affections dermatologiques). Une revue de la littérature confirme ces deux utilisations dans une vingtaine de pays africains. Il nous a donc semblé intéressant de mener des investigations sur cette plante dont les usages alimentaires et médicaux sont si largement répandus. Pour ce faire, une récolte quantitative de feuilles de cette plante s'imposait. Le premier plant sur lequel nous avons récolté les feuilles, nous a frappé par un fait inhabituel. Au point de contact de la feuille et du sol (au niveau de l'une des dents du lime) s'élevait une jeune pousse. Comme les quantités récoltées étaient insuffisantes pour nos investigations, nous avons pensé que produire par marcottage à partir de feuilles, de jeunes pousses, et plus tard de jeunes plants, était possible. Un premier essai sur des feuilles récoltées l'après-midi était négatif. Le second, effectué sur des feuilles récoltées tôt le matin selon les indications des personnes enquêtées et des tradipraticiens, nous permettait d'obtenir une feuille mature (30 à 35 dents), 30 à 35 nouvelles pousses. Comme une plante adulte porte en moyenne 30 folioles matures, à partir de cette dernière, par marcottage, sous des conditions particulières, 900 à 1050 jeunes plantes destinées, soit à l'alimentation (source de vitamine C, d'acide

citrique et surtout de calcium et de mucilage), soit comme phytomédicaments. Par ailleurs, la toxicité aiguë de l'extrait acqueux (DL50 = 6,4 g/Kg poids corporel) atteste de l'innocuité des ces feuilles largement consommées par les enfants dénutris en phase de croissance au Cameroun et dans les pays en voie de développement.

E34 : Contribution a l'étude d'un module de signalisation associé au processus de l'embryogenèse somatique du blé

NATO A., MOURSALIMOVA A., FRESNEAU C., MIRSHAHI M., LAVERGNE D., HENRY Y., DUCREUX G., DE BUYSER J.

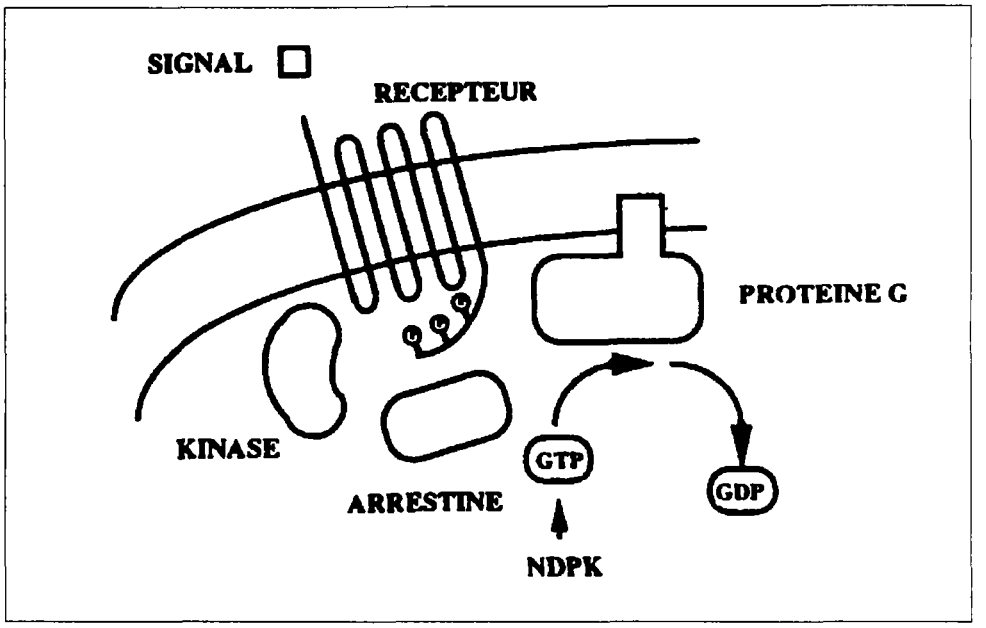
Université Paris-XI, INSERM 86, URA CNRS 1128 et 1116

Les processus complexes de la croissance et du développement des Plantes Supérieures dépendent notamment de facteurs environnementaux et de médiateurs chimiques. L'ensemble de ces signaux nécessitent que les cellules végétales mettent en œuvre des systèmes de perception et de génération de messagers intra- et intercellulaires conduisant à des modifications de la physiologie ou du métabolisme. À l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires des voies de transduction de signaux et de la communication cellulaire constituent un vaste champ d'investigation pour la biologie végétale. La complexité du réseau des voies de signalisation commence à être perçue du fait de l'identification de nombreuses familles de gènes. Il semble que certains modules de signalisation aient été parfaitement conservés durant l'évolution (levures, mammifères, plantes). Par analogie avec ce qui est connu des voies de signalisation dans les systèmes animaux et la levure, les récepteurs potentiels des hormones et des photons lumineux dans les cellules végétales, paraissent être couplés à des protéines G. Cependant on dispose de très peu de données sur les protéines régulatrices impliquées dans les différents systèmes de transduction chez les plantes.

Objectifs : C'est dans cette perspective que nous avons entrepris de rechercher chez les végétaux une protéine analogue à l'arrestine, molécule jouant un rôle fondamental dans la régulation de la phototransduction visuelle chez les mammifères. Nous avons élargi notre étude à l'analyse d'un module de signalisation comprenant des arrestine-like, des protéines G et la nucléoside diphosphate kinase (NDPK). Ces éléments sont susceptibles de contrôler les phases de prolifération cellulaire et de différenciation lors de l'induction hormonale du processus de l'embryogenèse somatique (figure 1). Les **arrestines** constituent une famille de protéines monomériques de 39 à 49 kD, dont la structure est très conservée durant l'évolution. L'arrestine rétinienne bovine ou antigène S est une protéine soluble de 48 kD. Elle se lie dans les bâtonnets à la rhodopsine photoactivée et phosphorylée, et inhibe les effets amplificateurs de la transducine (protéine G), assurant ainsi la désensibilisation des récepteurs. Considérée comme n'étant pas spécifique des cellules photoréceptrices, l'arrestine apparaît aujourd'hui comme le premier membre identifié d'une famille de protéines homologues possédant un rôle régulateur dans des systèmes de transduction médiés par les protéines G. Les **protéines G** lient et hydrolysent le GTP. Elles appartiennent à une large famille. La première sous-famille est celle des protéines G hétérotrimériques (sous-unités a, b et g), autour de 45 kD, couplées à des récepteurs à sept segments transmembranaires. Des protéines de cette sous-famille sont surexprimées durant l'embryogenèse (Xénope, algue, *Arabidopsis*). La seconde sous-famille, très large, rassemble des protéines G monomériques, de 20 à 35 kD, contrôlant le cycle cellulaire, la croissance, la différenciation, la sécrétion. Chez les végétaux, des protéines G sont impliquées dans la signalisation de la lumière et des hormones, les mécanismes de défense et la régulation de l'activité des canaux ioniques. La **NDPK**, protéine native hexamère de 100 kD (sous-unités de 17-20 kD), joue un rôle central dans le contrôle du flux métabolique des

groupements phosphates. Cette enzyme est actuellement considérée comme un marqueur potentiel de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Ainsi, chez la Drosophile, le gène *awd* est impliqué dans le développement et présente une forte homologie avec le gène humain *Nm23*. Récemment, la forte analogie des séquences de la NDPK d'Épinard et les produits des gènes *awd* et *Nm23*, nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une contribution de cette enzyme aux processus de prolifération et de différenciation des cellules végétales.

Figure 1. Éléments de signalisation.



Modèle biologique : Nous avons choisi la variété de blé (*Triticum aestivum* L.) Chinese Spring comme modèle expérimental. Les embryons zygotiques immatures (14 jours après la pollinisation) ont été utilisés pour initier l'embryogenèse somatique induite par le 2,4-D, lors de la culture à la lumière ou à l'obscurité. Nous disposons de souches embryogènes et non embryogènes de cette variété, ainsi que de ses lignées aneuploïdes : 36 lignées ditélosomiques (DT) et 6 lignées nullisomiques-tétrasomiques (NT). Deux lignées DT, CSDT3DS et CSDT3DL (S pour court et L pour long, 3 pour le chromosome et D pour le génome) ont été particulièrement analysées, du fait de leur capacité non embryogène (DT3DS) et embryogène (DT3DL) en culture *in vitro* (Henry *et al* 1994).

Approches expérimentales : Les techniques d'immuno-empreintes (Western blot) ont été développées grâce à l'apport des anticorps monoclonaux de l'arrestine bovine, de la NDPK humaine et d'un anticorps polyclonal dirigé contre un peptide synthétique de la séquence conservée de la sous unité a de la protéine G. Les protéines possédant un site de fixation pour le GTP ont également été recherchées par les techniques des overlays avec l'(a^{-32}P) GTP.

Résultats

1 - Une première forme soluble d'arrestine-like de 40 kD est détectée par les anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes N-terminaux et centraux de l'arrestine bovine. Sa présence est générale dans les organes des germinations de blé (racine, coléoptile, feuille). Cette protéine se retrouve également dans l'embryon immature de blé. La synthèse de cette forme n'est pas sensible à la lumière de croissance, mais est fortement surexprimée dans les cultures *in vitro* initiées à partir d'embryons immatures, en présence de 2,4-D. Une seconde forme soluble et membranaire d'arrestine-like de 29 kD est décelée par plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes C-terminaux de l'arrestine bovine. Cette seconde forme qui apparaît dans les organes chlorophylliens lors de la culture à la lumière est spécifique

des tissus embryogènes. L'analyse de 42 lignées aneuploïdes a montré que le bras chromosomique 3DL, essentiel pour l'embryogenèse somatique possède un gène qui code pour la forme arrestine-like de 29 kD ou contrôle son expression (Nato *et al* 1997). De plus, des résultats récents obtenus dans notre laboratoire ont montré que la forme membranaire de cette arrestine-like semble être intégrée dans les structures thylakoïdales des chloroplastes.

2 - L'anticorps polyclonal dirigé contre la sous-unité a de la protéine G reconnaît un polypeptide soluble et membranaire de 58 kD dans les embryons immatures. La culture *in vitro* de ces embryons en présence de 2,4-D provoque l'apparition d'un nouvelle forme de 32 kD. Cette seconde forme pourrait être liée à la prolifération cellulaire résultant de la présence d'une auxine dans les cultures. Les expériences de marquage avec l'($a^{-32}P$) GTP ont confirmé la stimulation des formes protéiques liant le GTP en relation avec la prolifération et la différenciation cellulaires induites lors de l'embryogenèse somatique du blé.

3 - L'analyse par Western blot montre que la forme soluble de 16 kD de la NDPK du blé, présente dans l'embryon immature, est plus fortement exprimée durant la culture *in vitro*. Les extraits solubles des cultures embryogènes montrent en outre la présence d'une forme de 32 kD, qui pourrait jouer un rôle dans la différenciation. Malgré l'apparition de cette nouvelle forme, le niveau de l'activité enzymatique de la NDPK ne varie pas lors de la mise en culture *in vitro* des embryons immatures.

Perspectives :

Les anticorps utilisés nous ont permis de déceler des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire et la différenciation. L'analyse de l'expression de plusieurs molécules (protéine G, arrestine, NDPK), sous l'influence de la lumière et des hormones, confirme qu'elles jouent un rôle important dans les cascades de signalisation participant au métabolisme et au développement (Nato *et al* 1996). Des avancées dans la connaissance de leur mode d'action pourront être obtenues par le clonage des ADNc (en cours de réalisation pour la NDPK), l'analyse des séquences et l'étude de la structure des gènes. Les travaux ultérieurs devraient permettre d'affiner notre connaissance des mécanismes participant au développement des plantes.

Bibliographie

1. HENRY Y., MARCOTTE J.-L., DE BUYSER J. 1994. Chromosomal location of genes controlling short-term and long-term somatic embryogenesis in wheat revealed by immature embryo culture of aneuploid lines. *Theor Appl Genet* 89 : 344-350.
2. NATO A., DE BUYSER J., MIRSHAHI A., LAVERGNE D., JEAN C., CAVALCANTE A.J.M., DUCREUX G., TICHTINSKY G., JOUANNIC S., HAMAL A., KREIS M., HENRY Y. 1996. Expression of signalling molecules during plant development and embryogenesis. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4 : 212-214.
3. NATO A., MIRSHAHI A., TICHTINSKY G., MIRSHAHI M., FAURE J.-P., LAVERGNE D , DE BUYSER J., DUCREUX G., HENRY Y. 1997. Immunological detection of potential signal transduction proteins expressed during wheat somatic tissue culture. *Plant Physiol* 113 (sous presse)

E35 : Effets à long-terme du saccharose exogène sur la croissance, la photosynthèse et le métabolisme du carbone des plantes de tomate *in vitro*

LE V.Q., SAMSON G., DESJARDINS Y.

Les effets à long-terme du saccharose exogène sur la croissance, la photosynthèse et le métabolisme du carbone ont été étudié sur des plants de tomate cultivés sous deux conditions différentes. Sous une faible intensité lumineuse (50µE $m^{-2}s^{-1}$) et une concentration en CO_2 de 400 ppm, la présence du saccharose augmente la croissance, la photosynthèse, la teneur en

chlorophylle, la teneur en sucres solubles (hexoses et saccharose) et en amidon dans les racines, les feuilles jeunes et matures par rapport aux plantes photo-autotrophique. L'apport du saccharose augmente fortement l'activité de la saccharose synthase (SS) (EC 2.4.1.13) dans les racines et les jeunes feuilles tant dit que l'activité de la saccharose phosphate synthase (SPS) (EC 2.4.1.14), de l'invertase (INV) (EC 3.2.1.26) et de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (ADPGppase) (EC 2.7.7.27) augmente dans les racines et les feuilles matures. Au contraire, les activités de la SS dans les racines et de l'ADPGppase dans les feuilles matures sont bien moins stimulées par le saccharose exogène dans des conditions de forte intensité lumineuse (500 $\mu E\ m^{-2}s^{-1}$) et de forte concentration en CO_2 (4 000 ppm). On observe une diminution de la croissance, de l'activité de la SPS ainsi que de la photosynthèse et une forte accumulation d'hexoses et d'amidon. Nous n'avons pas observé d'effet du saccharose exogène sur le rendement du photosystème II estimé par le rapport Fv/Fm dans les deux cas *In vitro*, dans des conditions limites de culture (lumière et CO_2 faible) la plante a besoin de saccharose exogène pour augmenter la photosynthèse et la croissance alors que dans des conditions très favorables pour la photo-autotrophie (lumière et CO_2 élevé) la présence du saccharose diminue non seulement la photosynthèse mais aussi la croissance par la perturbation dans la plante entière des relations source-puit.

E36 : Interaction cytosquelette cortical, paroi cellulaire chez les plantes. Contrôle de la division asymétrique de la cellule apicale de *Sphacelaria* (Fucophycée)

OUICHOU A., DUCREUX G.

Laboratoire de Morphogenèse Expérimentale Végétale, Bât 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

La cellule apicale de *Sphacelaria* montre une organisation polarisée permanente, produit par des divisions asymétriques et successives des cellules sous apicales, qui contribuent à la construction du thalle.

Durant l'interphase de la cellule apicale, les deux centrosomes diamétralement opposés, coïncident avec l'axe de croissance et organisent un réseau de microtubules polarisé. Le marquage des filaments d'actine et vitronectine amènent des preuves sur les connexions entre le cytosquelette cortical et la paroi à travers la membrane plasmique. Une confirmation indirecte est apportée par la désorganisation du cytosquelette et l'altération dramatique de la polarité chez les protoplastes de la cellule apicale.

Durant la mitose, la polarité du fuseau mitotique et la polarité cellulaire est conservée en permanence. A la fin de la mitose, les centrosomes de dédoublent immédiatement et migrent à égale distance du site originel du pôle distale. Un réseau de microtubules se forme à partir de chaque centrosome, une orientation du noyau rend ce réseau parallèle à l'axe de la cellule et s'allonge jusqu'à l'extrémité proximale, des connexions s'établissent probablement avec la paroi cellulaire par l'intermédiaire de l'actine. En conséquence, la polarité du fuseau mitotique coïncide de nouveau avec la polarité cellulaire. Ces événements sont caractéristiques de la cellule apicale et sont reliés a son organisation structurale. L'identification des protéines impliquées dans les connexions entre le cytosquelette cortical et la paroi cellulaire est en cours, en prenant comme modèle les interactions cortex cellulaire-matrice extracelullaire chez les cellules animales.

E37 : Régénération intensive du pois (*Pisum sativum* l.) en présence de thidiazuron, *in vitro*

POPIERS D., SANGWAN-NORREEL B.S.
Laboratoire Androgenèse et Biotechnologie, Université de Picardie Jules Verne, Faculté des Sciences 33, rue Saint Leu, F-80039 AMIENS Cedex 01

La régénération *in vitro* du Pois, *Pisum sativum* L. a été améliorée grâce à l'utilisation de Thidiazuron. Des bourgeons sont initiés à partir de nœuds cotylédonaires de l'axe embryonnaire, isolé à partir de graines matures, et cultivés sur un milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné de 13,3 µM de 6-benzylaminopurine (BA), de 16,1 µM d'acide α-naphtalène acétique et de 0,2 µM d'acide-2,3,5-triiodobenzoïque (TIBA) (Tétu *et al.*). Les structures obtenues sont par la suite excisées en fines tranches et cultivées sur le même milieu ; ou en présence de Thidiazuron, ces tranches produisent une deuxième vague de bourgeonnement. Les meilleurs résultats (90-110 bourgeons par explant) sont obtenus avec 10 µM de Thidiazuron (Popiers *et al*). La production de massifs organogènes primaires et secondaires est indépendante du génotype et est reproductible. Les bourgeons s'allongent sur le milieu initial, puis s'enracinent en présence de 5,37 µM d'acide α-naphtalène acétique et se développent en plantes viables.

Bibliographie

1. POPIERS D., FLANDRE F., SANGWAN-NORREEL B.S. 1997. Intensification de la régénération du Pois, (*Pisum sativum* L.), par le thidiazuron, *via* la formation de structures caulinaires organogènes. J. Can. Bot. (sous presse).
2. MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., **15** : 473-497.
3. TETU T., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S. 1990 Direct somatic embryogenesis and organogenesis in cultured immature zygotic embryos of *Pisum sativum* L. J Plant Physiol, **137** 102-109.

E38 : Micropropagation de la patate douce (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) à partir du développement de bourgeons axillaires

ROBÉNE-SOUSTRADE I., KODJA H., FIGIER J.
Laboratoire de Biologie et Physiologie végétales, Université de La Réunion, 15 Av. René Cassin, BP 7151 97715 ST Denis Messag 9.

La patate douce (*Ipomea batatas*) est une plante d'intérêt économique considérable dans les zones tropicales humides. Tel est le cas à la Réunion où elle est utilisée à la fois dans la nutrition humaine mais aussi dans l'alimentation bovine. En effet, l'introduction de la patate douce (ses tubercules racinaires et ses feuilles) dans la nutrition des vaches, augmente de manière sensible la production laitière, et ceci, sans apport supplémentaire de concentré de

fourrage. Malheureusement, les zones de culture de la patate douce à la Réunion sont situées à une altitude largement inférieure à celle des zones d'élevage des bovins où règnent des températures relativement basses en saison hivernale.

Des expérimentations au champ ont montré que des variétés de patate douce importées de pays de hauts plateaux (Madagascar et Pérou) pouvaient s'adapter aux zones d'altitude élevées à la Réunion. Cependant, la productivité de ces variétés importées est largement inférieure à celle des espèces locales en basse et moyenne altitudes. Les méthodes de culture *in vitro* et de manipulations génétiques, notamment l'exploitation de la variation somaclonale, l'hybridation somatique et la transformation génétique, permettent d'envisager, à cours terme, l'amélioration génétique de ces variétés notamment au niveau de leur rendement et de leur adaptabilité. Cependant, l'application de ces techniques nouvelles nécessite la maîtrise des systèmes de régénération *in vitro* chez la patate douce. La méthode classique de multiplication végétative *in vitro* est l'embryogenèse somatique. Cependant, outre que cette technique ne garantit pas une multiplication conforme des génotypes, il existe chez la patate douce certains clones pour lesquels il est difficile, voire impossible, d'obtenir des embryons somatiques. Pour ces clones, il est préconisé une autre méthode de micropropagation : l'organogenèse. Notre travail a été de démontrer que la micropropagation de la patate douce peut se réaliser facilement à partir de bourgeons axillaires. Pour cela, des explants (d'environ 3 mm), formés du dôme apical et des deux dernières feuilles récemment formées, ont été prélevés sur des tiges feuillées juvéniles de deux variétés locales (les variétés RP40 et RP90) cultivées en serre. Après désinfection, ces explants ont été déposés sur différents milieux d'induction. Le milieu de base (MS30) est celui de Murashige et Skoog gélosé, additionné de saccharose (30 g/l). Différentes combinaisons hormonales composent ces milieux d'inductions. En effet, deux phytohormones sont utilisées : l'ANA, acide α-naphtaléne acétique (0 et 0,5 mg/l) ainsi que le TDZ, thidiazuron (0, 0,5, 1, 2 et 3 mg/l). Après quatre semaines de culture à la lumière à 25°C, les explants induits sont transférés sur le milieu de régénération : milieu MS30 dépourvu d'hormone. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les milieux inducteurs ne contenant pas d'ANA et pourvus de TDZ à 0,5 et 1 mg/l. En effet, ces milieux induisent vers la troisième ou quatrième semaine, le développement d'un bourgeon axillaire secondaire (visible à l'œil nu). La transformation de ce bourgeon en une tige feuillée est accélérée lors du transfert sur le milieu de régénération. Après quatre semaines de croissance sur ce dernier milieu, les tiges feuillées isolées sont transférées sur un milieu d'enracinement (milieu MS30 pour lequel les macroéléments sont dilués de moitié). Le pourcentage d'enracinement des tiges feuillées est de 100 % et débute dés la première semaine aprés le repiquage. Les plants ainsi obtenus sont transférés dans une miniserre (480X330X200 mm) contenant un mélange de vermiculite et de sable (2:1). Ces plants se développent facilement aprés une ouverture progressive du couvercle de la miniserre. En conclusion, nous disposons maintenant d'une technique de micropropagation de la patate douce, basée sur le bourgeonnement axillaire. Il s'agit d'une "vitro-méthode" relativement simple, avec une régénération des tiges feuillées à partir de zones méristématiques préexistantes, qui d'ordinaire, garantit la conformité génotypique. L'utilisation de cette technique sur les différentes variétés de Patate douce locales ou importées à des fins agronomiques à la Réunion, permettra d'une part la constitution d'une «banque de gènes ou vitrothèque » et d'autre part, d'avoir un matériel végétal « sain » et disponible susceptible de servir pour des tests de sélection ou de manipulation dans le domaine du génie génétique.

La présentation de ce poster aux 6e journées scientifiques des Biotechnologies végétales a été faite avec l'aide de l'AUPELF/FICU.

E39 : Effet de l'apport exogène in planta d'acide 2,3,5 triiodobenzoique ou TIBA sur la régénération *in vitro* de Betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.).

ROUSSY I., DUBOIS F., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S.
Laboratoire Androgenèse et Biotechnologie, Université de Picardie Jules Verne, 33, rue Saint-Leu, 80 039 Amiens, Cedex 01, France

Nous avons développé un protocole de régénération indirecte chez la Betterave sucrière, à partir de fragments de limbes de plantes adultes entretenues en serre. Un apport exogène (2 fois par semaine) d'un inhibiteur du transport auxinique, tel que le TIBA ou acide 2,3,5 triiodobenzoïque, à la concentration de 3 mg/l, à des plantes agées de 6 mois, est essentiel pour l'obtention de cals organogènes (Roussy *et al.*, 1996). L'effet bénéfique, de l'apport en culture *in vitro* du TIBA, sur la régénération directe et indirecte a déja été rapporté chez cette espéce (Detrez *et al.*, 1988 ; Jacq *et al.*, 1992). De plus, seuls les cals produits sur un milieu d'induction, contenant du thidiazuron ou TDZ à la concentration de 2,2 mg/l ou 10 µM, ont donné des pousses. Le nombre de bourgeons régénérés augmente au cours des repiquages. Nous avons noté en parallèle que, par rapport aux plantes témoins, l'activité des péroxydases était supérieure chez les plantes traitées par du TIBA à 3 mg/l. Dans un contexte biotechnologique, visant à la transformation génétique de cette espèce, via *Agrobacterium tumefaciens*, ce protocole pourrait s'avérer être un outil très intéressant pour la régénération de plantes transgéniques.

Bibliographie

1. DETREZ C., TÉTU T., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S. (1988) J Exp Bot 39 · 917-926.
2. JACQ B., TÉTU T., SANGWAN R.S., DE LAAT A., SANGWAN-NORREEL B.S. (1992) Plant Cell Reports 11 : 329-333.
3. ROUSSY I., DUBOIS F., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S. (1996) Plant Cell Reports 16 : 142-146.

E40 : Rôle du 3F-ip (4,4,4 trifluoroisopentenyladenine) et du CPPU (N-(2,chloropyridyl) 4-N' phénylurée), molécules de synthèse à activité cytokinine, sur l'initiation et la multiplication de protocormes de régénération de *Phalaenopsis*

SAMSON I., HAMAMA L., LETOUZE R.
Laboratoire de Recherche en Physiologie Végétale des Pays de la Loire (L.R.P.V), 16, Boulevard Lavoisier - 49045 Angers Cedex 01 - France

Le *Phalaenopsis* (fam. Orchidaceae), qui tient son nom du grec "Phalaina" = papillon et "opsis" = ressemblance, est une orchidée épiphyte à croissance monopodiale.

Actuellement, la propagation industrielle du *Phalaenopsis*, qui passe par la multiplication sexuée entre deux parents issus le plus souvent d'hybridations dirigées, est parfaitement maîtrisée mais pose le problème de variabilité et d'hétérogénéité du semis.

La multiplication végétative (protocormes de régénération) est la seule alternative pour résoudre les problèmes liés à la multiplication sexuée ; elle permet d'obtenir un matériel génétiquement homogène, conforme à un pied-mère sélectionné.

Si la formation de protocormes de régénération est possible à partir d'explants de *Phalaenopsis* (1), la méthodologie reste délicate et les résultats obtenus permettent rarement une application industrielle programmable.

L'objectif de ce travail a été de tester à trois niveaux différents et comparativement avec les hormones classiquement utilisées, des molécules nouvelles (2)[1] à activité cytokinine (3F-ip ; CPPU) sur les différentes étapes du processus de régénération par embryogenèse somatique.

CLONAGE DE VARIÉTÉS HYBRIDES À HAUT INTÉRÊT ÉCONOMIQUE

Des boutures gemmées de hampes florales de *Phalaenopsis*, préalablement désinfectées sont mises en culture sur le milieu Vacin-Went additionné d'ANA (0,1 à 5 mg/l), de BAP (0,5 à 5 mg/l), de 20 % de lait de coco et solidifié avec 2 g/l de gelrite. Au bout de deux mois de culture, selon la position du bourgeon sur la hampe florale, ce milieu permet la formation de pousses végétatives ou de hampes florales qui après isolement, sont cultivées sur le même milieu et repiquées tous les mois. Ce matériel végétal conduit à l'obtention de clones génétiquement homogènes.

INITIATION DES PROTOCORMES DE RÉGÉNÉRATION

Les plateaux racinaires des pousses végétatives obtenues *in vitro* âgées de 8 à 12 mois sont mis en culture sur le milieu NDM additionné de saccharose 10 g/l, d'ANA (0,1-3 mg/l), de 3 F-ip (0,1-5 mg/l) , de 15 % de lait de coco et solidifié avec 2 g/l de gelrite.

Au bout d'un mois, les explants non nécrosés demeurent verts et 1 à 2 mois plus tard donnent naissance aux premiers protocormes de régénération.

Cette étape d'initiation des embryons somatiques est particulièrement délicate. Le prélèvement de l'explant, la balance hormonale et le choix de la cytokinine sont les clefs de la réussite. Les plateaux racinaires de vitroplants se sont révélés les explants les plus performants pour l'initiation des protocormes. La nature de l'explant le plus favorable étant définie, le travail en cours tend à améliorer la balance hormonale.

MULTIPLICATION DES PROTOCORMES DE RÉGÉNÉRATION

Les protocormes de régénération obtenus précédemment sont sectionnés et mis en culture sur le milieu NDM additionné d'ANA (0,1-2 mg/l), de CPPU (hormone de synthèse à activité cytokinine - 0,5 à 5 mg/l), de 15 % de lait de coco, de saccharose 10 g/l et solidifié avec 2 g/l de gelrite. Au bout d'un mois chaque fragment de protocormes présente de nombreux protocormes néoformés, d'aspect globuleux. L'utilisation du CPPU permet un taux de multiplication supérieur de 28 % à celui obtenu sur le même milieu avec ANA et BAP. Les protocormes obtenus via l'hormone de synthèse présentent un aspect satisfaisant, alors que ceux multipliés via les hormones traditionnelles présentent fréquemment un aspect vitreux.

ÉVOLUTION DES PROTOCORMES DE RÉGÉNÉRATION

Les protocormes sont isolés et mis sur le milieu NDM additionné d'ANA (0,1-5 mg/l), de BAP (0,5-6 mg/l), de 15 % de lait de coco et solidifié avec de la gelrite à 2 g/l.

La première feuille se forme très rapidement, au bout d'un à deux mois l'ensemble présente l'aspect d'une plantule non enracinée. À partir de cet instant, 45 jours plus tard, les racines commencent à se former d'une façon asynchrone.

---

[1] Don du Professeur Mornet, Université d'Angers.

L'utilisation de molécules de synthèse à activité cytokinine (3F-ip ; CPPU) s'avère prometteuse pour une application industrielle de l'embryogenèse somatique du *Phalaenopsis*

Bibliographie

1. TANAKA M., SAKANISHI Y., 1977. - Clonal propagation of *Phalenopsis* by leaf tissue culture. American Orchid Society Bulletin, 733-737.
2. CLEMENCEAU D., COUSSEAU J, MARTIN V., MOLINES H., WAKSELMAN C., MORNET R, NOGUE F., LALOUE M., 1996. - Synthesis and cytokinin activity of two fluoro derivatives of N^6-Isopentenyladenine. Am. Chem. Soc., 320-323.

E41 : L'augmentation du taux de CO_2 atmosphérique permet d'atténuer les effets du déficit hydrique sur la croissance et la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses

SERRAJ R.[1,2], SINCLAIR T.R.[2]
[1] Laboratoire de Physiologie Végétale, Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc [2] USDA-ARS. Université de Florida, États Unis d'Amérique.

L'augmentation globale du taux de gaz carbonique [CO_2] dans l'atmosphère et son impact sur les changements climatiques ont été récemment bien documentés[1]. Certains modèles climatiques[2] prédisent une sécheresse accrue dans certaines régions du Monde liée à l'augmentation de [CO_2]. De nombreuses études ont été menées sur les réponses des légumineuses à l'augmentation de [CO_2][1]. Cependant la quasi-totalité de ces recherches a été consacrée à des plantes cultivées dans des conditions optimales : alimentation hydrique et nutrition azotée minérale adéquates. La fixation symbiotique de l'azote (FSA) et le déficit hydrique seraient pourtant des processus extrêmement importants dans un scénario de changement climatique global, puisqu'une large proportion de la croissance des plantes devrait alors, avoir lieu sur des sols déficients en eau et en azote. Nous avons montré précédemment que la FSA chez le soja était extrêmement sensible au déficit hydrique[3,4], et que par conséquent, l'accumulation de l'azote était plus inhibée que celle du carbone[5]. La présente étude a été consacrée a l'analyse physiologique de l'interaction du déficit hydrique et de l'enrichissement en [CO_2] sur la FSA et la croissance chez le soja. Les plantes [*Glycine max* (L.) Merr.] ont été inoculées avec une préparation commerciale de *Bradyrhizobium japonicum* et cultivées pendant 6 semaines, en milieu contrôlé en conditions hydriques et [CO_2] normales, sans apport d'azote minéral. Les plantes ont été ensuite exposées à 2 traitements hydriques : irrigué, non irrigué, combinés avec 2 traitements de CO_2 : ambiant, élevé (approx. 700 uL L^{-1}). Différents paramètres physiologiques (croissance foliaire, transpiration, photosynthèse, activité nitrogènes, production de biomasse, teneurs en glucides et uréides) ont été mesurés durant les deux semaines qui ont suivi le début des traitements. Pour les 2 concentrations en CO_2, le déficit hydrique a provoqué une inhibition très marquée du développement de la surface

foliaire, des échanges gazeux, de l'activité fixatrice d'azote et de l'accumulation de biomasse dans les différents tissus de la plante. L'augmentation de [CO_2] s'est traduite par une diminution des pertes en eau et une stimulation de la croissance foliaire, pour les 2 traitements hydriques. Il n'y a eu néanmoins aucun effet significatif de [CO_2] sur les réponses relatives de la croissance et des échanges gazeux foliaires au déficit hydrique. Par contre, en conditions de déficit hydrique, l'augmentation de [CO_2] a eu pour conséquence de retarder significativement la diminution de l'activité fixatrice d'azote en réponse au dessèchement du sol. L'augmentation de [CO_2] a permis en outre, le maintien du développement et de la croissance des nodosités en conditions de déficit hydrique, relativement au [CO_2] ambiant. Nous avons conclu que l'un des effets importants de l'enrichissement en CO_2 en conditions de déficit hydrique, réside dans la stimulation de l'assimilation du C et l'augmentation de l'allocation de substrats carbonés aux nodosités, ce qui se traduit par le maintien de la fixation symbiotique de l'azote en conditions d'eau limitante. À partir de l'interaction des effets de [CO_2] et du déficit hydrique, nous proposons une discussion concernant les éventuels effets bénéfiques de l'augmentation de [CO_2] sur la production des légumineuses en améliorant la tolérance à la sécheresse de la fixation symbiotique, l'assimilation du C et la réduction des demandes en eau et en azote.

Bibliographie

1. ALLEN A.H.1994.2. Manabe and Wetherald. 1980. 3. Sinclair T.R., Serraj R. 1995 Nature 378 (6555): 344. 4. Serraj R., Sinclair T.R. 1996. Crop Sci. 36:961-968. 5. Serraj R., Purcell L.C., Bona S , Sinclair T.R. 1997. Field Crops Res. (Sous presse).

E42 : Gynogenèse *in vitro* du blé dur *Triticum durum* dans le cadre d'une création de tolérance à l'aridité : souches régénérantes des plantes vertes

SIBI M.L., SHEKAFANDEH A.
ENSAIA, 2 ave. de la forêt de Haye, 54505 Vandœuvre, France

Dans le cadre de la création de tolérance à l'aridité, afin d'obtenir des souches régénérantes de blé dur qui pourront être soumises *in vitro* à des pressions sélectives, nous nous sommes attachés à élaborer une technique de gynogenèse.

Gynogenèse du blé dur : Le matériel végétal est constitué de 6 variétés marocaines (Cocorit, Isly, Jori, Oued-Zénati, Sarif) et de Cham1, variété « témoin » pour l'ensemble des laboratoires du réseau. Toutes ces variétés sont des blés barbus et atteignent une hauteur d'environ 80 cm. Le prélèvement des épis est effectué lorsque le pollen contenu dans les anthères est déjà bi- ou trinucléé. À la suite d'un prétraitement au froid adéquat, les épis nus sont stérilisés et disséqués. Une quinzaine d'ovaires est alors déposée sur le milieu contenu dans chacune des boites de 6 cm de diamètre. Dans une première série d'expérimentations, pour l'ensemble des variétés présentées ci-dessus, un total de près de 10 500 ovaires a été mis en culture. Chez Isly, après les premiers résultats positifs qui ont amené à 15 plantes pour 105 ovaires (14,3 %), le peaufinage de la technique a permis d'obtenir, sur ce génotype, 32 plantes pour 102 ovaires (31,4 %). Les autres meilleures valeurs observées sont de 37 plantes pour 120 ovaires (30,8 %) pour Jori, et de 14 plantes pour 60 ovaires (23,3 %) chez Cocorit. Toute expérimentation confondue, un total de 147 plantes a été obtenu lors de cette première phase de régénération (phase I), avec 50 plantes pour Isly, 61 pour Jori, et 36 pour Cocorit. Étant donné le cadre du programme dans lequel s'intègre ces travaux, une phase d'entretien de l'activité régénératrice,

associée à la prolifération des cals a été recherchée pour obtenir des souches utilisables en condition de stress. Les souches régénérantes issues des génotypes Cocorit et Isly, ont été difficiles à maintenir et n'ont donné que peu de plantes complémentaires. Pour Cocorit, à partir des 144 souches suivies, un seul repiquage d'entretien a pu être effectué, donnant une unique plante. Quant à Isly, quatre repiquages des 186 souches succédant la phase I, ont donné : 16, puis 7, 0, et enfin 5 plantes Cependant, pour Jori, lors des 4 repiquages ultérieurs des 165 souches de départ : 132, puis 27, 35, et enfin 52 plantes ont été générées par une dizaine de ces souches, constituées d'un total de 18 à 22 cals. L'ensemble amène, en comptabilisant les régénérants primaires, à un global de 307 plantes. Ainsi, après cette première campagne d'expérimentations, près de 422 plantes ont été obtenues, et le processus de régénération continue actuellement sur les souches toujours viables de Jori et Isly, laissant prévoir à nouveau une quarantaine de plantes. Une nouvelle série de mises en culture est en cours, afin d'optimaliser la technique et d'étendre les résultats aux autres génotypes. Il est à souligner qu'aucun albinisme n'a jamais été observé et que par ailleurs, il y a peu de doublements spontanés des chromosomes.

E43 : Obtention et électrofusion des protoplastes de la canne à sucre

SIHACHAKR D.[1], GONZALES S.[2], DUCREUX G.[1]

[1] Université Paris-Sud, Lab. de Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, France. [2] Lab. De Biotechnologia Vegetal, Dpto. De Biologia Vegetal, Fac de Biologia, Universidad de la Habana, 10400 Cuba

Dans le présent travail nous proposons une nouvelle méthode simple et rapide pour obtenir des protoplastes des cals de la canne à sucre. Les protoplastes des deux variétés étudiées : Jaronu-605 et Cuba-8751 qui ont des réponses différentes au stress hydrique ont été électrofusionnées. Cette méthode sert de point de départ dans le travail d'hybridation somatique chez la canne à sucre pour obtenir de nouvelles variétés résistantes à la sécheresse.

E44 : Régénération et caractéristiques agronomiques de vitroplants de triticale (*X-Triticosecale* Wittmack)

YACOUBI-TEJ M., ZID E.

Laboratoire de Physiologie/Écophysiologie végétale. Faculté des Sciences de Tunis. Campus Universitaire. 1060 Tunis. Tunisie.

Des embryons de triticale (*X-Triticosecale* Wittmack, variété INRAT 109, récolte 1994), prélevés sur des grains matures imbibés pendant 24 h dans l'eau distillée, sont mis en culture sur le milieu de Murashige et Skoog solidifié par de l'agar-agar purifié (Sigma Cell Culture) à 7 $g.l^{-1}$ et additionné de saccharose à 20 $g.l^{-1}$ et de 2,4-D à différentes concentrations (1 à 3 $mg.l^{-1}$). Les cultures sont conduites en boites de Pétri de 9 cm de diamètre, à une température de 25°C, et sous éclairement artificiel de 6000 lux avec une photopériode de 16 h.

Dans ces conditions, la plupart des embryons germent et forment des cals 3 à 4 jours après l'ensemencement. Les fortes doses de 2,4-D (2.5 à 3 $mg.l^{-1}$) engendrent des cals mous, verdâtres et vitrifiés présentant une forte aptitude à la rhizogenèse. D'autres cals blanchâtres,

d'aspect mucilagineux, ont tendance à s'hypertrophier. Ces deux types de cals ne sont pas régénérables.

Aux doses plus faibles de 2,4-D (1 à 2 $mg.l^{-1}$), les cals sont friables, jaunâtres, et organogènes. Les cals initiés sont transférés tous les mois sur des milieux frais. Au premier transfert, les coléoptiles issus de la germination des embryons sont éliminés. La concentration de 2,4-D est diminuée progressivement au cours des transferts successifs, jusqu'à suppression totale. Après 5 transferts en général, chaque cal permet de régénérer 4 ou 5 plantules.

L'acclimatation des vitroplants se fait, sous atmosphère saturée en humidité, par transplantation en pots de végétation sur un substrat formé par un mélange de tourbe, de sable grossier et de feuilles de chêne. Après séjour d'une semaine sous serre vitrée, les pots sont transférés en conditions naturelles et arrosés jusqu'à la fin du cycle de développement.

Chez les 20 vitroplants régénérés, constituant la génération R_0, le tallage est important et les épis sont fertiles. Des variations phénotypiques ont été observées. En particulier, un vitroplant a formé des épis à 6 rangs (4 rangs chez les autres vitroplants). Le nombre d'épis par plante, de grains par épi et le poids moyen du grain ont été déterminés. Le grain est moins ridé que celui issu des plantes mères et possède un très bon pouvoir germinatif. Les plants de deuxième génération (R_1), cultivés en plein champ, en comparaison avec les parents, présentent un tallage important et sont actuellement au stade montaison.

E45 : Recherches sur les méthodes de sélection *in vitro* pour la tolérance au NaCl chez *Triticum durum*

ZAIR I.

Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Département de Biologie. B.P. 1014 Rabat. Maroc

Les capacités embryogènes des cultures de cals de blé ont été améliorées par la fragmentation longitudinale de l'embryon immature. L'initiation du cal à partir de moitiés d'embryons immatures sur des milieux contenant NaCl, l'extrait de pomme de terre ou un mélange des deux, a significativement amélioré la croissance en matières fraîche et sèche des cals, le pourcentage de régénération ainsi que la tolérance à la salinité des plantes régénérées.

L'application du stress aux cals déjà initiés en absence de NaCl ne s'avère pas une méthode de sélection recommandable chez les cals de blé; les cultures perdent leur capacité de régénération avant de s'adapter à l'agent stressant. En effet la réduction due à l'allongement de la durée de culture est relativement plus importante que celle provoquée par le stress salin. Ainsi, chez les cals de la variété Kypérounda, initiés à partir de moitiés d'embryons immatures, le pouvoir de régénération après dix semaines de culture baisse de 46 % sur le milieu sans NaCl, et de 41, 60, 70, et 81 % respectivement sur 2,5, 5, 10 et 15 g/l de NaCl. Le même comportement a été enregistré chez les variétés Oum Rabiâ, Sebou et $Acsad_{65}$.

Par contre, l'apport simultané de NaCl dans le milieu d'initiation du cal a été adopté comme méthode plus efficace pour l'amélioration de la tolérance des cultures. Le nombre de plantes régénérées en présence du stress salin dépend étroitement du génotype et particulièrement sur les fortes concentrations de NaCl. En effet, les génotypes Kypérounda, Oum Rabiâ, Tassaout et Sarif régénèrent un nombre de plantules relativement élevé (23 à 30 %) sur 10 et (5 à 17 %) sur 15 g de NaCl, alors que Jori, Cocorit, $Acsad_{65}$ et Marzak n'ont formé que très peu de plantes (5 à 17 %) sur 10 g et aucune sur 15 g/l de sel. Le test de la fluorescence de la chlorophylle a montré que la tolérance de ses plantes a été significativement améliorée.

L'addition de NaCl dans le milieu contenant l'extrait de pomme de terre, reconnu par ses capacités stimulatrices de l'embryogenèse somatique a permis d'améliorer les compétences embryogènes des cals initiés en présence du stress salin. Des plantes normales ont été régénérées à partir des cals initiés sur un milieu contenant 10 g/l de sel chez plusieurs variétés de blé.

Plusieurs explants ont été aussi cultivés afin de déterminer les meilleures conditions d'embryogenèse somatique pour une application ultérieure des conditions de stress salin. Les cultures d'inflorescences immatures, de coléoptiles, de feuilles et de racines pour 10 génotypes de *Triticum durum* dans différentes conditions de culture ont montré une variation des pourcentages d'induction de cals et de régénération de plantules en fonction du génotype, de la concentration en 2,4D du milieu de culture et de la nature solide ou liquide de ce dernier. De même les meilleures capacités à l'embryogenèse somatique et à la régénération ont été observées pour les inflorescences immatures, à des tailles ne dépassant pas 0.5 cm, cultivées sur un milieu d'induction MS contenant 2mg/l de 2.4D. Cependant la nature du milieu d'initiation n'influe pas sur les pourcentages d'induction et de régénération. Aussi le facteur génotype ne devient-il significatif que pour les inflorescences de tailles supérieures à 1 cm.

L'effet du génotype et du 2,4D sont très marquants pour la culture de fragments de coléoptile. En effet, les meilleurs pourcentages d'induction de cals sont observés pour les variétés Sebou et Massa cultivées sur milieu d'initiation additionné de 1,5 mg/l de 2,4D, alors que les meilleurs pourcentages de régénération sont obtenus pour les variétés Massa et Isly cultivées sur des milieux contenant respectivement 2 mg/l et 2,5 mg/l de 2,4D.

Aucune induction de cals n'a été observée pour les cultures de racines et de feuilles sur différents types de milieux avec plusieurs combinaisons d'hormones.

Liste des auteurs

ABDELGUERFI Aissa Enseignant chercheur INA Alger Labo Amélioration des Plantes El Harrach 16200 ALGER ALGERIE

ABDELKEFI Abbès Maître assistant Faculté des Sciences Dept des Sciences Biologiques 1060 Campus Universitaire Le Belvédère - TUNIS TUNISIE

AIT-KAKI Yasmina Maître-Assistante Université d'Annaba INESSM Labo Botanique Médicale 23000 ANNABA ALGERIE

ALMANSOURI Malika Doctorante Univ Cathol Louvain la Neuve Labo de Cytogénétique Bât Carnoy, b 13, La Croix du Sud 5 B 1348 LOUVAIN la NEUVE BELGIQUE

ALONSO Alejandro Etudiant Faculté Sciences d'Avignon Dpt Biologie Végétale Expérimentale 33, rue Louis Pasteur 84000 AVIGNON FRANCE

AMSSA Mohamed Docteur es sciences. Professeur Faculté Sciences de Meknès Labo des Biotechnologies Végétales B P 4010 MEKNES MAROC

AOUAD Abdelghafour Thèsard Université Cadi Ayyad Labo de Biochimie Biol Molec Plantes Fac Sciences-Semlalia B P S 15 MARRAKECH MAROC

ASSALI Nour-Eddine Responsable Labo Marquage IAV Hassan II Dpt Ecologie Végétale B P 6202 RABAT MAROC

AUBANELLE Laurent Faculté des Sciences Université de Picardie Androgenèse & Biotechnologie Ilot des Poulies 33 rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

AUBOIRON Erik Responsable biotechnologie et Amélioration C. de Recherches Régionales Bananiers et Plantain Labo de Biotechnologie Njombé, B P 832 DOUALA CAMEROUN

AZMEH Mohamad Fawaz Professeur Université de Damas Fac d'Agronomie, Dept Protection des Plantes B P 30621 DAMAS SYRIE

AZOULAY Gérard Maître de Conférences Université de Paris Sud Faculté Jean Monnet 92231 SCEAUX CEDEX FRANCE

BAAZIZ M Professeur Université Cadi Ayyad Labo Biochimie et Biologie Molec Plantes Fac Sciences-Semlalia B P S 15 MARRAKECH MAROC

BAJJI Mohammed (1) Doctorant Univ Cathol Louvain la Neuve Labo de Cytogénétique Bât Carnoy, Pl Croix du Sud 5, b 13 B 1348 LOUVAIN la NEUVE BELGIQUE

BANI-AAMEUR Fouzia (1) Professeur Université Ibnou Zohr, Fac des Sciences Labo Recherches Var Génétique BP 28/S 80 000 AGADIR MAROC

BEAUJEAN Antony Faculté des Sciences Université de Picardie Androgenèse & Biotechnologies Ilot des Poulies 33 rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

BELABED Abdelmajid Directeur de laboratoire Faculté Sciences d'Oujda Groupe Génétique 60000 OUJDA MAROC

BELKOURA Mouhssine Directeur de Recherche Fac Sciences SEMLALIA av Prince My Abdellah BP S15 MARRAKHECH MAROC

BEN ABDALLAH Abdallah (1) Chercheur INRA Tunisie Labo Biotechnologies Rue Hedi Karray - Tunis 2049 ARIANA TUNISIE

BEN SALEM Moncef Directeur Labo BTV INRA Tunis Dpt Physiologie et Biotechnologie Rue Hedi Karray 2049 ARIANA TUNIS TUNISIE

BENCHAABANE Abderrazzak Maître de Conférences Fac Sciences SEMLALIA Labo Ecologie Vegetale BP S 15 40000 MARRAKECH MAROC

BENCHEIKH Mohamed Responsable equipe Centre Universitaire de CHLEF Institut d'Agronomie B P 151 2000 CHLEF ALGERIE

BENDIAB Khadija Enseignante chercheur Universite Cadi Ayyad Dpt Biologie BP 618 MARRAKECH MAROC

BENLARIBI Mostefa Maître de Conferences Enseignant ISN Université de Constantine Biologie Végétale et Amelioration des Plantes Route de Ain El Bey 25000 CONSTANTINE ALGERIE

BENLHABIB Ouafae Professeur Inst Agron et Vet Hassan II Dept Agron et Amelior Plantes BP 6202 RABAT 10101 MAROC

BENNACEUR-HERMOUCHE M Enseignante chercheur Universite d'Es-Senia Inst Sciences de la Nature - Labo Biochimie B P 1524 ORAN ALGERIE

BENSALAH Boubker Assistant SCSP DPVCTRF B P 6520 10101 Rabat Instituts RABAT MAROC

BENSARI Morad Recteur Universite de Constantine Route Ain El-Bey 25000 CONSTANTINE ALGERIE

BERTIN Pierre Ingenieur agronome. Station d'Amélioration des Plantes, rue du Bordia 4, B-5030 Gembloux, BELGIQUE

BERVILLE André INRA ENSAM Montpellier DGAP 2, place Viala 34060 MONTPELLIER Cedex 1 FRANCE

BILOA ADZEGUE Pierre Conseiller en environnement "SOS ENVIRONNEMENT" ICS SENCHIM B P 26 257 DAKAR SENEGAL

BOITEL Michèle Faculte des Sciences Universite de Picardie Androgenese & Biotechnologie Ilot des Poulies 33 rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

BONNY Sylvie Chercheur INRA INRA-ESR 78850 GRIGNON FRANCE

BOUABDALLAH Louiza Enseignante Universite d'Es-Senia Labo de Phytopathologie 31000 ORAN ALGERIE

BOUGHEDIRI Larbi Docteur Enseignant Universite d'Annaba INESSM Labo Physiologie Vegetale B P 12 23000 ANNABA ALGERIE

BOUIAMRINE El Houssine Thesard Universite Moulay Ismail, Fac des Sciences Biotechnologies Vegetales B P 4010 50000 MEKNES MAROC

BRANCHARD Michel Directeur de l'Institut Universite de Bretagne Occidentale ISAMOR Technopôle de Brest-Iroise 29280 PLOUZANE-BREST FRANCE

BRINIS Louichi Enseignant chercheur Universite d'Annaba INESSM Labo Physiologie Vegetale B P 12 23000 ANNABA ALGERIE

BUI VAN LE Docteur chercheur Université Paris Sud Institut de Biotechnologie des Plantes 91405 ORSAY Cedex FRANCE

CARPIN Sabine Thèsarde Faculté de Pharmacie EA 2106 "Biologie Végétale" 31 ave Monge 37200 TOURS FRANCE

CHAGVARDIEFF Pierre Dr, Chef de laboratoire CEA Labo Phytotechnologie Centre d'Etudes de Caradache, DPVE 13108 ST PAUL LES DURANCE Cedex FRANCE

CHARRIER Andr,é Professeur, Directeur du labo GAP INRA ENSAM Montpellier UFR Génet et Amelior Plantes 2, place Viala 34060 MONTPELLIER Cedex 1 FRANCE

CHLYAH Hassane Professeur Univ. Mohamed V Fac Sciences Labo Physiologie Végétale BP 1014 RABAT MAROC

CHRIQUI Dominique Professeur CEMV U P M C (Paris VI) Labo CEMV Bât N2-case courrier 150 - 4, pl Jussieu 75252 PARIS Cedex 05 FRANCE

COMEAU André Chercheur Université LAVAL Centre de Recherche Agriculture et Agroalimentaire 250 Boulevard Hochelaga, Ste-Foy QUEBEC G1V 2J3 CANADA

DA Sié Eric Ingénieur des Eaux et Forêts Centre National de Semences Forestières Labo Physiologie 01 B P 2682 Ouaga 01 OUAGADOUGOU 01 BURKINA FASO

DE BUYSER Jacques Maître de Conférences Universite Paris Sud Labo Morphogenèse Vég Exptale Bât 360 91405 ORSAY Cedex FRANCE

DELPORTE Fabienne Assistante CRA Gbx Stat Amelior Plantes Labo Biologie moléculaire rue du Bordia, 4 B 5030 GEMBLOUX BELGIQUE

DELSENY Michel Directeur de Recherche 1 Université de Perpignan Labc de Phys et biol molé vég URA 565 52, ave de Villeneuve 66860 PERPIGNAN Cedex FRANCE

DHED'A Djailo Professeur Associé, Dr, Université de Kisangani Faculté des Sciences C/o Ridja D Buma, SOTEXKI B P 14897 KINSHASA I ZAIRE

DIENG Hamidou Enseignant chercheur Institut Supérieur Scientifique Labo Biologie Végétale B P 5026 NOUAKCHOTT R I MAURITANIE

DJEKOUN Abdelhamid Maître de Conférences Université de Constantine UFR Genet et Amelioration des Plantes Route Ain El Bey 25000 CONSTANTINE ALGERIE

DOUIMI Rajae Chercheur Faculté des Sciences Université Moulai Ismail B P 4010 Beni M'hamed 50000 MEKNES MAROC

DUCREUX Georges Professeur Université Paris Sud Labo Morphogenèse Vég Exptale Bât 360 91405 ORSAY Cedex FRANCE

DUTUIT Pierre Responsable Labo Université Paris Sud Centre Chatenay Eq d'Ecotechnologie Tour E1 2ème 92296 CHATENAY-MALABRY FRANCE

EL HADRAMI Ismail Enseignant chercheur Université Cadi Ayyad Labo Physiologie Végétale Fac Sciences Semlalia BP S15 40000 MARRAKECH MAROC

EL JAAFARI Samir Professeur Univ My Ismail, Faculté des Sciences Labo Biotech. et Amél. des plantes B P. 4010 - Béni M'hamed 50000 MEKNES MAROC

EL KHLIFI Oum Keltoum Maître-Assistante Faculté des Sciences Casa Labo de Cytogénétique IAV Rabat BP 6202 10100 RABAT MAROC

EL MOUSADIK Abdelhamid Enseignant chercheur Université Ibnou Zohr Faculte des Sciences Ressources phytogénétiques B P 28/S 80000 AGADIR MAROC

ELLOUZ Oumema Enseignant Inst preparatoire aux Ingénieurs ENIS Route Sarka km 3 SFAX 3038 TUNISIE

ENGELMANN Florent Docteur IPGRI In vitro conservation Via delle Sette Chiese 142 00145 ROMA ITALIE

EUDES François Doctorant Universite LAVAL Departement de Phytologie Pavillon Paul-Comtois, St-Foy G1K 7P4 QUEBEC CANADA

FAGROUD Mustapha Enseignant chercheur Ecole Nationale d'Agriculture Centre Biometrie et Informatique B P S/40 50000 MEKNES MAROC

FARES Khalid Enseignant chercheur Faculte des Sciences Sciences des Aliments MARRAKECH MAROC

FERNANDEZ Sophie Thesarde Universite Montpellier II Labo Physiologie Vegetale Bât 15 Case 00 34095 MONTPELLIER Cedex 5 FRANCE

FERRY Michel Directeur Scientifique ESTACION PHOENIX Apartoda 996 03201 ELCHE ESPAGNE

FOURRÉ Jean-Luc Docteur Universite Catholique de Louvain Unité des Eaux et Forêts Place croix du Sud, 2 1348 - LOUVAIN la NEUVE BELGIQUE

FRANCHE Claudine Docteur Laboratoire Gene Trop-ORSTOM Physiologie Cellulaire et Moleculaire des Arbres 911 avenue Agropolis 34032 MONTPELLIER Cedex 1 FRANCE

FRANKARD Valérie Post-Doc VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL Plantengenetica Paardenstraat 65 1640 - SIRT GENESIUS RODE BELGIQUE

GARGOURI-BOUZID Radhia Maître-Assistant Centre de Biotechnologie B P W 3038 SFAX TUNISIE

GONZALEZ Sergio (1) Chercheur Universidad de la Habana Lab de Biotecnologia vegetal 10400 CUBA CUBA

GRAPIN Agnès Chercheur détachee du CIRAD au CATIE CATIE Labo Biotechnologies Apdo 104 7170 TURIALBA COSTA RICA

GROS François Secrétaire Perpetuel Institut de France Academie des Sciences 23 Quai Conti 75006 PARIS FRANCE

GUERROUCHA Hocine Enseignant chercheur Université de Constantine Labo Biologie Vegetale Route de Ain El bey 25000 CONSTANTINE ALGERIE

GUMEDZOE Yawovi Mawkena Directeur adjoint, Maître-Assistant Université du Bénin Ecole Superieure d'Agronomie Labo Virologie B P 1515 LOME TOGO

HAICOUR Robert Maitre de Conferences Universite Paris Sud Labo Morphogenèse Vegetale Experimentale Bât 360 91405 ORSAY Cedex FRANCE

HAJJI Mokhtar Professeur Universite Tunis II Labo Physiologie Végétale Campus universitaire 1060 TUNIS TUNISIE

HAMON Serge Responsable de laboratoire ORSTOM Labo Ressources Génétiques Vegetales 911 Av Agropolis 34032 MONTPELLIER Cedex 1 FRANCE

HAMZA Sonia Assistant Professeur INAT, Inst Nat Agronomique de Tunis Labo Génétique 43 ave Charles Nicole 1082 TUNIS TUNISIE

HARZALLAH Hanène (1) Responsable Labo Ecole Nat Médecine Vétérinaire Dpt Production Animale Sidi Thabet 2020 TUNIS TUNISIE

HENRY Yves Chargé de Recherche CNRS IBP Université Paris Sud Biologie du développement des plantes Bât 630 91405 ORSAY Cedex FRANCE

HOANG Kim Oanh Docteur chercheur Institut de Biotechnologie CNSHT NGHIADO, TULIEM HANOI VIETNAM

HOCHER Valérie Chercheur ORSTOM IRGAPT B P. 5045 34032 MONTPELLIER Cedex 1 FRANCE

HOUNKPEVI G Alphonse Enseignant chercheur Université Nationale du Bénin, Faculté des Science Labo Biologie Végétale B P 2748 COTONOU BENIN

IGHILHARIZ Zohra Enseignante Université d'Oran Es Senia Labo Biologie Végétale 31000 ORAN ALGERIE

J'AITI Fatima Docteur Université Cadi Ayyad Dpt Biologie labo de physiologie végétale MARRAKECH MAROC

JADARI Rachida Maître-Assistante I A V Hassan II Labo Cultures in vitro RABAT 10101 MAROC

JEMMALI Ahmed Chercheur INRAT Rue Hédi Karray 2049 ARIANA TUNISIE

JLIBENE Mohammed Chercheur INRA Meknes CRRA Saiz Moyen Atlas B.P. 578 50000 MEKNES MAROC

JOUANIN Lise INRA Stat Amel Pl VERSAILLES Labo de Biologie Cellulaire Route de St Cyr 78026 VERSAILLES Cedex FRANCE

KAAN François Directeur de Recherche INRA ENSAM Montpellier, UFR Amélioration des Plantes, 2 place Viala, 34060 MONTPELLIER Cedex 1 FRANCE

KHALFALLAH Nadra Enseignante Université de Constantine Labo de Cytogénétique Route de Ain El Bey 25000 CONSTANTINE ALGERIE

KHELIFI Douadi Enseignant Université de Constantine Institut des Sciences de la Natur 25000 CONSTANTINE ALGERIE

KINET Jean-Marie Directeur du Laboratoire Université Catholique de Louvain Labo de Cytogénétique 5, place Croix du Sud Boite 13 B-1348 LOUVAIN la NEUVE BELGIQUE

KODJA Hippolyte Maître de Conférences Université de la Réunion Labo Biologie et Physiologie Végétale 15, ave René Cassin 97715 St-DENIS Messag Cedex 9 REUNION (La)

KONAN Kouakou Eugène Ingénieur Agronome, chargé de recherches IDEFOR DPO Labo Cultures in vitro 13 BP n° 989 ABIDJAN 13 COTE d'IVOIRE

KOULLA Latifa Maître-Assistante Université Cadi Ayyad Labo Physiologie Végétale Fac de Sciences Rue Moullay Abdellah 40000 MARRAKECH MAROC

LABHILILI Mustapha Chercheur ICARDA Germplasm Improvement PO BOX 5466 ALEPPO SYRIE

LAINÉ Eric Maître de Conférences Université de Picardie Jules V Labo Biotechnologies Végétales 33, rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

LAMINI Hachouma Chercheur Ecole Natle Super - Meknes B.P S/40 50000 MEKNES MAROC

LAOUAR Meriem Post-Doc Institut National Agronomique d'Alger Labo Phytotechnie 16200 ALGER ALGERIE

LARHISSI Zakia Enseignante chercheur Institut de formation de l'industrie meunière km 115 Ancienne route de Rabat Sidi Bernoussi CASABLANCA MAROC

LAROCHE Liette Etudiante Université LAVAL Département de Phytologie Pavillon Paul-Comtois, St-Foy G1K 7P4 QUEBEC CANADA

LAVERGNE Danièle Maître de Conférences Enseign Chercheur Université Paris Sud Labo Morphogenese Vég Exptale Bât 360 91405 ORSAY Cedex FRANCE

LE THI Anh Hong Stagiaire (Vietnamienne) Fac Sc Agronomiques Gbx Labo de Phytopathologie Passage des Déportés 2 B 5030 GEMBLOUX BELGIQUE

LE THIERRY D'ENNEQUIN Maud Thesarde Université Paris Sud Labo Évolution et Systematique Bât 362 91405 ORSAY Cedex FRANCE

LE Van Quy Chercheur Univ Laval Fac Sc Agr Alim Pavillon de l'Envirotron Ste FOY G1V 4G6 QUÉBEC CANADA

LEBTAHI Fatiha Assistante de Recherche Inst Nat Rech Forestières Labo Cultures in vitro INRF BP 35 Cheraga ALGER ALGERIE

LOPEZ-BAEZ Orlando Enseignant chercheur INIFAP Campo experimental "rosario izapa" Km 18 Carretera a Cacahoatan Apartado postal 96 Tapachula 30700 CHIAPAS MEXIQUE

MAKNI Mohamed Maître de Conferences Faculte Sciences de Tunis Labo Génetique et Biologie Moléculaire Campus Universitaire 1060 TUNIS TUNISIE

MANDIMBA Georges Raphael Maître-Assistant Institut de Développement Rural Labo Biotechnologies B P 13346 BRAZZAVILLE CONGO

MARS Mohamed Chercheur Institut National de Recherche Scien et Technique B P 95 2050 HAMMAN-LIF TUNISIE

MASMOUDI R Fac de Sciences de Sfax Labo Biotechnologies végétales 3038 SFAX TUNISIE

MAZOUZ Hamid Enseignant chercheur Faculte des Sciences et Technique d'Errachidia Labo Biologie ERRACHIDIA MAROC

MBODJI Ousmane Stagiaire en DEA Univ Cheikh Anta Diop, Fac des Sciences Dpt Biologie Végétale. Labo de CIV URCI ISRA / ORSTOM BP 1386 DAKAR-FANN SENEGAL

MEHRI-KAMOUN Raoudha Enseignante Ecole Supérieure d'Horticulture Biotechnologies Vegetales Chott-Mariem 4042 SOUSSE TUNISIE

MELLOUKI Fouad Doctorant Université Paris Sud. UFR de Pharmacie Labo Biologie Cellulaire Rue J -B Clément 92196 CHATENAY MALABRY Cedex FRANCE

MERGEAI Guy 1er Assistant Fac Sc Agronomiques Gbx Phytotechnie des regions intertropicales 2 passage des Déportés B 5030 GEMBLOUX BELGIQUE

MERGHEM Rachid Docteur es-sceinces Universite de Constantine I S N Labo de Phytochimie Route Ain el bey 25000 CONSTANTINE ALGERIE

MIHAMOU-ZIYYAT Aatika (1) Maître-Assistante Faculté Sciences d'Oujda Labo Biologie 60000 OUJDA MAROC

MOKHTARI Faouzia Maître-Assistante Faculte Sciences de Meknès Biotechnologie et Amélioration des Plantes B P 4010 MEKNES MAROC

MOLINIER Jean Doctorant I B P M Dr Gunther HAHNE 12 rue du Gl Zimmer 67084 STRASBOURG Cedex FRANCE

MONNEVEUX Philippe Professeur INRA ENSAM Montpellier UFR Génétique et Amélioration des Plantes 2, place Viala 34060 MONTPELLIER Cedex 1 FRANCE

MORAES-FERNANDES Maria Irene Directeur de Recherche EMBRAPA Labo Cytologia PASSO FUNDO (RS) BRESIL

MORARU Irina Constanta Chercheur IRCPT Labo Biotechnologies Nicolae Balcescu 1 8264 FUNDULEA, CALARAS ROUMANIE

MOURAS Armand Professeur Université de Bordeaux II Labo de Biologie Cellulaire Ave des Facultés 33405 TALENCE Cedex FRANCE

NACHIT Miloudi Généticien Principal ICARDA/CIMMYT Germplasm Improvement PO Box 5466 ALEP SYRIE

NAJIMI Bouchra Maître-Assistante Université Moulay Ismail Labo Biotechnologies et Amiol. Plantes B.P 4010 Béni M'hamed 50000 MEKNES MAROC

NATO Aimé Maître de Conférences Université Paris Sud Labo Morphogenèse Expérimentale Vég Bât 360 91405 ORSAY Cedex FRANCE

NSIKA-MIKOKO Elie Professeur Université Marien NGOUABI Labo de Phytopathologie Faculté des Sciences, B P 69 BRAZZAVILLE CONGO

OMOKOLO Ndoussou Denis Enseignant chercheur Ecole Normale Supérieure Labo Physiologie Végétale B P 47 YAOUNDE CAMEROUN

OUAHBI Abdelilah Enseignant chercheur Faculté des Sciences Université Moulay Ismail Labo Biotechnologies et Environnement B P 4010 BENI M'hamed 50000 MEKNES MAROC

OUAZZANI Noureddine Directeur de laboratoire Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès Departement d'Arboriculture BP 540 MEKNES MAROC

OUICHOU Aicha Thèsarde Université Paris Sud Labo Morphogenèse Vég. Exptale Bât 360 91405 ORSAY Cedex FRANCE

PAUL Roger Maître de Conférences Fac Sc Agronomiques Gbx UER Biologie Végétale Passage des Déportés, 2 5030 GEMBLOUX BELGIQUE

PESSEL Fabrice Thèsard Université Paris Sud Labo Évolution et Systématique Bât 362 91405 ORSAY Cedex FRANCE

PONCET Valérie Thèsarde Université Paris Sud Labo Evolution et Systématique des végétaux Bât 362 91405 ORSAY Cedex FRANCE

POPIERS Delphine Faculté des Sciences Université de Picardie Androgenèse & Biotechnologie Ilot des Poulies 33 rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

PRIOUL Jean-Louis Professeur Université Paris Sud I B P Bât 630 91405 ORSAY Cedex FRANCE

QARIANI Latifa Chercheur Doctorante Université Moulay Ismail Labo Biotechnologies BP 4010 Béni M'hamed 50000 MEKNES MAROC

RAIES Aly Professeur Enseignement Supérieur Fac Sciences Tunis Laboratoire de Biochimie Campus Universitaire 1060 Le Belvédère - TUNIS TUNISIE

RENARD Michel Responsable Labo Colza INRA Stat Amel Pl RENNES Labo Colza BP 29 35650 Le RHEU FRANCE

RIVAL Alain Docteur Chercheur CIRAD ORSTOM LRGAPT Av Val de Montferrand BP 5045 34032 MONTPELLIER Cedex 1 FRANCE

RIZQI Abdelhak Ingénieur agronome responsable labo Direction des domaines agricoles Unité de controle des plants Ave Imam Malik km 7,5 Dome Dar Es-Salam 10000 RABAT MAROC

ROUSSY Isabelle Faculté des Sciences Université de Picardie Androgenèse & Biotechnologie Ilot des Poulies 33 rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

ROUSTAN Jean-Paul Maître de Conférences ENSAT INP Lab des Industries Alimentaires 145, ave. du Muret 31076 TOULOUSE FRANCE

SABOUNJI Karima Thèsard Faculté des Sciences Ave Ibn Batouta B.P. 1014 RABAT MAROC

SABOUR Ilham Chercheur Doctorante Universite Moulay Ismail Labo Biotechnologies BP 4010 Beni M'hamed 50000 MEKNES MAROC

SAKA Hayett Responsable Labo C I V INRA ALGÉRIE Labo Physiologie Végétale 2 rue des Freres Ouaddek-Hassène Badi-Belfort EL-HARRACH ALGERIE

SAMSON Isabelle Thèsarde Universite d'Anvers (UIA) Labo Rech Physio Veg (L R P V) 16 bd Lavoisier 49045 ANGERS Cedex 01 FRANCE

SARRAFI Ahmad Responsable d'equipe ENSAT INP Labo BAP Eq Ass INRA 145, avenue de Muret 31076 TOULOUSE Cedex FRANCE

SEMADI Ammar Professeur en Sciences Biologiques Université d'Annaba INESSM Dept d'Ecologie B P 12 23000 ANNABA ALGERIE

SENE Mouhamadou Docteur ORSTOM Bel Air BP 3972 DAKAR COTE d'IVOIRE

SERRAJ Rachid Enseignant chercheur Universite Cadi Ayyad Labo Physiologie Végétale BP S 15 Bld My Abdallah 4000 MARRAKECH MAROC

SIBI Monique Professeur ENSAIA Labo Genetique et Biotechnologies 2, av de la forêt de Haye 54505 VANDOEUVRE FRANCE

SIDIKOU Ramatou Enseignant chercheur COMITE NORD - LA PIGACHE Ave François Mitterand 62217 BEAURAINS FRANCE

SIHACHAKR Darasinh Maître de Conferences Université Paris Sud Labo Morphogenese Veg Exptale Bât 360 91405 ORSAY Cedex FRANCE

SILJAK-YAKOVLEV Sonya Chercheur CNRS Labo Évolution et Systématique Bât 360 91405 ORSAY Cedex FRANCE

SLIM AMARA Hajer Resp Labo Culture in vitro INAT Labo Biotechnologies 1082 Cité Mahragène TUNIS TUNISIE

ST PIERRE Claude André Professeur Universite Laval-FSAA Dpt Génetique des Céréales 3234-D Pavillon Comtois Ste FOY - QUEBEC GIK 7P4 CANADA

TAHRI El Houssine Maître-Assistant Faculte Sciences d'Oujda Amélioration et production vegetales Rue Sidi Maâfa 60000 OUJDA MAROC

TRIFI Mokhtar Maître-Assistant Faculte des Sciences de Tunis Campus Universitaire 1060 TUNIS Le Belvedere TUNISIE

TSALA NDZOMO Guy Enseignant chercheur Ecole Normale Supérieure Département des Sciences Biologiques B P 47 YAOUNDE CAMEROUN

UMBOH Magdalena Irène Dr Professeur SEAMEO BIOTROP Forest Biotechnology Laboratory JL Raya Tajur Kmb PO Box 116 BOGOR INDONESIE

VANNEREAU Agnès Maître de Conférences Université Paris Sud, UFR de Pharmacie Labo Biologie Cellulaire Rue J -B Clément 92196 CHATENAY MALABRY Cedex FRANCE

YACOUBI-TEJ M'barka Chercheur Faculté Sciences de Tunis Labo Physiologie Végétale 1060 TUNIS TUNISIE

ZAHIDI Abdelaziz Etudiant en 3ème cycle Universite Ibnou Zohr, Faculté des Sciences Labo de Recherche sur la Variabilité Génétique BP 28/S 80 000 AGADIR MAROC

ZAIR Itto Enseignante Université Mohamed V Fac des Sciences Labo Physiologie Végétale BP 1014, Ave Ibn Battouta RABAT MAROC

ZOUNDJIHEKPON Jeanne Maître de Conférences WWF-08 BP1776 - Abidjan 08 Côte d'Ivoire

Liste des autres co-auteurs et des inscrits ayant participé ou non aux Journées

ABERLENC Frédérique ORSTOM FRANCE

AIZAC Bernard GEVES, Domaine de Lavalette, 711 rue Jean François Breton, 34030 MONTPELLIER, FRANCE

AL ZUBI Hussein Doctorant Université d'Avignon, Laboratoire de Biologie Végétale Expérimentale, 33 rue Louis Pasteur, 84000 AVIGNON, FRANCE

ALATOU Djamel Maître de Conférences Institut des Sciences de la Nature, Biologie et physiologie végétales, Université de Constantine, 35000 CONSTANTINE, ALGERIE

ALEMANNO LAURENCE Chercheur CIRAD CP, B.P. 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

ALIBERT G Professeur, BAP INP ENSAT, Laboratoire BAP, 145 Avenue nue de Muret, 31076 TOULOUSE Cedex, FRANCE

AMBROISE Annick Technicienne Université Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

AMMAR Saida Maître de Conférences Faculté Sciences de Tunis, Laboratoire Physiologie Végétale, Campus Universitaire, 1060 TUNIS, TUNISIE

AMOUKOU ADAMOU Ibrahim Maître-Assistant Université Abdou Moumouni de Niamey, Faculté d'Agronomie, Département des Productions Végétales, B.P 10960, NIAMEY, NIGER

ASSAF-DUCROQ Corinne Faculté des Sciences, Université de Picardie, Androgenèse et Biotechnologie, Ilot des Poulies, 33 rue St Leu, 80039 AMIENS Cedex, FRANCE

ASSANI Akym Ingénieur Agronome BAZ Grünbach,Graf Seinsheim Str 23, BOCHHORN, ALLEMAGNE

AYADI Abdelkader Enseignant Faculté Sciences de Tunis, Campus Universitaire, 1060 TUNIS, TUNISIE

BAKRY Frédéric Maître de Recherche CIRAD-GERDAT, Laboratoire BIOTROP, Avenue Val de Montferrand, BP 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

BALANGÉ Pierre Professeur Université de Rouen, Parai et Plymre Pariétaux, 76821 Mt St Aignan, FRANCE

BALLANGE P.A Professeur Faculté des Sciences et Techniques de Rouen, Laboratoire 3P SCUEOR, B P 118, 76134 MONT-SAINT-AIGNAN Cedex, FRANCE

BEN ABDALLAH Ferjani Assistant I.N.R S.T., Laboratoire Cultures in vitro, B.P. 95, 2050 HAMMAN-LIF, TUNISIE

BENBELKACEM Abdelkader Directeur Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC), Station Expérimentale EL-KHROUB, B P. 35, EL-KHROUB 25100, ALGERIE

BENNACEUR Mbarek Dr, Chargé de Recherche INRA Tunis, Laboratoire Physiologie Végétale, Rue Hédi Karray, 2049 ARIANA TUNIS, TUNISIE

BENZAGHOU Selim Doctorant Faculté des sciences agronomiques de Gembloux, Laboratoire Physiologie Végétale, Passage des Déportés 2, B 5030 GEMBLOUX, BELGIQUE

BERTHOULY Marc Biotechnologiste café cacao CIRAD CP, BIOTROP, Avenue du Val de Montferrand, B P. 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

BESSE Antoine Etudiant U P M C Paris VI, 180 rue Jeanne d'Arc ,75013 PARIS CEDEX, FRANCE

BETHMONT Michel Technicien Université de Paris Sud FRANCE

BIGOT Claude 3, rue de Mercantour, 78310 MAUREPAS, FRANCE

BIROUK Ahmed Professeur I A V Hassan II, B P 6202, RABAT 100 101, MAROC

BOCCON-GIBOD Jacques, Professeur, Institut National de l'Horticulture, 2 rue Le Nôtre, F 49045 Angers Cedex 01 France

BOSSOUTROT Dominique Responsable Biosécurité SPG, Semences Production, Domaine du Moulin ,84260 SARRIANS, FRANCE

BOUGUEDOURA Nadia Maître de Conférences et de Recherche Université des Sciences et Techniques H Boumedienne, URZA USTHB, B P 44, ALGER-Gare 16000, ALGERIE

BOUHOUCHE Naima Thèsarde Faculté de Pharmacie Laboratoire de Botanique et Phytochimie, Rue J -B Clément, 92295 CHATENAY MALABRY, FRANCE

BOULAY Michel Docteur IIIème cycle LVMH Recherche, Département Végétal, 25 rue des Peupliers, 92752 NANTERRE, FRANCE

BOURGOIN Mireille GEVES, Laboratoire Biochimie, Domaine du Magneraud, 17700 SURGERES, FRANCE

BOUSALEM Mustapha Chercheur LPRC-CIRAD-ORSTOM, B P. 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

BOUSLAMA Mohamed Professeur Ecole Supérieure Horticulture de Chott-Mariem, Laboratoire Génétique et Amélioration Plantes, 4042 SOUSSE, TUNISIE

BOUSSAID Mohamed Enseignant INSAT, B P 676, 1080 TUNIS, TUNISIE

BOUSSEN Hamida Attachée de Recherche INRA Tunis, Laboratoire Physiologie Végétale, Rue Hedi Karray, 2049 ARIANA TUNIS, TUNISIE

BRUNNER Alain Expert près la Cour d'Appel CABINET, 93 rue de Calais, 59200 TOURCOING, FRANCE

CADET Frédéric Professeur Dr Université de la Réunion, Laboratoire Biochimie, 15 Avenue René Cassin, B P. 7151, 97715 St-DENIS Messag Cedex 9,FRANCE

CALLEN Jean Claude Maître de Conférences Université Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex ,FRANCE

CARON Delphine Faculté des Sciences, Université de Picardie, Androgenèse et Biotechnologie, Ilot des Poulies, 33 rue St Leu, 80039 AMIENS Cedex, FRANCE

CATTEROU Manuella Faculté des Sciences, Université de Picardie, Androgenèse et Biotechnologie, Ilot des Poulies, 33 rue St Leu, 80039 AMIENS Cedex, FRANCE

CAUDERON André Chercheur 15 Avenue nue Mirabeau, 78000 VERSAILLES, FRANCE

CERBAH Malika Université Paris Sud, Laboratoire Évolution et Systématique, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

CHAARI-RKHIS Anissa Chercheur Faculté de Sciences de Sfax, Institut de l'Olivier, 3038 SFAX, TUNISIE

CHABANE Djamilia Chercheur URZA, ALGER, ALGERIE

CHAIBI Wided Maître-Assistante Faculté Sciences de Tunis, Laboratoire Physiologie Végétal,e Campus Universitaire, 1060 TUNIS, TUNISIE

CHAPON Michel Sélectionneur Blé tendre PROCOSEM SA, Domaine du Chaumoy, 18570 LE SUBRAY, FRANCE

CHAPUT Marie-Hélène Enseignante LPH Montravel, 42000 VILLARS, FRANCE

CHERIF Mejda Maître-Assistante Institut National Agronomique de Tunis, Laboratoire Génétique, 43 Avenue Charles Nicolle, 1082 TUNIS, TUNISIE

CHLYAH Averil Bouchra Professeur Faculté des Sciences de Rabat Laboratoire de Physiologie Végétale B P 1014 RABAT MAROC

CHOKAIRI Mustapha Professeur Chef département biologie Faculté des Sciences de Rabat Département de Biologie B P 1014 RABAT MAROC

CLAUCE Hélène Faculté des Sciences Université de Picardie Androgenèse et Biotechnologie Ilot des Poulies 33 rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

COLLIN Jean Professeur Agrégé Université Laval-FSAA Département Phytologie Pavillon Comtois QUÉBEC - G1K 7P4 CANADA

COSSON Louis Professeur Université Paris Sud, UFR de Pharmacie Botanique et Phytochimie rue J -B Clément 92296 CHATENAY-MALABRY Cedex FRANCE

COUMANS Marc Maître de Conférences Université Montpellier II Laboratoire Physiologie Végétale Appliquée Bât 15 Case 002 34095 MONTPELLIER Cedex 5 FRANCE

CZARYSKI Sylvain Juriste 4 rue Pierre et Marie Curie 87800 NEXON FRANCE

DAALOUL Abderrazak Professeur Directeur Général INAT Laboratoire Génetique et Amélioration Plantes 43, Avenue Charles Nicolle 1002 Le Belvédère TUNIS TUNISIE

DAGUIN Florence Ingénieur Recherche Université d'Anvers (UIA) Laboratoire Recherche Physiologie Végétale (L R P V.) 16, bd Lavoisier 49045 ANGERS Cedex 01 FRANCE

DAHMANI Yahya Thèsard Faculté des Sciences d'Oujda, Université Mohamed 1 Département Biologie Route Sidi Maâfa 60000 OUJDA MAROC

DALLOT Sylvie ENSAM INRA Laboratoire Pathologie Végétale 2, place Viala 34060 MONTPELLIER Cedex 1 FRANCE

DALOUMAN Richard Enseignant chercheur Université de Cocody Abidjan Département de Biochimie 22 BP 582 ABIDJAN 22 COTE d'IVOIRE

DAUCHEL Hélène Maître de Conferences Universite de Rouen CNRS UPRES A 6037 76821 MONT SAINT AIGNAN FRANCE

DAUCHELLE Hélène Enseignant chercheur Faculte des Sciences et Techniques de Rouen Laboratoire 3P SCUEOR B P 118 76134 MONT-SAINT-AIGNAN Cedex FRANCE

De NUCE de LAMOTHE Michel President AGROPOLIS Avenue Agropolis 34394 MONTPELLIER Cedex 5 FRANCE

De VIENNE Dominique Resp Laboratoire G S V Université Paris Sud Station de Genetique Vegetale La Ferme du Moulon 91190 GIF sur Yvette FRANCE

DECLERCK Véronique Docteur, Enseignant chercheur I S A B Laboratoire Biotechnologies Vegetales 32, bd du Port 95094 CERGY PONTOISE FRANCE

DELBREIL Bruno Maître de Conférences Universite de Lille I 59655 VILLENEUVE D'ASCQ FRANCE

DEMARLY Yves Professeur des 14, allee des Gardes Royales 78000 VERSAILLES FRANCE

DRIRA Nourredine Professeur des Universites Faculte de Sciences de Sfax Institut de l'Olivier 3038 SFAX TUNISIE

Du JARDIN Patrick Professeur Faculte Sciences Agronomiques Gembloux Département Biologie Végétale Bât 48 Avenue Maréchal Juin B 5030 GEMBLOUX BELGIQUE

DUBLIN Pierre 15 rue des Fayvettes 21121 FONTAINE LES DIJON FRANCE

DUBOIS Frédéric Faculté des Sciences Universite de Picardie Androgenèse et Biotechnologie Ilot des Poulies 33 rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

DUBOIS Joseph Directeur Général CRA Gembloux Station d'amélioration des plantes 4, rue du Bordia B 5030 GEMBLOUX BELGIQUE

EL BELLAJ Mounir Thesard Faculte Sciences SEMLALIA Laboratoire Physiologie Végétale 40001 MARRAKECH MAROC

EL BOUAMI Fouad Maître de Conférences Docteur Université Moulay Ismail Laboratoire Biotechnologies BP 4010 Bébi N'hamed 50000 MEKNES MAROC

ELMESBAHI L Laboratoire de Phytogénetique et de Biotechnologies, *Institut Agronomique et Vétérinaire* Hassan II (IAVH), Rabat Institut, BP 6202, Rabat, Maroc

EL MTILI Nourredine Professeur Faculté Sciences d'Oujda Groupe Génétique 60000 OUJDA MAROC

ESPAGNAC Henri Professeur Universite d'Avignon Faculté des Sciences, Laboratoire Biologie Végetale 33, rue Louis Pasteur 84000 AVIGNON FRANCE

FOLLIN Jean-Claude CIRAD-CA, B P 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

FONTANEL Annie Chercheur CRN, Tours 101, Avenue Gustave Effel, 37390 NOTRE DAME d'OE, FRANCE

FOUILLARD Philippe Sélectionneur HILLESHOG NK 408, rue George Lapatie, 60490 RESSONS sur MATZ, FRANCE

GAISNE Colette, Secrétaire, Laboratoire MVE, bât 360 UPS Orsay 91405

GHRIR Rachid Professeur Institut National de la Recherche desSciences et Technique, Laboratoire de biochimie végétale et microbiologie des sols, BP 95, HAMAMM-LIF 2050, TUNISIE

GIGI Nicolas Ingénieur Agronome Universite Catholique Louvain la Neuve, Laboratoire de Cytogénétique, Département Biologie, Place croix du Sud,Bte 13, B 1348 LOUVAIN la NEUVE, BELGIQUE

GLASZMANN Jean-Christophe Chercheur CIRAD, Département CA ,Avenue du Val de Montferrand, B.P 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

GRANIER Christel Chercheur Semences CARGILL, Centre de Recherche de Boissay, BP 17, BOISSAY, 28310 TOURY, FRANCE

GREGOIRE Serge Ingénieur INRA, Station Amélioration des Plantes, Route de Saint-Cyr, 78026 VERSAILLES Cedex, FRANCE

GRENIER Docteur, Enseignant chercheur I S.A.B., Laboratoire Biotechnologies Végétales, 32 boulevard du Port, 95094 CERGY PONTOISE, FRANCE

GRENIER DE MARCH Ghislaine Res. labo Amel pl Enseignante Chercheur I S A.B , Laboratoire Biotechnologies Végétales, Rue Pierre Waguet, B P 313, 60026 BEAUVAIS, FRANCE

GUEDIRA Abdelkarim Enseignant chercheur Université Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

GUEYE Mathieu Stagiaire Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Laboratoire de Phytopathologie, Passage des Déportés 2, B 5030 GEMBLOUX, BELGIQUE

HALLARD Jacques Gérand EURL HORTISEM, 2240 Chemin du Tilleul, 13160 CHATEAURENARD, FRANCE

HARRABI Moncef Professeur INAT, Institut Agronomique de Tunis Génétique, Amélioration des Plantes, 43 Avenue Charles Nicolle, 1082 TUNIS, TUNISIE

HARRAG Abdelmalek Enseignant chercheur Institut des Sciences Biologiques, Université Ferhay Abbas, 19000 SETIF, ALGERIE

HASSINI Fatma Chercheur INRF (BAINEM), BP 37, CHERAGA ALGER, ALGERIE

HATIMI Saadia Doctorant Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Service de technologie microbienne, Passage des Déportés 2, B 5030 GEMBLOUX, BELGIQUE

HERVE Yves Professeur ENSAR, Science du Végétal, 65 Route de St Brieuc, 35042 RENNES Cedex, FRANCE

HINAS Nora Stagiaire Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Laboratoire de Phytopathologie, Passage des Déportés 2, B 5030 GEMBLOUX, BELGIQUE

HOUBA-HERIN Nicole Chargée de Recherche INRA VERSAILLES, Laboratoire Biologie Cellulaire, Route de St Cyr, 78026 VERSAILLES Cedex, FRANCE

JACQMIN Sophie Assistante de Recherche Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Amélioration des Plantes, Rue Bordia 4, B 5030 GEMBLOUX, BELGIQUE

JACQUEMIN Jean-Marie Chef de travaux Centre Recherche Agronomique, Biologie moléculaire SAP, rue du Bordia 4, B 5030 GEMBLOUX, BELGIQUE

KASSEM My Abdelmajid Doctorant U P M C (Paris VI) CEMV, Bât N2 Boite 150, 75252 PARIS Cedex, FRANCE

KENNY Lahcen Maître de Conférences I.A V Hassan II, Laboratoire Biotechnologie et Physiologie Végétale, B P 18/S, AGADIR, MAROC

KHELIFI Mohamed Enseignant Université de Constantine, Institut des Sciences de la Nature, 25000 CONSTANTINE, ALGERIE

KONARE Damien Journaliste Afrique Agricultures, 3 Avenue des Béguines, 95807 CERGY PONTOISE Cedex, FRANCE

KOUAME Brou Directeur adjoint IDEFOR, Département Plantes Oléagineuses, 01 BP 1001, ABIDJAN 01, COTE d'IVOIRE

KOUAME N'zue Stagiaire Faculte Sciences Agronomiques Gembloux, Laboratoire de Phytopathologie, Passage des Déportés 2, B 1348 LOUVAIN la NEUVE, BELGIQUE

LABERCHE Jean-Claude Faculté des Sciences Université de Picardie, Androgenèse et Biotechnologies, Ilot des Poulies, 33 rue St Leu, 80039 AMIENS Cedex, FRANCE

LAGODA Pierre Jean Laurent Docteur, Chercheur CIRAD BIOTROP AGETROP, Avenue Val de Montferrand, BP 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

LAKHOUA Lilia Maître-Assistante, Responsable

Ecole Nationale des Ingénieurs E N I S , Route de la Soukra km 3,5, BPW 30, 38 SFAX, TUNISIE

LAMIDI Maroufath Chercheur Faculte de Pharmacie, Laboratoire de Pharmacognosie, 27 Bd Jean Moulin, 13005 MARSEILLE ,FRANCE

LAMY-MAHMOUD Françoise Maître de Conférences Université Paris Sud, Laboratoire Evolution et Systématique des Vegetaux, Bât 362, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

LARGITTE Lydia Secrétaire Universite de Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Végétale Experimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

LASCAUX Bruno Technicien Enseignement Universite Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Vegetale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

LE THI Anh Hong Docteur, directeur du labo Institut de Génétique Agronomique, Laboratoire Pathologie Végétale, Conhue-Tuliem, HANOI, VIETNAM

LEFORT Marianne Directrice Bureau Ressources Génétiques 57 rue Cuvier, 75231 PARIS Cedex 05, FRANCE

LEGALL Chantal Technicienne Universite de Paris Sud, Laboratoire Morphogenese Vegetale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

LEMONNIER Catherine Cadre Scientifique GAE, 91000 MAISSE, FRANCE

LEPOIVRE Philippe Professeur Faculte Sciences Agronomiques Gembloux, Laboratoire Pathologie Végétale, Passage des Déportés 2, B 5300 GEMBLOUX, BELGIQUE

LEROY Thierry Cadre Scientifique CIRAD CP, Amélioration des Plantes, B P 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

LETOUZE Robert Professeur Laboratoire Recherche en Physiologie Végétale, Laboratoire Biotechnologies, 16 boulevard Lavoisier, 49045 ANGERS Cedex 01, FRANCE

LOUKILI Azeddine Thesard Faculte Sciences de Tunis, Laboratoire Physiologie Végetale, Campus Universitaire, 1060 TUNIS, TUNISIE

MAALEJ Mohamed Doctorant Faculté de Sciences de Sfax, Institut de l'Olivier, 3038 SFAX, TUNISIE

MAKAMBILA Casimir Enseignant chercheur Université Marien NGOUABI, Faculté Sciences, Laboratoire Phytopathologie, B P 3011, Bacongo BRAZZAVILLE, CONGO

MAROYA Norbert Ingenieur Agronome SRCV,Niaouli, BP 03, ATTOGON, BENIN

MEMBRE Nathalie CNRS I B M P, Institut de Botanique, 28 rue Goethe, 67083 STRASBOURG, FRANCE

MEZIOU Basma Doctorant Faculté de Sciences de Sfax, Laboratoire Biotechnologies, Route de Soukre, 3038 SFAX, TUNISIE

MICHAUX-FERRIERE Nicole Chercheur Responsable Laboratoire Histologie CIRAD BIOTROP, Laboratoire Histologie, B P 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

MITTEAU Martine Chargé de Mission Bureau des Ressources Génétiques (BGR), 51 rue Cuvier, 75231 PARIS Cedex 05, FRANCE

MOKHLISSE-DUNAND Noelle Enseignant chercheur Faculté Sciences Semlalia, Laboratoire BBMP Biochimie, BPS 15, 40000 MARRAKECH, MAROC

MONDEIL Fanja Responsable laboratoire de Génétique Université Nationale de Cote d'Ivoire de Cocody Laboratoire Génétique Faculté Sciences et Technique BP V316 ABIDJAN 01 COTE d'IVOIRE

MORCILLO Fabienne Allocataire de Recherche ORSTOM-CIRAD, Laboratoire Génétique des Plantes Tropicales, 911 Avenue Agropolis, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

MOSTEFAOUI Hafida Stagiaire Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Laboratoire de Phytopathologie, Passage des Déportés 2, B 5030 GEMBLOUX, BELGIQUE

MOUNOLOU Jean-Claude Enseignant Université Paris Sud, Bât 336, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

MOURAD ABDENNADHER Maître de Recherche INRA Tunis, Laboratoire Biotechnologies, Rue Hédi Karray, 2049 ARIANA, TUNIS TUNISIE

MUSSIO Isabelle Docteur 32 Avenue Paul Sumien, 91600 SAVIGNY s/ORGE, FRANCE

MVILA Armand Claude Stagiaire Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Laboratoire de Phytopathologie, Passage des Déportés 2, B 5030 GEMBLOUX, BELGIQUE

MZOURI Karima Thèsarde Université Moulay Ismail, Département Biotechnologies Végétales, 50000 MEKNES, MAROC

NANCY WOURDJIWOUA T. L Doctorant Faculté de médecine et de pharmacie, Laboratoire de Pharmacognosie, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 MARSEILLE, FRANCE

NZE-EKEKANG Lucienne Chercheur IPHAMETRA, B.P. 1935, LIBREVILLE, GABON

OBAME GABON

OUHMIDOU Bouchra Stagiaire Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Laboratoire de Phytopathologie, Passage des Déportés 2, B 5030 GEMBLOUX, BELGIQUE

PHAM-DELEGUE Minhtta Docteur INRA, Laboratoire Neurobiologie des Invertébrés, B.P 23, 91440 BURES-sur-YVETTE, FRANCE

PHAN Thi Hai Chercheur Université Paris Sud, I B.P., Bât 630, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

PICARD Emmanuel Maître de Conférences Université Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

POISSON Charles Directeur de Recherche INRA, S A P F LUSIGNAN, Laboratoire Graminées Fourragères, 86600 LUSIGNAN, FRANCE

RADUCANU Florentina Chercheur IRCPT, Laboratoire Biotechnologies, Nicolae Balcescu 1, 8264 FUNDULEA, CALARAS ROUMANIE

RAHMOUNE Chaabane Professeur Université de Constantine, Environnement I S N , route Ain et Bey, 25000 CONSTANTINE, ALGERIE

RAMDANI Nour-eddine Etudiant CNED RENNES, Boulevard Sabra 18 EL QUOD S, 60000 OUJDA, MAROC

RAVENEAU Marie-Paule Enseignant chercheur Ecole Supérieure d'Agriculture, Biotechnologie des Sols et Agronomie, 55 rue Rabelais, B P 748,49007 ANGERS Cedex 01, FRANCE

ROBÈNE-SOUSTRADE I Université de la Reunion, Laboratoire de Physiologie Végétale, 15 Avenue Rene Cassin, B P 7151, 97715 St Denis Message, REUNION (La)

SAGHI Mohammed Doyen Faculté des Sciences, Dhar El Mahraz, B P 1796, Atlas FES, MAROC

SANGWAN Brigitte Professeur Faculte des Sciences, Université de Picardie, Androgenèse et Biotechnologies, Ilot des Poulies, 33 rue St Leu, 80039 AMIENS Cedex, FRANCE

SANGWAN Rajbir Directeur de Recherche Faculte des Sciences, Universite de Picardie Androgenese et Biotechnologies, Ilot des Poulies, 33 rue St Leu, 80039 AMIENS Cedex, FRANCE

SARR Aboubakry Professeur Universite Paris Sud, Laboratoire Évolution et Systématique, Bât 362, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

SAUTON Annie Responsable Laboratoire Biotech SEMINIS VEGETABLE SEEDS, Laboratoire Biotechnologies, Mas de Rouzel, chemin des canaux, 30900 NIMES, FRANCE

SAVADOGO Issa Ingénieur Eaux et Forêts Direction des Embellissement Urbains 03 ,BP 7044, OUAGADOUGOU 03, BURKINA FASO

SAYAHI Lamia Chercheur Faculte Sciences de Tunis, Laboratoire Biologie Morphogenese, Campus Universitaire, 1060 TUNIS, TUNISIE

SCHMITT Paulette Chercheur CNRSI B M P, Institut de Botanique, 28 rue Goethe, 67083 STRASBOURG, FRANCE

SCHWENDIMAN Jacques Directeur de BIOTROPCIRAD BIOTROP, BP 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

SENE Djibril Président Commission des Affaires Etrangères, Assemblée Nationale, DAKAR, SENEGAL

SERRAF-BATTERIA Isabelle Docteur Universite Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Végetale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

SERVAES Aline Technicienne Université de Paris, Sud Laboratoire Morphogenèse Végétale Experimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

SIDIKOU DJERMAKOYE SEYNI R Maître-Assistante Université de Niamey, Faculté des Sciences, Département Biologie, B P 12 022, NIAMEY,NIGER

SMETS Bernard Directeur de Recherche SPG Semences Production, Domaine du Moulin, 84260 SARRIANS, FRANCE

TALAMALI Amel Etudiante Résidence Universitaire Bures Nord, Chambre 4031, 91440 BURES-sur-YVETTE, FRANCE

TARCHOUN Néjib Enseignant chercheur IRESA, Ministère de l'Agriculture, El Manzeh, TUNIS, TUNISIE

TEISSON Claude Resp Cultures in vitro CIRAD-GERDAT, Laboratoire BIOTROP, Avenue Val de Montferrand, BP 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

TRAN THANH VAN Kiêm Directeur de Recherche I B P., Laboratoire Physiologie Moléculaire, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

TRIGUI Hamed Directeur de Recherche Faculté de Sciences de Sfax, Institut de l'Olivier 3038 SFAX TUNISIE

VAN HERCK Jean-Claude Directeur de Recherche WARCOING Research and plant breeding Département, 1 rue de la Sucrerie, 7740 PECQ-WARCOING, BELGIQUE

VROH BI IRIE Doctorant Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Phytotechnie des régions intertropicales, Passage des Déportés 2, 5030 GEMBLOUX, BELGIQUE

WAN CHOW WAH YF Enseignante Faculty of Agriculture, University of Mauritius. Reduit. MAURITIUS, MAURICE

ZACCOMER Bruno Biologiste cellulaire Semences CARGILL, B P 17, BOISSAY, 28313 TOURY, FRANCE

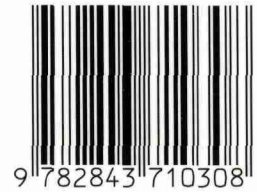
ZAHARIEVA Maria Chercheur INRA ENSAM Montpellier,,DGAP, 2 place Viala, 34060 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

ZID Ezzedine Professeur Université Tunis II. Laboratoire de Physiologie/Ecophysiologie Végétale. Campus universitaire, 1060 TUNIS, TUNISIE

Achevé d'imprimer sur les presses d'Offset Services
56, rue Lucien Dupuis - 28500 VERNOUILLET

Créée à l'initiative de l'**Université des Réseaux d'Expression Française**, la collection *Universités Francophones* s'insère, depuis 1988, dans le paysage éditorial international. L'UREF met ainsi à la disposition des étudiants et des chercheurs des ouvrages de haute qualité scientifique.

Rédigés par des équipes à caractère multilatéral, manuels, monographies et actes de colloques abordent des problématiques intéressant l'ensemble du monde francophone. En outre, ils s'adaptent, grâce à une politique de prix particulière, à ses différentes réalités économiques : autant de conditions contribuant à la reconnaissance et au succès de la collection.

280 FF
60 FF – UREF/Prix préférentiel : Afrique, Asie, Amérique du Sud, Haïti

ISBN 2 84371 030 8